

انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم و تحلیل گیاهان تراریخت در صنوبر سیاه هیبرید (*Populus × euromericana*) (Dode Guinier)

شهنوش نیری^۱ و بهرام باغبان کهنه‌روز^{۲*}

۱- دکتری تخصصی، گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴)

چکیده

صنوبر سیاه هیبرید (*Populus × euromericana*)، گیاهی با کاربردهای مهم اقتصادی در صنایع خمیرچوب و کاغذ، سوخت زیستی و مواد نانوسلولزی و حذف آلودگی‌های خاک است. در این پژوهش، شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم و باززایی مستقیم گیاه با استفاده از بافت میانگره ساقه صنوبر سیاه هیبرید ارائه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخت انجام شد. جهت باززایی گیاه کامل از کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه در محیط‌کشت القای ساقه‌زایی حاوی محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) و غلظت‌های مختلف ترکیبات $BAP \times IBA$ و برای ریشه‌زایی (RIM) از محیط‌کشت القای ریشه‌زایی حاوی غلظت‌های $IBA \times NAA$ استفاده شد. با ارزیابی فاکتورهای فیتوهورمونی در باززایی مستقیم، بالاترین میزان باززایی ساقه (۲۸/۵۷) ساقه در هر ریزنمونه از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد. بهترین ریشه‌زایی ساقه‌های باززا در محیط‌کشت RIM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA تولید شد. ۱۰۰ درصد گیاهان باززا با محیط سازگار شده و به گلخانه منتقل گردیدند. نتایج مربوط به حساسیت به علف‌کش نشان داد که ۰/۵ میکرومولار Basta® سیستم‌گزینش دقیقی جهت مهار سلول‌های غیرتراریخت فراهم می‌آورد. بالاترین فراوانی انتقال ژن (۹۳/۳۳ درصد) از طریق پیش‌کشت ریزنمونه‌ها به‌مدت ۶ روز و تلقیح آن‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 ($OD_{600} = 0.6$) همراه ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. آنالیزهای لکه‌گذاری سادرن، RT-PCR و آزمون هیستوشیمیایی GUS به‌ترتیب درج یک تا دو نسخه ژن *gus* در DNA ژنومی و بیان پایدار آن را در گیاهان نسل T0 منتخب تأیید کرد. یافته‌های این تحقیق می‌تواند به‌عنوان شیوه‌نامه باززایی و انتقال ژن به گیاه صنوبر سیاه هیبرید مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: باززایی مستقیم، بیان ژن GUS، لکه‌گذاری سادرن، میانگره‌ساقه، *Populus × euromericana*

مقدمه

صنوبر سياه هيبريد (*Populus × euramericana*) يكي از انواع صنوبر هيبريد است كه از تلاقي بين گونه‌اي *Populus deltoides* اروپايي و *P. nigra* آمريكايي به‌دست آمده است و در برابر آفات و بيماري‌ها و تنش‌هاي غيرزيستي همچون خشكي مقاومت بالايي دارد (Arend and Fromm, 2007; Jiang et al., 2015). بسياري از گونه‌هاي هيبريد *Populus* sp. در مناطق حاصلخيز جهان به‌دليل خصوصيات بي‌بديل از جمله قابليت رشد سريع، تكثير رويشي و حجم بالاي توليد بيوماس گياهي (۲۵ تا ۳۰ مترمكعب چوب در هكتار) جهت بهره‌برداري در صنايع چوب، خميركاغذ، گياه‌پالايي خاك‌هاي آلوده، بيابان‌زدايي و توليد بيواتانول و مواد سلولزي به‌صورت انبوه كشت مي‌شوند (Rishi et al., 2001). چوب صنوبر سياه هيبريد (*Populus × euramericana*) سبك، نرم، يكنواخت، داراي رنگ روشن، با كيفيت، مقاوم در برابر خمش و كشش است (Arend and Fromm, 2007; Confalonieri et al., 1998; Cong et al., 2013). کاربردهاي متنوع اين گونه هيبريد و ارزش اقتصادي بالاي آن منجر به كشت انبوه آن در نوار شمالي ايران شامل مناطق آذربايجان تا خراسان شمالي شده است؛ به‌طوري كه بيش از ۲۷ درصد جنگل‌كاري‌هاي شمال کشور به اين گونه اختصاص دارد (Khosravan et al., 2017).

اهميت اقتصادي گونه‌هاي هيبريد صنوبر سياه منجر به جلب توجه بسياري از پژوهشگران در توسعه صفات مهم اقتصادي با استفاده از روش‌هاي نوين مهندسي ژنتيك شده است كه مي‌تواند محدوديت‌هاي روش‌هاي معمول اصلاح نباتات را جهت ارتقاي درختان جنگلي از پيش روي اصلاح‌گران بردارد (Confalonieri et al., 2003). اين گياهان چوبي به‌دليل اندازه كوچك ژنوم (۵۰۰~ مگا جفت‌باز)، دسترسي به كتابخانه برچسب‌هاي توالي‌هاي بيان‌شده، دوره رشد كوتاه، امكان باززايي و تكثير درون‌شيشه‌اي و سهولت در انتقال ژن، به‌عنوان يك گياه مدل، گزينه مناسبی در مطالعات ژنتيكي، ژنوميكس عملكردي، مورفوفيزيولوژي، سينتيك بيولوژي، ويرايش

ژنوم، سيستم بيولوژي، بيولوژي مولكولي گياهان چوبي قلمداد مي‌شود (Abbas et al., 2020; Bae et al., 2011; Balestrazzi et al., 2009; Bali et al., 2016; Biswal et al., 2015; Bjuhager et al., 2010; Bonadei et al., 2012; Bruegmann et al., 2019; Bryan et al., 2016; Buhl et al., 2017; Cai et al., 2016; Caruso et al., 2008; Che et al., 2003; Chen et al., 2009; Dai et al., 2003; Dharmawardhana et al., 2010; Du et al., 2012; Fan et al., 2020; Fan et al., 2015; Foston et al., 2011; Han et al., 2000; Hori et al., 2020; Igasaki et al., Muhr; 2002; Kim et al., 2020; Movahedi et al., 2021 et al., 2018; Nayeri et al., 2022; Raj et al., 2011; Ruttink et al., 2007; Song et al., 2019; Stanculescu et al., 2018; Street et al., 2006; Triozzi et al., 2021; Xin et al., 2020; Xu et al., 2021; Yoo et al., 2017; Zhang et al., 2021). با اين اوصاف، كليه روش‌هاي مهندسي ژنتيك و انتقال صفات مطلوب در اين گياهان چوبي تحت تاثير توان باززايي آن‌ها قرار دارد. در گونه‌هاي صنوبر سياه و كلون‌هاي هيبريد آن، تاكنون شيوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباكتريوم صرفاً در گونه صنوبر سياه (*P. nigra* Confalonieri) گزارش شده است (Confalonieri et al., 1994; Mohri et al., 1996; Nishiguchi et al., 2006). علاوه بر اين، يوتوشكو و ميسرا (Yevtushenko and Misra, 2010) توانستند شيوه‌نامه باززايي و انتقال ژن به‌روش آگروباكتريوم با استفاده از ريزنمونه‌هاي ساقه و برگ در گونه هيبريد ديگري از صنوبر سياه (*P. nigra × P. maximowiczii* A. Henry) را ارائه کنند. با اين حال، راتلج و دوگلاس (Rutledge and Douglas, 1998) نشان دادند كه امكان باززايي بافت ساقه در صنوبر سياه هيبريد *P. × euramericana* cv. Robusta وجود ندارد. همچنين، توليد درون‌شيشه‌اي گياهچه‌هاي كامل در گونه‌هاي صنوبر سياه هيبريد (*P. × euramericana*) براي اولين بار توسط آگراوال و گوپتا (Agrawal and Gupta, 1991) با استفاده از كشت ساقه‌هاي حاوي جوانه جانيي مربوط به درختان ۲۵ ساله صنوبر سياه در محيط كشت MS (Murashige and Skoog, 1962) گزارش شد. با توجه به دشواري باززايي گياه از ريزنمونه ساقه و برگ گونه هيبريد *P. × euramericana*، تاكنون انتقال ژن با آگروباكتريوم و باززايي گياهان تراريخته در اين گونه گزارش نشده است. در اين تحقيق براي اولين بار شيوه‌نامه بهينه جهت باززايي مستقيم

هیپوکلیت سدیم حاوی ۵ درصد کلرین فعال) به مدت ۶ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳۰ ثانیه با شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه، ضد عفونی سطحی شدند. در هر مرحله ضد عفونی، نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه با آب دیونیزه‌ی اتوکلاو شده، شستشو شدند. در نهایت نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب دیونیزه‌ی اتوکلاو شده، به مدت ۵ دقیقه شستشو و آبکشی شدند.

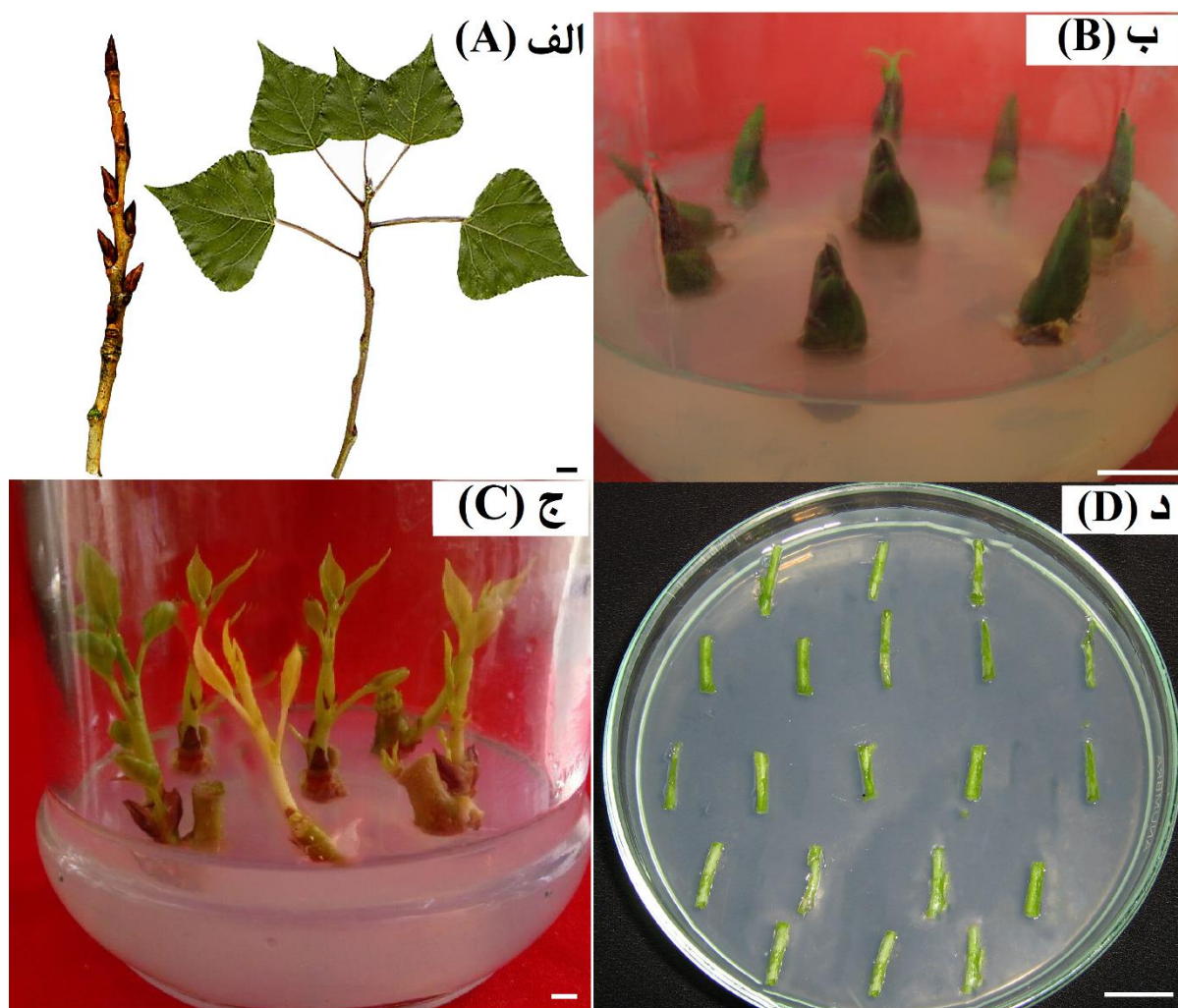
منبع و نوع ریزنمونه: جوانه‌های انتهایی و جانبی ضد عفونی شده در محیط کشت پایه MS حاوی آگارز ۰/۶ درصد با ۵/۷ pH = به مدت ۴ هفته کشت شدند (شکل ۱-ب). در این مطالعه جهت باززایی و انتقال ژن به‌روش آگروباکتريوم از ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده شد (شکل ۱-ج).

بررسی تأثیر ترکیب و غلظت PGRها در القای ساقه‌زایی: میزان باززایی ساقه در ریزنمونه میانگره ساقه (طول ۱ سانتی‌متر) صنوبر سیاه هیبرید روی محیط کشت القاء ساقه‌زایی (Shoot inducing medium, SIM) حاوی محیط کشت پایه MS و BAP (CAT. No. B3274, Sigma-Aldrich, USA) بر اساس مطالعات انجام شده در گونه‌های *P. nigra* و *P. alba* (Alba, 1992; Biswas et al., 2012; Confalonieri et al., 1998; Confalonieri et al., 2000; Pintarić, 2008; Yevtushenko and Misra, 2010; Zhang et al., 2021) و نتایج آزمایش‌های اولیه در گونه *P × euramericana* که قبل از شروع آزمایش اصلی تجربه شده‌اند در ۴ غلظت (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (CAT. No. I5386, Sigma-Aldrich, USA) در ۳ غلظت (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، آگار ۰/۶ درصد (Extra pure Agar CAS 9002-18-0, Merck, Germany) و pH = ۵/۸ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱-د). جهت القای افزایش طول ساقه، ریزساقه‌ها به محیط کشت القا طویل شدن ساقه (Shoot elongation medium, SEM) حاوی محیط کشت پایه MS و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار واگشت و تعداد ساقه‌زایی به ازای هر ریزنمونه پس از ۶ هفته کشت اندازه‌گیری شد.

گیاه به‌همراه شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتريوم از ریزنمونه‌های میانگره ساقه صنوبر سیاه هیبرید بین‌گونه‌ای *Populus × euramericana* Dode Guinier گزارش شد. در این مطالعه، بهترین ترکیب غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (Plant growth regulators, PGR) سیتوکینین و اکسین در باززایی بافت میانگره ساقه بدون القای کالوس در گیاه صنوبر سیاه هیبرید شناسایی گردید. حداقل غلظت مهارکننده علف‌کش Basta® به‌عنوان نشانگر گزینش گیاهی، جهت تولید گیاهان تراریخته در ریزنمونه‌های میانگره ساقه تعیین گردید. جهت دستیابی به شیوه‌نامه انتقال ژنتیکی به‌روش آگروباکتريوم اثر عوامل مؤثر در انتقال ژن بررسی شد و شیوه‌نامه انتقال ژن جهت تولید گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گرفت. انتقال و بیان پایدار ژن *gus* در ژنوم گیاهان T0 صنوبر سیاه هیبرید با استفاده از روش‌های لکه‌گذاری سادرن و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) تأیید شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ضد عفونی سطحی: در این تحقیق از درختان شناسنامه‌دار صنوبر سیاه هیبرید *P. × euramericana* Dode Guinier cv. 561/41 واقع در باغ تحقیقات گیاه‌شناسی دانشگاه تبریز (BRGUT) (عرض جغرافیایی 38°03'30.4"N شمالی و طول جغرافیایی 46°20'07.8"E شرقی، با میانگین بارندگی ۳۳۰ میلی‌متر) استفاده شد. جهت تأمین ریزنمونه، تعداد ۳۰ عدد ساقه جوان و در حال رشد (به طول ۲۰-۳۰ سانتی‌متر و قطر تقریبی ۰/۲-۰/۵ سانتی‌متر) حاوی جوانه انتهایی و جوانه‌های جانبی توسط قیچی باغبانی از درخت جدا شده (شکل ۱-الف) و در ظرف حاوی آب دیونیزه اتوکلاو شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت حذف مواد فنلی و آلودگی‌های سطحی، شاخه‌های حاوی جوانه‌های انتهایی و جانبی (شکل ۱-الف) با استفاده از مسواک حاوی یک قطره مایع ظرف‌شویی به ازای هر ساقه به مدت ۵ دقیقه به‌طور کامل شستشو و سپس به مدت ۲ ساعت زیر آب روان آبکشی شدند. نمونه‌ها به‌ترتیب با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، مایع سفیدکننده تجاری ۲۰ درصد



شکل ۱- منبع و نوع ریزنمونه مورد استفاده جهت تعیین شیوه‌نامه باززایی مستقیم گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P. ×euramericana* Dode Guinier)

Figure 1. Explant source and type for shoot regeneration of hybrid black poplar (*P. ×euramericana* Dode Guinier)

الف) شاخه جوان و سالم به طول تقریبی ۲۰-۳۰ سانتی‌متر و قطر ۰/۳ سانتی‌متر جدا شده از درخت صنوبر سیاه هیبرید؛ در سمت چپ جوانه‌های جانبی و انتهایی درخت صنوبر نشان داده شده است. ب) کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی گیاه صنوبر سیاه هیبرید در محیط کشت MS جهت جوانه‌زنی و رشد ساقه. ج) ساقه‌های رشد یافته از جوانه‌ها پس از ۴ هفته کشت در محیط پایه MS؛ کشت‌های مورد نظر در فیتوترون با دوره فتوتروپیسم ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۴۵۰۰ لوکس حاصل از لامپ فلورسنت سفید و زرد در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. د) کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در محیط کشت SIM. خطوط نشان دهنده واحد اندازه‌گیری معادل ۱ سانتی‌متر است.

A) The young and healthy branches with 20-30 cm in length and 0.3 cm in diameter from hybrid black poplar. In the left, the apical and lateral buds of the hybrid black poplar was shown; B) The lateral and apical buds cultured on MS medium to obtain *in vitro* regenerated shoots; C) The shoots from buds after 4 weeks culturing on MS medium. The cultures were maintained at 26°C, 16/8 hrs light/dark photoperiod exposing to 4500 Lux light intensity from a cool white, fluorescent lamp. D) The internodal stem explants with 1 cm long from the *in vitro* regenerated shoots cultured on SIM. Bars indicate 1 cm.

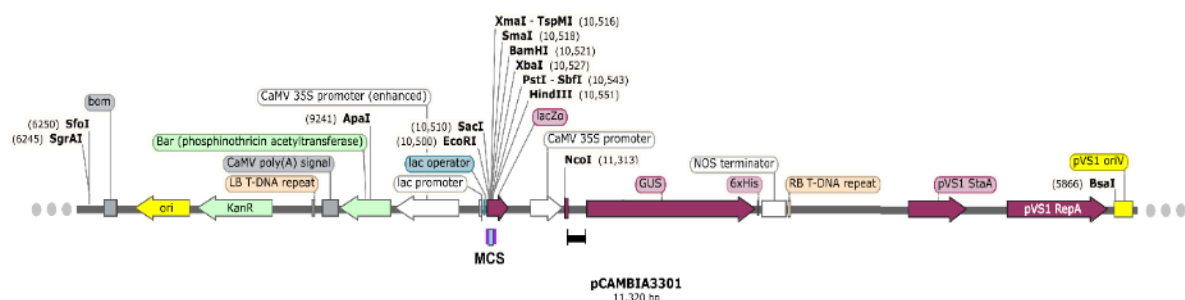
میلی‌گرم در لیتر، آگار ۰/۶ درصد و $\text{pH} = 5/8$ انتقال داده شدند. درصد فراوانی ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده به ازای هر تیمار و تعداد ریشه و میانگین طول ریشه‌ها به ازای هر گیاهچه پس از ۸ هفته اندازه‌گیری شد.

القای ریشه‌زایی: ریزساقه‌ها (به طول ۱-۲ سانتی‌متر) به محیط کشت ریشه‌زایی (Root inducing medium, RIM) حاوی محیط کشت پایه MS حاوی ترکیبات فیتوهورمونی IBA و NAA (Sigma-Aldrich, CAT. No. N0640, USA) هر کدام در ۳ غلظت متفاوت شامل ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱

ساقه، دو سویه باکتری *A. tumefaciens* شامل LBA4404 (اکتوپین) با قدرت بیماری‌زایی پایین (Hoekema *et al.*, 1982; Ooms *et al.*, 1983) و EHA105 (آگروپین) با قدرت بیماری‌زایی بالا (Hood *et al.*, 1993) در نظر گرفته شد. DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *uidA* رمزکننده پروتئین GUS و ژن گزینشگر گیاهی *bar* رمزکننده آنزیم فسفینوتریسین N-استیل ترانسفراز (عامل مقاومت به علف‌کش Basta®) تحت کنترل پیشبر فوق‌بیانی 35S CaMV است. علاوه بر این، در ساختار این ناقل بیانی ژن *nptII* رمزکننده نئومایسین فسفوترانسفراز II (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین) جهت گزینش سلول‌های تراریخته باکتریایی استفاده شده است (شکل ۲). ناقل بیانی مورد نظر توسط فرآیند تاریختی به روش الکتروپوریشن به سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم مستعد در هر دو سویه، منتقل شد (Green and Sambrook, 2020; Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook and Russell, 2006). سلول‌های باکتریایی نوترکیب در محیط کشت LB (Luria-Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، استرپتومایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر گزینش شد. وجود DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301 در سلول باکتریایی نوترکیب طی واکنش کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* (جدول ۱) تأیید گردید.

سازگاری به محیط و انتقال به گلخانه: گیاهچه‌های ریشه‌دار (به طول ۶ تا ۸ سانتی‌متر) از محیط کشت استریل خارج شده و ریشه‌های آن‌ها با آب مقطر شستشو داده شد. پس از حذف محیط کشت، گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی مخلوط ماسه، پیت ماس و پرلیت با نسبت ۳:۲:۱ انتقال داده شدند. جهت حفظ رطوبت نسبی گیاهچه‌ها، گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی محافظت شدند. با ایجاد سوراخ در سرپوش پلاستیکی به صورت هفتگی از میزان رطوبت فضای اطراف گیاه کاسته و امکان تطابق‌پذیری گیاه با محیط گلخانه فراهم شد. پس از سازگاری، گیاهان به خاک منتقل شده و در فضای گلخانه قرار گرفتند.

آزمون حساسیت علف‌کش Basta® روی ریزنمونه‌های میانگرم ساقه: جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده علف‌کش Basta® ریزنمونه‌های میانگرم ساقه روی محیط کشت SIM حاوی محیط پایه MS، BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر)، آگار ۶ درصد و علف‌کش Basta® (REG.NR. L4872, Bayer CropScience AG, Germany) در ۵ غلظت مختلف شامل ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱/۰ میکرومولار کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار واکنش شدند و درصد فراوانی ریزنمونه‌های باززا شده و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به ازای هر تیمار پس از ۶ هفته کشت اندازه‌گیری شد. ناقل بیانی و سویه‌های *Agrobacterium tumefaciens*: جهت بررسی میزان کارایی انتقال ژن در ریزنمونه‌های میانگرم



شکل ۲- نمای شماتیک نقشه ناقل بیانی pCAMBIA3301 (۱۱۳۲۰ جفت‌باز) حاوی ژن گزارشگر GUS (فلش بنفش) و ژن گزینشگر

گیاهی *bar* رمزکننده فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (فلش سبز) جهت ایجاد مقاومت به علف‌کش Basta® در گیاهان تراریخته

Figure 2. Schematic diagram from map of pCAMBIA3301 binary vector (11320bp) containing GUS reporter gene (Purple-colored arrow) and *bar* plant selectable marker gene encoding phosphinothricin acetyltransferase enzyme (Green-colored arrow) to obtain Basta® herbicide resistance in transgenic plants.

با دوره فتوتروپیسم ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۴۵۰۰ لوکس حاصل از لامپ فلورسنت سفید و زرد در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA کل ژنومی (gDNA) و تأیید اولیه تراریختی گیاهچه‌های T0 به روش PCR: از هر ریزنمونه باززا شده در محیط SM، یک گیاهچه باززا شده به محیط SEM و RIM حاوی ۰/۵ میکرومولار Basta® و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت القای ریشه‌زایی منتقل شد. DNA کل ژنومی گیاهچه‌های باززا شده‌ی منتخب با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle, 1987). تراریختی گیاهچه‌های T0 طی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی ژن‌های *bar* و *gus* تأیید اولیه گردید. عدم آلودگی نمونه‌ها با سویه‌های آگروباکتریوم طی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir G* مشخص شد. توالی آغازگرهای اختصاصی هر ژن در جدول ۱ ارائه شده است. تکثیر قطعات ژنی طی واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم gDNA، ۴۰۰ نانومولار از هر یک از یک جفت آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X واکنش PCR (Vivantis, Cat. No. PR8252C) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه چرخه‌ساز حرارتی (Astech, Japan) طبق برنامه دمایی ذیل انجام گرفت. مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه و سپس مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصولات PCR به همراه ۲ میکرولیتر نشانگر وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز (Cat. No. SM1153, Thermo Scientific™, USA)، در ژل آگارز ۱ درصد (Sigma-Aldrich, CAS. No. 9012-36-6) حل شده در بافر 0.5X TBE و حاوی محلول RedSafe™ 20000X (Cat. No. 21141, Intron biotechnology, USA) ۵ درصد (v/v) بارگذاری شده و به مدت یک ساعت الکتروفورز (۸۵ ولت) گردید. نتایج الکتروفورز در دستگاه ژل‌داک (Gel Imaging Quantum) (ST4, Vilber Lourmat, France) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

شیوه‌نامه انتقال ژن به روش آگروباکتریوم: جهت بررسی تأثیر مدت‌زمان پیش‌کشت در میزان کارایی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم، ریزنمونه‌های میانگه ساقه در محیط کشت SIM در ۴ تیمار زمانی شامل ۰، ۳، ۶ و ۹ روز کشت شدند. سوسپانسیون سلول‌های آگروباکتریوم سویه‌های EHA105 و LBA4404 (CFU برابر با $10^8 \times 3/15$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط) در سه غلظت OD_{600} (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹) در محیط تلقیح (Inoculum medium, IM) (محیط کشت ۰/۵MS حاوی میواینوزیتول (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ساکارز (۵ درصد) و $pH = 5/2$) تعلیق شدند. ریزنمونه‌های مربوط به هر تیمار پیش‌کشت SIM در ۳ تیمار سوسپانسیون تلقیح باکتریایی ($OD_{600} = 0/3, 0/6, 0/9$) در دمای اتاق و در شرایط تاریکی به مدت ۵ دقیقه تیمار شدند. در این مرحله غلظت استوسیرینگان (Acetosyringone, AS) و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها به میزان حداقل در نظر گرفته شد. پس از حذف مازاد رطوبت و سلول‌های باکتریایی، توسط کاغذ صافی استریل اتوکلاو شده، ریزنمونه‌های تلقیح شده جهت هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم به محیط کشت SIM منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مطلق به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید. سپس، ریزنمونه‌های تلقیح شده با سلول‌های باکتریایی سویه LBA4404 به محیط گزینش (Selection medium, SM) حاوی محیط‌کشت پایه MS، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر JBA، ۰/۵ میکرومولار Basta® و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شد. جهت حذف سلول‌های باکتریایی سویه EHA105 علاوه بر سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از تیمستین ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز در محیط کشت SM استفاده گردید.

در مرحله بعد، اثر هر یک از عوامل AS در ۴ غلظت (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی در ۴ تیمار (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۰ دقیقه) به‌طور مستقل در میزان انتقال ژن نیز مورد مطالعه قرار گرفت. درصد فراوانی تراریختی ریزنمونه‌های باززا شده به ازای هر تیمار بر اساس تعداد ریزنمونه‌های حاوی گیاهچه‌های T0 پس از ۶ هفته اندازه‌گیری شد.

شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و سازگاری گیاهان: محیط‌کشت‌های مورد نظر در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌های درون‌شیشه‌ای و گیاهان باززا شده جهت سازگاری در اتاقک رشد

جدول ۱- توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس در واکنش PCR جهت تأیید تراریختی گیاهچه‌های T0

Table 1. The sequence of forward and reverse primers used for PCR reaction to validate the regenerated T0 plantlets

نام ژن	نام آغازگر	توالی (5'→3')	طول قطعه تکثیر یافته (bp)
Gene name	Primer name	Sequence (5'→3')	Length of amplificant (bp)
<i>bar</i>	Bar-F	ATGAGCCCAGAACGACGCCCGG	552
	Bar-R	TCAAATCTCGGTGACGGGCAGG	
<i>gus</i>	GUS-F	ACCTCGCATTACCCTTACGCTGAA	450
	GUS-R	AATCGCCGCTTTGGACATACC	
<i>Vir G</i>	Vir-F	ATGATTGTACATCCTTCACG	850
	Vir-R	TGCTGTTTTATGAGTTGAG	
<i>α-actin</i>	Act_F	AGGCATCCACGAAACCACAT	153
	Act_R	CTTGGGGCTAGTGCTGAGAT	

آنالیز لکه‌گذاری سادرن: جهت تعیین تعداد نسخه‌های ژن انتقالی، gDNA (۶ میکروگرم) از ۵ گیاهچه بازآ شده T0 به روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle, 1987). gDNA مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. برش‌یافته در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و به‌روش کاپیلاری به غشای نایلونی با بار الکتریکی مثبت متصل گردید. قطعه‌ای از ژن *gus* (۴۵۰ جفت‌باز) به‌عنوان DNA کاوشگر استفاده شد و طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده با استفاده از *digoxigenin-11-PCR DIG Probe Synthesis* در کیت ستنز پروب (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. 1163690910) نشان‌گذاری گردید. دورگ‌گیری مولکول‌های کاوشگر ۴۵۰ جفت‌بازی (تک رشته شده با شوک حرارتی آبجوش و یخ صفر درجه) پس از بلوکه کردن غشای نایلونی با بافر مربوطه در درون لوله‌های اتافک دورگ‌گیری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هشت ساعت انجام شد. آنتی‌بادی اختصاصی به‌کار رفته علیه مولکول‌های DIG الحاقی به پروب، *anti-DIG* متصل به آلکالین فسفاتاز بوده و برای آشکارسازی سیگنال طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده از سوبسترای نیتروبلو تترازولیوم کلرید (Nitro blue tetrazolium chloride, NBT) و ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل فسفات (Bromo-4-۵-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP) موجود در کیت شناسایی لومینسانس DIG (Roche Applied Science, Cat. No. 11636514910) استفاده گردید.

عدم آلودگی نمونه‌های RNA با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *α-actin* (جدول ۱) تأیید شد. نمونه‌های فاقد باند DNA نشان‌دهنده عدم آلودگی DNA ژنومی بود (Dashchi et al., 2021). DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آغازگر الیگو dT₁₂₋₁₈ بر اساس شیوه‌نامه کیت ستنز cDNA (Quanti Tect® Transcriptase Kit, Qiagen, Hilden, Germany Reverse) ستنز شد. برای ساخت رشته دوم و تکثیر cDNA از واکنش PCR مطابق برنامه دمایی اشاره شده و آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* استفاده شد. سپس محصولات PCR به‌همراه ۲ میکرولیتر نشانگر وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز (Cat. No. SM1153, Thermo) و ۱۰۰ جفت‌باز (Scientific™, USA) در ژل آگارز ۱ درصد (-9012 CAS. No. 36-6, Sigma-Aldrich) حل شده در بافر 0.5X TBE و حاوی محلول RedSafe™ 20000X ۵ درصد (v/v) بارگذاری شده و به‌مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید. نتایج الکتروفورز در دستگاه ژل‌داک مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

آزمون هیستوشیمیایی *GUS*: جهت تأیید بیان پایدار پروتئین گزارشگر *GUS* در گیاهان T0 از آزمون هیستوشیمیایی *GUS* استفاده شد. نمونه‌های برگ‌ی از ۵ گیاه صنوبر هیبرید T0 جداسازی و با محلول ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل-بتا-D-گلوکورونید (X-Gluc) ۲ میلی‌مولار، بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، فری‌سیانید پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار، فروسیانید پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار و تریتون X-100 ۰/۱ درصد، به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از رنگ‌آمیزی، محتوای کلروفیل بافت برگ با استفاده از اتانول ۹۵ درصد طی ۲۴ ساعت حذف شد (Gallagher, 1992).

استخراج RNA کل و واکنش RT-PCR: RNA کل از نمونه‌های برگ‌ی ۵ گیاهچه T0 منتخب و گیاه غیرتراریخته به‌روش Trizol (CAT. No. RN7713C, RNXTM, Invitrogen, USA) استخراج گردید. پس از تیمار با آنزیم Dnase I (Thermo)

تجزيه و تحليل آماری: تجزيه آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS v.17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) انجام شد. بررسی القاء ساقه‌زایی در ریزنمونه‌های میانگه ساقه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely randomized design,) با سه تکرار انجام شد. هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ ریزنمونه میانگه ساقه به طول ۱ سانتی‌متر، به عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. بررسی القای ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا در ترکیبات فیتوهورمونی مختلف در طرح CRD طی آزمایش فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۵ گیاهچه باززا بود که به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. آزمایش بررسی اثرات عوامل دخیل در میزان کارایی انتقال ژن به روش آگروباکتريوم شامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها، نوع سوبه آگروباکتريوم و غلظت سوسپانسیون باکتریایی (OD_{600}) بر اساس طرح CRD و آزمایش فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۱۰ ریزنمونه میانگه ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. تجزيه و تحليل داده‌های باززایی و انتقال ژن به روش آگروباکتريوم بر اساس تجزيه و تحليل واریانس و مقایسه میانگین بر مبنای حداقل اختلاف معنی‌دار قابل اعتماد (HSD) posthoc Tukey انجام گرفت. آزمایش بررسی اثرات غلظت‌های مختلف AS, Basta® و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM هرکدام به صورت مستقل در طرح CRD و با ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۱۰ ریزنمونه میانگه ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌های مستقل مربوط به عوامل غلظت AS, Basta®, غلظت AS و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM بر اساس One-way ANOVA و بر مبنای (HSD) posthoc Tukey در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد بررسی شد. بررسی توزیع نرمال داده‌های باززایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌ها بر اساس آزمون One-sample Kolmogorov-Smirnov (1-sample K-S) تأیید شد.

نتایج و بحث

باززایی مستقیم از ریزنمونه میانگه ساقه در صنوبر سیاه هیبرید (*Populus × euromericana*): نتایج آزمون ناپارامتری توزیع نرمال 1-sample K-S نشان داد که داده‌های تعداد ساقه باززا در تیمارهای فیتوهورمونی با میانگین ۱۲/۳۹ و انحراف

معیار ۹/۴۹ با درجه اطمینان ۹۵ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. بر اساس نتایج بر اساس تجزيه واریانس نتایج مربوط به باززایی مستقیم (شکل ۴-الف و ب)، علاوه بر معنی‌داری اثرات اصلی، اثر متقابل معنی‌داری در ترکیب فیتوهورمون‌ها نیز مشاهده گردید (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل $BAP \times IBA$ نشان داد که کشت ریزنمونه میانگه ساقه در محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA با میانگین ۲۸/۵۷۳ ساقه باززا شده به ازای هر ریزنمونه بیشترین باززایی را داشته است. افزایش غلظت BAP حداکثر تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA تأثیر مثبت و معنی‌داری بر القای باززایی مستقیم ساقه دارد. به طوری که افزایش غلظت BAP از ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA با افزایش ۲ تا ۴ برابری در میزان القای ساقه همراه شد (شکل ۳-الف). در شکل ۴-الف میزان القای ساقه‌زایی ریزنمونه میانگه ساقه در صنوبر سیاه هیبرید در محیط SIM حاوی ترکیب فیتوهورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA پس از ۶ هفته نشان داده شده است. همچنین شکل ۴-ب، نمای نزدیک از باززایی یک ریزنمونه و تعداد ساقه‌های باززا شده را در محیط کشت SIM منتخب، حاوی ترکیب فیتوهورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را نشان می‌دهد. این ترکیب فیتوهورمونی به عنوان محیط‌کشت باززایی ساقه برای انتقال ژن به روش آگروباکتريوم روی ریزنمونه‌های میانگه ساقه استفاده شد.

اگرچه نوع بافت گیاه و نوع ریزنمونه در میزان باززایی و کارایی انتقال ژن به عنوان عواملی مهم گزارش شده‌اند (Confalonieri et al., 2003; Han et al., 2000; Han et al., 2013)، اغلب گونه‌های *Populus sp.* و کلون‌های هیبرید آن‌ها بدون استفاده از غلظت‌های PGR، قابلیت باززایی غیرمستقیم مناسبی از بافت برگ، میانگه ساقه و ریشه نشان دادند. با این حال چنین گزارشی در گونه *P. nigra* و هیبریدهای نزدیک به آن ارائه نشده است. اغلب مطالعات مربوط به باززایی و انتقال ژنتیکی در *P. nigra* مبتنی بر تولید درون‌شیشه‌ای کالوس، هم‌کشتی کالوس‌ها با آگروباکتريوم و باززایی از این روش بوده است (Confalonieri et

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در القای ریشه‌زایی: گیاهچه‌های با طول ساقه ۱ تا ۲ سانتی‌متر در محیط RIM حاوی ۹ ترکیب غلظتی مختلف IBA و NAA کشت شدند. هر دو فیتوهورمون اکسین در ۳ سطح (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) اعمال شدند. نتایج اثرات ترکیبی غلظت‌های فیتوهورمون‌های IBA و NAA در صفات تعداد ریشه و طول ریشه گیاهان باززا شده تجزیه و تحلیل شدند. نتایج آزمون ناپارامتری توزیع نرمال 1-sample K-S نشان داد که داده‌های تعداد ریشه باززا شده (میانگین \pm SD برابر با $4/48 \pm 5/39$) و میانگین طول ریشه‌ها در هر گیاه باززا (میانگین \pm SD برابر با $4/76 \pm 7/85$) در مجموع تیمارهای فیتوهورمونی با درجه اطمینان ۹۵ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. نتایج نشان داد که تعداد و طول ریشه در سطوح ترکیبی IBA و NAA تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند (جدول ۳).

(al., 1994; Mohri et al., 1996; Nishiguchi et al., 2006). توجه به این‌که مسیر کالوس‌زایی می‌تواند ایجاد تنوع ناخواسته در گیاهان تراریخته نماید، پرهیز از این روش مطلوب می‌باشد (Rani et al., 1995; Saiced et al., 1994; Zhang et al., 2021). حذف مرحله کالوس‌زایی و تلقیح مستقیم ریزنمونه‌های القا شده با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم می‌تواند علاوه بر کاهش تنوع ژنتیکی، منجر به کاهش شدت آلودگی آگروباکتریومی و کاهش تولید نمونه‌های شبه‌تراریخته (False positive T0 plants) شود. مطابق آنچه که بیواس و همکاران (Biswas et al., 2012) گزارش کردند، استفاده از فیتوهورمون BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA می‌تواند در ۸۷ درصد از ریزنمونه‌های میانگه ساقه در صنوبر سیاه (P. nigra L. var. italica Kohne) نیز منجر به باززایی مستقیم ساقه بدون القای کالوس شود.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر فیتوهورمون‌های BAP و IBA بر صفت تعداد ساقه باززا شده از ریزنمونه‌های میانگه ساقه

Populus × euromericana

Table 2. The variance analysis of shoot regeneration from internodal stem explant of *Populus × euromericana* cultured on SIM with different BAP and IBA combinations

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار (Treatment)	11	286.772	30663312.03**
BAP	3	976.688	104433122.71**
IBA	2	66.698	7131710.79**
BAP × IBA	6	15.172	1622273.76**
خطا (Error)	24	9.352E-6	
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		7.57E-5	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد
**: Significant at 1% probability level

جدول ۳- تجزیه واریانس فیتوهورمون‌های NAA و IBA بر صفات تعداد و طول ریشه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های میانگه ساقه *Populus*

× euromericana

Table 3. The variance analysis of the interaction effects of the traits, including root No. and root length in regenerated plantlets of *Populus × euromericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	تعداد ریشه (Number of root)		طول ریشه (Root length)	
		میانگین مربعات Mean square	F	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار (Treatment)	8	65.24	1504.45**	73.63	1959.78**
IBA	2	232.64	5351.70**	266.09	7082.34**
NAA	2	9.60	221.35**	6.58	175.11**
IBA × NAA	4	9.64	222.38**	10.92	290.83**
خطا (Error)	18	0.043		0.04	
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		3.85		2.55	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد
**: Significant at 1% probability levels

Cavusoglu *et al.*, 2011;) ۹۰-۸۰ درصد گزارش شده است (Khosravan *et al.*, 2017; Lubrano, 1992; Rutledge and Douglas, 1988). اين موضوع حاكي از توانايي بالاي بالقوه و بالفعل اين گونه هيبريد را نشان مي دهد (شكل ۴).

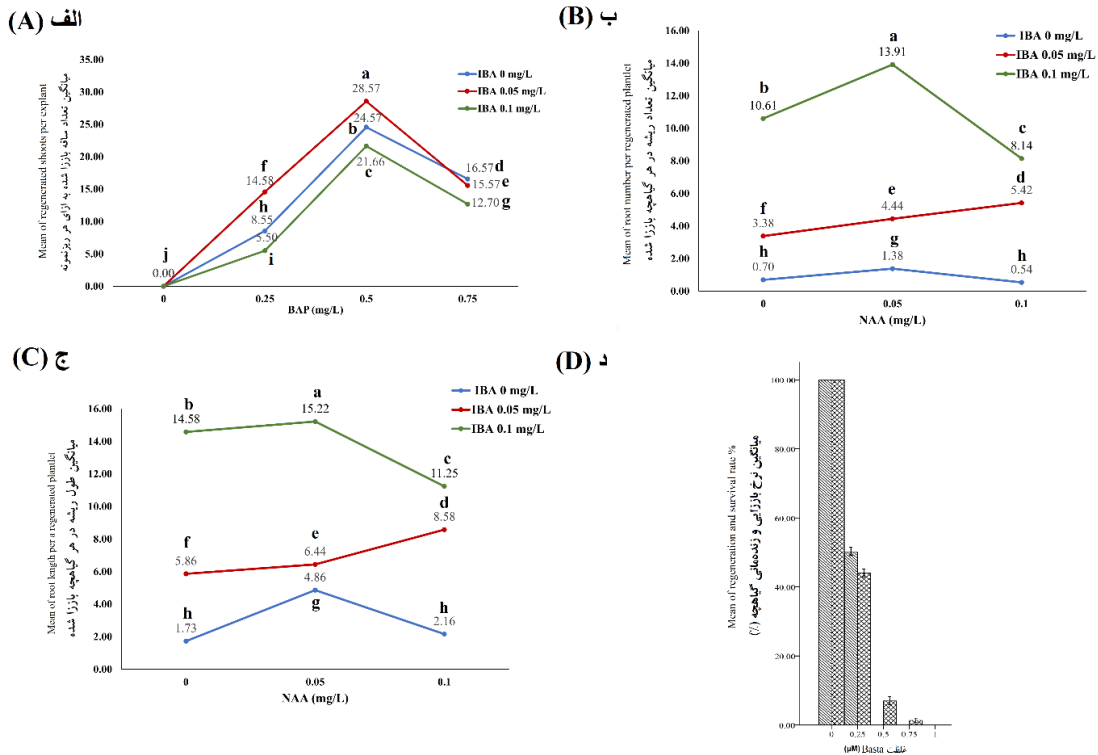
تعيين حداقل غلظت مهاركننده علفكش Basta® در ريزنمونه هاي ميانگره ساقه: باززايي و گزينش گياهان TO به اندازه ريزنمونه، ضخامت آن، نوع گزينش گر گياهي و ميزان حداقل غلظت مهاركننده (Minimum inhibitory concentration, MIC بستگي دارد (Fan *et al.*, 2015; Shestibratov *et al.*, 2010). بنا بر اين، پيش از انتقال ژن به روش آگروباكتريوم در ريزنمونه هاي ميانگره ساقه، تعيين MIC گزينش گر گياهي جهت غربال گياهچه هاي TO، ضروري است. در گزارش هاي متعدد به آنتي بيوتيك كاناماسين و علفكش Basta® به عنوان دو گزينشگر معمول در غربال گياهان *Populus sp.* اشاره شده است (Confalonieri *et al.*, 1997; Confalonieri *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2007; Zelasco *et al.*, 2015). نتايج مقايسه ميانگين مربوط به بررسي ميزان حساسيت و نرخ باززايي و زنده مانني ريزنمونه ها در شكل ۳-د نشان داده شده است. در محيط كشت SIM بدون علفكش Basta®، نرخ باززايي و زنده مانني نمونه ها ۱۰۰ درصد بود. درحالي كه ريزنمونه هاي كشت شده در محيط SIM حاوي علفكش Basta® در غلظت ۰/۲۵ ميكرومولار، نرخ زنده مانني با ميانگين ۰/۵۷ ± ۴۴ درصد را نشان داد. اين نتيجه مابين حساسيت بالاي ريزنمونه ها به علفكش Basta® است. در اين غلظت غير از بحث زنده مانني تقريباً در ۵۰ درصد ريزنمونه ها نشانه هاي باززايي ساقه نيز مشاهده نشد. در محيط كشت SIM حاوي علفكش Basta® ۰/۵ ميكرومولار، ريزنمونه ها حساسيت بسيار بالايي به علفكش Basta® نشان دادند؛ به طوري كه نه تنها باززايي در ريزنمونه ها مشاهده نشد و نرخ زنده مانني ريزنمونه ها نيز به شدت کاهش و در حدود ۰/۳۵ ± ۴ درصد بود. در محيط كشت SIM با غلظت هاي بالاتر علائم قهوه اي يا نكروزه شدن نمونه ها پس از ۳ هفته مشاهده شد. نتايج نشان مي دهد كه محيط كشت SIM حاوي ۰/۵ ميكرومولار Basta®، به طور كامل باعث حذف سلول هاي غير تراريخته مي شود. اين غلظت Basta® بسيار كمتر از غلظت هاي مورد

غلظت هاي مختلف NAA باعث توليد ريشه هاي اندك با طول ۲ تا ۴ سانتيمتر گرديد. در حالي كه تركيب IBA با NAA تاثير مثبتي در افزايش تعداد ريشه و طول ريشه داشت. افزايش غلظت IBA در تركيب با ۰/۰۵ ميلي گرم بر ليتر NAA روند افزايشي معني داري در تعداد ريشه (شكل ۳-ب) و طول ريشه (شكل ۳-ج) نشان داد. با اين حال افزايش غلظت NAA در تركيب با غلظت هاي مختلف IBA در تعداد و طول ريشه اثر منفي دارد. طي نتايج مقايسه ميانگين اثر متقابل IBA و NAA، تركيب فيتوهورمون هاي ۰/۱ ميلي گرم بر ليتر IBA و ۰/۰۵ ميلي گرم بر ليتر NAA داراي بيشترين تعداد ريشه و طول ريشه به ترتيب با ميانگين $SD \pm$ برابر با 0.62 ± 13.913 و 0.38 ± 15.22 است. در شكل ۴-ج گياهان حاوي ريشه پس از ۶ هفته كشت در محيط RIM حاوي فيتوهورمون هاي IBA در غلظت ۰/۱ ميلي گرم بر ليتر و NAA در غلظت ۰/۰۵ ميلي گرم بر ليتر نشان داده شده است. در اغلب گزارش ها باززايي صنوبر سياه (*P. nigra*) و گونه هاي هيبريد آن از فيتوهورمون هاي IBA در غلظت ۰/۵ ميلي گرم بر ليتر و NAA در غلظت ۰/۰۲ ميلي گرم بر ليتر جهت ريشه زايي گياهچه ها استفاده شده است (Biswas *et al.*, 2012; Mohri *et al.*, 1996; Nishiguchi *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008). اگرچه در اين پژوهش ها براي القاي ريشه زايي از غلظت هاي بالاي IBA و NAA استفاده شده است، نتايج ما نشان داد كه غلظت پايين اين دو فيتوهورمون اكسيني باعث القاي ريشه زايي مطلوب در گياهچه هاي باززا شده صنوبر هيبريد مي شود. اين در حالي است كه تاكنون گزارشي از باززايي ساقه و ريشه در اين گونه هيبريد صنوبر سياه ارائه نشده است.

سازگاري و انتقال گياهان ريشه دار شده *Populus × euromericana* به گلخانه: نتايج حاصل از روش به كار رفته در سازگارسازي، نشان داد كه نرخ زنده مانني گياهان باززا طي سازگاري ۱۰۰ درصد است و كليه گياهان باززا شده به طور موفقيت آميز به محيط گلخانه سازگار شدند (شكل ۴-د). در مطالعات قبلي نيز جهت سازگاري گياهان باززا شده در جنس *Populus sp.* از مخلوط ماسه، پرليت و پيت ماس يا خاك برگ با نسبت هاي ۱:۱:۱، مخلوط ماسه و پيت ماس با نسبت ۲:۱ يا نسبت ۱:۱ استفاده شده بود كه ميزان موفقيت و زنده مانني گياهان

مؤثر بوده است (Confalonieri *et al.*, 2000; Shestibratov *et al.*, 2010). با توجه به نتایج آزمون حساسیت علف‌کش Basta® محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میکرومولار علف‌کش Basta® جهت گزینش ریزنمونه‌های مقاوم به علف‌کش Basta®، در طی فرایند تراریختی استفاده شد.

استفاده در سایر مطالعات است (Confalonieri *et al.*, 1997; Confalonieri *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2007; Zelasco *et al.*, 2015). در بسیاری از گزارش‌ها غلظت‌هایی بین ۵ تا ۲۰ میکرومولار از علف‌کش Basta® در گزینش ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ در ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر مربع

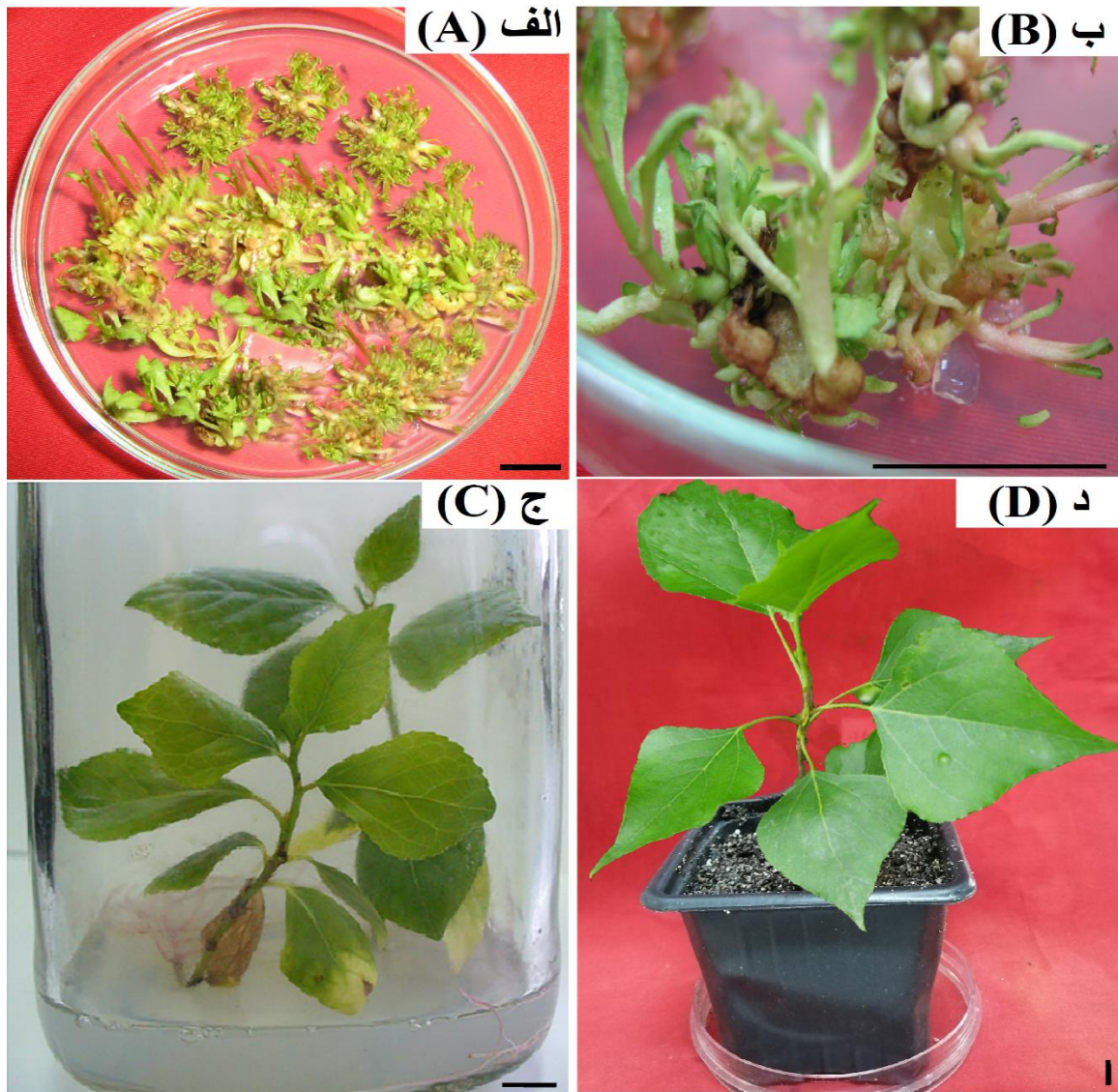


شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل فیتوهورمون‌های مورد استفاده در باززایی مستقیم و تعیین حداقل غلظت مهارکننده Basta® در ریزنمونه‌های میانگره ساقه گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P. x euramericana* Dode Guinier).

Figure 3. The compare means of *in vitro* plant regeneration and MIC of Basta® in internodal stem explants from hybrid black poplar (*P. x euramericana* Dode Guinier).

الف) مقایسه میانگین توان باززایی ریزنمونه‌های میانگره ساقه تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف IBA × BAP (ب) مقایسه میانگین صفت تعداد ریشه در گیاهچه‌های باززا شده تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف IBA × NAA (ج) مقایسه میانگین صفت طول ریشه در گیاهچه‌های باززا شده تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف IBA × NAA (د) تأثیر علف‌کش Basta® حاوی ترکیب فعال فسفینوتریسیس در میزان باززایی و نرخ زنده‌مانی ریزنمونه‌های میانگره ساقه روی محیط‌کشت SIM حاوی پایه MS، BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر) و علف‌کش Basta® در ۵ غلظت مختلف علف‌کش Basta® شامل ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱/۰ میکرومولار کشت شدند. ستون‌های با خطوط مورب نشان دهنده درصد باززایی و ستون‌های با خطوط لوزی شکل نشان دهنده درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها است.

A) The compare mean of shoot induction from internodal stem explant of *P. x euramericana* cultured on SIM with different BAP and IBA combinations. B) The compare mean of root No. in regenerated plantlets of *P. x euramericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations. C) The compare mean of root length in regenerated plantlets of *P. x euramericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations. D) Effect of commercial herbicide Basta® with phosphinothricin active compound on shoot regeneration (Dark grey-colored column) and survival rate (Light grey-colored column) of internodal stem explant of *P. x euramericana* cultured on SIM medium containing basal MS medium supplemented with BAP (0.5 mg/L), IBA (0.05 mg/L) and Basta® in 5 concentrations levels (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 μM) after 6 weeks.



شکل ۴- باززایی مستقیم انبوه با استفاده از بافت میانگره ساقه در گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P. × euramericana* Dode Guinier).
 Figure 4. Direct plant regeneration from internodal stem explant of hybrid black poplar (*P. × euramericana* Dode Guinier) without callus induction.

الف) القای ساقه‌زایی و باززایی پس از ۶ هفته از ریزنمونه‌های میانگره ساقه کشت شده در محیط SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA. ب) نمای نزدیک از باززایی ساقه در یک ریزنمونه میانگره ساقه پس از ۶ هفته در محیط SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA. ج) القای ریشه‌زایی در گیاهچه‌های باززا شده در محیط کشت RIM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA. د) گیاهان درون شیشه‌ای *P. × euramericana* Dode Guinier سازگار شده در اتاقک رشد و شرایط گلخانه‌ای در حال رشد در مخلوط خاک (ماسه، پیت‌ماس و پرلایت به نسبت ۳:۲:۱). خطوط سیاه‌رنگ نشان دهنده واحد اندازه‌گیری ۱ سانتی‌متر هستند.

A) Shoot induction and regeneration after 6 weeks from internodal stem explant cultured on SIM containing MS basal medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) and IBA (0.05 mg/L). B) Closeup view of regenerated shoots from single internodal stem cultured on SIM containing MS basal medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) and IBA (0.05 mg/L). C) Root development in MS basal medium supplemented with IBA (0.1 mg/L) and NAA (0.05 mg/L). D) A hardened in vitro raised *P. × euramericana* Dode Guinier growing in soil mixture (sand, peat moss and perlite in 3:2:1 ratio). Bars indicate 1cm.

تأثیرگذار بر میزان کارایی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم در ریزنمونه میانگره ساقه بررسی شد. در بسیاری از مطالعات پیشین، به لزوم بررسی عوامل تأثیرگذار در انتقال ژن به روش

شیوه‌نامه کارآمد انتقال ژن به روش آگروباکتریوم با استفاده از ریزنمونه‌های میانگره ساقه در *Populus × euramericana* Dode Guinier در این مطالعه، عوامل

غلظت سلول‌های باکتریایی در ۳ سطح OD₆₀₀ برابر با ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ بررسی شد. در این مرحله محیط‌های IM و SIM فاقد AS بوده و مدت‌زمان تیمار ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی نوترکیب ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. نتایج آزمون توزیع نرمال 1-sample K-S داده‌ها نشان داد که داده‌های تعداد گیاهان باززا در تیمارهای مختلف عوامل مؤثر در انتقال ژن بروش آگروباکتریوم با میانگین ۱۶/۰۸۶ و انحراف معیار ۱۸/۲۱ با درجه اطمینان ۹۹ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. نتایج تجزیه واریانس سه عامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه آگروباکتریوم نشان داد که تمام اثرات اصلی و دوجانبه و سه‌جانبه معنی‌دار هستند و بررسی اثر سه‌جانبه می‌تواند بهترین ترکیب سه عاملی را برای استفاده در روش معمول تراریختی معرفی نماید (جدول ۴).

آگروباکتریوم همچون طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت القای ساقه‌زایی، نوع سویه و غلظت سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم، غلظت استوسیرینگون، مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با سلول‌های باکتریایی نوترکیب و طول دوره هم‌کشتی در گونه‌های *Populus sp.* تأکید شده است (Han et al., 2000; Han et al., 2013; Song et al., 2019). بنابراین، در این مطالعه، عواملی همچون مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM، نوع سویه *A. tumefaciens* غلظت سلول‌های باکتریایی (OD₆₀₀) هر سویه، غلظت AS و مدت‌زمان تیمار ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای مورد بررسی طی دو مرحله مورد آزمون قرار گرفتند. در مرحله اول اثر متقابل سه عامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM در چهار سطح ۰، ۳، ۶ و ۹ روز، نوع سویه *A. tumefaciens* شامل دو سویه LBA4404 و EHA105

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر متقابل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه، غلظت سلول‌های باکتریایی (OD₆₀₀) و نوع سویه *A. tumefaciens* بر

درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگه ساقه *P. × euramericana* Dode guinier

Table 4. The variance analysis of the interaction effect of the traits, including preculturing of internodal stem explant in SIM medium, concentration of bacterial suspension (OD₆₀₀) and *A. tumefaciens* strain on frequency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using inter nodal stems explants from *P. × euramericana* Dode guinier

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار Treatment	23	1023.206	1743.688**
نوع سویه باکتری Bacterial strain type	1	383.876	654.179**
غلظت سلول‌های باکتریایی (OD ₆₀₀) Concentration of bacterial cell suspension (OD ₆₀₀)	2	3207.204	5465.531**
مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه Preculturing time	3	2318.246	3950.621**
نوع سویه باکتری × غلظت سلول‌های باکتریایی Strain type × OD ₆₀₀	2	532.881	908.105**
مدت‌زمان پیش‌کشت × غلظت سلول‌های باکتریایی Preculturing time × OD ₆₀₀	6	524.283	893.452**
نوع سویه باکتری × مدت‌زمان پیش‌کشت Strain Type × Preculturing time	3	1414.756	2410.960**
نوع سویه × غلظت سلول‌های باکتریایی × مدت‌زمان پیش‌کشت Strain type × Preculturing time × OD ₆₀₀	6	220.826	376.318**
خطا Error	48	0.587	
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		4.76	

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد
** : Significant at 1% probability level

را داشته است. بر اساس نتایج، پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت SIM به مدت ۶ روز و آلودگی آن‌ها با سلول‌های باکتریایی مستعد *A. tumefaciens* سویه LBA4404 با OD₆₀₀ برابر با ۰/۶ بود که با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیشترین میزان درصد انتقال ژن با میانگین 0.76 ± 0.83 را نشان داد. مقایسه این تیمار با تیمار مشابه با سویه EHA105 نشان می‌دهد که کارایی تیمار مربوط به سویه LBA4404 در حدود ۵/۱۲ برابر بیشتر از سویه EHA105 است.

در جدول ۵، اختلاف میانگین اثر متقابل عوامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه *A. tumefaciens* در درصد فراوانی انتقال ژن یا تراریختی ارائه شده است. بر اساس نتایج با افزایش مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت SIM و افزایش OD₆₀₀ سلول‌های باکتریایی درصد فراوانی انتقال ژن در ریزنمونه‌ها افزایش یافته است. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که سویه LBA4404 به‌عنوان سویه با قدرت بیماری‌زایی پایین بیشترین میزان کارایی انتقال ژن

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه *A. tumefaciens* بر درصد

فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه *P. × euramericana* Dode guinier

Table 5. The compare mean of the interaction effect of the traits, including preculturing of internodal stem explant in SIM medium, concentration of bacterial suspension (OD600) and *A. tumefaciens* strain on frequency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using internodal stems explants from *P. × euramericana* Dode guinier

تیمار Treatment	نوع سویه باکتری <i>A. tumefaciens</i> Agrobacterium strain	پیش‌کشت ریزنمونه (روز) Explant preculturing Time (day)	OD ₆₀₀	درصد فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation frequency (%)	
				میانگین Mean	انحراف استاندارد SD
1	LBA4404	0	0.3	0.00k	0.00
2	LBA4404	0	0.6	0.00k	0.00
3	LBA4404	0	0.9	0.00k	0.00
4	LBA4404	3	0.3	21.67f	1.53
5	LBA4404	3	0.6	43.00c	1.00
6	LBA4404	3	0.9	6.50j	0.50
7	LBA4404	6	0.3	35.00d	1.00
8	LBA4404	6	0.6	68.83a	0.76
9	LBA4404	6	0.9	13.25h	1.00
10	LBA4404	9	0.3	0.00k	0.00
11	LBA4404	9	0.6	33.50d	1.00
12	LBA4404	9	0.9	0.00k	0.00
13	EHA105	0	0.3	0.00k	0.00
14	EHA105	0	0.6	0.00k	0.00
15	EHA105	0	0.9	0.00k	0.00
16	EHA105	3	0.3	10.00i	0.50
17	EHA105	3	0.6	21.50f	1.00
18	EHA105	3	0.9	4.67j	0.57
19	EHA105	6	0.3	28.50e	1.50
20	EHA105	6	0.6	13.50h	1.00
21	EHA105	6	0.9	1.33k	0.57
22	EHA105	9	0.3	21.33f	1.25
23	EHA105	9	0.6	47.33b	0.29
24	EHA105	9	0.9	17.16g	0.29
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)				57.24	

شده و ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه تلقیح شدند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، اثر غلظت AS بر درصد فراوانی انتقال ژن

جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف AS، غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار AS به محیط‌کشت IM و SIM اضافه

یک ساعت تلقیح کردند، به طوری که فراوانی انتقال ژن ریزنمونه‌ها در حدود ۳۶۳ درصد بود. در مقایسه با نتایج مطالعات قبلی، تلقیح ریزنمونه‌های میانگره ساقه پیش کشت شده به مدت ۶ روز با سوسپانسیون سلول باکتریایی نوترکیب سویه LBA4404 ($OD_{600} = 0.6$) حاوی استوسپیرینگون $100\mu M$ به مدت ۱۰ دقیقه میزان کارایی انتقال ژن ۹۳/۳۳ درصد در گیاه صنوبر سیاه هیبرید نشان داد.

تعیین تعداد نسخه ترانس ژن در گیاهان TO: الگوی درج DNA انتقالی در گیاهان TO منتخب به روش لکه گذاری سادرن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ژنوم رخدادهای تراخیختی منتخب یک یا دو نسخه از ترانس ژن حاوی ژن *gus* درج شده است (شکل ۵-ج). این وضعیت با توجه به رواج تکثیر غیرجنسی در صنوبر مشکلی در هموزیگوت سازی مکان ژنی نداشته و به خاطر قابلیت تکثیر غیرجنسی در طول نسل‌های متمادی می‌توان از پایداری همی‌زیگوتی گیاهان تراخیخته بهره‌مند شد.

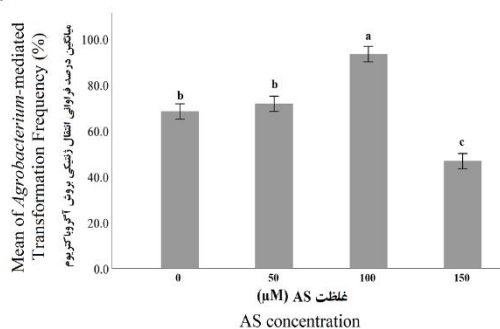
تأیید بیان ژن *gus* به روش RT-PCR: بیان پایدار ژن *gus* در گیاهان TO صنوبر سیاه هیبرید با استفاده از واکنش RT-PCR تأیید گردید. همان‌طور که در شکل ۵-د نشان داده شده است، آثاری از تکثیر cDNA مربوط به ژن *gus* در گیاه غیر تراخیخته مشاهده نشد. بر اساس نتایج RT-PCR، در هر ۵ گیاه تراخیخته TO-1 تا TO-5، نسخه برداری mRNA ژن *gus* تأیید شد.

در شکل ۵-ه نتایج مربوط به آزمون هیستوشیمیایی ژن *uidA* و بیان پایدار *gus* در برگ گیاهان پنج رخداد تراخیختی منتخب (TO-1, TO-2, TO-3, TO-4 and TO-5) نشان داده شده است. به نظر می‌رسد بین بیان کیفی ژن *uidA* تفاوت معنی داری دیده نمی‌شود، ولی می‌توان به روش اسپکتروسکوپی به مطالعه کمی تغییرات بین رخدادهای تک ژنی و دو ژنی مبادرت نمود. با توجه به مکان درج متفاوت ژن‌ها و اثر موضعی ژن‌های درج شده احتمال تفاوت در میزان بیان ژن‌های انتقالی وجود داشته و لازم است این موضوع در پروژه‌های مربوط به ایجاد صفات مهم اقتصادی بررسی گردد.

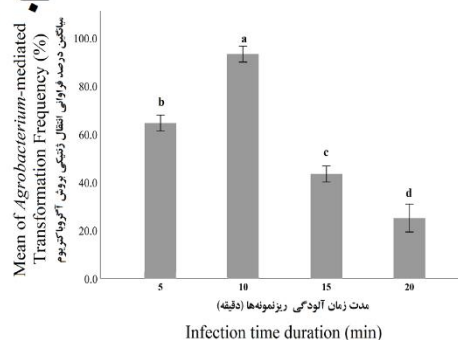
ریزنمونه‌های میانگره ساقه، بین ۴ تیمار مورد بررسی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ادرصد وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین ۴ غلظت AS نشان می‌دهد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین درصد فراوانی انتقال ژن را دارد؛ در حالی که اختلاف معنی داری بین تیمارهای ۰ و ۵۰ میکرومولار مشاهده نشد. در شکل ۵-الف، نمودار درصد فراوانی انتقال ژن در ۴ غلظت AS نشان داده شده است. بر اساس نتایج، AS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به عنوان غلظت بهینه در انتقال ژن به روش آگروباکتریوم در نظر گرفته شد. کونفالیونیری و همکاران (Confalonieri et al., 2000) بالاترین درصد فراوانی انتقال ژن را به ترتیب با استفاده از محیط کشت تلقیح حاوی AS ۱۵۰ میکرومولار به دست آوردند. لیکن، نتایج بررسی غلظت‌های AS روی ریزنمونه‌های میانگره ساقه نشان می‌دهد که غلظت بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار تأثیر منفی در درصد انتقال ژن دارد و به دلیل افزایش شدت آلودگی باکتریایی علائمی همچون رشد بیش از حد باکتری‌ها و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها ایجاد شد.

پس از تعیین غلظت بهینه AS، مدت زمان آلودگی ریزنمونه‌ها با سلول‌های باکتریایی نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، کلیه عوامل تأثیرگذار در غلظت بهینه تثبیت شده و فقط مدت زمان آلودگی ریزنمونه میانگره ساقه در ۴ تیمار شامل ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۵-ب، نمودار مقایسه میانگین هر یک از تیمارها و میزان اختلاف آن‌ها نشان داده شده است. بر اساس نتایج، ۱۰ دقیقه تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط کشت IM حاوی سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم سویه LBA4404 با غلظت OD_{600} برابر با ۰/۶ و AS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین درصد فراوانی انتقال ژن با میانگین $1/77 \pm 93/33$ را نشان داد. یووتوشنکو و میسرا (Yevtushenko and Misra, 2010) توانستند انتقال ژن به روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه در صنوبر سیاه هیبرید *P. nigra* L. × *P. maximowiczii* A. Henry انجام دهند. آن‌ها ریزنمونه‌های میانگره ساقه را با سوسپانسیون باکتریایی آگروباکتریوم سویه MP90 ($OD_{600} = 0.5$) به مدت

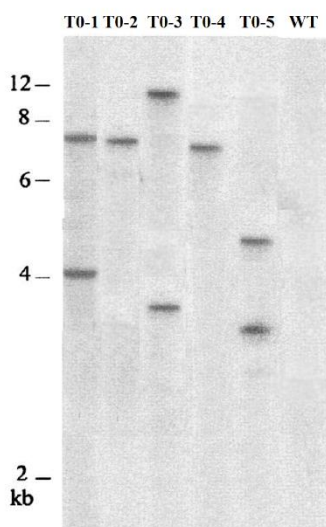
(A) الف



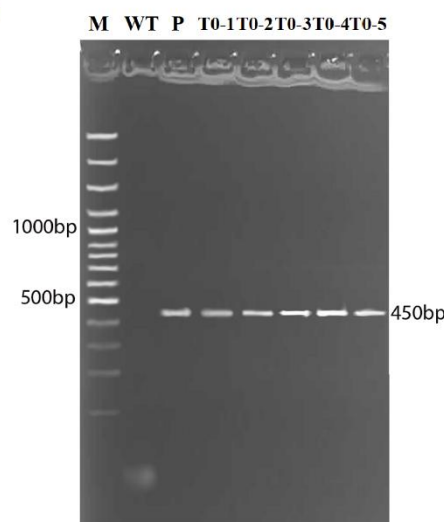
(B) ب



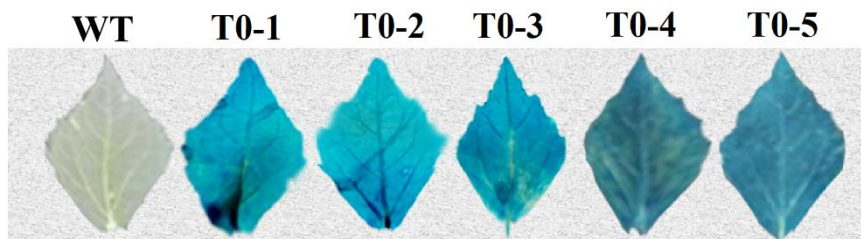
(C) ج



(D) د



(E) هـ



شکل ۵- مقایسه میانگین درصد فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم در غلظت‌های مختلف AS و مدت‌زمان تلقیح با سوسپانسیون باکتریایی Figure 5. The compare means of *Agrobacterium*-mediated transformation frequency of the internodal stem explant under the influence of Acetosyringone concentration and inoculation time

الف) نمودار مقایسه میانگین اثر غلظت AS بر درصد فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم. ب) نمودار مقایسه میانگین اثر مدت‌زمان آلودگی ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتریایی *A. tumefaciens* سویه LBA4404 ($OD_{600} = 0.6$) بر درصد فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم. ج) آنالیز لکه‌گذاری سادرین در گیاهان T0 صنوبر سیاه هیبرید منتخب (T0-1 تا T0-5) و گیاه غیر تراریخته (WT) که درج پایدار ژن *gus* را در DNA ژنومی برش یافته با آنزیم‌های برشی محدود کننده *EcoRI* و *HindIII* نشان می‌دهد. د) آنالیز RT-PCR گیاهان T0 و غیر تراریخته. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه cDNA ژن *gus* (۴۵۰ جفت‌باز) در ۵ گیاه T0 منتخب انجام شد. M: نشانگر DNA وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز؛ P: کنترل مثبت DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301: WT: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخته)؛ T0-1-T0-5: نوار DNA محصول PCR از cDNA ژن *gus* در ۵ گیاه صنوبر سیاه هیبرید T0 منتخب (T0-1 تا T0-5). ه) آزمون هیستوشیمیایی GUS در نمونه‌های برگ گیاهان تراریخته و ۵ گیاه T0 پس از ۳ ماه رشد.

A) The compare means of *Agrobacterium*-mediated transformation frequency in different AS concentrations, including 0, 50, 100 and 150 μM. B) The compare means of GUS-positive transformation frequency in different inoculation times, including 5, 10, 15 and 20 mins using bacterial suspension of *A. tumefaciens* strain LBA4404 ($OD_{600} = 0.6$). C) Southern blot analysis of five independent T0 poplar plants of T0-1 - T0-5 (Lanes T0-1-T0-5) and untransformed plant (Lane WT) reveals stable insertion of the *gus* gene in the genomic DNAs digested with *EcoRI* and *HindIII* restriction enzymes. D) RT-PCR analysis of the control and T0 transgenic plants. The RT-PCR reaction were performed using GUS-specific primer pair to specifically amplify the 450 bp GUS fragment in the five T0 plants. Lane M, DNA ladder 100 bp; P, positive control (plasmid pCAMBIA3301); WT, negative control (wild type plant); Lanes T0-1 to T0-5, PCR product from GUS-related cDNA of T0 hybrid black poplars. E) GUS assays in the leaf samples of the three month-old control and T0 plants.

بوده و بر همین اساس چشم‌انداز روشنی برای تولید گیاهان صنوبر اقتصادی، قابل پیش‌بینی است.

سپاسگزاری

این پژوهش تحت حمایت مادی و معنوی آزمایشگاه مهندسی ژنتیک، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز صورت گرفته است.

با توجه به این‌که این‌گونه هیبرید از نظر تولید بیوماس سلولزی و کاربرد آن در صنایع مختلف همچون خمیر چوب و کاغذ، بیواتانول و فراورده‌های سلولزی بسیار حائز اهمیت است، از دستاورد این پژوهش می‌توان برای تولید صنوبرهای سیاه هیبرید تراریخته با صفات مطلوب بهره‌مند شد. ویرایش ژنتیکی به‌روش CRISPR/Cas9 نیازمند برخورداری از شیوه‌نامه باززایی انبوه

References

- Abbas, M., Peszlen, I., Shi, R., Kim, H., Katahira, R., Kafle, K., Xiang, Z., Huang, X., Min, D. and Mohamadamin, M. (2020). Involvement of Cesa4, Cesa7-A/B and Cesa8-A/B in secondary wall formation in *Populus trichocarpa* wood. *Tree Physiology*, **40**: 73-89.
- Agrawal, V. and Gupta, S.C. (1991). In vitro plantlet development from explants of 25-year-old trees of *Populus × euramericana*—a hybrid poplar. *Plant Science*, **78**: 99-105.
- Alba, N. (1992). Mejora genética de *Populus alba* L. *El cultivo de álamos y Sauces Actas de la 19 sesión de la Comisión Internacional del Alamo (IPC) Zaragoza*, **25**: 157-168.
- Arend, M. and Fromm, J. (2007). Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiology*, **27**: 985-992.
- Bae, E.K., Lee, H., Lee, J.S. and Noh, E.W. (2011). Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). *Gene*, **483**: 43-48.
- Balestrazzi, A., Bonadei, M., Quattrini, E. and Carbonera, D. (2009). Occurrence of multiple metal-resistance in bacterial isolates associated with transgenic white poplars (*Populus alba* L.). *Annals of Microbiology*, **59**: 17-23.
- Bali, G., Khunsupat, R., Akinosho, H., Payyavula, R.S., Samuel, R., Tuskan, G.A., Kalluri, U.C. and Ragauskas, A.J. (2016). Characterization of cellulose structure of *Populus* plants modified in candidate cellulose biosynthesis genes. *Biomass and Bioenergy*, **94**: 146-154.
- Biswal, A.K., Hao, Z., Pattathil, S., Yang, X., Winkeler, K., Collins, C., Mohanty, S.S., Richardson, E.A., Gelineo-Albersheim, I. and Hunt, K. (2015). Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, **8**: 1-26.
- Biswas, K.K., Mohri, T., Kogawara, S., Hase, Y. and Oono, Y. (2012). An improved system for shoot regeneration from stem explants of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *Italica* Koehne). *American Journal of Plant Sciences*, **3**: 1181.
- Bjurhager, I., Olsson, A.M., Zhang, B., Gerber, L., Kumar, M., Berglund, L.A., Burgert, I., Sundberg, B.R. and Salmén, L. (2010). Ultrastructure and mechanical properties of *Populus* wood with reduced lignin content caused by transgenic down-regulation of cinnamate 4-hydroxylase. *Biomacromolecules*, **11**: 2359-2365.
- Bonadei, M., Zelasco, S., Giorcelli, A., Gennaro, M., Calligari, P., Quattrini, E., Carbonera, D. and Balestrazzi, A. (2012). Transgene stability and agronomical performance of two transgenic Basta®-tolerant lines of *Populus alba* L. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **146**: 33-40.
- Bruegmann, T., Polak, O., Deecke, K., Nietsch, J. and Fladung, M. (2019) Poplar Transformation. In: Kumar, S., Barone, P. and Smith, M., Eds., *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, pp. 165-177, Springer New York, USA.
- Bryan, A.C., Jawdy, S., Gunter, L., Gjersing, E., Sykes, R., Hinchee, M.A., Winkeler, K.A., Collins, C.M., Engle, N. and Tschaplinski, T.J. (2016). Knockdown of a laccase in *Populus deltoides* confers altered cell wall chemistry and increased sugar release. *Plant Biotechnology Journal*, **14**: 2010-2020.

- Buhl, C., Meilan, R. and Lindroth, R.L.** (2017). Genetic modification of lignin in hybrid poplar (*Populus alba* × *Populus tremula*) does not substantially alter plant defense or arthropod communities. *Journal of Insect Science*, **17**(3): 76.
- Cai, Y., Zhang, K., Kim, H., Hou, G., Zhang, X., Yang, H., Feng, H., Miller, L., Ralph, J. and Liu, C.J.** (2016). Enhancing digestibility and ethanol yield of *Populus* wood via expression of an engineered monoglucosyl 4-O-methyltransferase. *Nature Communications*, **7**: 11989.
- Caruso, A., Cheddor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F.M., Kahlem, G. and Morabito, D.** (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 932-941.
- Cavusoglu, A., Ipekci-Altas, Z., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N. and Zehir, A.** (2011). Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with tissue culture. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 3216-3221.
- Che, D., Meagher, R.B., Heaton, A.C., Lima, A., Rugh, C.L. and Merkle, S.A.** (2003). Expression of mercuric ion reductase in Eastern cottonwood (*Populus deltoides*) confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotechnology Journal*, **1**: 311-319.
- Chen, F., Liu, C.J., Tschaplinski, T.J. and Zhao, N.** (2009). Genomics of secondary metabolism in *Populus*: interactions with biotic and abiotic environments. *Critical Reviews in Plant Science*, **28**: 375-392.
- Confalonieri, M., Allegro, G., Balestrazzi, A., Fogher, C. and Delledonne, M.** (1998). Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (KTI 3) gene. *Molecular Breeding*, **4**: 137-145.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A. and Bisoffi, S.** (1994). Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, **13**: 256-261.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S. and Carbonera, D.** (2003). In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **72**: 109-138.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A. and Cella, R.** (1997). Genetic transformation of *Populus deltoides* and *Px euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **48**: 53-61.
- Confalonieri, M., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Negri, S., Facciotto, G., Schenone, G. and Delledonne, M.** (2000). Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, **19**: 978-982.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W. and Marraffini, L.A.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**: 819-823.
- Dai, W., Cheng, Z.M. and Sargent, W.** (2003). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from in vitro leaf tissues. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **39**: 6-11.
- Dashchi, S., Rahnama, H., Cheghamirza, K. and Zamani, K.** (2021). Construction of plant expression vectors harboring WRI1 and LPAAT genes and its transformation in tobacco plants. *Plant Genetic Researches*, **7**(2): 41-54 (In Persian).
- Delledonne, M., Allegro, G., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Picco, F., Levine, A., Zelasco, S., Calligari, P. and Confalonieri, M.** (2001). Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding*, **7**: 35-42.
- Dharmawardhana, P., Brunner, A.M. and Strauss, S.H.** (2010). Genome-wide transcriptome analysis of the transition from primary to secondary stem development in *Populus trichocarpa*. *BMC Genomics*, **11**: 150.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Du, N., Liu, X., Li, Y., Chen, S., Zhang, J., Ha, D., Deng, W., Sun, C., Zhang, Y. and Pijut, P.M.** (2012). Genetic transformation of *Populus tomentosa* to improve salt tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **108**: 181-189.

- Fan, D., Li, C., Fan, C., Hu, J., Li, J., Yao, S., Lu, W., Yan, Y. and Luo, K.** (2020). MicroRNA6443-mediated regulation of FERULATE 5-HYDROXYLASE gene alters lignin composition and enhances saccharification in *Populus tomentosa*. *New Phytologist*, **226**: 410-425.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. and Luo, K.** (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific Reports*, **5**: 1-7.
- Foston, M., Hubbell, C.A., Samuel, R., Jung, S., Fan, H., Ding, S.Y., Zeng, Y., Jawdy, S., Davis, M. and Sykes, R.** (2011). Chemical, ultrastructural and supramolecular analysis of tension wood in *Populus tremula* x *alba* as a model substrate for reduced recalcitrance. *Energy & Environmental Science*, **4**: 4962-4971.
- Gallagher, S.R.** (1992) *Quantitation of GUS Activity by Fluorometry*. Academic Press INC, Sandiego, California, USA.
- Green, M.R. and Sambrook, J.** (2020). Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2020**: 232-238.
- Han, K.H., Meilan, R., Ma, C. and Strauss, S.** (2000). An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports*, **19**: 315-320.
- Han, X., Ma, S., Kong, X., Takano, T. and Liu, S.** (2013). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar *Populus davidiana* Dode × *Populus bollena* Lauche. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 2515-2528.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J. and Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, **303**: 179-180.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, **2**: 208-218.
- Hori, C., Takata, N., Lam, P.Y., Tobimatsu, Y., Nagano, S., Mortimer, J.C. and Cullen, D.** (2020). Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in *Populus*. *Scientific Reports*, **10**: 1-13.
- Igasaki, T., Ishida, Y., Mohri, T., Ichikawa, H. and Shinohara, K.** (2002). Transformation of *Populus alba* and direct selection of transformants with the herbicide bialaphos. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute*, **1**: 235-240.
- Jiang, C., Liu, Z. and Zheng, Q.** (2015). Direct regeneration of plants derived from in vitro cultured shoot tips and leaves of poplar (*Populus* × *euramericana* 'Neva'). *Journal of Life Sciences*, **9**: 366-372.
- Khosravan, S., Mirzaie-Nodoushan, H., Ghamari Zare, A. and Ebrahimi, M.A.** (2017). Different responses of poplar inter-specific hybrids to micropropagation. *Scientific Journal Management System*, **25**: 43-56.
- Kim, H., Li, Q., Karlen, S.D., Smith, R.A., Shi, R., Liu, J., Yang, C., Tunlaya-Anukit, S., Wang, J.P. and Chang, H.M.** (2020). Monolignol benzoates incorporate into the lignin of transgenic *Populus trichocarpa* depleted in C3H and C4H. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **8**: 3644-3654.
- Lubrano, L.** (1992) Micropropagation of poplars (*Populus* spp.) in *High-Tech and Micropropagation II* pp. 151-178, Springer, Berlin, Heidelberg, DE.
- Mohri, T., Yamamoto, N. and Shinohara, K.** (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *Italica* Koehne) using stem segments. *Journal of Forest Research*, **1**: 13-16.
- Movahedi, A., Wei, H., Chen, Z.H., Sun, W., Zhang, J., Li, D., Yang, L. and Zhuge, Q.** (2021). Highly efficient CRISPR-mediated homologous recombination via NHEJ deficiency rather than HDR factors overexpression in *Populus*. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.04.188219>.
- Muhr, M., Paulat, M., Awwanah, M., Brinkkötter, M. and Teichmann, T.** (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus* BRANCHED1 and BRANCHED2 orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. *Tree Physiology*, **38**: 1588-1597.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Nayeri, S., Baghban Kohnhrouz, B., Ahmadikhah, A. and Mahna, N.** (2022). CRISPR/Cas9-mediated P-CR domain-specific engineering of CESA4 heterodimerization capacity alters cell wall

- architecture and improves saccharification efficiency in poplar. *Plant Biotechnology Journal*, **2022**: 1-16
- Nishiguchi, M., Yoshida, K., Mohri, T., Igasaki, T. and Shinohara, K.** (2006). An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *Italica*). *Journal of Forest Research*, **11**: 175-180.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J., Van Veen, R.J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuinck, T.J. and Schilperoort, R.A.** (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, **7**: 15-29.
- Pintarić, B.** (2008). Micropropagation of white poplar (*Populus alba* L.). *Šumarski List*, **132**: 343-354.
- Raj, S., Bräutigam, K., Hamanishi, E.T., Wilkins, O., Thomas, B.R., Schroeder, W., Mansfield, S.D., Plant, A.L. and Campbell, M.M.** (2011). Clone history shapes *Populus* drought responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**: 12521-12526.
- Rani, V., Parida, A. and Raina, S.** (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports*, **14**: 459-462.
- Rishi, A., Nelson, N.D. and Goyal, A.** (2001). Genetic modification for improvement of *Populus*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **7**: 7-21.
- Rutledge, C.B. and Douglas, G.** (1988). Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar in vitro. *Physiologia Plantarum*, **72**: 367-373.
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J.R., Bhalerao, R.P., Boerjan, W. and Rohde, A.** (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *The Plant Cell*, **19**: 2370-2390.
- Saieed, N.T., Douglas, G. and Fry, D.** (1994). Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus culture. *Tree Physiology*, **14**: 1-16.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2006). Transformation of *E. coli* by electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2006** (1). doi: 10.1101/pdb.prot3933.
- Shestibratov, K., Bulatova, I. and Novikov, P.** (2010). In vitro response of transgenic aspen containing glutamine synthetase gene GSI to the sublethal dose of phosphinothricin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46**: 763-768.
- Song, C., Lu, L., Guo, Y., Xu, H. and Li, R.** (2019). Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Commercial Hybrid Poplar *Populus Alba* × *Populus glandulosa* Uyeki. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**: 2594.
- Stanculescu, I., Badea, A., Marculescu, C., Khachatryan, L. and Boldor, D.** (2018). Reaction constants and activation energies in pyrolysis for *Populus Alba*. *University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, **80**: 65-74.
- Street, N.R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., Rodríguez-Acosta, M., Nilsson, P., Jansson, S. and Taylor, G.** (2006). The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *The Plant Journal*, **48**: 321-341.
- Tao, Y.Z., Li, F. and Li, Y.** (2008). Establishment of tissue culture regeneration system of *Populus nigra* var. *thevestina*. *Journal of Northwest A&F University*, **37**: 203-207.
- Triozzi, P.M., Schmidt, H.W., Dervinis, C., Kirst, M. and Conde, D.** (2021). Simple, efficient and open-source CRISPR/Cas9 strategy for multi-site genome editing in *Populus tremula* × *alba*. *Tree Physiology*, **41**: 2216-2227.
- Xin, H., Zhang, T., Wu, Y., Zhang, W., Zhang, P., Xi, M. and Jiang, J.** (2020). An extraordinarily stable karyotype of the woody *Populus* species revealed by chromosome painting. *The Plant Journal*, **101**: 253-264.
- Xu, W., Cheng, H., Zhu, S., Cheng, J., Ji, H., Zhang, B., Cao, S., Wang, C., Tong, G. and Zhen, C.** (2021). Functional understanding of secondary cell wall cellulose synthases in *Populus trichocarpa* via the Cas9/gRNA-induced gene knockouts. *The New Phytologist*, **231**: 1478.

- Yevtushenko, D.P. and Misra, S.** (2010). Efficient Agrobacterium-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L.× *P. maximowiczii* A. Henry. *Plant Cell Reports*, **29**: 211-221.
- Yoo, C.G., Yang, Y., Pu, Y., Meng, X., Muchero, W., Yee, K.L., Thompson, O.A., Rodriguez, M., Bali, G. and Engle, N.L.** (2017). Insights of biomass recalcitrance in natural *Populus trichocarpa* variants for biomass conversion. *Green Chemistry*, **19**: 5467-5478.
- Zelasco, S., Ressegotti, V., Confalonieri, M., Carbonera, D., Calligari, P., Bonadei, M., Bisoffi, S., Yamada, K. and Balestrazzi, A.** (2007). Evaluation of MAT-vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of ipt marker-free transgenic plants by 'single-step transformation'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **91**: 61-72.
- Zhang, W., Wang, Y., Diao, S., Zhong, S., Wu, S., Wang, L., Su, X. and Zhang, B.** (2021). Assessment of epigenetic and phenotypic variation in populus nigra regenerated via sequential regeneration. *Frontiers in Plant Science*, **2**: 632088.

Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Analysis of Transgenic Plants in Hybrid Black Poplar (*Populus × euromericana* Dode Guinier)

Shahnoush Nayeri¹ and Bahram Baghban Kohnehrouz^{2,*}

- 1- Ph.D., Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: January 25, 2022 - Accepted: March 15, 2022)

Abstract

Black poplar (*Populus × euramericana* Dode Guinier) is an industrially important tree with broad applications in wood and paper, biofuel and cellulose-based industries as well as plant breeding programs and soil phytoremediation approaches. Here, we have focused on development of direct shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation protocols using the *in vitro* internodal stem tissue from hybrid black poplar. To obtain efficient plant regeneration, the internodal stem explant was cultured on SIM and RIM medium containing different concentrations of BAP × IBA and IBA × NAA, respectively. The crucial factors involved in genetic transformation have been evaluated to achieve *Agrobacterium*-mediated transformation protocol. We achieved fast and highly potential shoot regeneration from the explants cultured on SIM containing BAP 0.5mg/L and IBA 0.05mg/L with 28.57 shoots per explant. The normal roots developed from the plantlets cultured on RIM containing IBA 0.1mg/L and NAA 0.05mg/L and 100% of the regenerated plants were hardened and transferred to the greenhouse condition. Our results indicated that 0.5 μM Basta® could provide a stringent selection for the inhibition of non-transformed cells. We also obtained the highest transformation efficiency of 93.33% through preculturing the explants for 6 days and dipping into IM medium containing *A. tumefaciens* strain LBA4404 ($OD_{600} = 0.6$) and 100 μM AS for 10 min. The Southern blotting analysis, RT-PCR and GUS histochemical analysis were confirmed the stable single or two-copies *gus* transgenesis in the genomic DNA and its expression in the selected T0 generation plants. The findings indicate that these protocols could be used for genetic engineering approaches in hybrid black poplar.

Keywords: Direct regeneration, GUS gene expression, Southern blotting, Internodal stem, *Populus × euramericana*

* Corresponding Author, E-mail: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir