



تراریختی گوجه فرنگی با ژن پیروفسفاتاز واکوئلی (AVP1) در جهت افزایش تحمل آن به شوری

Transformation of tomato with vacuolar Pyrophosphatase gene (AVP1) to enhance salt tolerance

ابراهیم دورانی* و محمود تورچی

Ebrahim Dorani* and Mahmod toorchi

گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: dorani@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۰ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۶/۲۷)

Received: 2023/11/04 | Accepted: 2024/04/29 | Published: 2024/09/17

Abstract

Genetic engineering becomes a hopeful tool to develop stress tolerance transgenic plants including salt tolerance transgenic plants. The subject of this study was the transformation of tomato with a vascular antiporter gene using Agrobacterium. The pBZP plasmid harboring AVP1 gene was transferred to *E.coli* for amplification and then transferred to Agrobacterium for tomato transformation. Cotyledon and hypocotyl explants inoculated with recombinant Agrobacterium transferred to MS medium supplemented with three concentrations of BAP for plant regeneration. Analysis of variance showed there was no interaction between BAP and explant type in regeneration capacity but both explant and BAP concentration in medium had significant effect on transformation efficiency. Mean comparison using Duncan multiple range test at 5 percent level showed that highest regeneration of transgenic plants achieved in MS medium supplemented with 2 mg/L BAP. Regeneration efficiency from Cotyledon explant was more than cotyledonary explants. Genomic DNA of putative transgenic plants extracted and analyzed by PCR for presence of transgene using AVP1 gene specific primers. The results showed 440 bp of AVP1 amplicon in transgenic plants. The transgenic plants transferred to greenhouse for next investigations.

Key words: Salt tolerance, cotyledon, vacuole, membrane pump

رفرانس دهی این مقاله Citation

Dorani E, Toorchi M. (2024). Transformation of tomato with vacuolar pyrophosphatase gene (AVP1) to enhance salt tolerance. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (1) : 3, 22-30. Doi: 10.61186/gebsj.13.1.9.

URL: <http://gebsj.ir/article-1-475-fa.html>

دورانی ا، تورچی م. (۱۴۰۳). تراریختی گوجه فرنگی با ژن پیروفسفاتاز واکوئلی (AVP1) در جهت افزایش تحمل آن به شوری. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. دوره ۱۳ شماره ۱ صفحه ۲۲-۳۰.

URL: <http://gebsj.ir/article-1-475-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal Volume 13, Number 1, 2024

خلاصه

امروزه مهندسی ژنتیک به یکی از ابزار امیدوار کننده برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های زیستی از جمله تنش شوری تبدیل شده است. هدف از این تحقیق، انتقال ژن پیروفسفاتاز واکوئلی آرابیدوبسیس به گیاه گوجه فرنگی با استفاده از آگروباکتریوم بود. وکتور نو ترکیب pPZP حامل ژن AVP1 ابتدا به باکتری اکولای جهت تکثیر و سپس به باکتری آگروباکتریوم جهت تراریختی گیاه گوجه فرنگی انتقال یافت. ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل تلقیح یافته با آگروباکتریوم حاوی وکتور نو ترکیب پس از هم‌کشتی با آگروباکتریوم جهت باززایی در محیط کشت تکمیل شده با سه غلظت مختلف BAP کشت شدند. بین ریزنمونه و تنظیم کننده رشد گیاهی BAP اثر متقابل معنی‌داری در باززایی نوساقه‌های تراریخته مشاهده نشد، ولی اثر میزان BAP و نوع ریزنمونه در تراریختی گیاه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که از محیط تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر BAP گیاهان تراریخت بیشتری باززا شدند. همچنین درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیل بهتر بود. به منظور بررسی مولکولی گیاهچه‌های احتمالا تراریخت، استخراج DNA از نمونه‌ها انجام و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن AVP1، PCR صورت گرفت. نتایج حاصل وجود محصول واکنش با طول ۴۴۰ جفت باز ژن AVP1 را نشان داد. در مرحله بعد گیاهان تراریخت جهت تولید بذر به گلخانه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: تحمل به شوری، کوتیلدون، واکوئل، پمپ غشایی

مقدمه

Introduction

در کشاورزی مهم‌ترین عامل کاهش عملکرد، تنش‌های غیرزنده (دمای بالا، سرما، یخ‌زدگی، کمبود آب ناشی از خشکی یا شوری، شدت تابش نور خورشید، غرقاب شدن، نور ماورای بنفش و فلزات سنگین) معرفی شده است. اکثر این تنش‌های محیطی به طور مستقیم یا غیرمستقیم موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش‌پذیر شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شوند (Mittler et al. 2004). بیش از ۵۰ درصد زمین‌های کشاورزی با مشکل شوری مواجه هستند که موجب کاهش قابل توجهی در عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند (Gou, et al, 2022).

گوجه‌فرنگی (*Solanum Lycopersicon*)، از جنبه‌های غذایی، اقتصادی و علمی از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به حساسیت این گیاه زراعی نسبت به تنش‌های غیر زیستی، بهینه‌سازی روش‌های مهندسی ژنتیک این گیاه در جهت بهبود شرایط کمی و کیفی آن، ضروری می‌باشد، از طرفی با توجه به وسعت بالای زمین‌های شور ایران، شناسایی، همسانه‌سازی، معرفی ژن‌ها و تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری ضروری می‌باشد. در زمینه تولید گیاهان تراریخته متحمل به شوری

زندگی انسان بطور عمده تحت تاثیر سه عامل کمبود مواد غذایی، مشکلات سلامتی و مسائل زیست محیطی قرار گرفته است. غذا و سلامتی از نیازهای اساسی بشر است. با توجه به افزایش جمعیت جهان، نیاز مبرم به تامین مواد غذایی سالم با قیمت مناسب اهمیت زیادی دارد. با وجود تلاش‌های فراوان در افزایش تولیدات کشاورزی، تولید مواد غذایی کنونی جهان بسیار پایین‌تر از نیازهای بشر است (Khan et al. 2016). یکی از راه حل‌های پیشرو برای غلبه بر این کمبود، استفاده از فن‌آوری‌های جدید از جمله زیست‌فناوری می‌باشد (باقری‌راد و همکاران، ۱۳۹۷). در کنار رویکردهای سنتی، امروزه روش‌های مهندسی ژنتیک ضمن کوتاه کردن دوره طولانی اصلاح گیاهان، برنامه‌های اصلاحی گیاهان را هدفمندتر کرده است. در روش‌های اصلاحی مرسوم، تعداد زیادی ژن‌های اختصاصی و غیراختصاصی به گیاه هدف منتقل می‌شود ولی مهندسی ژنتیک تنها بلوک کوچکی از ژن‌های مطلوب را از طریق روش‌های مختلف از جمله آگروباکتریوم به هدف منتقل می‌کند.

راهکارهای متفاوتی مد نظر قرار گرفته است. از جمله این راهکارها می‌توان از دستورزی عوامل نسخه‌برداری، سنتز محافظ-های اسمزی و افزایش بیان پمپ‌های یونی و آنتی‌پورترها نام برد (Zhang et al. 2011). افزایش بیان پمپ‌های یونی مستقر در غشای واکوئل، به‌عنوان یکی از راهبردهای اساسی گیاهان هالوفیت در مقابله با شوری، از راهبردهای امید بخش در تولید گیاهان متحمل به شوری است. از جمله این پمپ‌های یونی در تونوپلاست پمپ پیروفسفاتاز می‌باشد، که توسط ژن پیروفسفاتاز

واکوئلی (AVP1) کد می‌شود این پمپ با انتقال و جمع‌آوری H^+ در داخل واکوئل یک شیب الکتروشیمیایی ایجاد می‌کند، که آنتی پورتر Na^+/H^+ غشایی با مبادله Na^+ سیتوزولی در برابر پروتون به داخل واکوئل، تحمل گیاه را در برابر تنش شوری افزایش می‌دهد (Bao et al. 2009, Zhang et al. 2011). هدف از این بررسی بهینه‌سازی انتقال ژن پیروفسفاتاز واکوئلی (AVP1) به گیاه گوجه فرنگی رقم ارومیه با استفاده از سویه GV3101 آگروباکتریوم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

Materials and Methods

انتقال ژن AVP1 به گیاه گوجه فرنگی

به‌منظور تهیه نمونه‌های استریل، بذور گوجه فرنگی رقم کم‌رنگ ارومیه از مرکز تحقیقات آذربایجان شرقی تهیه شده و پس از ضدعفونی، کشت بذرها در شرایط استریل بر روی محیط کشت 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) انجام شد و سپس تمامی کشت‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انتقال یافتند. دو ریز نمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل پنج روزه جهت باززایی و تراریزش انتخاب شد.

کوتیلدون‌ها از محل اتصال به هیپوکوتیل بریده و سپس به صورت وارونه (سطح رویی آن مماس با محیط کشت) بر روی محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۳۰ درصد ساکاروز قرار داده شدند. همچنین ریزنمونه هیپوکوتیل، دقیقاً از زیر مریستم تا حدود یک سانتی‌متر از بالای ریشه‌ی گیاهچه‌ی استریل جدا شده و به ۲ تا ۳ قطعه تقسیم شدند. هیپوکوتیل‌ها به حالت افقی بر روی محیط کشت قرار داده شدند. ریزنمونه‌های حاصل به مدت ۴۸ ساعت به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انتقال یافتند و در محیط کشت باززایی پیش کشت شدند.

آگروباکتریوم در محیط مایع حاوی آنتی بیوتیک ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شد و در

در این پژوهش از پلاسمید pBZP مبتنی بر ناقل عمومی pBI121 دارای گزینشگر گیاهی و باکتریایی نئومایسین فسفوترانسفرز II (nptII) برای انتقال ژن H^+ -پیروفسفاتاز واکوئلی گیاه آرابیدوپسیس (AVP1) به گیاه گوجه‌فرنگی استفاده شد. پلاسمید تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S بود. همچنین از باکتری *E.coli* سویه DH5 α به منظور تکثیر پلاسمید و از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 برای انتقال ژن استفاده شد.

برای تکثیر و تایید صحت پلاسمید ابتدا پلاسمید pPZP به باکتری‌های اکولای شایسته به روش شوک حرارتی منتقل شد. حضور توالی ژن در پلاسمیدها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن شامل پرایمر فوروارد با توالی 5-GGCTCTGTTGAGGGATTTCAG-3 و پرایمر رورس با توالی 3-5-GCAATGACAGCTGGGTTTCTT-3 PCR تایید شد. در مرحله بعد، پلاسمید نو ترکیب به سلول‌های سه سویه مستعد (LBA4404 و GVG3101، AGL1) آگروباکتریوم منتقل و در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین کشت شد. از کلونی‌های حاصل استخراج پلاسمید انجام گرفت و سپس مجدداً حضور ژن با استفاده از PCR و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد تایید گردید.

میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. پس از ۳ تا ۴ هفته، ریزنمونه‌های با نوساقه‌های باززا شده در محیط کشت جدید مربوط به ترکیب خود وا کشت شدند. پس از حدود ۶ تا ۷ هفته، تعداد ریزنمونه‌های باززا شده برای هر تکرار شمارش شدند و نوساقه‌های باززا شده (مرحله دو تا چهار برگه)، از محل اتصال به ریزنمونه‌ی اصلی قطع و به محیط کشت ساقه‌زایی که محیط کشت MS تکمیل شده با ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP بود، منتقل شدند. ساقه‌های رشد یافته به محیط ریشه‌زایی (MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر IBA، یک درصد ساکاروز، ۰/۷ درصد آگار، ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. گیاهان ریشه‌دار شده ابتدا در لیوان‌های سرپوشیده حاوی خاک استریل منتقل شدند تا با دما و رطوبت محیط سازگار شود و بعد از دو هفته گیاه سازگار شده، در گلدان کشت شده و به گلخانه انتقال یافت.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته

استخراج DNA از برگ تعدادی از گیاهان تراریخته احتمالی به روش CTAB انجام شد (Saghai Maroof *et al.* 1984). جهت بررسی مولکولی و تایید گیاهان تراریخته احتمالی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AVP1 صورت گرفت. ۰/۵ تا یک میکرولیتر از DNA گیاهی (با غلظت ۵۰ تا ۷۰ نانوگرم) با مخلوط واکنش ترکیب شد. پس از انجام واکنش PCR، محصولات واکنش بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ران شدند.

شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه قرار داده شد تا OD₆₀₀ آن به غلظت ۰/۸ برسد. بعد از رشد باکتری در محیط کشت مایع، سوسپانسیون تازه تهیه شده‌ی باکتری به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. رسوب باکتریایی در محیط کشت مایع MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۲۰ درصد ساکاروز (pH برابر ۵/۲) حل شد.

ریزنمونه‌های پیش کشت شده در محیط مذکور در بالا به این سوسپانسیون باکتری اضافه شدند و پس از ۲۰ دقیقه ریزنمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا محلول اضافه باکتری حذب کاغذ صافی شوند. سپس ریزنمونه‌های به محیط کشت اندام‌زایی فاقد آنتی‌بیوتیک شامل محیط پایه MS تکمیل شده با BAP (۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) و یک میلی گرم در لیتر IAA منتقل شدند و به مدت ۷۲ ساعت در اتاقک رشد در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای هر ترکیب تیمار BAP و ریزنمونه سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ ریزنمونه در یک پتری‌دیش ده سانتی‌متری در نظر گرفته شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS V25 انجام گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

گزینش و ریشه‌زایی نوساقه‌های تراریخته احتمالی در محیط

جهت انتخاب نوساقه‌های تراریخته حاوی ژن AVP1، ریزنمونه‌ها به محیط کشت حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۴۰۰

نتایج و بحث

پس از تراریختی موفق هر سه سویه آگروباکتریوم با پلاسمید نو ترکیب (شکل ۱-الف) جهت مدیریت حجم کار، تنها از سویه GV3101 برای تراریختی گیاه استفاده شد. کوتیلدون‌ها در گیاهچه‌های زیر هشت روز بسیار ظریف بوده و هنگام برش با اسکالپل له و پژمرده می‌شدند. ولی ریزنمونه‌های بین هشت تا ده از لحاظ اندازه و خشبی بودن در حد مناسبی برای تراریختی بودند (شکل ۱-الف). در طی تراریختی، حاشیه‌های بریده شده

Results and Discussion

گیاهچه‌های زیر هشت روز در زمان هم‌کشتی، نکروزه می‌شدند و باززایی خیلی ضعیفی از آنها صورت گرفت. در منابع مختلف سن ریز نمونه بین ۷ تا ۱۴ روز گزارش شده است (Raj *et al.* 2009) and Harish *et al.* 2010 سن ریز نمونه‌ها بر موفقیت کشت بافت و در نتیجه، تراریختی موثر بوده و بافت‌های جوان و نرم در مقایسه با بافت‌های پیر و چوبی برای کشت بافت انعطاف پذیری

بيشتری نشان می‌دهند (Saeed et al. 2019 and Raj et al. 2009).

باززایی، شاخه زایی و ریشه زایی نمونه‌ها

ريزنمونه‌های شاهد تلقيح شده با آگروباکتریوم پس از چند روز در محیط کشت بدون گزینش شروع به متورم شدن کرده و پس از دو هفته جوانه‌های ساقه‌ای به صورت واضح قابل مشاهده بودند و پس از سه هفته تقریباً همه ریزنمونه‌ها جوانه‌ها را در

نواحی زخمی شده و برش یافته تشکیل داده بودند (شکل ۱ - ب). بیشترین میزان باززایی از قسمت انتهایی کوتیلدون (محل اتصال به هیپوکوتیل) و راس هیپوکوتیل (نزدیک جوانه انتهایی) صورت گرفت، ولی امکان باززایی از سایر نقاط زخمی ریزنمونه‌ها نیز وجود دارد (Bhatia et al. 2004) کشت افقی ریزنمونه گوجه فرنگی در محیط کشت بهترین حالت برای اندام زایی است (Saeed et al. 2019).



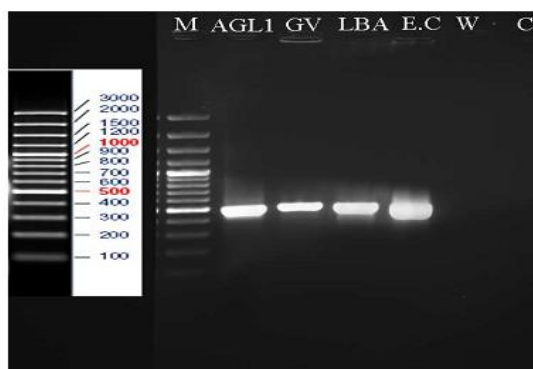
شکل ۱- ترايختی گوجه با ژن AVP1 و گزینش گیاهان ترايخته: الف) کشت بذر برای تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدونی و کوتیلدونی؛ ب) اندام زایی در شرایط بدون گزینش از ریزنمونه‌های بدون تلقيح؛ ج) باززایی پایین ترايخت‌ها از ریزنمونه‌های هیپوکوتیلدون؛ د) باززایی ترايخت‌ها از ریزنمونه‌های کوتیلدون؛ ه) واکشت ریزنمونه‌های با نوساقه‌های ترايخت در محیط جدید؛ و) رشد و تکامل ساقه‌ها در محیط ساقه زایی؛ ی) القای ریشه در محیط ریشه زایی؛ م) سازگاری گیاهچه‌های ترايخته به محیط آزاد و ک) انتقال گیاهان به گلخانه

Fig 1. Transformation of tomato with AVP1 gene and selection of transgenic plants: A) in vitro seed culture for preparation of cotyledon and hypocotyledon as explants; B) Organogenesis from un-inoculated explant in selection free condition; C) generation of transgenes from hypocotyledons; D) regeneration of transgenes from cotyledons; E) subculture of the regenerated shoots in new medium; F) shoot elongation and development in stem induction medium; H) hardening of the transgenic plants and transfer to greenhouse

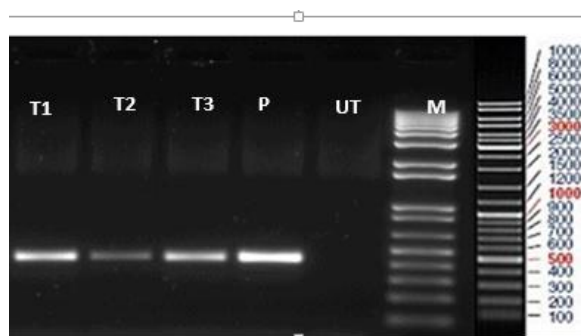
نمونه‌های غیر ترايخته در محیط گزینش، با از دست دادن کلروفیل پس از دو هفته، به رنگ سفید در آمدند، این ریزنمونه‌ها فاقد رشد بوده و پس از مدتی از بین رفتند (شکل ۱- ج و د).

در محیط گزینشی گیاهچه‌های ترايختی احتمالی که با دریافت T- DNA آگروباکتریوم در مقابل آنتی بیوتیک مقاوم بودند و در حضور این آنتی‌بیوتیک سبز باقی ماندند در حالی که ریز

عامل مهم مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، بین ریزنمونه و تنظیم کننده رشد BAP از لحاظ باززایی اثر متقابل معنی دار مشاهده نشد اما اثرات اصلی دارای تأثیر معنی دار بر درصد باززایی بودند.



الف



ب

شکل ۲- الف) تکثیر ژن AVP1 با آغازگرهای اختصاصی در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم تراریخت شده با پلاسمید pBZP: M، 100 bp DNA ladder؛ AGL1، GV و LBA، سویه‌های آگروباکتریوم؛ E.C باکتری ای کولای و W نیز نمونه فاقد دی.ان.ا می باشند. ب) نتایج تکثیر ژن AVP1 با آغازگرهای اختصاصی در PCR: T1 تا T3 گیاهان تراریخته؛ UT گیاه کنترل غیر تراریخته و M 1 kb DNA ladder

Fig 2. A) Amplification of AVP1 gene using gene specific primers in *Agrobacterium* transformed with pBZP: M, 100 bp DNA ladder; AGL1, GV and LBA different *Agrobacterium* strains, EC, *E.coli* and W DNA free sample. B) AVP1 gene amplification by PCR with gene specific primers: T1 – T3 transgenic plants DNA; UT, untransformed plant DNA and M, 1 kb DNA ladder

مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین درصد باززایی در محیط تکمیل شده با دو میلی گرم در لیتر BAP، بدست آمد و کمترین درصد باززایی در محیط تکمیل شده با یک میلی گرم در لیتر اتفاق

میزان بالای آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) در محیط کشت موجب شد ریزنمونه‌های بدون تراریختگی پس از سه هفته به طور کامل نکروزه شده و از بین رفتند هرچند که ریزنمونه‌های با تراریختگی با سرعت کمتری رشد کردند ولی ساقه‌های باززا شده بر روی ریزنمونه به رنگ سبز روشن به رشد خود در این محیط ادامه دادند.

در آزمایش مقدماتی استفاده از میزان کمتر آنتی بیوتیک (۲۵ میلی گرم در لیتر) هرچند میزان باززایی را افزایش داد ولی به خاطر احتمال فرار از گزینش در ادامه آزمایش میزان ۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. ولی در مراحل بعدی گزینش (ساقه‌زایی و ریشه‌زایی) از غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین استفاده شد چون اثرات بازدارنده کانامایسین حتی برای رشد گیاهان تراریخته اثر محدود کننده دارد.

جوانه‌های سبز شده برای افزایش طول ساقه آنها به محیط کشت جدید با میزان ۱ میلی گرم در لیتر BAP منتقل شدند اکثر جوانه‌های تراریخته در این محیط توسعه ساقه دادند و پس از یک ماه طول ساقه‌ی آنها به بیش از ۳ سانتی متر رسید. گیاهانی که احتمالاً تراریخته نبودند و حاصل فرار از آنتی بیوتیک بودند در این محیط قادر به ادامه رشد نبوده و در نهایت از بین رفتند شکل ۱- و). در مرحله بعد گیاهچه‌ها به محیط ریشه زایی منتقل شدند بعد از ۱۰ روز انتقال گیاهچه‌ها به محیط ریشه‌زایی، در گیاهان تراریخته احتمالی ریشه‌ها ظاهر شدند و رشد کردند (شکل ۱-ی).

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی دارای ژن AVP1

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AVP1، در نمونه شاهد و پلاسمید استخراج شده از آگروباکتریوم وجود یک باند در ناحیه ۴۴۰ جفت بازی را نشان داد در حالی که شاهد منفی (آب) و پلاسمید شاهد فاقد باند بود که این امر پلاسمید نو ترکیب و حضور ژن را تایید کرد (شکل ۲-ب).

اثر ریزنمونه و سیتوکینین در باززایی گیاهان تراریخته

ریزنمونه گیاه گوجه‌فرنگی (کوتیلدون و هیپوکتیل) و تنظیم کننده رشدی BAP (یک، دو و چهار میکروگرم در لیتر) به عنوان دو

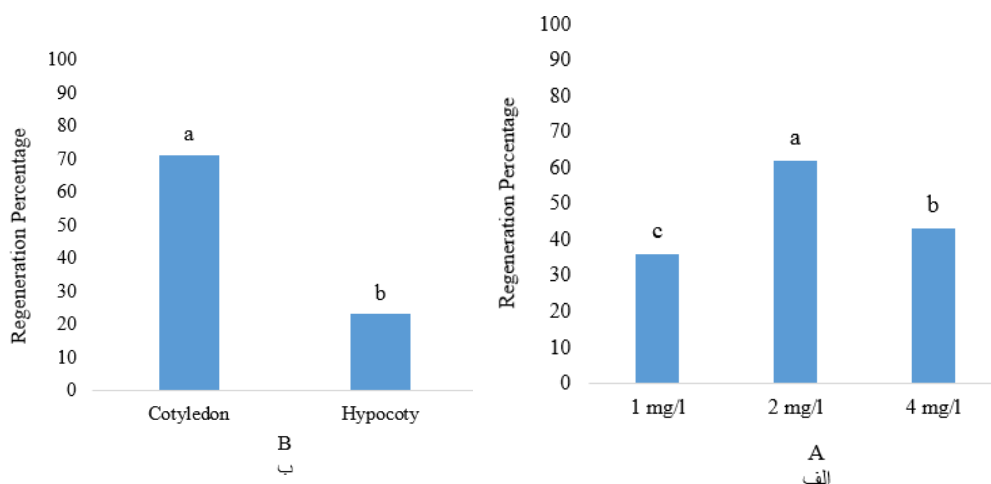
های گوجه فرنگی را بهبود بخشیده است (Sherkar, H.D. and Chavan, 2014 and Rashid, 2012).

افتاد (شکل ۳ الف). تنظیم کننده‌های رشدی مورد استفاده در این مطالعه یعنی IAA و BAP متداول‌ترین تنظیم کننده‌ها در کشت بافت گوجه فرنگی بوده‌اند و ترکیب این دو باززایی از ریزنمونه-

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد باززایی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تیمارهای مختلف

Table 1. Analysis of variance for regeneration under different treatment		
S.O.V	DF	MS
Explant	1	126.75**
BAP	2	855.75*
Explant × BAP	2	126.75 ^{ns}
Error	6	15.78

ns, * و ** به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



شکل ۳- الف) مقایسه میانگین باززایی تراریخته‌ها تحت تیمارهای مختلف BAP (ب) مقایسه میانگین باززایی تراریخته‌ها از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل

Fig 3. A) Mean compression of transgenic regeneration ratio under different concentration of BAP and B) Mean compression of transgenic regeneration ratio from cotyledonary and hypocotyl explants

Sivanesan, and Jeong,) گزارش شد (۲۰۰۷). بایهان و یوچسان (Bayhan and yuchesan, 2024) نشان دادند هرچند میزان اندام زایی درون شیشه‌ای در گیاه گیلای سیاه در غلظت‌های بالا بیشتر بود ولی میزان شیشه‌ای شدن گیاهان بدست آمده در غلظت‌های بالای BAP زیاد بود. به عنوان یک نتیجه مهم در این آزمایش مشخص شد که هورمون BAP نقش بسزایی در باززایی داشت که با نتایج اگاندار و همکاران (Ugandhar et al. 2011) که بیشترین میزان باززایی را از ریزنمونه‌های کوتیلدون

در گیاه ریحان نیز بیشترین درصد باززایی در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (اصغری و همکاران، ۱۳۸۹). BAP نقش مهمی در باززایی گیاهان خانواده نعناع دارد، گزارش شده است که در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای ازدیاد شاخه نمونه‌های نعناع فلفلی (Mentha piperita L) مناسب بود (Kiran, et al. 2004). مطالعه دیگر جهت ازدیاد درون شیشه‌ای گیاه *Pentstemon indicum* بهترین تنظیم‌کننده رشدی محیط ۴ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱

مهندسی ژنتیک گیاهان برای افزایش تحمل به شوری و خشکی به خاطر تغییرات اقلیمی اخیر در دنیا بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه یک ژن دخیل در تحمل به شوری به گوجه-فرنگی منتقل شد و نسل T1 گیاهان، پس از سرمادهی و بذر گیری برای مطالعات توارث ژن و عملکردی و افزایش تحمل گیاهان تراپخته به شوری مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

قدردانی و تشکر: هزینه این مطالعه از گرنت تحقیقاتی برای طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز تامین شده است.

خيار در محیط حاوی غلظت بالای BAP در ترکیب با غلظت بسیار پایین اکسین بدست آوردند مطابقت دارد. همچنین مشاهده شد که درصد باززایی در نمونه‌های کوتیلدون بیشتر از هیپوکتیل بود (شکل ۱- ج و د، شکل ۳ - ب). عکس العمل برتر ریزنمونه کوتیلدون نسبت هیپوکتیل را می‌توان به غلظت‌های بالای هورمون اکسین درون‌زا در کوتیلدون و اثر متقابل آن بر ریزنمونه (Gambley and Dodd, 1990) و یا پتانسیل اندام‌زایی بیشتر این ریزنمونه به دلیل وجود سلول‌های مریستمی تولید کننده ساقه در سطح رویی کوتیلدون نسبت داد (Motamedi et al. 2010).

References

منابع

- Asghari, F., Hasani, B. and Farrokhi, J. (2013). Effects of genotype and different concentration of BA on direct shoot regeneration of Basil (*Ocimum basilicum*) in vitro. *Journal of Horticulture Science*, 4(4), 434-439. doi:10.22067/jhorts4.v0i0.18257
- Bagheri Rad, E., Norouz, P and Fasaha, P. (2018). Comparison of Organic, Traditional and Transgenic Agricultural Products. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 7(1), 103-114. Doi: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.1.0
- Bao A, Wang, S, Wu G., Xi, J., Zhang, J., Wang, C. (2009). Over-expression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 76, 232-240. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.10.009
- Bayhan, N., Yücesan, B. (2024). The impact of sucrose and 6-benzylaminopurine on shoot propagation and vitrification in *Aronia melanocarpa* (black chokeberry). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 156, 55. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02652-x>
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T. and Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 78, 1-21. doi: 10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-44. doi: 10.1126/science.218.4571.443
- Bray, E.A., Bailey-serres, J. and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA 11581249.
- Gambley, R.L. and Dodd, W.A. (1990). An in vitro technique for the production of de novo multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 20, 177-183. doi: 10.1007/BF00041879
- Guo, J., Shan, C., Zhang, Y., Wang, X., Tian, H., Han, G., Zhang, Y., Wang, B. (2022). Mechanisms of Salt Tolerance and Molecular Breeding of Salt-Tolerant Ornamental Plants. *Frontiers Plant Science*, 13, 854116. doi: 10.3389/fpls.2022.854116
- Harish, M.C. Rajeev kumar, S. and Sathish kumar, R. (2010). Efficient in vitro Callus Induction and Regeneration of Different Tomato Cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2, 178-184. doi: 10.3923/ajbkr.2010.178.184
- Khan, S., Ullah, M.W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. and Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 2405954. doi:10.1155/2016/2405954
- Kiran, G., Kaviraj, C.P., Venugopal, R.B., Jabeen, F. and Rao, S. (2004). Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoots tip and nodal explants. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 594-598.
- Mittler, R. S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9, 490-498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Motamedi, J., Zebajadi, A.R., Kahrizi, D., Hatef Salmanian, A. and Soheilikhah, Z. (2010). Study of Callus Induction and Shoot Regeneration of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Using Hypocotyl and Cotyledon Explants Culture. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2, 99-111. doi: 10.22103/jab.2011.364
- Murashige, S. and Skoog, M. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

- Plant Physiology, 15, 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Raj, SK., Singh, R., Pandey, Sk. and Singh, BP. (2009). Agrobacterium-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. Research Communication, 88, 1674-1679. <http://www.jstor.org/stable/24110495>.
- Rashid, R., Bhat, J.A., Bhat, Z., Dar, W.A. and Shafi, W. (2012). Callus formation and organogenesis of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Vegetos. 25, 243-28.
- Saeed, W., Naseem, S., Gohar, D. and Ali, Z. (2019). Efficient and reproducible somatic embryogenesis and micropropagation in tomato via novel structures - Rhizoid Tubers. PloS one, 14(5), e0215929. doi:10.1371/journal.pone.0215929.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P.Q. and Allard, R.W. (1984). Extraordinarily polymorphic micro satellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America, 91, 5466-5470. doi: 10.1073/pnas.91.12.5466
- Sherkar, HD. and Chavan, AM. (2014). Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. Science research reports. 4, 89-93. doi: 10.1073/pnas.91.12.5466
- Sivanesan, I. and Jeong, BR. (2007). Micropropagation and in vitro flowering in *Pentstemon indicum* Ling. Plant Biotechnology, 24(5), 527-532.
- Ugandhar, T., Venkateshwarlu, M., Begum, G., Srilatha, T. and Jaganmohanreddy, K. (2011). In vitro plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativum* L.) from cotyledon and hypocotyl explants. Science Research Reporter, 1, 164-169. doi: 10.13140/RG.2.1.4203.3366
- Zhang, J., Li, J., Wang, X. and Chen, J. (2011). OVP1, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase) overexpression improved rice cold tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 49(1), 33-38. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.014