



Review Article: Genetic Engineering in Cereals: Focusing on Agrobacterium Application

Noosheen Falahi^{1,2} , Armin Saed-Moucheshi³ ✉, Abbas Rezaizad³ & Mohammad Gerdakaneh³

¹ Iranian Company for Maize Development, Seed Laboratory, Kermanshah, Iran.

² Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.

³ Horticulture and Crop Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Kermanshah, Iran.

✉ Corresponding author. E-mail: saedmoocheshi@gmail.com

ABSTRACT

Improving the quality and performance of plant products has significant and beneficial implications for food security and sustainable agriculture. Accordingly, plant genetic modification is a key issue in agricultural research to achieve these goals. To date, conventional breeding methods and genetic engineering have developed plants with higher yield and performance, better seed quality, and higher resistance to pests and diseases. The process of gene transfer in genetic engineering refers to a series of genetic procedures through which a specific segment of DNA, carrying a new gene or a novel structure of genes, is artificially inserted into the genome of a living organism using laboratory techniques. In this genetic process, the recipient of the new gene is referred to as a transgenic organism. Two systems are employed in this process: direct and indirect gene transfer methods. Gene transfer via *Agrobacterium* is one of the successful methods for transferring genes in plants. This bacterium is regarded as nature's smallest genetic engineer. In the gene transfer technique to plants using *Agrobacterium*, the natural system of this bacterium is utilised to facilitate the transfer of the target gene. The application of this method by plant breeding researchers has led to beneficial genetic changes in various plant species. This technique offers numerous advantages over other gene transfer methods, including the stability of transgenic plants, simplicity, and cost-effectiveness. However, there are limitations to this technology, such as lower efficiency of transgene, limited effectiveness in monocotyledonous plants, and dependence on genotype and explant. To address these limitations, genetic engineers are striving to overcome the complex mechanisms and challenges associated with this method, aiming to provide effective solutions for the targeted insertion of DNA into appropriate plant genomic locations. Given the importance of gene transfer via *Agrobacterium* and the need to enhance the efficiency of this method, investigating the mechanisms of gene transfer with this bacterium is essential. A deeper understanding of *Agrobacterium* biology can facilitate the expansion of gene transfer applications through this system. Furthermore, advancements in this gene transfer method require manipulation and iterative testing throughout the biological process. Therefore, the upcoming review article offers comprehensive information on gene transfer methods, the process of plant transgenics via *Agrobacterium*, the types of plants that have been modified using this technique, as well as the associated challenges and issues. This article will be beneficial for individuals working on plant genome editing using *Agrobacterium* and the CRISPR/Cas9 technique.

Keywords: *Agrobacterium*, gene transfer, genetic engineering, transgenic plant, Ti plasmid.

Article Type: Review Article

Article history: Received: 02 Nov 2024, Revised: 05 Dec 2024, Accepted: 17 Feb 2025, Published online: 28 Mar 2025

Cite this article: Falahi, N., Saed-Moucheshi, A., Rezaizad, A. & Gerdakaneh, M. (2025). Review Article: Genetic Engineering in Cereals: Focusing on *Agrobacterium* Application. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 4(1), 132-164. DOI: [10.22126/cbb.2025.11721.1102](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11721.1102)



© The Author(s).



[10.22126/cbb.2025.11721.1102](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11721.1102)

Publisher: Razi University



بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات



شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

Homepage: <https://cbb.razi.ac.ir>

مقاله مروری: مهندسی ژنتیک در غلات با تاکید بر کاربرد آگروباکتریوم

نوشین فلاحی^۱، آرمین ساعدموچشی^۲، عباس رضائی زاده^۳ و محمد گردکانه^۳

^۱ شرکت توسعه ذرت ایران، آزمایشگاه بذر، کرمانشاه، ایران.

^۲ گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

^۳ مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

✉ نویسنده مسئول: saedmoocheshi@gmail.com

چکیده

بهبود در کیفیت و عملکرد محصولات گیاهی پیامدهای مفید و مهمی برای امنیت غذایی و کشاورزی پایدار دارد. اصلاح ژنتیکی گیاهان یک حوزه مهم در بخش تحقیقات کشاورزی، جهت تحقق این امر است. تاکنون از طریق روش‌های بن‌زادی مرسوم و مهندسی ژنتیک، گیاهانی با عملکرد بالاتر، کیفیت بهتر دانه و مقاوم در برابر آفات و بیماری‌ها تولید شده است. فرایند انتقال ژن در مهندسی ژنتیک به مجموعه‌ای از فرایندهای ژنتیکی اطلاق می‌گردد که طی آن قطعه معینی از DNA استخراج شده، که حامل ژن جدید یا ساختار جدیدی از ژن‌ها است را با استفاده از فنون آزمایشگاهی به‌طور مصنوعی وارد ژنوم یک موجود زنده می‌کنند. در این فرایند، دریافت-کننده ژن جدید را گونه‌ای تراریخته می‌نامند و از دو روش مستقیم یا روش غیرمستقیم برای انتقال ژن استفاده می‌شود. انتقال ژن توسط آگروباکتریوم یکی از روش‌های موفق مورد استفاده در گیاهان زراعی و باغی است. انتقال ژن توسط این باکتری جزئی از کوچکترین مهندسی‌های ژنتیک در طبیعت است. فن انتقال ژن با آگروباکتریوم، از سازوکار طبیعی این باکتری برای انتقال ژن هدف استفاده می‌کند. بکارگیری این روش از سوی پژوهشگران علوم به‌زادی موجب ایجاد تغییرات ژنتیکی مفیدی در گیاهان شده است و گونه‌های مختلفی از گیاهان با این روش اصلاح و بهبود یافته‌اند. این روش نسبت به سایر روش‌های انتقال ژن برتری‌های زیادی دارد که از جمله آن می‌توان به پایداری گیاه تراریخته، نبود پیچیدگی و همچنین مقرون به صرفه بودن آن اشاره کرد. از محدودیت‌های این فناوری هم می‌توان بازده پایین تراریختگی، کارایی اندک در گیاهان تک‌لپه و وابستگی به ژنوتیپ و ریزنمونه را نام برد. جهت برطرف کردن این محدودیت‌ها مهندسی ژنتیک در تلاشند که سازوکارهای پیچیده و مشکلات این روش را مرتفع کنند و راه‌حل مناسبی برای قرار دادن هدفمند DNA در مکان‌های ژنومی مناسب در گیاهان ارائه دهند. به دلیل اهمیت انتقال ژن با آگروباکتریوم و بهبود کارایی این روش، بررسی مکانیسم انتقال ژن با این باکتری ضروریست، چرا که درک فزاینده ما از زیست‌شناسی آگروباکتریوم می‌تواند به گسترش کاربرد انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم کمک کند. از سوی دیگر لازمه پیشرفت در این روش انتقال ژن، دستکاری و ایجاد تغییرات به همراه آزمون و خطا در مراحل این فرایند زیستی است. بر این اساس، مقاله مروری پیش‌رو اطلاعات جامعی را در مورد روش‌های انتقال ژن، چگونگی تراریختگی گیاهان توسط آگروباکتریوم، انواع گیاهانی که با این روش اصلاح شده‌اند و همچنین چالش‌ها و مشکلات مرتبط با این روش ارائه می‌کند. این مقاله برای افرادی که بر روی ویرایش ژنوم گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم و روش CRISPR/Cas9 کار می‌کنند مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، انتقال ژن، مهندسی ژنتیک، گیاه تراریخته، پلاسمید Ti.

نوع مقاله: مقاله مروری

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۲ **اصلاح:** ۱۴۰۳/۰۹/۱۵ **پذیرش:** ۱۴۰۳/۱۱/۲۹ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۰۱/۰۸

استناد: فلاحی، ن.، ساعدموچشی، آ.، رضائی‌زاده، ع. و گردکانه، م. (۱۴۰۴). مقاله مروری: مهندسی ژنتیک در غلات با تاکید بر کاربرد آگروباکتریوم. *بیوتکنولوژی و*

بیوشیمی غلات، ۱(۴)، ۱۳۲-۱۶۴. DOI: [10.22126/cbb.2025.11721.1102](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.11721.1102)

© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی



مقدمه

اصلاح ساختار ژنتیکی محصولات گیاهی کمک شایانی برای رفع بسیاری از چالش‌های پیش روی کشاورزان است. بدون شک روش‌های مرسوم و متعارف به‌نژادی گیاهی موجب بهبود و توسعه صفات خوب در گیاهان شده است، اما این روش‌ها در رفع نیازهای غذایی جمعیت جهانی که به شدت در حال افزایش است کارایی لازم را ندارند (Saed-Moucheshi et al., 2021; Zahedi et al., 2016). علاوه بر این، کاهش زمین‌های قابل کشت به دلیل شهرنشینی گسترده نیز یکی از معضلاتی است که بشر برای تامین غذای خود با آن روبه‌روست. یک راه‌کار عملی و کارآمد برای برطرف کردن این مشکلات، استفاده از مهندسی ژنتیک است. استفاده از ابزارهای نوین مولکولی و ژنتیکی سرعت پیشرفت در این زمینه را بیشتر کرده است و آینده امیدوارکننده‌تری را ترسیم می‌کند (Sohrabi and Saed-Moucheshi, 2023). با این حال، بسیار مهم است که این پیشرفت‌ها به شیوه‌های اخلاقی و در جهت رفع نیازها و رفاه کشاورزان، مصرف‌کنندگان و محیط زیست باشد. در فناوری انتقال ژن از DNA نو ترکیب برای تغییر ماده ژنتیکی گیاه و جایگزینی قسمت‌هایی از آن با ژن‌های مورد نظر که دارای ویژگی‌های مهم و مفید زراعی هستند استفاده می‌شود که این موضوع موجب تسریع بهبود ژنتیکی محصولات می‌شود (Saed-Moucheshi and Safari, 2023a; Sohrabi and Saed-Moucheshi, 2023).

گیاه تراریخته یک ابزار آزمایشی قدرتمند و مناسب برای همسانه‌سازی ژن و تحقیقات ژنومیک است. سازوکار تنظیم بیان ژن‌ها در گیاهان تراریخته (کاهش بیان، افزایش بیان و یا خاموشی ژن‌ها) موجب بهبود عملکرد در این گیاهان می‌شود (Saed-Moucheshi and Safari, 2023b). تولید گیاهان تراریخته چند مرحله مهم دارد که شامل شناسایی ژن (های) بیان‌کننده صفت مورد نظر، جداسازی یا سنتز ژن مورد نظر، انتخاب عناصر تنظیم‌کننده (راه‌انداز^۱، تقویت‌کننده‌ها^۲ و پایان‌دهنده‌ها^۳)، انتخاب یک ناقل مناسب، انتخاب نشانگر مناسب، همسانه‌سازی ژن در ناقل، سیستم کشت بافت کارآمد، روش‌های بیوشیمیایی برای تشخیص بیان ژن در گیاهان تراریخته است (Saed-Moucheshi and Mozafari, 2022). محصولات اصلاح شده ژنتیکی در سال ۲۰۱۹ سهم اقتصادی بزرگی در جهان داشته است به‌طوری که حدود ۱۹۰ میلیون هکتار از این محصولات در آن سال کشت شده‌اند (ISAAA, 2020).

روش‌های انتقال ژن به دو دسته تقسیم می‌شوند ۱- انتقال مستقیم: در این شیوه جهت انتقال مواد ژنتیکی از نیروهای خارجی برای رساندن ژن‌های هدف به سلول‌های گیاهی استفاده می‌شود (الکتروپوراسیون^۴، میکرو تزریق^۵، تفنگ ژنی، فیبر سیلیکون^۶ کرباید، لیپوزیم، لوله گرده) ۲- انتقال غیرمستقیم: در این روش از ارگانیسم‌هایی

¹ Promotor

² Enhancer

³ Terminator

⁴ Electroporation

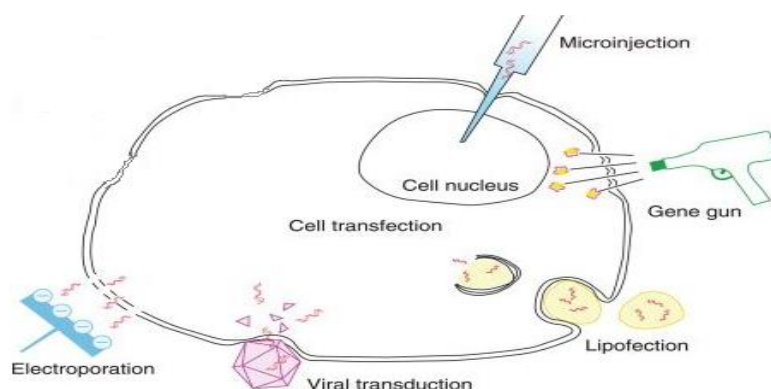
⁵ Microinjection

⁶ Fiber Selection

انتقال ژن توسط آگروباکتریوم و عوامل موثر بر کارایی و سازوکار عمل این باکتری ارائه می‌دهیم.

مانند باکتری آگروباکتریوم و ویروس به عنوان ناقل استفاده می‌گردد (شکل ۱). در میان این روش‌ها، انتقال از طریق آگروباکتریوم و تفنگ ژنی مرسوم‌تر است (Busov et al., 2005).

در این مقاله ما به معرفی روش‌های متداول انتقال ژن در گیاه می‌پردازیم. همچنین اطلاعات جامع و کاملی از روش



شکل ۱: انواع روش‌های انتقال ژن در گیاهان (برگرفته از سایت فارس تراوا:

<https://persiantarava.me/?p=1593>)

Figure 1. Different methods for gene transfer used in plants (adopted from <https://persiantarava.me/?p=1593>)

مولکول‌های زیستی از طریق دیواره سلولی چند لایه سخت به سلول‌های گیاهی ۲- باززایی گیاهان تراریخته از یک ریزنمونه کشت‌شده در شرایط آزمایشگاهی، از طریق اندام‌زایی de novo یا جنین‌زایی سوماتیکی (Ramkumar et al., 2020).

روش‌های غیر مستقیم انتقال ژن

تفنگ ژنی

روش‌های انتقال ژن

روش‌های متعددی جهت انتقال ژن وجود دارد که می‌توانند به طور پایدار ژن‌های جدید را به ژنوم هسته‌ای گونه‌های مختلف گیاهی وارد کنند. با وجود چندین دهه پیشرفت فناوری، تغییر ژنتیکی و باززایی کارآمد در گیاهان همچنان یک چالش برای بسیاری از گونه‌ها است. تغییر ژنتیکی گیاه به‌طور عمده به دو مرحله تقسیم می‌شود: ۱- انتقال ژن مورد نظر و چگونگی ورود

برنج (Begemann *et al.*, 2017) و سویا (Bonawitz *et al.*, 2019) اصلاح شده‌اند (جدول ۱).

الکتروپوریشن

این فن انتقال ژن یک روش الکتریکی است که از تکانه-های کوتاه برای ایجاد منافذ گذرا در غشای پلاسمایی سلولهای هدف استفاده می‌کند و نفوذپذیری غشای سلول میزبان را افزایش می‌دهد. در این روش سلول هدف و DNA مورد نظر در کنار هم قرار می‌گیرند سپس با استفاده از جریان الکتریکی منافذی در پروتوپلاست ایجاد می‌شود و DNA از طریق این منافذ به سلول راه می‌یابد. به‌طوری که بعد از ایجاد تکانه‌های الکتریکی مولکول‌های آب به لیپیدهای دو لایه سلول نفوذ کرده و یک منفذ آبی ایجاد می‌کنند. در ادامه سر قطبی لیپیدها به سمت آب جهت‌گیری کرده و منافذ آبدوست را ایجاد می‌نمایند و امکان انتقال غشایی ملکول‌های نفوذ ناپذیر را فراهم می‌کنند، بنابراین DNA به سلول گیرنده وارد می‌شود (Kotnik *et al.*, 2019).

در نهایت تحت یک تکانه الکتریکی بهینه، این منافذ می‌توانند بار دیگر بسته شوند و سلول‌ها را به حالت اولیه خود بازگرداند (شکل ۲b). در مقایسه با آگروباکتریوم و تفنگ ژنی این روش مزایایی مانند کاربرد سریع، هزینه کم و نرخ تبدیل بسیار پایدار دارد. از معایب الکتروپوریشن این است که این روش قادر نیست منافذ مناسب در غشاء سلول‌های گیاهی با دیواره‌های سلولی ضخیم ایجاد کند و از طرف دیگر در تعداد محدودی از گونه‌های گیرنده

تغییر ژنتیکی به واسطه بمباران ذرات که با نام تفنگ ژنی نیز شناخته می‌شود یک روش فیزیکی برای وارد کردن DNA به‌طور مستقیم به ژنوم گیاه است. در این روش محدودیتی در اندام گیرنده ژن وجود ندارد به‌طوری که امکان شلیک به همه اندام‌ها مانند سلول‌ها، کالوس‌ها، جنین‌های نابالغ و غیره وجود دارد و تمامی اندام‌ها می‌توانند به عنوان سلول هدف در نظر گرفته شوند. در این روش، ژن هدف با ذرات طلا یا تنگستن پوشانده می‌شود و توسط گاز هلیوم با فشار بالا به سمت سلول هدف شلیک می‌شود. این ذرات با سرعت بالایی که دارند شتاب کافی برای سوراخ کردن سلول‌های گیرنده را دارند. ژن هدف پس از ورود به سلول با کروموزوم گیاه ادغام می‌شود و تراریختگی در گیاه را موجب می‌شود (Anami *et al.*, 2020) (شکل ۲a).

بعد از انتقال ژن توسط آگروباکتریوم این روش کارآمدترین روش انتقال ژن است و با موفقیت در بسیاری از گونه‌های گیاهی اعمال شده است. این روش دارای کاستی‌هایی مانند نرخ تبدیل ژنتیکی کم و هزینه بالا است. از طرفی در این روش تنها می‌توان قطعات DNA کوچک‌تر از ۱۰ کیلوبایت را منتقل کرد، زیرا قطعات بزرگ‌تر به راحتی در طول پرتاب شکسته می‌شوند و همچنین هنگام استفاده از قطعات بزرگ اتصال مناسب بین ژن هدف و ذرات طلا و تنگستن اتفاق نمی‌افتد و ممکن است در هنگام شلیک DNA جدا شود (Anami *et al.*, 2020). تاکنون با روش تفنگ ژنی گیاهانی مانند

کارآمد است. علاوه بر این، تکانه‌های میدان الکتریکی قوی می‌توانند ژن برهنه را از بین ببرند و در نتیجه منجر به ترجمه نادرست محصول نهایی شود (Lv et al., 2020).

انتقال ژن به وسیله لیپوزوم

انتقال ژن توسط لیپوزوم‌ها یکی از روش‌های نوین و اثرگذار برای انتقال مواد ژنتیکی به داخل سلول‌ها است. لیپوزوم‌ها شامل وزیکول‌های کروی شکل هستند که از یک یا چند غشای دولایه فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. آن‌ها قادرند مولکول‌های DNA یا RNA را درون خود جای دهند و این مولکول‌ها را به سلول‌های هدف منتقل کنند. این فرایند به دلیل تشابه ساختاری لیپوزوم‌ها با غشای سلولی، انجام می‌گیرد، و به این دلیل لیپوزوم‌ها می‌توانند به راحتی با سلول‌ها ادغام شوند. اندازه لیپوزیم‌ها از ۳۰ نانومتر تا چند میکرومتر متغیر است و فسفولیپیدهای آن از کلسترول طبیعی تشکیل شده‌اند. با توجه به اندازه و تعداد غشاهای دولایه، لیپوزوم‌ها را می‌توان به دو نوع وزیکول‌های چند لایه و تک لایه تقسیم کرد. وزیکول‌های تک لایه شامل وزیکول‌های تک لایه بزرگ و وزیکول‌های تک لایه کوچک هستند (Akbarzadeh et al., 2016). سازوکار این روش به گونه ای است که می‌توان DNA هدف را از طریق همجوشی غشای پلاسمایی یا اندوسیتوز پروتوپلاست به پروتوپلاست‌ها وارد کند (شکل ۲C) به طوری که لیپوزوم با بار مثبت به سمت DNA با بار منفی و غشای سلولی جذب می‌شود و چسبندگی لیپوزوم به سطح پروتوپلاست را امکان‌پذیر می‌سازد، در ادامه لیپوزوم و پروتوپلاست در

محل‌های اتصال آن‌ها ادغام می‌شود و در نهایت لیپوزوم را در سلول‌های هدف آزاد می‌کند. انتقال ژن توسط لیپوزوم‌ها در درمان بیماری‌های ژنتیکی، توسعه واکسن‌ها، و تحقیقات پایه‌ای در زیست‌شناسی مولکولی و سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند. این فناوری به دلیل قابلیت کنترل بالا و کاهش عوارض جانبی نسبت به روش‌های دیگر انتقال ژن، اهمیت بسیاری دارد. از مزیت‌های انتقال ژن به وسیله لیپوزوم‌ها می‌توان به تهیه و بسته‌بندی آسان ژن‌ها برای ورود به درون سلول، سمیت کم و قابلیت استفاده در گونه‌های گیاهی متعدد، حفاظت اسید نوکلئیک‌ها از فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی و بازده بالا در انتقال DNA به درون پروتوپلاست سلول‌های میزبان اشاره کرد. به دلیل اینکه در این روش ژن‌ها در ژنوم وارد نمی‌شوند و بیان ژن در آن پایین است، کاربرد این سامانه زیستی مستلزم بررسی‌های بیشتری است (van Wordragen et al., 1997).

انتقال ژن توسط فیبرهای سیلیکون کرباید

فیبرهای سیلیکون کرباید ماهیت بسیار سخت با لبه‌های برنده و تیز به قطر ۰/۵ و طول ۱۰-۸۰ میکرومتر دارند. این فیبرهای سخت به راحتی شکافته می‌شوند و لبه‌های برشی تیز آن‌ها ایجاد می‌شود. این لبه‌های تیز دیواره سلولی و در نهایت هسته سلول را سوراخ می‌کند. فیبرهای سیلیکون کرباید به دلیل بار منفی نمی‌توانند به DNA متصل شوند، لذا در این روش سلول‌های هدف یا کالوس‌های جنینی و DNA مورد نظر را در تیوب‌های حاوی این فیبرها قرار می‌دهند. در نهایت با طریق سرو ته

پس از پایان فرایند انتقال ژن، کشت داده شده و به گیاهان تراریخته تبدیل می‌شوند (Lorz *et al.*, 1981) (شکل ۲۵). این روش به طور گسترده در سلول‌های حیوانی استفاده شده است، اما در گیاهان به دلیل ضخیم بودن دیواره سلولی گیاهان، ورود پیپت میکروکاپیلار برای نفوذ مؤثر به دیواره سلولی و تزریق DNA خارجی به سلول با مشکل مواجه می‌شود. البته می‌توان دیواره سلولی گیاه را توسط آنزیم هیدرولاز تجزیه کرد (Crossway *et al.*, 1986).

انتقال ژن توسط لوله گرده

در فرآیند گرده‌افشانی در گیاهان عالی، گرده پس از جوانه زدن بر روی سطح کلاله، لوله گرده را تشکیل می‌دهد تا با عبور از آن تخمک را بارور کند. انتقال ژن به وسیله لوله گرده مستلزم حذف کلاله از گیاه گیرنده بلافاصله پس از گرده افشانی است. پس از حذف کلاله محلول DNA مورد نظر به صورت قطره‌ای به گیاه منتقل می‌شود و DNA مورد نظر توسط رشد لوله گرده به تخمدان گیاه گیرنده منتقل می‌شود و در نتیجه DNA در مرحله جنین‌زایی با ژنوم گیاه گیرنده ادغام شده و در نهایت دانه تشکیل شده تراریخته را به وجود می‌آورد (Ali *et al.*, 2015) (شکل ۲۶). انتقال ژن توسط روش مسیر لوله گرده، بر خلاف تفنگ ژنی، الکتروپوریشن و آگروباکتریوم، شامل حذف پروتوپلاست، کشت سلولی یا فرآیندهای بازسازی گیاه نمی‌شود و ساده‌تر است. همچنین این روش اغلب از معایب محدودیت ژنوتیپ و

کردن تیوب فیبرهای سیلیکون کرباید می‌تواند منافذ سوزنی ماندی را روی غشای سلول ایجاد کنند که از طریق آن DNA مورد نظر می‌تواند وارد غشای سلول‌های هدف شود (Mizuno *et al.*, 2004) (شکل ۲۷). انتقال ژن با این روش ساده، سریع است و به ابزار یا تجهیزات خاصی نیاز ندارد. با این حال، این روش به دلیل آسیب به سلول در طول روند انتقال ژن و پایین بودن ظرفیت باززایی سلول‌ها، بازده انتقال ژن نسبتاً پایینی دارد لذا به همین دلیل و نیز به دلیل سرطان‌زایی الباف کاربرد سیلیکون تمامی مراحل باید با احتیاط زیادی انجام پذیرد (Saeed *et al.*, 2013).

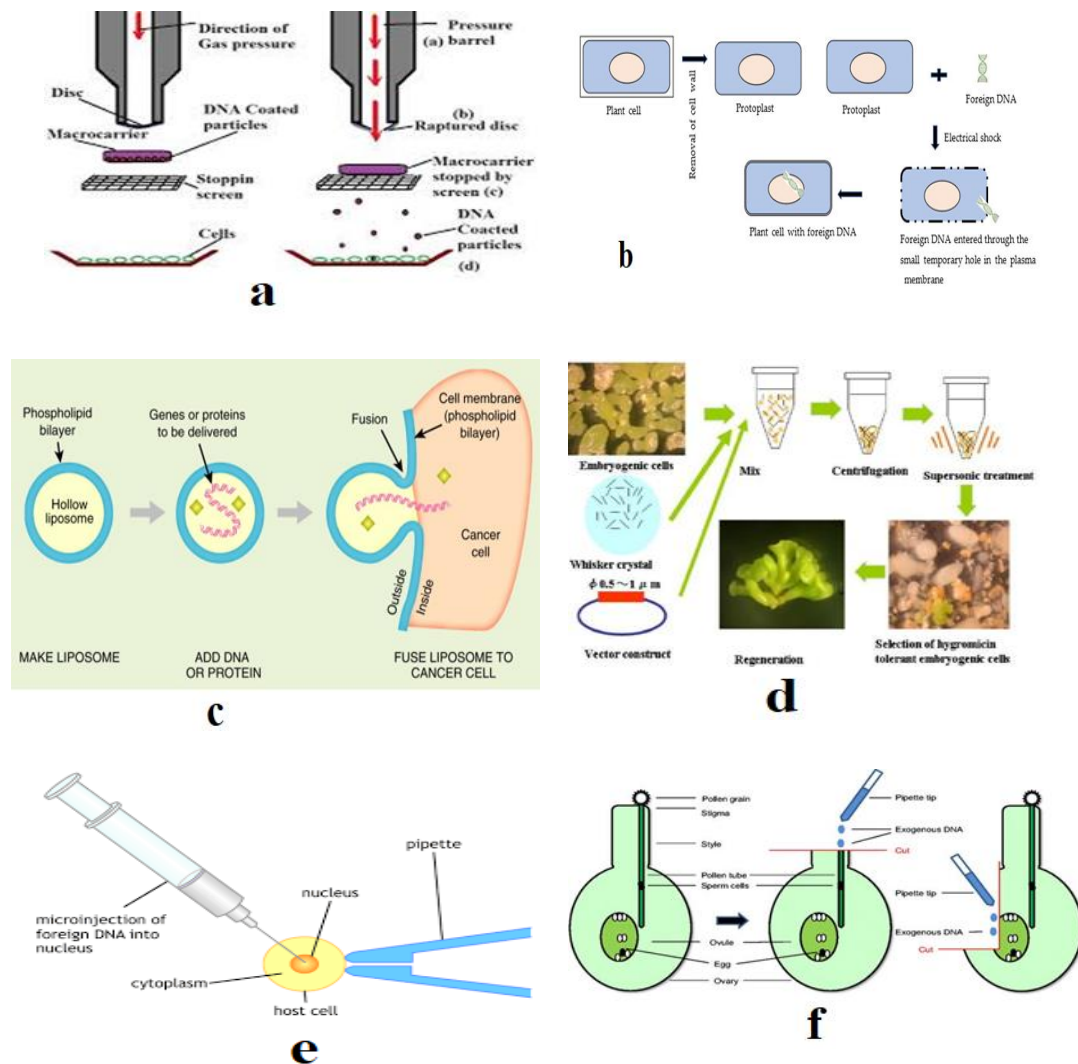
انتقال ژن به روش ریز تزریقی (میکرواینجکشن Microinjection)

تبدیل ژنتیکی گیاه با واسطه میکرواینجکشن تکنیکی است که شامل تزریق DNA به یک هسته گیاهی یا سیتوپلاسم با استفاده از تزریق به وسیله پیپت میکروکاپیلار شیشه‌ای است. در این روش، سلول هدف زیر میکروسکوپ ثابت می‌شود. بقیه مراحل توسط دو میکرومانیپلاتور انجام می‌شود که یکی از آن‌ها پیپت نگهدارنده است و سلول را ثابت می‌کند و دیگری یک لوله بسیار نازک حاوی مقدار کمی DNA برای نفوذ به غشای سلولی یا غشای هسته‌ای است. DNA از طریق تزریق و با استفاده از پیپت میکروکاپیلار شیشه‌ای با اندازه ۰/۵ تا ۱۰ متر در نوک) به سیتوپلاسم هسته سلول‌های گیاهی یا پروتوپلاست‌ها منتقل می‌شود و سلول‌های تراریخته

گسترده مورد استفاده قرار نگرفته است (Kausch *et al.*, 2019).

تنوع ژنتیکی مانند جهش و متیلاسیون جلوگیری می‌کند.

با این حال، با توجه به محدودیت های دوره گلدهی طبیعی، انتقال ژن با استفاده از این روش تنها در چند گیاه تک لپه‌ای یا دو لپه موفق بوده است و به طور



شکل ۲- a: انتقال ژن توسط تفنگ ژنی. b: انتقال ژن به روش الکتروپوریشن. c: انتقال ژن توسط لیپوزوم. d: انتقال ژن توسط فیبرهای سیلیکون کرباید. e: انتقال ژن به روش میکرواینجکشن. f: انتقال ژن توسط لوله گرده در گیاهان (برگرفته از سایت آنلاین با آدرس: <https://www.microscopemaster.com/transgenic-plants.html>).

Figure 2- a: Gene transfer using the Gene gun method. b: Gene transfer using the electroporation method. c: Using liposomes for gene transfer. d: Using silicon carbide for gene transfer. e: Gene transfer using the microinjection method. f: Gene transfer using the pollen tube of plants (adopted from the microscope master online site with address: <https://www.microscopemaster.com/transgenic-plants.html>).

جدول ۱- غلات تراریخت شده توسط روش‌های مستقیم انتقال ژن (Wenbin و همکاران، ۲۰۲۳)

Table 1. Transgened cereal using gene transfer direct methods (Wenbin and et al., 2023)

گونه	ریزنمونه	ژن هدف	روش انتقال ژن	تراریختگی (%)
Species	Sample	Aimed gene	Transfer method	Transgenecity (%)
Barley	Seeds	OsWRKY70, OsWRKY53, and gus	Particle bombardment	-
Maize	Calli	VHb	Particle bombardment	-
Sorghum	Immature embryos	NptII	Particle bombardment	46.6%
Rice	Calli	Cpf1, crRNA, and repair templates	Particle bombardment	8%
Wheat	Immature embryo	gfp and bar	Particle bombardment	-
Wheat	Callus	a	Particle bombardment	-
Wheat	Immature embryos	bar and uidA	Electroporation	0.4%
Maize	Embryogenic callus	gus and bar	Silicon carbide whisker	-
Barley	Protoplasts	Act1, gus, and nos	Microinjection	-
Maize	Pollen	GFP	Pollen tube pathway	0.86%

انتقال ژن به روش غیر مستقیم توسط آگروباکتریوم

در برخی از کشورهای توسعه یافته، درصد بالایی از سطح زیر کشت محصولات مهم اقتصادی مانند ذرت، سویا، پنبه، کلزا، سیب زمینی و گوجه فرنگی تراریخته هستند. تعداد زیادی از این گونه‌های تراریخته به کمک آگروباکتریوم تولید شده‌اند یا به زودی تولید خواهند شد (Amro et al., 2023).

مکانیسم انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم

آگروباکتریوم یک باکتری بیماری‌زای گرم منفی رایج است که در همه جای خاک وجود دارد. جنس آگروباکتریوم به تعدادی گونه تقسیم می‌شود. این تقسیم‌بندی به‌طور عمده بر اساس نشانه‌های حاصل از بیماری و طیف میزبان می‌باشد. *A. radiobacter* یک گونه غیر بیماری‌زا است، *A. tumefaciens* عامل بیماری گال تاجی، *A.*

rhizogenes عامل بیماری ریشه مویی و *A. rubi* عامل بیماری گال نیشکر می‌باشد. به تازگی یک گونه جدید به نام *A. vitis* که عامل ایجاد گال در انگور و تعداد دیگری گیاه است، شناسایی شده است. این باکتری به قسمت‌های زخمی اکثر گیاهان دو لپه‌ای حمله کرده و آن‌ها را آلوده می‌کند و موجب ایجاد تومورهای گال ماندنی می‌شود (Kluepfel et al., 2014). انواع مختلفی از وکتورهای پلاسمیدی وجود دارد. انتخاب پلاسمید مناسب به هدف آزمایش و گونه‌های گیاهی بستگی دارد. پلاسمید *Ti* موجود در آگروباکتریوم تومه- فاشینس در مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است چراکه در مهندسی ژنتیک جهت انتقال ژن از پلاسمید *Ti* به عنوان منبع محرک بسیار فعال و مهم در گیاهان استفاده می‌شود. پلاسمید *Ti* (القا کننده تومور) مشتق شده از سویه *Agrobacterium tumefaciens* به طور طبیعی قادر به

انتقال DNA به سلول‌های گیاهی است. اساس این کار به گونه‌ایست که یک منطقه به نام T-DNA از یک پلاسمید بزرگ القا کننده تومور (Ti) در آگروباکتریوم با ژنوم گیاه ادغام می‌شود. اندازه پلاسمید Ti ۱۶۰ تا ۲۴۰ کیلو باز است. T-DNA یا DNA منتقل شونده، در منطقه T پلاسمید Ti قرار دارد و اندازه ای حدود ۳۰-۱۵ کیلوباز دارد (Amro et al., 2023).

T-DNA در ناحیه con کد می‌شود و انتقال پلاسمید Ti بین باکتری‌ها را تنظیم می‌کند. T-DNA شامل سه مجموعه ژن است که دو دسته از آن‌ها انکوژن (ژن‌های تومورزا) و میتوژن (اکسین و سیتوکینین) نام دارند و باعث رشد و تقسیم نامحدود بافت‌های زخمی گیاه برای تشکیل تومورهای گال‌زا می‌شوند. مجموعه سوم اوپین است (اسیدهای آمینه کمیاب) که جهت سنتز ژن‌های تولید کننده اکتوپین، نوپالین، آگروپین، سوکسیناموپین مورد استفاده قرار می‌گیرند. T-DNA توسط دو ناحیه پایانی تقریباً ۲۵ جفت بازی، به نام مرز چپ (LB) و مرز راست (RB) احاطه شده است. این دو ناحیه در فرایند جدا شدن و ادغام T-DNA مشارکت دارند. فرایند انتقال T-DNA از پلاسمید Ti و ارسال آن از باکتری به سلول گیاهی حاصل فعالیت ژن‌های بیماری‌زا (vir genes) می‌باشد. عموماً ژن‌های vir رمز شونده توسط پلاسمید Ti به عنوان مهم‌ترین عامل انتقال ژن مورد توجه هستند، که توسط پلاسمید Ti حمل می‌شوند. اندازه ژن‌های vir حدود ۳۶ کیلوباز است. در واقع در ناحیه vir پروتئین-هایی کد می‌شود که موجب پردازش و ادغام T-DNA در

ژنوم هسته گیاه می‌شود (Amro et al., 2023). VirA و VirG دو پروتئین مهم در پروسه انتقال ژن هستند. زمانی که در گیاه زخمی ایجاد می‌شود یکسری ترکیبات فنلی خاص ترشح می‌شود که این ترکیبات القا کننده VirA می‌باشند. VirA با هماهنگی یک مولکول مونوساکاریدی به نام ChvE و در حضور مقدار مناسبی فنل و مولکول قند، خود و پروتئین VirG را فسفریله می‌کند. VirG در حالت غیر فسفریله غیرفعال است، اما در حالت فسفریله، این پروتئین به فعال شدن یا افزایش سطح رونویسی ژن‌های vir کمک می‌کند. همچنین VirD4 به همراه ۱۱ پروتئین VirB، یک سیستم ترشحی که برای انتقال T-DNA و چند پروتئین دیگر Vir شامل VirE2 و VirF لازم است، می‌سازند. شاید VirD4 به عنوان یک پیوند دهنده عمل نماید تا برهمکنش مجموعه T-DNA/VirD2 با سیستم ترشحی رمز شده VirB را افزایش دهد. بیشتر پروتئین‌های VirB یا کانال غشایی می‌سازند یا به عنوان ATPase، انرژی لازم برای تشکیل کانال یا فرآیندهای خروج مولکول‌ها را فراهم می‌کنند. چندین پروتئین شامل VirB2، VirB5 و احتمالاً VirB7 در ساختن T-pilus شرکت دارند. VirB2 اصلی‌ترین پروتئین پیلوس است. پیلوس در انتقال T-DNA نقش دارد و نحوه عملکرد آن هنوز نامشخص است. ولی شاید به عنوان کانالی برای عبور T-DNA و پروتئین‌های Vir عمل نماید یا ممکن است فقط به عنوان قلبی برای برقراری ارتباط با سلول گیاهی پذیرنده عمل

کند و باکتری و گیاه را در نزدیکی هم قرار داده تا انتقال مولکولی مؤثری صورت گیرد. تحقیقات نشان داده حداکثر القا ژن‌های vir در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه است. تعیین درجه حرارت مناسب در کشت همزمان آگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی یکی از عوامل مهم در موفقیت فرایند انتقال ژن می باشد (Shreni et al., 2022).

پروتئین‌های VirD2 و VirE2 نقشی حیاتی و احتمالاً کامل‌کننده در انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم بازی می‌کنند. این دو پروتئین به همراه رشته T، مجموعه‌ای به نام مجموعه T تشکیل می‌دهند که شکل منتقل شونده T-DNA می‌باشد. به دلیل اتصال VirD2 به انتهای ۵' رشته T، این پروتئین ممکن است به عنوان راهنمای این رشته برای عبور از کانال انتقالی عمل نماید. VirD2 همچنین احتمال دارد در مراحل دیگری از فرایند انتقال ژن، در داخل سلول گیاهی، نقش داشته باشد. VirE2 یک پروتئین متصل‌شوند به توالی‌های غیر اختصاصی DNA تک رشته می‌باشد و وقتی به DNA تک رشته متصل شود (احتمالاً در سلول گیاهی)، می‌تواند DNA با ساختار پیچیده را تبدیل به حالتی شبیه به سیم پیچیده تلفن نماید. این شکل T-DNA، به هدایت آن با حرکات مارپیچی کمک نماید. ممکن است یک وظیفه دیگر VirE2، تشکیل سوراخی در غشاء سیتوپلاسمی برای تسهیل عبور رشته T باشد. همچنین VirE2 احتمالاً رشته T را از تجزیه نوکلئوتیدی در سیتوپلاسم و هسته گیاه محافظت می‌کند. همچنین ژن‌های کروموزومی chvA، chvB، att، pscA، chvD و chvI نیز وجود

دارند که بیشتر پروتئین‌های متصل به غشاء را رمزگذاری می‌کنند و این پروتئین‌ها مسئول حرکت و انتقال باکتری‌ها به محل زخم گیاه هستند و به اتصال باکتری به سلول و تشکیل توده‌ها کمک می‌کنند. جهت انتقال ژنتیکی، ژن مورد نظر بین نواحی LB و RB قرار می‌گیرد و جایگزین ژن‌های انکوژن و سنتز کننده اوپین می‌شود و منجر به انتقال و ادغام ژن مورد نظر به ژنوم گیاه هدف می‌شود. روشن شدن توالی کامل آگروباکتریوم، مطمئناً بستر مناسبی برای کشف ژن‌های دیگری که در انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم درگیر هستند، فراهم می‌کند (Shreni et al., 2022).

بازده انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم بسته به گونه گیاهی و سیستم ناقل مورد استفاده به طور گسترده‌ای متفاوت است. انتقال ژن در این روش شامل انتقال DNA به ژنوم گیاه در مکان‌های تصادفی است. این می‌تواند هدف قرار دادن ژن‌های خاص برای اصلاح را دشوار کند و ممکن است منجر به تغییر ژن‌های ناخواسته شود. ادغام تصادفی همچنین منجر به بیان متغیر ژن در گیاهان تراریخته می‌شود (Gouka et al., 1999).

گیاهانی که از طریق آگروباکتریوم تراریخته و تجاری سازی شده‌اند

بسیاری از گیاهان به وسیله آگروباکتریوم مهندسی و تجاری‌سازی شده‌اند و جدول ۱ و جدول ۲ مثال‌هایی از مهمترین محصولات زراعی که در کشورهای مختلف اصلاح و تایید شده‌اند. جدول ۲ غلاتی را نشان می‌دهد

که توسط روش آگروباکتریوم به صورت تراریخته درآمده و تجاری سازی شده اند. جدول ۳ نیز نشان دهنده مثال هایی از سایر گیاهان زراعی غیرغله است که تراریختگی آنها تایید شده و در حال حاضر فعال هستند.

جدول ۲- گیاهان تک لپه ای که از طریق آگروباکتریوم تراریخته شده اند (Wenbin و همکاران، ۲۰۲۳)

Table 2. Transgenic monocotyledon Plants by agrobacterium (Wenbin and *et al.*, 2023)

گونه Species	ریزنمونه Sample	ژنوتیپ Genotype	ژن هدف Aimes gene	سویه آگروباکتریوم Agrobacterium strain	پلازمید Plasmid	نشانگر انتخابی Selective marker	تراریختگی (%) Transgenic percent
Wheat	Immature Embryos	Bobwhite SH98 26	sGfp	AGL1	pGH215	Hpt	Up to 15%
	Immature Embryos	Fielder	gus	AGL1	pGolden-GreenGate	Hpt	Up to 25%
	Immature Embryos	CB037, Fielder, Jimai 22 Kenong 199, Shi 4185	gus	C58C1	pRK2013	Bar	2.8–53%
	Mature and immature embryos	DBW 88, DBW 90, DBW 93, DPW 621-50, HD 3086 and WH 1105	gus	EHA105	pCAMBIA3301	Bar	9.8–14.9%
Rice	Immature Embryos	a broad range of species	gfp	LAB4404 and EHA105	UG1-1	Hpt	–
	Embryogenic Calli	Sambha mahsuri	AmSOD1	LAB4404 and EHA105	pSFSOD1	Hpt	–
Maize	Immature Embryos	ND101 and ND88	DsRed	EHA105		Bar	Up to 17.6%
	Immature Embryos	HC69 and PH2RT	YFP	LBA4404THY	pVIR	PAT/PMI	–
Barley	Immature Embryos	Scarlett and Golden Promise	HvCKX2	AGL1	pMCG161	Bar	3.47%
	Immature Embryos	Golden Promise	gus	AGL1	pBRAC7	Hpt	25%

جدول ۳- گیاهان دولپه ای که از طریق آگروباکتریوم تراریخته شده اند

Table 3. Transgenic dicotyledon plants by agrobacterium

منبع References	تراریختگی (%) Transgenic percent	نشانگر انتخابی Selective marker	پلازمید Plasmid	سویه آگروباکتریوم Agrobacterium strain	ژن هدف Aimes gene	ژنوتیپ Genotype	ریزنمونه Sample	گونه Species
Mohanta et al., 2019	1.9%	Npt II	pBI121	GV3101, LBA4404, EHA105, and AGL1	Gus	E. urophylla _ E. grandis clone DH32-29	Leaves	Eucalyptus
Lu et al., 2020	60.7%	Geneticin	pBI121	EHA105	Gus	52053	Callus	Liriodendron Hybrid
Carroll et al., 2011	-	Bar	myc-pBA	EHA101	GsWRKY20	Jack	Cotyledonary Node	Soybean
1 Carroll et al., 2020	91.07%	Hpt	pCambia1381	GV3101	Gus	(Franch.) Nannf.	Stems	Codonopsis pilosula
Wright et al., 2005	Up to 8.01%	AADA	pCambia2300	-	GFP and RUBY	Gossypium hirsutum, Gossypium barbadense and Gossypium arboreum	Shoot apical meristem	Cotton
Schim et al., 2014	3.6%	-	PS1aG-3	EHA105	Gus	Camellia sinensis	Callus	Tea
119	83%	Hpt	pCambia1301	LBA4404	gus/gfp	ICPL 85063	Cotyledons	Pigeon pea
Shi et al., 2017	-	-	35S:GUS vector	GV3101	Gus	Populus Alba_Populus glandulosa Uyeki 84K	Leaves	Poplar
Gil-Humane et al., 2017	greater than 50%	Hygromycin B	pCAMBIA1301	GV3101	Gus		Callus	

عوامل مؤثر بر انتقال به وسیله آگروباکتریوم

عوامل مختلفی بر فعالیت و میزان انتقال ژن آگروباکتریوم تأثیر می‌گذارند که به عنوان مثال می‌توان از آن‌ها به گونه گیاه، ژنوتیپ گیاه، ریزنمونه مورد استفاده، pH محیط کشت، محیط همکشتی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، دما، آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین سویه‌های آگروباکتریوم اشاره

کرد. اصلی‌ترین عامل دخیل در این روش، گونه‌های گیاهی یا ارقام مورد استفاده هستند چرا که برخی از گونه‌های گیاهی به‌طور کامل به آگروباکتریوم مقاوم هستند یا بازده انتقال بسیار پایینی دارند. حتی ارقام یک گونه پاسخ‌های متفاوتی به آلودگی دارند (Sutradhar et al., 2023). به عنوان مثال، لاین DH12075 براسیکا مستعد تغییر ژنتیکی توسط این باکتری است، در حالی

که لاین DH4079 کاملاً نسبت به آگروباکتریوم مقاوم است (Calabuig Serna *et al.*, 2023). نوع ریزنمونه استفاده شده نیز برای نرخ تراریختگی بسیار مهم است و نیاز به بهینه سازی دارد. ریزنمونه مورد استفاده در انتقال ژن از گیاه به گیاه و حتی برای سویه های آگروباکتریوم نیز متفاوت است. دما نیز نقش مهمی در انتقال T-DNA در زمان همکشتی دارد (Fallahi *et al.*, 2024). مشخص شده است که محدوده دمایی بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد دمای مناسب برای بالاترین میزان انتقال T-DNA در برگ های تنباکو است. با این حال، دما در سیستم های انتقال ژن تک لپه ای و دولپه ای متفاوت است (Liu *et al.*, 2023).

مهندسی آگروباکتریوم برای انتقال ژن

در این روش پس از تلقیح ریزنمونه با باکتری، ریزنمونه ها باززا و به یک گیاه کامل تبدیل می شوند. سپس به گیاهان اجازه داده می شود تا چرخه زندگی خود را کامل کرده و دانه تولید کنند. در نهایت با استفاده از یک نشانگر انتخابی، گیاهان تراریخته از غیر تراریخت تمیز داده می شوند. این روش ساده و راحت است و به تخصص کمتری نیاز دارد (Ye *et al.*, 2023). انتقال ژن توسط آگروباکتریوم بر روی ریزنمونه های مختلف برای قرار دادن ژن های خارجی در ژنوم سلول گیاه میزبان انجام گرفته است (Smith, 2013).

رایج ترین ریزنمونه های مورد استفاده ریزنمونه برگ و مریستم ساقه هستند. هورش و همکاران (Horsch *et al.*)

(1985, *al.*) پژوهشگران پیشگام در سیستم تلقیح ریزنمونه برگ بودند و امکان وارد کردن ژن های خارجی به دو لپه های مختلف مانند تنباکو، سیب زمینی و گوجه فرنگی را از طریق ریزنمونه برگ فراهم کردند. محدودیت هایی در استفاده از ریزنمونه های برگ وجود دارد. به عنوان مثال، تعداد کمی از گونه های گیاهی را می توان از طریق ریزنمونه برگ باززا و تکثیر کرد و تغییرات سوماکلونال می تواند در طول باززایی باعث ایجاد شاخساره نابجا شود. بعدها استفاده از مریستم ساقه به عنوان ریزنمونه، کشت بافت خسته کننده و وقت بر، محدودیت های تنوع سوماکلونال و بازده بازسازی کم را از بین برد (Niazian *et al.*, 2017). سایر ریزنمونه هایی که برای تلقیح آگروباکتریوم ها استفاده شده اند شامل گیاهچه، هیپوکتیل، لپه ها، کالوس ها، مریستم ریشه و جنین های سوماتیک هستند. در ابتدا، انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به دو لپه ای ها محدود می شد، اما با پیشرفت در روش های کشت بافت، انتقال ژن در تک لپه ها نیز انجام شد (Masters *et al.*, 2020).

محققان دریافتند که شوک حرارتی می تواند فعالیت آگروباکتریوم را افزایش دهد. آن ها از ژنوتیپ های مختلف سیب زمینی برای انتقال T-DNA با اعمال شوک حرارتی در دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه قبل از آلوده شدن با آگروباکتریوم استفاده کردند و متوجه شدند شوک حرارتی در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه کارایی آگروباکتریوم را بالا برد. نقش سورفکتانت ها نیز در تسهیل انتقال ژن به وسیله

آگروباکتریوم گزارش شده است. تا کنون برخی از سورفکتانت ها مانند silwet L77 و اسید پلورونیک F68 استفاده شده‌اند (Teo, 2022). با این حال، اخیراً پژوهش‌های و همکاران (Ye *et al.*, 2023) نشان داده که استفاده از سورفکتانت‌ها باعث کاهش نرخ انتقال ژن و در نتیجه در تناقض با مطالعات قبلی است. عوامل دیگری مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر سفوتاکسیم نیز تأثیر منفی بر تغییر شکل گیاه دارند، اما این آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل رشد بیش از حد آگروباکتریوم مورد نیاز هستند (Calabuig Serna *et al.*, 2023; Hayta *et al.*, 2019). علاوه بر این، نقش استوسرینگون در کشت آگروباکتریوم برای افزایش میزان تحویل T-DNA نیز در پروتکل‌های انتقال ژن فعلی بسیار مهم و مطلوب گزارش شده است (Du *et al.*, 2022; Koetle *et al.*, 2015).

تعامل آگروباکتریوم با پروتئین‌های میزبان

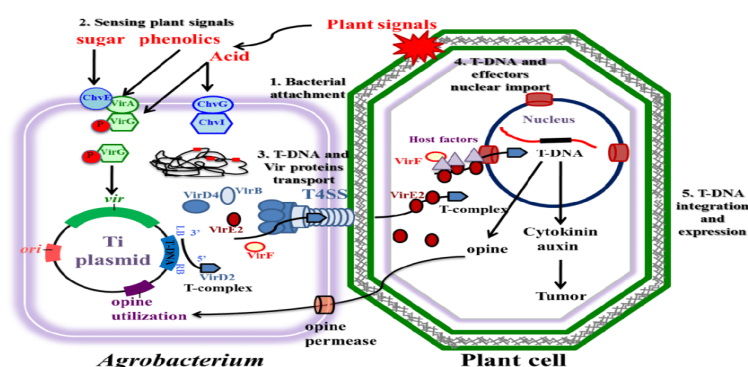
اطلاعات بسیار محدودی در مورد برهمکنش ژن‌های آگروباکتریوم با ژن میزبان وجود دارد و به منظور امکان پذیر ساختن اهداف یک انتقال ژن موفق نیاز به بررسی بسیار بیشتر تعاملات پروتئینی در فرایند انتقال ژن است. در مراحل اولیه آلودگی آگروباکتریوم در گیاهان، سازوکار دفاعی گیاه موجب تحریک ژن‌های دفاعی متفاوتی در گیاه می‌شود، اما در مراحل بعد، آگروباکتریوم کنترل گیاه میزبان را به دست می‌آورد و ژن‌های دفاعی گیاه را برای انتقال T-DNA خود سرکوب می‌کند (Veena *et al.*, 2003).

تکثیر و ایجاد عفونت توسط آگروباکتریوم، فرایند ورود T-DNA به هسته سلول گیاهی و ادغام آن با ژنوم گیاه به برهمکنش و تعامل چندین پروتئین از گیاه و آگروباکتریوم نیاز دارد. هنگامی که DNA تک رشته‌ای (T-DNA) به سلول‌های گیاهی منتقل می‌شود جهت ادغام با ژنوم میزبان، DNA دو رشته‌ای ژنومی با دخالت بسیاری از پروتئین‌های میزبان شکسته می‌شود. بعد از شکسته شدن DNA، ژن‌های بیماری‌زا در آگروباکتریوم ژن‌های متعددی را در گیاهان فعال می‌کند که فعال‌سازی این ژن‌ها موجب ادغام T-DNA در ژنوم گیاه می‌شود (Hu *et al.*, 2021). در ادامه ژن‌های virE2 فعال می‌شوند که به انتقال هسته‌ای و همچنین القای تومور کمک می‌کند. همچنین ثابت شده است که ژن virE2 با ژن‌های دیگر مانند ژن بیان کننده پروتئین CG1 میزبان نیز تعامل دارد (شکل ۳) (Li *et al.*, 2020).

بیشتر گیاهان نسبت به آگروباکتریوم که عامل اصلی اصلاح ژنتیکی محصولات است، مقاوم هستند. اما گاهی اوقات، بازده تغییر ژنتیکی از طریق آگروباکتریوم بسیار کم است. یکی از مشکلاتی است که باید مورد توجه قرار گیرد و بسیار مهم است این است که گیاهان هدف را نسبت به آگروباکتریوم حساس کنیم. تاکنون برخی از ژن‌هایی که با آگروباکتریوم برهم‌کنش داشته‌اند شناسایی شده‌اند اما تعداد این ژن‌های شناسایی شده کافی نیست و نیاز به بررسی بیشتری دارند. به نظر می‌رسد استفاده از تکنیک CRISPR/Cas9 برای ویرایش گیاهان به‌منظور ایجاد حساسیت نسبت به آگروباکتریوم می‌تواند مفید

آگروباکتریوم را هدف قرار دادند. آن‌ها در مطالعه خود، در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ژن همجوشی stB-istA در C58، ژن cell در EHA105، ژن اگزونوکلئاز '۳ تا '۵ و ژن اندوگلوکاناز در سویه NBRC 13257 را مهندسی کردند که راه‌های جدیدی را برای مهندسی سویه‌های آگروباکتریوم در آینده باز می‌کند. همچنین لی و همکاران در پژوهشی از CRISPR-dCas9 جهت ویرایش ژنی سویه‌های مختلف باکتریایی مانند سودوموناس، اروینیا، آگروباکتریوم استفاده کردند.

باشد. از طریق CRISPR/Cas9 می‌توان آن دسته از ژن‌های آگروباکتریوم را که با ژن‌های میزبان تعامل دارند، هدف قرار داد و میزان آلودگی در آن را افزایش داد. به تازگی، از طریق CRISPR-Cas12a ژن‌های باکتریایی ویرایش شده‌اند که اثبات مفهومی برای ویرایش ژن‌های آگروباکتریوم در آینده است (Liu et al., 2022). در مطالعه دیگری، ژن‌های باکتری ریزوبیوم با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 اصلاح شده است. بیان و همکاران (Bian et al., 2022) ژن‌های میزبان در



شکل ۳- نمایی شماتیک از تعامل پروتئین‌های گیاه و آگروباکتریوم (<https://2023.igem.wiki/sz-shd/plant>)

Figure 3. Interaction between plant proteins and agrobacterium (adopted from online site: <https://2023.igem.wiki/sz-shd/plant>)

آگروباکتریوم مقاومت نشان می‌دهند و در نتیجه انتقال ژن را با مشکل مواجه می‌کند. گیاهان تک لپه‌ای به طور کلی در مقایسه با گیاهان دو لپه‌ای مقاومت بالایی در برابر عفونت آگروباکتریوم نشان می‌دهند. همچنین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم دارای بازده انتقال ژن متفاوتی هستند، که نشان می‌دهد انتخاب سویه می‌تواند به میزان قابل توجهی بر میزان موفقیت فرایند انتقال تأثیر بگذارد. شیوه‌نامه‌های اتخاذ شده، از جمله عواملی مانند غلظت

محدودیت‌های انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم

انتقال ژن توسط آگروباکتریوم سنگ بنای بیوتکنولوژی گیاهی است. با وجود استفاده گسترده از آن، چندین محدودیت مانع از کاربرد جهانی و کارایی کلی آن می‌شود. به عنوان مثال کارایی انتقال ژن توسط این باکتری به‌طور کامل تحت تأثیر گونه‌های گیاهی قرار دارد. گونه‌های گیاهی خاصی به طور طبیعی نسبت به عفونت

تنظیمی غیرراه اندازی مانند اینترون ها و پپتیدهای سیگنال، بیشتر دستکاری کرد (Hensel, et al., 2011). ویژگی اصلی بیان گذرا این است که از تولید و نگهداری زمان بر و پرزحمت رگه های^۷ تراژنی پایدار اجتناب می کند. این مزیت به ویژه در مورد غلات که در مقایسه با بسیاری از گونه های دولپه ای کمتر مستعد ترانسفورماسیون پایدار هستند، مرتبط است. طیف وسیعی از روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای انتقال DNA به انواع بافت های غلات وجود دارد که این امر، آزمون های بیان گذرا را هم برای تحقیقات پایه و هم برای برخی کاربردهای زیست فناوری جذاب می سازد (Hensel, et al., 2011).

توسعه روش بمباران با ذرات ریز (تنگستن یا طلا) (معروف به «بیولیستیک» یا «بالیستیک») برای انتقال DNA به سلول غلات، یک پیشرفت مهم در ارزیابی عملکرد ژن از طریق بیان بیش از حد گذرا بود. از آنجا که هر رویداد انتقال ناگزیر فقط یک سلول را تحت تأثیر قرار می دهد، بیان تراژن را می توان در سطح تک سلولی بررسی کرد. ناقل های DNA طراحی شده برای بیان بیش از حد گذرا نیازی به گنجاندن چیزی بیش از کاست بیان هدف ندارند. از آنجا که روش بیولیستیک امکان گنجاندن چندین ناقل در یک بمباران را فراهم می کند، می توان انواع تراژن ها و یا سازه ها مانند نشانگرهای قابل سنجش (gus یا gfp) را به طور همزمان در یک سلول بررسی کرد. هم بمبارانی همچنین می تواند برای تغییر ژنتیکی سلول

آگروباکتریوم مورد استفاده، مدت زمان همکشتی، انتخاب نشانگرهای انتخابی مناسب و ژن های گزارشگر می توانند به طور قابل توجهی بر نتیجه نهایی تأثیر بگذارند. با انجام آزمون و خطا و دستکاری فرآیند انتقال ژن در موارد نام برده می توان تا حدی محدودیت های این روش را مرتفع کرد. به عنوان مثال با توجه به دشواری باززایی گیاهان تراریخته از ریزنمونه، محققان راهکارهایی مانند افزودن هورمون های مختلف به محیط کشت را برای غلبه بر این مشکل ایجاد کرده اند (Debernardi et al. 2020; Fallahi et al., 2022). علاوه بر این، ادغام T-DNA در ژنوم گیاه می تواند تحت تأثیر توالی های DNA بومی اطراف قرار گیرد و در نهایت منجر به بیان بیش از حد یا خاموش شدن ژن تراریخته شود. علاوه بر این، اندازه T-DNA قابل انتقال کم است که این موضوع سبب می شود تعداد ژن ها یا اندازه ژنی که می تواند در T-DNA گنجانده شود محدود شود.

مشکلات بازایی غلات و بیان ژن موقت (گذرا)

یکی از عوامل محدودکننده اصلی که پیشرفت ها در فناوری تراژنی (انتقال ژن) غلات را مهار می کند، این است که بسیاری از راه اندازهای گیاهی که به خوبی شناخته شده اند، در گونه های دولپه ای توسعه یافته اند؛ بسیاری از این راه اندازها در محیط های تک لپه ای به دلایلی که هنوز به درستی درک نشده اند، ناکارآمد یا بی اثر بوده اند. با این حال، تعداد راه اندازهای تراژنی عملکردی در غلات به مرور زمان افزایش یافته است. بیان تراژن و محل تجمع محصول تراژن را می توان با انتخاب هوشمندانه عناصر

⁷ Lines

هدف به منظور فراهم کردن شرایط مناسب برای بیان تراژن استفاده شود؛ نمونه‌ای از این روش، استفاده از سازه بیان بیش‌ازحد Mlo برای سرکوب مقاومت پایه‌ای جو بمباران‌شده در برابر سفیدک پودری (*Blumeria graminis*) بود که محیطی مناسب برای تعامل میزبان-پاتوژن جهت بیان تراژن‌های تحت آزمون ایجاد کرد (Elliott et al., 2002).

روش بیولیستیک به‌طور گسترده در غلات برای تخمین فعالیت راه‌اندازهای ترکیبی با gus به کار رفته است. بارها نشان داده شده است که تعداد سلول‌های مثبت GUS قابل تشخیص با فعالیت راه‌انداز مرتبط است (Hensel, et al., 2011). به‌تازگی، مقایسه قدرت چهار راه‌انداز مختلف در رگه‌های تراژنی پایدار جو با فعالیت آن‌ها در برگ‌های ترانسفورم شده گذرا نیز همبستگی قوی را نشان داد (Himmelbach et al., 2010). در نتیجه، آزمون‌های گذرا می‌توانند اطلاعات قابل اعتمادی در مورد فعالیت نسبی راه‌انداز در گیاهان تراژنی ارائه دهند، اما سطوح مطلق کمی بیان را نمی‌توان به این روش برای رگه‌های ترانسفورم شده پایدار پیش‌بینی کرد. بنابراین، گیاهان ترانسفورم شده پایدار همچنان استاندارد طلایی برای مطالعات راه‌انداز هستند، اما روش بیولیستیک می‌تواند جایگزین مناسبی باشد، به‌ویژه زمانی که هدف، پیش‌غربالگری بسیاری از توالی‌های کاندید یا کسب سریع اطلاعات مقایسه‌ای بیان ژن است (Hensel, et al., 2011).

بیان ژن‌های مسئول تجمع پروتئین در دانه در غلات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و توسعه روش انتقال ژن با واسطه پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) در پروتوپلاست‌های مشتق از آندوسپرم گندم و جو پیشگام این زمینه بوده است. یکی از دستاوردهای اصلی این خط تحقیقاتی، درک فعالیت تعدادی از راه‌اندازهای ژن‌های ویژه بافت دانه بوده است (شکل ۴). همین روش انتقال ژن در پروتوپلاست‌های مشتق از سوسپانسیون‌های سلولی جنینی گندم و برگ جو نیز به کار رفته است. پروتوپلاست‌های مشتق از ریشه، برگ، آندوسپرم در حال رشد یا آلرون آندوسپرم بالغ تا حدی ویژگی بافتی خود را حفظ کردند و بنابراین امکان تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی در راه‌اندازها را فراهم کردند (Hensel, et al., 2011). به‌تازگی از پروتوپلاست‌های مزوفیل برگ گندم نیز برای تحلیل نقش پروتئین‌ها در تحمل تنش اکسیداتیو نوری استفاده شده است. پروتوپلاست‌های ترانسفورم شده با بیان بیش‌ازحد سوپراکسید دیسموتاز، سطح پایین‌تری از آسیب اکسیداتیو را نشان دادند، در حالی که بیان بیش از حد گلوکاتایون ردوکتاز هیچ تأثیری نداشت. هر دو آنزیم با استفاده از یک پپتید سیگنال به کلروپلاست‌ها هدف‌گیری شدند و بیان آن‌ها با اندازه‌گیری فعالیت ثبت شد (Melchiorre et al., 2009). به‌عنوان جایگزینی برای جذب DNA با واسطه PEG، از الکتروپوریشن برای ترانسفورماسیون گذرای پروتوپلاست‌های غلات استفاده شد. بسته به ماده اولیه، هر دو روش کارایی متفاوتی نشان دادند. درحالی که

الکتروپوریشن در پروتوپلاست‌های مشتق از برگ و ریشه کارآمدتر بود، پروتوپلاست‌های آندوسپرم فقط با روش انتقال ژن با واسطه PEG قابل ترانسفورماسیون بودند. در همه موارد، شرایط جداسازی پروتوپلاست‌ها از بافت‌های مختلف و شاخص‌های فنی انتقال ژن نیاز به بهینه‌سازی دقیق داشت. اگرچه استقرار بیان گذرای ژن در

پروتوپلاست‌ها از نظر فنی چالش‌برانگیز است، این روش به‌ویژه برای ارزیابی سریع عملکرد ژن مفید است و جایگزین مناسبی برای ترانسفورماسیون پایدار زمان‌بر غلات محسوب می‌شود (Hensel, et al., 2011).

جدول ۴. راه‌اندازهایی که در اندام‌های رویشی غلات مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و در آزمون بیان گذرا عملکردی نشان داده‌اند؛ S: راه‌اندازهایی که در گیاهان تراژنی پایدار آزمایش شده‌اند؛ T: راه‌اندازهایی که با روش بیان گذرا مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (Hensel و همکاران، ۲۰۱۱).

Table 4. Promoters shown to be functional in the cereals explants tested by transient expression assay; S: promoter tested in stably transgenic plants; T: promoter tested by transient expression assay (Hensel et al., 2011).

Promoter پروموتور	Specificity; Inducer الفا کننده اختصاصی	Transgene ژن تراریخته	Target species گونه هدف
Cauliflower Mosaic Virus 35S (35S)	Ubiquitous	bar gfp	Barley ^S Wheat ^S
ugarcane Bacilliform Virus (ScBV)	Ubiquitous	gus	Barley ^S , Wheat ^S
Maize ALCOHOL DEHYDROGENASE 1 (ADH1)	Ubiquitous	gus	Barley ^S Wheat ^S
Maize UBIQUITIN-1 (UBI-1)	Ubiquitous	gus, gfp, gus, bar, gfp	Barley ^S , Wheat ^S , Rye ^S , Triticale ^S
Maize HISTONE 2B (H2B)	Ubiquitous	gus	Wheat ^S
Maize SURESSOR MUTATOR (SPM)	Ubiquitous	phiC31 INTEGRASE	Wheat ^S
Recombinant emu	Mature embryo, protoplasts ^E , ubiquitous Ubiquitous	Gus pat, npt	Wheat ^T Wheat ^S
Rice ACTIN 1 (ACT1)	Ubiquitous	Gus, gfp gus	Wheat ^S Barley ^S
Rice Tungro Bacilliform Virus	Phloem, ubiquitous	gus	Wheat ^S
Wheat BENZOXAZINONE 3 (BX3)	Mesophyll, protoplasts ^E , ubiquitous	luc	Wheat ^T
Wheat BENZOXAZINONE 4 (BX4)	Mesophyll, protoplasts ^E , ubiquitous	luc	Wheat ^T
Barley HORDEIN B1 (HOR-B1)	Endosperm	Gus, Gfp, gus	Barley ^T , Barley ^S , Wheat ^S
Barley HORDEIN C (HOR-C)	Immature, endosperm ^E , Nitrogen-modulated	gus	Barley ^T
Barley HORDEIN D (HOR-D)	Endosperm	Gfp, gus	Barley ^S , Wheat ^S
Barley Bifunctional - AMYLASE/SUBTILISIN INHIBITOR (ISA)	Pericarp, embryo and aleurone	gfp	Barley ^S
Barley α -AMYLASE	Aleurone	HvXYN1	Barley ^T

ویرایش ژنوم در غلات

ویرایش ژنوم یک فناوری متحول کننده با کاربردهای فراوان در بسیاری از بخش ها از جمله کشاورزی است که برای بهبود محصولات کشاورزی به کار می رود (Armario Najera *et al.*, 2019). استفاده از تکنیک های ویرایش ژنوم که مکمل سایر روش های اصلاح نوین است، می تواند بسیاری از محصولات کشاورزی را از طریق جهش زایی هدفمند و هدفگیری دقیق ژن بهبود ببخشد (Sedeek *et al.*, 2019). تاکنون تکنیک های مختلف ویرایش ژنوم مانند مگانوکلائازها، نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، نوکلئازهای مؤثر فعال کننده رونویسی (TALENs) و CRISPR/Cas9 در غلات استفاده شده اند. در سال های اخیر، CRISPR/Cas9 به عنوان مؤثرترین و آسان ترین ابزار ویرایش ژنوم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ویرایش ژنوم با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک روش به نسبت ساده و موفق در بسیاری از محصولات گیاهی از جمله غلاتی مانند برنج، گندم، ذرت و جو معرفی شده است و مثال هایی از این گیاهان در جدول ۵ آورده شده است. در صورت مشخص بودن توالی بازها و و پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) تکنیک CRISPR/Cas می تواند در بهبود صفات مهم غلات نقش عمده ای داشته باشد و امکانات متعددی برای دستیابی به صفات مطلوب فراهم می کند (Zhu *et al.*, 2017). کریسپر شامل

توالی های کوتاه پالیندرومی فاصله دار منظم است که به طور مؤثر در موجودات مختلف، از جمله گیاهان مدل زراعی، به کار می رود (Weeks *et al.*, 2016). CRISPR/Cas9 دارای یک RNA راهنما (قطعه RNA کوچک) است که با یک اندونوکلاز DNA به نام Cas9 مرتبط است. چارچوب RNA از دو بخش تشکیل شده است که شامل RNA مشتق شده از CRISPR (crRNA) و RNA فعال کننده ترانس (Trance Active CRISPR RNA: tracrRNA) است. در تکنیک ویرایش ژنوم که از طریق کریسپر Cas9-RNA به محل هدف متصل می شود و در جایی که RNA با توالی همولوگ مطابقت دارد، یک شکستگی دو رشته ای ایجاد می کند (Jinek *et al.*, 2014). با وجود در دسترس بودن این تکنیک های مهم ویرایش ژنوم، به دلیل برخی مقررات جهانی هنوز محدودیت های خاصی در کاربرد ابزارهای CRISPR برای بهبود محصولات کشاورزی وجود دارد. از میان چالش های زیادی که تکنیک ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR با آن مواجه است، چالش اصلی در مورد اکثر غلات، پروتکل ها و قانون های موجود در ارتباط با استفاده از این روش است. این شیوه نامه ها تا حدود زیادی توسعه یافته اند، اما این روش ها تا حد زیادی مختص ژنوتیپ هستند و در چنین شرایطی، ویرایش ژنوم را نمی توان به طور مؤثر در زمینه ژنتیکی ارقام تجاری پر محصول بررسی کرد (Ansari *et al.*, 2021).

جدول ۵. مطالعات ویرایش ژن قابل توجه در محصولات غلات (Ansari et al., 2020).

Table 5. List of significant gene editing studies in cereal crops (Ansari et al., 2020)

Plant Species گونه گیاهی	Delivery Mode نوع حامل	Target Genes ژن های هدف	Gene Function عملکرد ژن	Vector used وکتور استفاده شده	Promoter پروموتور
Maize	<i>Agrobacterium</i> -transformation	<i>ZmIPK1A</i> , <i>ZmIPK</i> and <i>ZmMRP4</i>	Phytic acid synthesis	pEasy Blunt vector	Used
Maize	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	<i>ZmLG1</i> , <i>UB2</i> , and <i>UB3</i>	Development of a haploid-inducer mediated genome editing system	pCPB	ZmU6
Wheat	PEG4000-mediated transformation	<i>TaDEP1</i> , <i>TaGASR7</i> , <i>TaLOX2</i> , <i>TaNAC2</i> , <i>TaPIN1</i> , <i>TaGW2</i>	Inflorescence architecture and plant height regulator, lipoxygenase, and grain weight negative regulator	pJIT163	CaMV 35S
Wheat	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	<i>TaDREB2</i> and <i>TaERF3</i>	Drought resistance	pJIT163-2NLSCas9	TaU6
Rice	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	<i>OsSWEET11</i> , <i>OsSWEET14</i>	sucrose efflux transporter	pTOPO/D	TaU6
Rice	Biolistic transformation	<i>OsBADH2</i> , <i>Os02g23823</i> , <i>OsMPK2</i>	Responsible for aroma, a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, a mitogen-activated protein kinase	pJIT163	OsU6
Rice	Biolistic transformation	<i>OsMPK2</i> , <i>OsDEP1</i>	Yield under stress	pJIT163	OsU3
Rice	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	<i>OsDERF1</i> , <i>OsPMS3</i> , 5	Drought tolerance	sgRNA-Cas9	OsU3

خاموشی ژن در غلات

نهایت منجر به مهار رونویسی یا ترجمه می‌شوند (Brodersen and Voinnet, 2006; Borges and Martienssen, 2015). خاموش‌سازی ژن توسط siRNA، به عنوان خاموش‌سازی ژن پس از رونویسی در گیاهان شناخته می‌شود. این فناوری به روشی انتخابی برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن، به‌ویژه در گونه‌های پلی‌پلوئید تبدیل شده است (Travella et al., 2006; Gasparis et al., 2013). گزارش‌های متعددی از خاموشی ژن در گونه‌های تک‌لپه‌ای مانند گندم، جو و برنج وجود دارد (Chen et al., 2012; Butardo et al., 2011). به‌عنوان یک مثال عملی، Fahim و همکاران (Fahim et al., 2012) در سال ۲۰۱۲ از این تکنولوژی

خاموش‌سازی ژن به وسیله RNA مداخله‌گر یک فناوری قدرتمند در ژنتیک برای توصیف عملکرد ژن و به‌دست آوردن گیاهانی با ویژگی‌های مطلوب است. این فناوری مبتنی بر فرایندهای طبیعی تنظیم بیان ژن است و توسط RNAهای کوچک شامل میکرو RNAها (miRNA) و RNAهای کوتاه مداخله‌گر (siRNA) ها انجام می‌شود (Qssowski & et al., 2013; Rogers and Chen, 2013).

RNAهای کوچک عمدتاً ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند و تنظیم ژن‌های اختصاصی توالی را که در ابتدا توسط RNA دو رشته‌ای القاء می‌شدند را هدایت می‌کنند و در

این پژوهش نشان دهنده کاهش شدید بیان ژنهای Pinb و Sinb در هر دو گونه در نسل T1 بود که با کاهش سطح پروتئین و افزایش قابل توجه در سختی دانه همبستگی داشت (Gasparis *et al.*, 2017).

روش‌های ترنسفورماسیون In planta در غلات

اگرچه بیش از ۴۰ سال از انتشار اولین پژوهش‌های مربوط به گیاهان تراریخته می‌گذرد، با این حال تراریختی گیاهان همچنان یک موضوع مهم و اساسی در اکثر محصولات تجاری مهم است. ماهیت سرسخت بسیاری از گونه‌ها و ژنوتیپ‌های گیاهی در برابر باززایی درون‌شیشه‌ای (*InVtro*)، مانع مهمی برای بهبود گیاهان است (Somssich *et al.*, 2019). این موضوع علاوه بر اینکه پیشرفت علمی را کند می‌کند، به اتکای بیش از حد به گونه‌ها و ژنوتیپ‌هایی که به راحتی قابل تراریختی هستند، کمک می‌کند. با این حال، چندین استراتژی تراریختی بدون، یا با حداقل مراحل کشت بافت، در طول سال‌های اخیر پیشنهاد شده است و پژوهشگران روش‌های امیدوارکننده‌ای جهت جایگزینی مراحل پر زحمت کشت بافت و تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای ارائه داده‌اند. به چنین استراتژی‌های تراریختی in planta گفته می‌شود و در طیف وسیعی از گونه‌های تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای کاربرد دارد. در روش‌های in planta اغلب مرحله باززایی کالوس حذف شده است، به همین دلیل تغییرات سوماکلونال کمتری رخ می‌دهد (Woodward, 2018; Koornneef and Meinke, 2010).

جهت به دست آوردن گیاهان مقاوم در برابر ویروس موزاییک گندم به وسیله miRNA5 استفاده کردند و این مقاومت را در دو نسل ارزیابی کردند. استفاده از چند miRNA به صورت همزمان در ایجاد مقاومت به این ویروس در جو نیز موفقیت آمیز بوده است (Kis *et al.*, 2016). تحقیقات اخیر نشان داده است که استفاده از RNAهای کوچک مصنوعی سنتز شده که حامل توالی‌های متعدد مرتبط با مقاومت ویروسی هستند، احتمالاً برای مقاومت ویروسی پیشرفته، مؤثرتر از miRNA هستند (Carbonell *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). در پژوهشی خاموش کردن ژن‌های Pina و Pinb مرتبط با سختی دانه در گندم (Gasparis *et al.*, 2011) و ارتولوگ‌های آنها، ژن‌های Sina و Sinb در تریتیکاله (Gasparis *et al.*, 2013) با استفاده از استراتژی siRNA آزمایش شد. نتایج نشان داد که سطح رونوشت ژن‌ها در T1 بیش از ۸۰٪ و در T2 تا T4 بیش از ۹۰٪ کاهش یافت و در نسل‌های بعدی پایدار بود. علاوه بر این، خاموش کردن یکی از ژن‌های Pin یا Sin با واسطه RNA به طور همزمان بیان Pin یا Sin دوم را کاهش داد. کاهش سطح رونوشت هر دو ژن منجر به کاهش، یا فقدان، قابل توجه پروتئین‌های پورواپندولین و سکلواپندولین و افزایش سختی دانه در گندم شد. Gasparis و همکاران در پژوهشی دیگر نیز از miRNA مصنوعی برای خاموش کردن ژن‌های سختی دانه Pina/Sina و Pinb/Sinb دو گونه هگزاپلوئید از مجموعه Triticeae شامل گندم و تریتیکاله استفاده کردند. نتایج

آگروباکتریوم پژوهشگران موفق به تولید یک گیاه تراریخته جدید به نام Shiranekomugi شدند. در این پژوهش‌ها جنین‌های جوان برای آلودگی به آگروباکتریوم انتخاب شدند. ریزنمونه‌ها پس از آلودگی، یک بار با سفوتاکسیم شستشو داده شدند. گیاهان تراریخته در گلدان‌ها در محیط باز کشت داده شدند و با هیگرومایسین انتخاب شدند. حداکثر بازده انتقال در این تحقیق ۳۳٪ اعلام شد. همچنین، Rod-In و همکاران (Rod-In et al., 2013) یک سیستم انتقال in planta جدید برای برنج رقم هاشمی ایجاد کردند. آن‌ها جنین جوان را به وسیله سوزن‌هایی که در سوسپانسیون قوی آگروباکتریوم به همراه ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون فرو رفته بود تلقیح کردند. سپس جنین جوان روی کاغذ صافی و در شرایط تاریکی رشد داده شدند. علاوه بر آن، در پژوهشی دیگر توسط این پژوهشگران که بر روی برنج رقم RD41 انجام شد مشخص گردید که با استفاده از گل و به واسطه آگروباکتریوم می‌توان یک شیوه‌نامه کارآمد برای انتقال ژن در این رقم ارائه داد. در این روش سنبلیچه‌های جوان بریده شده برای انتقال ژن انتخاب شدند و بیان کایمرا در قسمت‌های مختلف گیاه با سنجش GUS بررسی شد (Rod-In et al., 2013). در دو پژوهش دیگر (Moisseva et al., 2014; Chumakov et al., 2006)، پژوهشگران سوسپانسیونی حاوی آگروباکتریوم به همراه استوسیرینگون تهیه کردند و سپس تزریق آگروباکتریوم به رشته‌های گل در این گیاه را با کمک سرنگ در دماهای مختلف شامل ۲۸-۲۹، ۳۰-۳۱ و ۳۳-

عمده مطالعات انجام‌شده شده مرتبط با روش‌های in planta در غلات بر پایه غوطه‌وری در سوسپانسیون آگروباکتریوم و آلوده کردن به وسیله آسیب جزئی به مریستم رأسی گیاه است. گندم یک گیاه تک‌لپه‌ای است که باززایی آن با روش درون‌شیشه‌ای مشکل است. بنابراین، انواع مختلفی از پروتکل‌های جدید و کارآمد انتقال ژن مستقیم با روش‌های in planta توسط بسیاری از پژوهشگران در این گیاه پیشنهاد شده است. در پژوهشی میکروسپورهای تک‌هسته‌ای جوان قرار گرفته در محل میانی و انتهایی سنبله‌های گندم در سوسپانسیون آگروباکتریوم غوطه‌ور شدند و گیاهچه‌های حاصل با اسپری پارومومایسین از کل گیاه تمیز داده شدند. در این روش گیاهان تراریخته سبز باقی می‌مانند در حالی که گیاهان غیر تراریخته از بین می‌روند. گیاهان تراریخته حاصل سطح بسیار پایینی از بیان ژن تراریخت را نشان دادند (Zale et al., 2009). در یک شیوه‌نامه انتقال ژن سریع و بهبود یافته in planta برای گندم با استفاده از سرنگ، سوسپانسیون آگروباکتریوم به مریستم رأسی و گلچه‌ها تزریق شد و سپس نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی کشت شدند. گیاهان تراریخته حاصل از این روش بوسیله کانامایسین و GUS غربالگری شدند. نتایج نشان داد که ۲۷٪ از گیاهان تراریخته فعالیت GUS مثبت و ۲۶٪ از گیاهان تراریخته نیز تکثیر PCR مثبت نشان می‌دهند (Razzaq et al., 2011). در دو پژوهش مجزا (Supertana et al., 2006; Naseri et al., 2012)، با استفاده از روش غوطه‌وری گیاه گندم در سوسپانسیون

منظور باید ژن‌های جدیدی که در گونه‌های گیاهی و آگروباکتریوم با هم در ارتباط هستند و برهم‌دیگر تاثیر می‌گذارند بررسی و شناسایی شوند. یکی از روش‌هایی که می‌تواند ما را در این امر یاری دهد پروفایل ترنسکریپتومیکس است. این تکنیک یک روش قوی است که می‌تواند دید جامعی از بیان ژن‌ها از زمان آلودگی با باکتری تا انتقال ژن به گیاه ارائه دهد. بنابراین با این تکنیک می‌تواند ژن‌های کلیدی را که در طول فرآیند انتقال ژن تعامل فعال دارند را کشف کرد. همچنین استفاده از ابزارهای ویرایش ژنوم (کریسپر) نیز برای شناسایی و هدف قرار دادن ژن‌های هدف ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر استفاده از ابزارهای ویرایش ژنوم در گیاهان، جداسازی و مهندسی سویه‌های جدید آگروباکتریوم نیز می‌تواند راه‌گشا باشد. همچنین سویه‌های باکتریایی طراحی‌شده به‌صورت سفارشی، متناسب با ترکیب ژنتیکی مختص گونه‌های گیاهی هدف نیز می‌تواند به دقت و کارایی ویرایش ژن‌ها و همچنین تسهیل انتقال ژن در گیاهان کمک کنند.

۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام دادند. پس از شستشوی پلاکت‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪، نمونه‌ها را در محیط کشت MS حاوی کانامایسین به عنوان محیط انتخابی رشد دادند. بیشینه کارایی انتقال ژن در این روش ۶۰/۳٪ اعلام شد (Moisseva et al., 2014; Chumakov et al., 2006).

نتیجه‌گیری

با وجود تمامی مشکلات و محدودیت‌ها، پیشرفت در بیوتکنولوژی گیاهی راه‌حل‌های مفیدی را جهت حل مشکلات ارائه می‌دهد. استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، بهینه‌سازی شیوه‌نامه‌های انتقال ژن و ادغام فناوری‌های جدید مانند سیستم‌های CRISPR/Cas9 برخی از روش‌هایی هستند که می‌توان برای غلبه بر این محدودیت‌ها بکار گرفته شوند. آینده انتقال ژن به لطف پژوهش‌های در حال انجام بسیار امیدوار کننده به نظر می‌رسد. موفقیت در ارائه شیوه‌نامه‌های کارآمد در انتقال ژن توسط این باکتری مستلزم درک دقیق تعاملات ژنتیکی بین گیاهان و گونه‌های آگروباکتریوم است. به‌این

References

- Aalami, O., Azadi, P., Hadizadeh, H., Wilde, H.D., Karimian, Z., Nemati, H., & Samiei, L. 2023. Melatonin strongly enhances the Agrobacterium-mediated transformation of carnation in nitrogen-depleted media. BMC Plant Biology, 23(1), p.316. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. 2016. Liposome: Classification, preparation, & applications. Nanoscale Research Letter, 8, 102. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Ali, A., Bang, S.W., Chung, S. M & Staub, J.E. 2015. Plant Transformation via Pollen Tube-Mediated Gene Transfer. Plant Molecular & Biology Reports, 33, 742–747. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>

- Allam, M.A., & Saker, M.M. 2017. Microprojectile Bombardment Transformation of Date Palm Using the Insecticidal Cholesterol Oxidase (ChoA) Gene. In: Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds) Date Palm Biotechnology Protocols Volume I. Methods in Molecular Biology, vol 1637. Humana Press, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5-23>
- Amro, J., Black, C., Jemouai, Z., Rooney, N., Daneault, C., Zeytuni, N., Ruiz, M., Bui, K.H., & Baron, C. 2023. Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus reveals the importance of positive charges in the lumen. *Structure*, 31(4), 375-384. <https://doi.org/10.1186/s1>
- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., & Lijsebettens, M.V. 2013/2020. Higher Plant Transformation: Principles & Molecular Tools. *International Journal of Developed Biology*, 57, 483–494. [10.1080/01904167.2013.868483](https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483)
- Andrieu, A., Breitler, J.C., Siré, C., Meynard, D., Gantet, P. & Guiderdoni, E. 2012. An in planta, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Rice*, 5, 1-12.
- Ansari, W.A., Chandanshive, S.U., Bhatt, V., Nadaf, A.B., Vats, S., Katara, J.L., Sonah, H. & Deshmukh, R. 2020. Genome editing in cereals: aroaches, alications & challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4040. <https://doi.org/10.3390/ijms21114040>
- Arshad, M., & Asad, S. 2019. Embryogenic Calli Explants & Silicon Carbide Whisker-Mediated Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Transgenic Cotton: Methods & Protocols*, 75-91.
- Asad, S., Mukhtar, Z., Nazir, F., Hashmi, J.A., Mansoor, S., Zafar, Y., & Arshad, M. 2008. Silicon carbide whisker-mediated embryogenic callus transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) & regeneration of salt tolerant plants. *Molecular Biotechnology*, 40, 161-169. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Begemann, M.B., Gray, B.N., January, E., Gordon, G.C., He, Y., Liu, H., Wu, X., Brutnell, T.P., Mockler, T.C., & Oufattole, M. 2017. PreciseInsertion & Guided Editing of Higher Plant Genomes Using Cpf1 CRISPR Nucleases. *Scientific Reports*, 7, 11606. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Belide, S., Vanhercke, T., Petrie, J.R., & Singh, S.P. 2017. Robust Genetic Transformation of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Using Differentiating Embryogenic Callus Induced from Immature Embryos. *Plant Methods*, 13, 109. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Bian, Z., Li, S., Yang, R., Yin, J., Zhang, Y., Tu, Q., Fu, J., & Li, R. 2022. Development of a new recombineering system for *Agrobacterium* species. *Alid & Environmental Microbiology*, 88(5), e02499-21. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Bonawitz, N.D., Ainley, W.M., Itaya, A., Chennareddy, S.R., Cicak, T., Effinger, K., Jiang, K., Mall, T.K., Marri, P.R., & Samuel, J.P. 2019. Zinc Finger Nuclease-mediated Targeting of Multiple Transgenes to an Endogenous Soybean Genomic Locus via Non-homologous End Joining. *Plant Biotechnology Journal*, 17, 750–761. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Borges, F., & Martienssen, R.A. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 727-741.
- Brodersen, P. & Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22(5), 268-280.

- Buiatti, M., Marcheschi, G., Venturo, R., Bettini, P., Bogani, P., Morpurgo, R., Nacmias, B., & Pellegrini, M.G. 1987. In vitro response to Fusarium elicitor & toxic substances in crosses between resistant & susceptible carnation cultivars. *Plant Breeding*, 98(4), 346-348.
- Busov, V. B., Brunner, A. M., Meilan, R., Filichkin, S., Ganio, L., Gandhi, S., & Strauss, S. H. 2005. Genetic transformation: A powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. *New Phytologist*, 167, 9–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Butardo, V.M., Fitzgerald, M.A., Bird, A.R., Gidley, M.J., Flanagan, B.M., Larroque, O., Resurreccion, A.P., Laidlaw, H.K., Jobling, S.A., Morell, M.K., & Rahman, S. 2011. Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4927-4941.
- Calabuig-Serna, A., Mir, R., Porcel, R., & Seguí-Simarro, J.M. 2023. The Highly Embryogenic Brassica napus DH4079 line is recalcitrant to Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Plants*, 12(10), p.2008. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Carroll, D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782.
- Čermák, T., Baltes, N.J., Čegan, R., Zhang, Y., & Voytas, D.F. 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome biology*, 16, 1-15.
- Chilton, M.D.M., & Que, Q. 2003. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant physiology*, 133(3), 956-965. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Chumakov, M.I., Rozhok, N.A., Velikov, V.A., Tyrnov, V.S. & Volokhina, I.V. 2006. Agrobacterium-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments. *Russian Journal of Genetics*, 42, 893-897. <https://doi.org/10.1134/S1022795406080072>
- Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., & Shewmaker, C.K. 1986. Integration of Foreign DNA Following Microinjection of Tobacco Mesophyll Protoplasts. *Molecular Gene & Genetics*, 202, 179–185. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Das, D.K. 2018. Expression of a bacterial chitinase (ChiB) gene enhances resistance against Erysiphe polygoni induced powdery mildew disease in the transgenic black gram (*Vigna mungo* L.) (cv. T9). *American Journal of Plant Sciences*, 9(8), 1759-1770. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.98128>
- Debernardi, J.M., Tricoli, D.M., Ercoli, M.F., Hayta, S., Ronald, P., Palatnik, J.F., & Dubcovsky, J. 2020. A GRF–GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 38(11), 1274-1279. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Desiderio, F., Zarei, L., Licciardello, S., Cheghamirza, K., Farshadfar, E., Virzi, N., Sciacca, F., Bagnaresi, P., Battaglia, R., Guerra, D., Palumbo, M., Cattivelli, L., & Mazzucotelli, E. 2019. Genomic regions from an Iranian landrace increase kernel size in durum wheat. *Frontier in Plant Science*, 10, 448-468. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Du, C., Chai, L.A., Liu, C., Si, Y., & Fan, H. 2022. Improved Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation using antibiotics & acetosyringone selection in cucumber. *Plant Biotechnology Reports*, 16(1), 17-27. [10.1080/01904167.2013.868483](https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483)
- Du, H., Shen, X., Huang, Y., Huang, M., & Zhang, Z. 2016. Overexpression of vitreoscilla hemoglobin increases waterlogging tolerance in Arabidopsis & maize. *BMC Plant Biology*, 16, 35. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>

- Duan, X., Hou, Q., Liu, G., Pang, X., Niu, Z., Wang, X., Zhang, Y., Li, B., & Liang, R. 2018. Expression of *Pinellia pedatisecta* lectin gene in transgenic wheat enhances resistance to wheat aphids. *Molecules*, 23(4), 748. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Elliott, C., Zhou, F., Spielmeier, W., Panstruga, R., & Schulze-Lefert, P. 2002. Functional conservation of wheat & rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(10), 1069-107
- Fahim, M., Millar, A.A., Wood, C.C., & Larkin, P.J. 2012. Resistance to Wheat streak mosaic virus generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 10(2), 150-163. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00647.x>
- Fallahi, N., Tahmasebi, Z., & Zebajadi, A. 2022. Effect of explant, type & concentration of hormone on callus induction & regeneration of two Iranian sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars. [10.1080/01904167.2013.868483](https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483)
- Fllahi, N., Zebajadi, A., & Tahmasebi, Z. 2024. Optimization of effective factors in the transfer of FAD3 gene effective in omega-3 biosynthesis to two sesame cultivars. *Modern Genetics Journal*, 18(4), .377-388. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Gao, S., Yang, Y., Wang, C., Guo, J., Zhou, D., Wu, Q., Su, Y., Xu, L., & Que, Y. 2016. Transgenic Sugarcane with a Cry1Ac Gene Exhibited Better Phenotypic Traits & Enhanced Resistance against Sugarcane Borer. *PLoS ONE*, 11, e0153929. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Gasparis, S., Kała, M., Przyborowski, M., Orczyk, W. & Nadolska-Orczyk, A. 2017. Artificial microRNA-based specific gene silencing of grain hardness genes in polyploid cereals appeared to be not stable over transgenic plant generations. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2017.
- Gasparis, S., Orczyk, W., & Nadolska-Orczyk, A. 2013. Sina & Sinb genes in triticale do not determine grain hardness contrary to their orthologs Pina & Pinb in wheat. *BMC Plant Biology*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-190>
- Gasparis, S., Orczyk, W., Zalewski, W., & Nadolska-Orczyk, A. 2011. The RNA-mediated silencing of one of the Pin genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, & increases grain hardness. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 4025-4036. <https://doi.org/10.1093/jxb/err103>
- Ge, X., Xu, J., Yang, Z., Yang, X., Wang, Y., Chen, Y., Wang, P., & Li, F. 2023. Efficient genotype-independent cotton genetic transformation & genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(4), 907-917. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Gelvin, S.B. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>
- Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C.V., Sánchez-León, S., Baltes, N.J., Starker, C., Barro, F., Gao, C., & Voytas, D.F. 2017. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons & CRISPR/Cas9. *The Plant Journal*, 89(6), 1251-1262. <https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
- Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T., & de Groot, M.J. 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology*, 17(6), .598-601. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Grazziotin, M.A., Cabral, G.B., Ibrahim, A.B., Machado, R.B., & Aragão, F.J. 2020. Expression of the Arcelin 1 gene from *Phaseolus vulgaris* L. in cowpea seeds (*Vigna*

- unguiculata* L.) confers bruchid resistance. *Annals of Applied Biology*, 176(3), 268-274. 10.1080/01904167.2013.868483
- Hassan, M. Akram, Z. Ali, S. Ali, G.M. Zafar, Y. Shah, Z.H., & Alghabari, F. 2016. Whisker-Mediated Transformation of Peanut with Chitinase Gene Enhances Resistance to Leaf Spot Disease. *Crop Breeding & Applied Biotechnology*, 16, 108-114. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Hayta, S., Smedley, M.A., Demir, S.U., Blundell, R., Hinchliffe, A., Atkinson, N., & Harwood, W.A. 2019. An efficient & reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*, 15, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Hensel, G., Himmelbach, A., Chen, W., Douchkov, D. K., & Kumlehn, J. 2011. Transgene expression systems in the Triticeae cereals. *Journal of Plant Physiology*, 168(1), 30-44 .
- Hensel, G., Marthe, C., & Kumlehn, J. 2017. Agrobacterium-mediated transformation of wheat using immature embryos. *Wheat Biotechnology: Methods & Protocols*, 129-139. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Himmelbach, A., Liu, L., Zierold, U., Altschmied, L., Maucher, H., Beier, F., Schützendübel, A. 2010. Promoters of the barley germin-like GER4 gene cluster enable strong transgene expression in response to pathogen attack. *The Plant Cell*, 22(3), 937-952 .
- Holm, P.B., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H., & Knudsen, S. 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Research*, 9, 21-32. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S.G., & Fraley, R.T. 1985. A simple & general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229-1231. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Hu, Y., Lacroix, B., & Citovsky, V. 2021. Modulation of plant DNA damage response gene expression during Agrobacterium infection. *Biochemical & biophysical research communications*, 554, 7-12. 10.1080/01904167.2013.868483
- ISAAA. 2020 b. Brief 55–2019: Executive Summary. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343, 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- Kaeler, H.F. Gu, W. Somers, D.A., & Rines, H.W. 1990. Cockburn, A.F. Silicon Carbide Fiber-Mediated DNA Delivery into Plant Cells. *Plant Cell Report*, 9, 415–418. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Karmakar, S., Molla, K.A., Gayen, D., Karmakar, A., Das, K., Sarkar, S.N., Datta, K., & Datta, S.K. 2019. Development of a Rapid & Highly Efficient Agrobacterium -Mediated Transformation System for Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *GM Crops Food*, 10, 115–138. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Karny, A., Zinger, A., Kajal, A., Shainsky-Roitman, J., & Schroeder, A. 2018. Therapeutic nanoparticles penetrate leaves & deliver nutrients to agricultural crops. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10. 10.1080/01904167.2013.868483
- Kaur, A., Reddy, M.S., & Kumar, A. 2022. Heat shock enhanced Agrobacterium tumefaciens mediated T-DNA delivery to potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant*

- Biochemistry & Biotechnology, 31(4), 853-863.
<http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Kausch, A.P., Nelson-Vasilchik, K., Hague, J., Mookkan, M., Quemada, H., Dellaporta, S., Fragoso, C., & Zhang, Z.J. 2019. Edit atWill:Genotype Independent Plant Transformation in the Era of Advanced Genomics & Genome Editing. *Plant Science*, 281, 186–205.
<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Kawai, J., Kanazawa, M., Suzuki, R., Kikuchi, N., Hayakawa, Y., & Sekimoto, H. 2022. Highly efficient transformation of the model zygnematophycean alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex by square-pulse electroporation. *New Phytologist*, 233(1), 569-578. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenes, B. & Havelda, Z. 2016. Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to W heat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 427-437.
- Kluepfel, D.A., McClean, A.E., Aradhya, M.K., & Moersfelder, J.W. 2014, April. Identification of *Juglans* wild relatives resistant to crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens*. In II International Symposium on Wild Relatives of Subtropical & Temperate Fruit & Nutrient Crops 1074 (. 87-94). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Koetle, M.J., Finnie, J.F., Balázs, E., & Van Staden, J. 2015. A review on factors affecting the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes. *South African Journal of Botany*, 98, 37-44.
<http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Koornneef, M. & Meinke, D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909-921.
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavcic, D. 2019. Membrane Electroporation & Electroporabilization: Mechanisms & Models. *Annual Review in Biophysics*, 48, 63–91. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Kumar, R., Mamrutha, H.M., Kaur, A., Venkatesh, K., Sharma, D., & Singh, G.P. 2019. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in spring bread wheat using mature & immature embryos. *Molecular biology reports*, 46(2), 1845-1853. 10.1080/01904167.2013.868483
- Li, M., Wang, D., Long, X., Hao, Z., Lu, Y., Zhou, Y., Peng, Y., Cheng, T., Shi, J., & Chen, J. 2022. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic callus in a *Liriodendron* hybrid (*L. Chinense* × *L. Tulipifera*). *Frontiers in Plant Science*, 13, p.802128. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Li, X., Yang, Q., Peng, L., Tu, H., Lee, L.Y., Gelvin, S.B., & Pan, S.Q. 2020. *Agrobacterium*-delivered VirE2 interacts with host nucleoporin CG1 to facilitate the nuclear import of VirE2-coated T complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(42), 26389-26397. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Liu, H., Zhao, J., Chen, F., Wu, Z., Tan, J., Nguyen, N.H., Cheng, Z., & Weng, Y. 2023. Improving *Agrobacterium tumefaciens*- mediated genetic transformation for gene function studies & mutagenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genes*, 14(3), p.601. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1963773>
- Liu, K., Gao, Y., Li, Z.H., Liu, M., Wang, F.Q., & Wei, D.Z. 2022. CRISPR-Cas12a assisted precise genome editing of *Mycolicibacterium neoaurum*. *New Biotechnology*, 66, 61-69. 10.1080/01904167.2013.868483

- Lorz, H., Paszkowski, J., Dierks-Ventling, C., & Potrykus, I. 1981. Isolation & Characterization of Cytoplasts & Miniprotoplasts Derived from Protoplasts of Cultured Cells. *Physiology of Plant*, 53, 385–391. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04325-5>
- Lu, Y., Tian, Y., Shen, R., Yao, Q., Wang, M., Chen, M., Dong, J., Zhang, T., Li, F., Lei, M. & Zhu, J.K. 2020. Targeted, efficient sequence insertion & replacement in rice. *Nature Biotechnology*, 38(12), 1402-1407.
- Lv, Q., Chen, C., Xu, Y., Hu, S., Wang, L., Sun, K., Chen, X., & Li, X. 2017. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*). *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 105-109. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Lv, Z., Jiang, R., Chen, J., & Chen, W. 2020. Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. *The Plant Journal*, 104(4), 880-891. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1963773>
- Masani, M.Y.A., Noll, G.A., Parveez, G.K.A., Sambanthamurthi, R., & Prüfer, D. 2014. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection & DNA microinjection. *PloS One*, 9(5), p.e96831. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Masters, A., Kang, M., McCaw, M., Zobrist, J.D., Gordon-Kamm, W., Jones, T., & Wang, K. 2020. *Agrobacterium*-mediated immature embryo transformation of recalcitrant maize inbred lines using morphogenic genes. *Journal of Visualized Experiments*. 10(156), 60-78. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Melchiorre, M., Robert, G., Trii, V., Racca, R., & Lascano, H. R. 2009. Superoxide dismutase & glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance & changes in cellular redox state. *Plant Growth Regulation*, 57(1), 57-68.
- Miroshnichenko, D., Ashin, D., Pushin, A., & Dolgov, S. 2018. Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* L.), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnology*, 18, 1-13. 10.1080/01904167.2013.868483
- Mizuno, K., Takahashi, W., Ohyama, T., Shimada, T., & Tanaka, O. 2004. Improvement of the Aluminum Borate Whisker-Mediated Method of DNA Delivery into Rice Callus. *Plant Production Science*, 7, 45–49. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Mohanta, D., Patnaik, S., Sood, S., & Das, N. 2019. Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 293-300.
- Moiseeva, Y.M., Velikov, V.A., Volokhina, I.V., Gusev, Y.S., Yakovleva, O.S. & Chumakov, M.I. 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method. *British Biotechnology Journal*, 4, 116-125. <http://www.sciencedomain.org/abstract.php?iid=364&id=11&aid=2706>
- Najera VA, Twyman RM, Christou P, Zhu C. 2019. Applications of multiplex genome editing in higher plants. *Current Opinion on Biotechnology*, 59, 93-102, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.015>
- Naseri, G., Sohani, M.M., Pourmassalehgou, A. & Allahi, S. 2012. In planta transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *African Journal of Biotechnology*, 11(31), 7885-7893.
- National Academy of Sciences, 113, 1949–1954. 10.1080/01904167.2013.868483
- Niazian, M., Noori, S.A.S., Galuszka, P., & Mortazavian, S.M.M. 2017. Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated & in planta transformation methods. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>

- Ning, W., Zhai, H., Yu, J., Liang, S., Yang, X., Xing, X., Huo, J., Pang, T., Yang, Y., & Bai, X. 2017. Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances drought tolerance & improves plant yields under drought stress in transgenic soybean. *Molecular Breeding*, 37, 1-10. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1963773>
- Ossowski, S., Schwab, R., & Weigel, D., 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs & other small RNAs. *The Plant Journal*, 53(4), 674-690.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNA and other small RNAs. *Plant Journal*. 53, 674-690. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03328.x
- Petolino, J.F., Hopkins, N.L., Kosegi, B.D., & Skokut, M. 2000. Whisker-mediated transformation of embryogenic callus of maize. *Plant Cell Reports*, 19, 781-786. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Ramkumar, T.R., Lenka, S.K., Arya, S.S., & Bansal, K.C. 2020. A Short History & Perspectives on Plant Genetic Transformation. In *Biostic DNA Delivery in Plants*; Rustgi, S., Luo, H., Eds.; Humana: New York, NY, USA, . 39-68. 10.1080/01904167.2013.868483
- Razzaq, A., Hafiz, I.A., Mahmood, I. & Hussain, A. 2011. Development of in planta transformation protocol for wheat. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), p.740.
- Reddy, S.S.S., Singh, B., Peter, A.J., & Rao, T.V. 2019. Genetic transformation of indica rice varieties involving Am-SOD gene for improved abiotic stress tolerance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 294-300. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Rod-In, W., Sujipuli, K. & Ratanasut, K. 2014. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation.
- Rogers, K., & Chen, X., 2013. Biogenesis, turnover, & mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383-2399.
- Saed-Moucheshi A., & Mozafari A. A. 2022. Alternate gene expression profiling of monoterpenes in *Hymenocrater longiflorus* as a novel pharmaceutical plant under water deficit. *Scientific Reports*, 12(1): 4084. 10.1080/01904167.2013.868483
- Saed-Moucheshi A., & Safari H. 2023a. Investigation of regulatory elements related to superoxide dismutase enzyme genes in wheat. *Cereal Biotechnology & Biochemistry*, 1(3) 23-38. 10.1080/01904167.2013.868483
- Saed-Moucheshi A., & Safari H. 2023b. Superoxide dismutase enzyme expression in root & shoot of triticale seedlings under drought stress conditions. *Cereal Biotechnology & Biochemistry*, 1: 581-595. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Saed-Moucheshi A., Sohrabi F., Fasihfar E., Baniasadi F., Riasat M., Mozafari A. A. 2021. Superoxide dismutase (SOD) as a selection criterion for triticale grain yield under drought stress: a comprehensive study on genomics & expression profiling, bioinformatics, heritability, & phenotypic variability. *BMC Plant Biology*, 21: 1-19. 10.1080/01904167.2013.868483
- Saeed, T., & Shahzad, A. 2016. Basic principles behind genetic transformation in plants. in *biotechnological strategies for the conservation of medicinal & ornamental climbers*; Shahzad, A., Sharma, S., Iddiqui, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, . 327-350. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Schimpl, S., Fauser, F., & Puchta, H. 2014. The CRISPR/C as system can be used as nuclease for in planta gene targeting & as paired nickases for directed mutagenesis in *A. rabidopsis* resulting in heritable progeny. *The Plant Journal*, 80(6), .1139-1150. <https://doi.org/10.1111/tpj.12704>

- Sedeek, K.E., Mahas, A., &Mahfouz, M. 2019. Plant genome engineering for targeted improvement of crop traits. *Frontiers in Plant Science*, 10, 114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00114>
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H. & Habben, J.E. 2017. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207-216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- Shimizu-Sato, S., Tsuda, K., Nosaka-Takahashi, M., Suzuki, T., Ono, S., Ta, K.N., Yoshida, Y., Nonomura, K.I., & Sato, Y. 2020. Agrobacterium-mediated genetic transformation of wild *Oryza* species using immature embryos. *Rice*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Shreni Agrawal, E.R.. 2022. A review: Agrobacterium-mediated gene transformation to increase plant productivity. *The Journal of Phytopharmacology*, 11, p.111. 10.1080/01904167.2013.868483
- Smith, R.H., 2013. Plant tissue culture: techniques & experiments. academic press. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Sohrabi F., & Saed-Moucheshi M. A. 2023. A review on biological roles of long non-coding RNAs (LncRNAs) in plants: A focus on cereal crops. *Plant Biotechnology*, 7, 56-71. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Sohrabi F.,& Saed-Moucheshi A. 2023. Investigation of NAD (P) H oxidase genes regulatory elements in wheat. *Cereal Biotechnology & Biochemistry*, 2, 98-117. 10.1080/01904167.2013.868483
- Somssich, M., 2019. A short history of plant transformation. 2019(1), 1–28. <https://peerj.com/preprints/27556/>.
- Song, C., Lu, L., Guo, Y., Xu, H., & Li, R. 2019. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus Alba*× *Populus glandulosa* Uyeki. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), p.2594. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Sorokin, A.P., Ke, X.Y., Chen, D.F., & Elliott, M.C. 2000. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Science*, 156(2), .227-233. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. & Kojima, M. 2006. Development of simple & efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 102(3), .162-170.
- Supartana, P., Shimizu, T., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M. & Kojima, M. 2005. Development of simple & efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 100(4), .391-397.
- Sutradhar, M., & Mandal, N. 2023. Reasons & riddance of Agrobacterium tumefaciens overgrowth in plant transformation. *Transgenic Research*, 32(1), .33-52. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1963773>
- Teo, Y.L., 2022. Engineering of plasmid vectors for enhancing agrobacterium-mediated plant transformation (Doctoral Dissertation, UTAR). 10.1080/01904167.2013.868483
- Thagun, C., Chuah, J.A. & Numata, K. 2019. Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating & chloroplast-targeting peptides. *Advanced Science*, 6(23), 1902064.

- Travella, S., Klimm, T.E. & Keller, B. 2006. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. *Plant Physiology*, 142(1), .6-20.
- van Wordragen, M., Shakya, R., Verkerk, R., Peytavis, R., van Kammen, A., & Zabel, P. 1997. Liposome-Mediated Transfer of YAC DNA to Tobacco Cells. *Plant Molecular & Biology Report*, 15, 170–178. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1963773>
- Veena, Jiang, H., Doerge, R.W., & Gelvin, S.B. 2003. Transfer of T-DNA & Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation & suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal*, 35(2), .219-236. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02919-5>
- Wang, M., Sun, R., Zhang, B., & Wang, Q. 2019. Pollen tube pathway-mediated cotton transformation. *Transgenic Cotton: Methods & Protocols*, .67-73. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Weeks, D.P.; Spalding, M.H.; Yang, B. 2016. Use of designer nucleases for targeted gene & genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 483–495. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261084/>
- Wen, S.S., Ge, X.L., Wang, R., Yang, H.F., Bai, Y.E., Guo, Y.H., Zhang, J., Lu, M.Z., Zhao, S.T., & Wang, L.Q. 2022. An efficient agrobacterium-mediated transformation method for hybrid poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*) using calli as explants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2216. <http://www.10.1080/01904167.2013.868483>
- Woodward, A.W. & Bartel, B. 1988. Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics*, 128(4), .1337-1349.
- Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey Jr, R.J., Irwin, P.A., Rajagopal, J., Lonosky, P.M., Hall, B.D., Jondle, M.D. & Voytas, D.F. 2005. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *The Plant Journal*, 44(4), .693-705.
- Wu, H., Acanda, Y., Jia, H., Wang, N., & Zale, J. 2016. Biolistic transformation of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Plant Cell Reports*, 35, .1955-1962. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Yang, A., Su, Q., & An, L. 2009. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector-and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear GFP cassette transformation. *Planta*, 229, .793-801. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2096467>
- Ye, X., Shrawat, A., Moeller, L., Rode, R., Rivlin, A., Kelm, D., Martinell, B.J., Williams, E.J., Paisley, A., Duncan, D.R., & Armstrong, C.L. 2023. Agrobacterium-mediated direct transformation of wheat mature embryos through organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, p.1202235. 10.1080/01904167.2013.868483
- Zahedi M. B., Hooman R., & Saed-Moucheshi A. 2016. Evaluation of antioxidant enzymes, lipid peroxidation & proline content as selection criteria for grain yield under water deficit stress in barley. *Journal of Allied Biological Sciences*, 8: 71-78. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Zale, J.M., Agarwal, S., Loar, S. and Steber, C.M. 2009. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 28, .903-913. <http://www.DOI.10.1007/s00299-009-0696-0>