مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۴-۱۳

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1

DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بهینه سازی انتقال ژن کیتیناز به گوجه‌فرنگی رقم بناب با استفاده از آگروباکتریوم تومفاشینس

Optimization of Chitinase gene transfer to tomatoes of Bonab cultivar using *Agrobacterium tumefaciens*

وحیده گوگردچی[۱]، ابراهیم دورانی*[۱]، مصطفی ولیزاده[۱]، محمدرضا زمانی[۲]

Vahideh Gougerdchi[1], Ebrahim Dorani[1]*, Mostafa Valizade[1], Mohammad Reza Zamani[2]

۱- گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email:
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dorani@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲)

چکیده

گوجه‌فرنگی از نظر غذایی، اقتصادی و علمی از اهمیت زیادی دارد. با توجه به اهمیت زراعی و حساسیت این گیاه نسبت به اغلب تنش‌های زنده و غیرزنده، استفاده از روش‌های نوین در اصلاح این گیاه نیاز می‌باشد. در این تحقیق عوامل موثر در تراریزش یک رقم محلی گوجه‌فرنگی زراعی بنام بناب از قبیل مدت زمان پیش‌کشت (۱، ۲، ۳ و ٤ روز)، غلظت آگروباکتریوم تومفشینس (۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤ =OD_{600nm})، مدت زمان تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه)، سطوح مختلف استوسیرینگون (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار)، مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲، ۳ و ٤ روز) و غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پیش‌کشت دو روزه ریزنمونه‌ها در تراریزش گیاهان اثر معنی‌داری داشت. بیشترین میزان تراریختی در غلظت باکتری OD_{600nm} =۰/٦ حاصل شد. همچنین بیشترین میزان تراریختی در مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه و مدت زمان هم کشتی دو روز حاصل شد. حضور استوسیرینگون اثر افزایشی در کارایی تراریختی گوجه‌فرنگی داشت، به طوریکه بیشترین میزان تراریختی در غلظت ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون بدست آمد. در نهایت حضور ژن کیتیناز در گیاهان تراریخت به وسیله PCR مورد تایید قرار گرفت. شرایط بهینه بدست آمده در این مطالعه می‌تواند برای انتقال ژن‌های هدف به این رقم گوجه‌فرنگی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن،
آگروباکتریوم،
گوجه‌فرنگی،
کیتیناز

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Tomato is an important economic crop with nutritional and scientific value for study. Due to its agronomic importance and the sensitivity to biotic and abiotic stresses, using new methods in breeding this crop is necessary. In this study, the effects of some factors, such as pre-cultivation time (1, 2, 3 and 4 days), Agrobacterium concentration ($OD6_{00nm}$ = 0.4, 0.6, 0.8, and 1), inoculation time (5, 10, 15 and 20 minutes), Acetosyringone concentration (0, 100, 150, and 200 µM), co-cultivation period (1, 2, 3 and 4 days) and different concentrations of the kanamycin (5, 10, 15 and 20 mg/l) on the transformation of a local cultivar of tomato called Bonab, were evaluated. The maximum transformation efficiency was obtained at the OD_{600}= 0.6. Also, the highest transgenic plants were obtained in the 10 minutes of inoculation and 2 days of co-cultivation. The presence of Acetosyringone had an increasing effect on the tomato transformation, and the highest percentage of transformation was obtained at 150 M of Acetosyringone. Finally, the presence of a Chitinase gene in the probable transgenic plants was confirmed by PCR. The optimal conditions that were obtained in this study can be used to transfer target genes to this tomato cultivar.

Key words: Chitinase, Tomato, Agrobacterium, Transgene

مقدمه

گوجه‌فرنگی زراعی (*Lycopersican esculentum* L.) یک محصول باغی با مصارف گوناگون است که متعلق به خانواده سولاناسه بوده و واریته‌های بسیاری از این گیاه جهت استفاده از میوه آن کشت می‌شوند (Zsögön *et al.*, 2017). این گیاه یکی از مهم‌ترین منابع ویتامین، ترکیبات فنلی، اسیدهای آمینه مفید، قند، مواد معدنی مثل پتاسیم و اسیدهای کربوکسیلیک است (Soare *et al.*, 2019).

بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک امید دستیابی به گیاهان زراعی با عملکرد بالا و افزایش دامنه سازگاری گیاهان زراعی در برابر عوامل محدود کننده محیطی از جمله تنش‌های زنده و غیر نده را افزایش داده است. شناسایی عوامل افزایش مقاومت در گیاه و بررسی امکان انتقال این عوامل به ارقام حساس زراعی از اهمیت ویژه‌ای در معرفی ارقام مقاوم و یا نیمه مقاوم اهلی برخوردار است. گیاهان تراریخته از لحاظ افزایش عملکرد با مدیریت محصول در برابر بیماری‌ها و آفات گیاهی، کاهش استفاده از حشره‌کش‌ها و کاهش خسارت پس از برداشت خیلی بهتر عمل می‌کنند (Chen *et al.*, 2014). با توجه به اهمیت زراعی گوجه فرنگی و حساسیت این گیاه نسبت به بیشتر تنش‌های زنده و غیر زنده، نیاز به استفاده از روش‌های نوین در اصلاح این گیاه بیش از پیش احساس می‌شود.

قارچ‌های بیماری‌زا یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت به محصولات زراعی می‌باشند. یکی از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی پوسیدگی ساقه اسکلروتینیایی با عامل *Sclerotinia sclerotionum* می‌باشد (Finch-Savage *et al.*, 2003). بسیاری از گیاهان زراعی، ژن‌های لازم برای تأمین درجه بالایی از مقاومت را ندارند، بنابراین انتقال ژن‌های ایجاد کننده مقاومت در برابر بیماری‌ها به گونه‌های گیاهی آسیب‌پذیر از طریق روش‌های بیوتکنولوژی می‌تواند راه موثری برای کنترل بیماری‌ها باشد. با مطالعه سازوکارهای مقابله گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا، پروتئین‌های ضدقارچی مختلفی در گیاهان شناسایی شده‌اند. این پروتئین‌ها بر اساس خصوصیات آنزیمی (مثل کیتینازها یا گلوکانازها)، ساختمان آن‌ها (مثل پروتئینهای غنی از سیستئین) یا شباهت آن‌ها به گروه خاصی از پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (Tian *et al.*, 2022).

کیتینازهای تولید شده توسط قارچ تریکودرما در کنترل زیستی آن بسیار موثر می‌باشند که با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی موجود در پلیمر خطی کیتین، ساختمان این ترکیب را در هم می‌شکنند. (Sharma *et al.*, 2011). نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی گوجه‌فرنگی (Lindsey and Baker, 1967)، تنباکو (Cole and

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

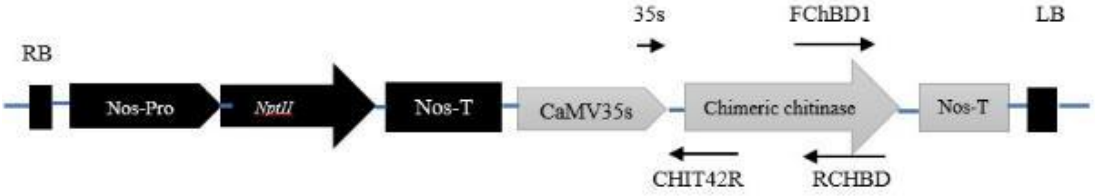
Zvenyika, 1986) و گیاهان زراعی مختلف (Chang *et al*., 1986) نشان می‌دهد که با حضور قارچ تریکودرما در خاک، رشد این گیاهان به نحو چشم‌گیری افزایش می‌یابد. دومین متصل شونده به کیتین (ChB) (Chitin Binding Domain) می‌تواند با اتصال آنزیم به سوبسترای کیتین موجب در دسترس قرار گرفتن رشته‌های کیتین برای هضم آنزیمی گردد (Deeba *et al*., 2022).

تولید گیاهان تراریخته مستلزم بهینه‌سازی شرایط کشت بافت، آشنایی با روش‌های مختلف تراریزش سلول‌های گیاهی و بهینه-سازی انتقال ژن و در نهایت دسترسی به یک سیستم گزینش کارآمد جهت انتخاب گیاهان تراریخته می‌باشد. تراریزش موفق گوجه‌فرنگی در مطالعات پایه و کاربردی برای اصلاح این گیاه ضروری است، به همین دلیل توسعه روش تراریزش کارآمد و بهینه سازی شرایط تراریزش برای تک تک ژنوتیپ ها بسیار تعیین کننده است (Hassan *et al*., 2021). انتقال مؤثر ژن به این گیاه تحت تاثیر عوامل مختلفی می‌باشد، غلظت مناسب آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است، به طوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه می‌تواند نقش بسزایی در افزایش کارایی انتقال ژن به گیاهان داشته باشد (Keshavareddy *et al*., 2018). مدت زمان پیش‌کشت و هم‌کشتی و مدت زمان تلقیح از دیگر عوامل موثر در تراریزش گیاهان هستند که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه‌ها کارایی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Singareddy *et al*., 2018). استوسیرینگون یکی دیگر از عوامل موثر در تراریختی گیاهان است که از طریق القاء بیان ژن‌های بیماری‌زای vir کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Osmani *et al*., 2019). این تحقیق با هدف مطالعه برخی از عوامل موثر در تراریزش گوجه-فرنگی از قبیل غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین، مدت زمان پیش-کشت، غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح باکتری، مدت زمان هم‌کشتی و غلظت استوسیرینگون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی بذور، شرایط رشد و تهیه ریزنمونه: بذرور رقم بناب گوجه فرنگی با قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در نهایت شستشو با آب مقطر، استریل سطحی شدند. بذرهای استریل شده بر روی محیط جوانه زنی (جدول ۱) قرار داده شدند. پس از هفت روز جوانه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۰ درصد و در دوره زمانی ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی ۹۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه رشد کردند. ریزنمونه‌های برگ‌لپه از گیاهچه‌های شش روزه تهیه شدند. برگ‌لپه‌های استریل جداسازی شده و بر روی محیط پیش کشت PM (Preculture Medium) (جدول ۱)، به مدت ۱، ۲، ۳ و٤ روز در تاریکی و در دمای ۲۵ قرار گرفتند تا آماده مرحله تلقیح شوند (Cortina and Culianez-Macia, 2004).

سویه باکتریایی و ساختار سازه: در این آزمایش از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. سازه pBISM2 (Matroodi *et al*., 2013) که مبتنی بر ناقل pBI121 است و حاوی ژن نشانگر مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین و ژن شیمری chit42 به جای ژن گزارشگر gus، می‌باشد برای تراریزش مورد استفاده قرار گرفت. ژن شیمری کیتیناز متشکل از cDNA ژن chit42با منشا قارچ *Trichoderma atroviride* به همراه دومین اتصال به کیتین با منشا باکتری (*Serratia marsescense*) می‌باشد که در انتهای کربوکسیلی آن قرار گرفته‌است (شکل ۱).



شکل ۱- سازه pBISM2 مبتنی بر ناقل pBI121 و حاوی ژن کیتیناز شیمری

Figure 1. PBISM2 construct based on pBI121 vector and containing chitinase chimeric gene

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

آزمون حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین: به منظور بهینه‌سازی و انتخاب غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین به منظور گزینش گیاهان تراریخته در محیط کشت، یک آزمون حساسیت ریزنمونه برگ‌لپه‌ایی غیرتراریخته نسبت به غلظت‌های مختلف کانامایسین انجام شد. به همین منظور ریزنمونه‌های برگ-لپه‌ایی تحت شرایط استریل روی محیط کشت MS حاوی غلظت-های (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) کانامایسین کشت شدند. ریزنمونه‌های حاصل در دمای ۲۵ درجه و ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند، واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یکبار صورت گرفت، پس از یک ماه، محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به عدم باززایی ریزنمونه‌ها و سرعت از دست دادن کلروفیل و مرگ بافتی، دوز کشنده (Lethal dose) تعیین شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم: به منظورتعیین بهترین مدت زمان پیش‌کشت، چهار زمان متفاوت (۱، ۲، ۳ و ٤ روز) به همراه حداقل غلظت باکتری (OD_{600nm} ۰/٤)، حداقل زمان تلقیح (۵ دقیقه)، فاقد غلظت استوسیرینگون و در مدت زمان ۲ روز هم-کشتی بررسی صورت گرفت.

جهت بررسی بهترین غلظت باکتریایی، ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pBISM2 حامل ژن کیتیناز شیمری تهیه شده با غلظت‌های مختلف باکتری (۱، ۰/۸، ۰/٦ و OD_{600nm} ۰/٤)، مدت زمان پیش‌کشت ۲ روز، فاقد استوسیرینگون و به مدت ۵ دقیقه تلقیح شد و به مدت زمان ۲ روز در شرایط تاریکی هم‌کشتی صورت گرفت.

همچنین برای بررسی اثر مدت زمان‌های مختلف تلقیح از چهار زمان متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) با مدت زمان پیش‌کشت بهینه ۲ روز و غلظت باکتری ۰/٦ بهینه شده در مرحله قبل، فاقد استوسیرینگون و پیش‌کشت دو روز استفاده شد.

جهت بررسی اثر سطوح مختلف استوسیرینگون با چهار غلظت ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار با مدت زمان پیش‌کشتی ۲ روز، غلظت آگروباکتریوم ۰/٦، مدت زمان تلقیح بهینه شده ۱۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی ۲ روز، تراریزش گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم: ریزنمونه‌های تلقیح شده روی کاغذ صافی استریل انتقال یافت، سپس ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشت CM (Co-culture Medium) (جدول ۱) فاقد آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. برای بررسی اثر مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی از چهار مدت زمان متفاوت (۱، ۲، ۳ و ٤) با مدت زمان پیش‌کشت ۲ روز، مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه، غلظت باکتری OD_{600}= ۰/٦ و غلظت ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون بهینه شده استفاده شد. در نهایت پس از انتخاب بهترین مدت زمان پیش‌کشت برای تراریختی، غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح، مدت زمان هم کشتی و اثر سطوح مختلف استوسیرینگون بر تراریختی گوجه-فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

گزینش ریزنمونه‌های تراریخته احتمالی در محیط گزینشگر: ریزنمونه‌های برگ‌لپه از محیط هم‌کشتی به محیط ساقه‌زایی RM (Regeneration Medium) (جدول ۱) حاوی کانامایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند (واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یکبار صورت گرفت)، پس از چهار هفته، زمانی که طول گیاهچه های باززا شده به ۳-۲ سانتی‌متر رسید، جهت ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زایی RTM (Rooting Medium) (جدول ۱) منتقل و در همان شرایط نگهداری شدند. در نهایت، بعد از اینکه سیستم ریشه گیاهان به خوبی تشکیل شد، گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت و خاک استریل انتقال یافت و به منظور سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوش‌های شفاف استفاده شد و پس از سازگاری سرپوش‌ها حذف شدند و به گلخانه منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل مولکولی: استخراج DNA از بافت گیاهی با روش CTAB (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) از تعدادی شاخساره‌های تراریخت به صورت تصادفی انجام شد. واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز (جدول ۲) به منظور تایید تراریزش انجام گرفت و نتایج بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد.

طرح‌های آماری وتجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: همه آزمایش-های این پژوهش با استفاده از طرح کاملا تصادفی (CRD) در چهار تکرار در هر تکرار هشت ریزنمونه اجرا شد. پس از شش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

هفته، صفات تعداد شاخه‌های باززا شده در محیط انتخابی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تجزیه آماری داده‌های، ابتدا نرمال بودن آن‌ها بررسی شد، سپس آنالیزها صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌های مستقل و بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم-افزار SPSS (Version 17) و Excel (2016) استفاده شد.

جدول۱- ترکیبات استفاده شده در محیط کشت

Table 1. Compounds used in the culture medium

	RTM	RM	CM	PM	GM
MS	+	+	+	+	+
Sacaros (g/l)	30	30	30	30	30
Agar (g/l)	7	7	7	7	7
pH	5.6-5.8	5.6-5.8	6.5-5.8	5.6-5.8	5.6-5.8
acetosyringone (µM)	–	–	150	–	–
BAP (mg/l)	–	2	2	2	–
IAA (mg/l)	0.2	0.2	0.2	0.2	–
Cefotaxime (mg/l)	150	200	–	–	–
Kanamycin (mg/l)	10	10	–	–	–

جدول۲- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش **Table 2.** Primers used in this study

Primer sequences	Primers name
5'-GCTCTAGAGCTACGACGACAGCCAGC-3'	FchBD1
5'-GCTCTAGATTACGCCAGGCGGCCCAC-3'	RchBD
5'-GCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3'	35S
5'-CGCCTCCGTTGATATAAGCC-3'	CHIT42R
5'-ATGATTGTACATCCTTCACG-3'	VirGF
5'-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG-3'	VirGR

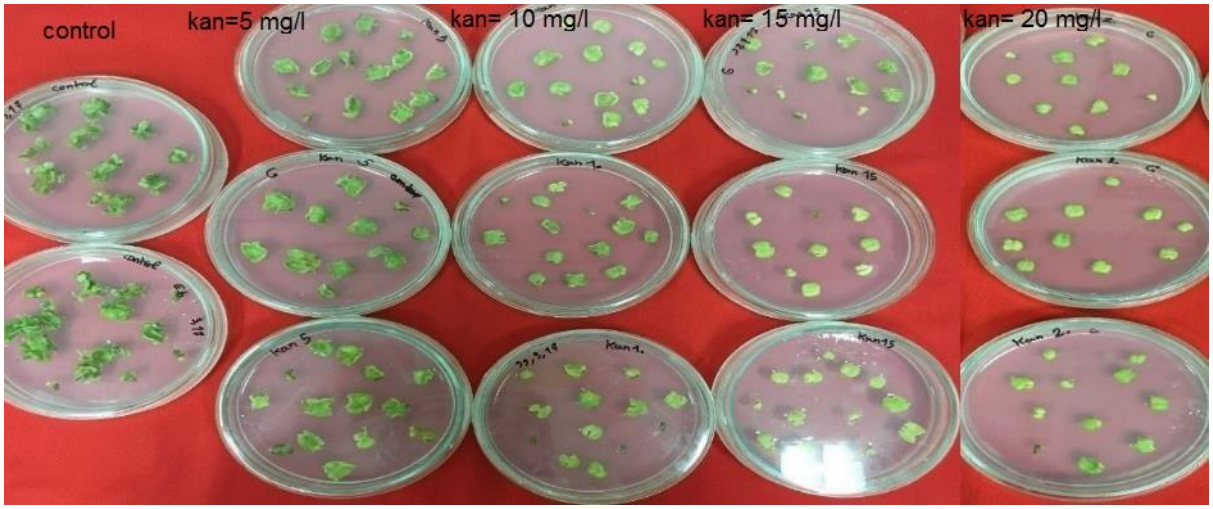
نتایج و بحث

تعیین غلظت مناسب کانامایسین: نتایج آزمون تعیین سطوح کانامایسین نشان داد که کمترین تعداد ریز نمونه از بین رفته در غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر بود. ریزنمونه‌های کوتیلدون غیرتراریخته در هیچ کدام از محیط کشت‌های باززایی حاوی سه غلظت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین، باززا نشدند و با از دست دادن کلروفیل خود در مدت چهار هفته از بین رفتند. بنابراین، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین حداقل غلظت کانامایسین لازم برای مرگ کامل بافت ریزنمونه در طول مدت زمان فوق بود (شکل۲). طبق آزمایش‌های Kazemi و همکاران (Kazemi *et al.*, 2020)، افزایش غلظت کانامایسین عامل بازدارنده در رشد و باززایی گوجه‌فرنگی است بنابراین انتخاب حداقل غلظت کانامایسین لازم برای مرگ ریزنمونه ضروری است.

اثر مدت زمان پیش‌کشت بر روی تراریختی گوجه‌فرنگی: با توجه به نتایج مقایسه میانگین به دست آمده پیش‌کشت دو روزه مناسب‌ترین حالت برای ریزنمونه‌های برگ‌لپه بود (شکل۳a). هنگامی‌که ریزنمونه‌های برگ لپه‌ایی با آگروباکتریوم بدون انجام پیش کشت تلقیح شدند، قسمت‌های زخمی ریزنمونه‌ها نکروزه شدند و باززایی صورت نگرفت. محیط پیش‌کشت سبب ایجاد شرایط مناسب سلولی به منظور آلوده‌سازی با آگروباکتریوم و انتقال به محیط انتخابی شد. ربزنمونه‌هایی که به مدت یک روز بر روی محیط پیش‌کشت نگهداری شده بودند، اغلب بسیار ضعیف بوده و پس از طی دوره هم‌کشتی و انتقال به محیط باززایی به حالت پلاسمولیزه در آمدند. همچنین، قرارگیری ریزنمونه‌ها به مدت چهار روز بر روی محیط پیش‌کشت پس از انتقال به محیط باززایی اغلب ریزنمونه‌ها به صورت شیشه‌ای درآمده و در مراحل بعدی حذف گردیدند. Yasmeen و همکاران (۲۰۰۹) گزارش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

کردند که در طی زمان پیش‌کشت در گیاه گوجه‌فرنگی، سطح ترکیبات القا کننده ژن‌های vir در بافت‌های زخمی گیاه افزایش می‌یابد که باعث بالا رفتن بازده تراریختی می‌گردد. همچنین نشان دادند که تقسیم فعال سلول‌های نواحی زخمی در طول زمان پیش‌کشت، سنتز دیواره سلولی و فعالیت سیستم همانندسازی در این سلول‌ها برای اتصال موثر آگروباکتریوم قبل از تراریختی و الحاق T-DNA ضروری بوده و سلول‌های در حال تقسیم را در مقایسه با سلول‌های غیر تقسیم شونده برای تراریختی مستعدتر می‌کند. این امر نشان داد که اعمال پیش‌کشت بر تراریزش گیاهان به وسیله آگروباکتریوم اثر مثبت دارد. در پژوهشی که توسط Secgin و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد بهترین زمان پیش-کشت در ریزنمونه برگ‌لپه گوجه‌فرنگی دو روز گزارش شد.



شکل۲- تعیین غلظت مناسب حساسیت ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم درلیتر

Figure 2. Determining the appropriate concentration of susceptibility of explants to the antibiotic kanamycin (5, 10, 15 and 20 mg/l)

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر روی تراریختی گوجه-فرنگی: نتایج به دست آمده بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها طبق شکل ۳b نشان داد که بین غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر تعداد شاخه باززا شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با افزایش غلظت آگروباکتریوم تا OD_{600} =۰/٦ کارایی انتقال نیز افزایش یافته ولی در غلظت‌های بالاتر از OD_{600} =۰/٦ کارایی انتقال کاهش یافته است. غلظت‌های بیشتر از OD_{600} =۰/٦ موجب رشد بیش از حد باکتری در زمان هم‌کشتی شده و در نهایت باعث مرگ ریزنمونه‌ها شد. غلظت‌های کمتر از این میزان نیز در انتقال T-DNA ضعیف نشان دادند.

به طور کلی چندین فاکتور می‌توانند اثر مهمی بر تراریختی گونه-های مختلف گیاهی با استفاده از آگروباکتریوم داشته باشد. با بهینه سازی فاکتورهای موثر می‌توان کارایی انتقال ژن به گوجه‌فرنگی را افزایش داد. غلظت باکتری یکی از اصلی‌ترین عواملی است که کارآیی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تعیین غلظت مناسب باکتری در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم، به عوامل متعددی از جمله نوع ژنوتیپ گیاهی و سویه آگروباکتریوم بستگی دارد (Kazemi *et al*., 2020). غلظت مناسب سویه LBA4404 برای تلقیح با گوجه‌فرنگی OD_{600} = ۰/٦-۰/۵ عنوان شده است (Raj *et al*., 2009). مطالعات Secgin و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد که بیشترین میزان تولید گیاهان تراریخته در گوجه‌فرنگی در غلظت OD_{600} =۰/٦ حاصل شده است که با نتایج این پژوهش منطبق است. در پژوهشی از میان غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (۰/۸ و ۰/٦، ۰/٤، ۰/۲= $OD_{600\ nm}$)، بالاترین درصد تراریختی گوجه‌فرنگی در OD_{600nm} =۰/٦ مشاهده شده است (Honda *et al*., 2021).

اثر مدت زمان تلقیح آگروباکتریوم بر روی تراریختی گوجه-فرنگی: بهترین مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها طبق شکل ۳c، ده دقیقه همراه شیک کردن تشخیص داده شد. در مدت زمان کمتر از ۱۰ دقیقه هیچ گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

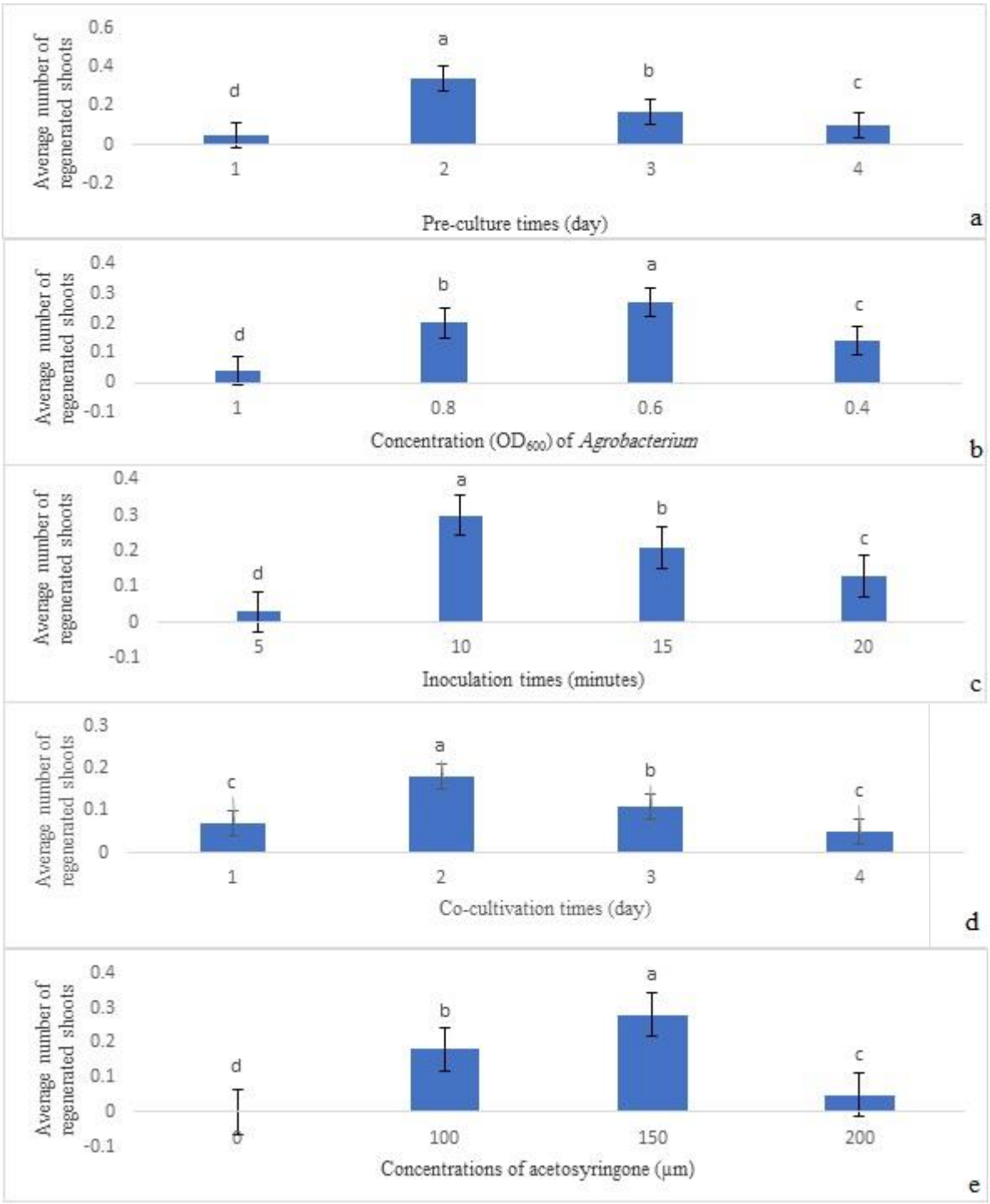
تراریخته‌ای به دست نیامد. مدت زمان بیشتر از ۱۰ دقیقه نیز باعث ضعیف یا نکروزه شدن بافت ریزنمونه‌ها و در نهایت از بین رفتن کامل آن‌ها شد.

مدت زمان لازم برای تلقیح باکتری با گیاهچه‌ها نیز از فاکتورهای موثر بر کارایی تراریختی گیاهان محسوب می‌شود، زیرا که در این مدت زمان، باکتری‌ها با گیاهچه‌ها تماس حاصل کرده و در ادامه در محیط هم‌کشتی موجب انتقال T-DNA به گیاه می‌شود (Jan *et al.*, 2018). در بررسی‌های انجام شده بهترین مدت زمان تلقیح در گوجه‌فرنگی ۱۰ دقیقه گزارش شده است که قابل انطباق با نتایج این پژوهش می‌باشد (Lopez *et al.*, 2015; Senapati. 2016). در حالیکه در مطالعه دیگر مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه برای گوجه-فرنگی گزارش شده است و درصد گیاهان تراریخته به دست آمده در کمتر از این مدت زمان پایین بوده است (Mishra. 2018).

اثر مدت زمان هم‌کشتی آگروباکتریوم روی تراریختی گوجه-فرنگی: این آزمایش به منظور تعیین مدت زمان هم‌کشتی مناسب در انتقال ژن کیتیناز به گوجه‌فرنگی انجام شد. به این منظور چهار مدت زمان مختلف هم‌کشتی ۱، ۲، ۳ و ٤ روز برای تراریختی ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از غلظت OD_{600} =۰/٦ آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش (شکل ۳d)، نشان داد که بین زمان‌های مختلف هم‌کشتی از نظر میزان آلوده‌سازی و انتقال ژن کیتیناز به گوجه‌فرنگی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. از هم-کشتی دو روزه پس از تلقیح آگروباکتریوم با ریزنمونه‌های برگ-لپه‌ای پاسخ بهتری بدست آمد و کمترین میزان کارایی تراریختی در مدت زمان هم‌کشتی یک روز حاصل شد. مدت زمان هم‌کشتی باکتری از دیگر عوامل موثر در تراریختی گیاهان است که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه‌ها کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم مدت زمان هم‌کشتی از ۱ تا ۷ روز متفاوت می‌باشد. معمولا بیشترین کارآیی تراریختی گیاهان در ۲ تا ۵ روز هم‌کشتی گزارش شده است (Sujatha *et al.*, 2012). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در مدت زمان هم‌کشتی کوتاه‌تر آگروباکتریوم زمان کافی برای انتقال و درج ژن هدف به گیاه را پیدا نمی‌کند. در صورت طولانی‌تر بودن زمان هم‌کشتی نیز، با توجه به رشد سریع باکتری در اطراف نمونه، در مراحل گزینش غلظت معمول آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط کشت، قادر به کنترل و حذف باکتری نخواهند بود. این امر سبب ایجاد مشکل در انجام تراریختی می‌شود (Stavridou *et al.*, 2019). همچنین در طول مرحله هم‌کشتی، قرار دادن ریزنمونه‌ها در تاریکی سبب القاء تراریختی شد. شاید یک علت برای اثر مثبت تاریکی برانتقال ژن این باشد که آگروباکتریوم یک باکتری خاکزی است که در زیر خاک (شرایط تاریکی) به طوقه گیاه حمله می‌کند. در نتیجه احتمالا تاریکی امکان اتصال مناسب باکتری به سلول‌های گیاه و انتقال ژن را فراهم می‌کند (Gurusaravanan *et al.*, 2020). در مطالعات مختلف از مدت زمان هم‌کشتی دو روز برای تراریختی در ریزنمونه برگ‌لپه و هیپوکوتیل گوجه‌فرنگی استفاده شده است که مطابق با نتایج ما می‌باشد (Mishra. 2018; Kazemi *et al.*, 2020; Secgin *et al.*, 2021).

اثر استوسیرینگون بر تراریزش گوجه‌فرنگی: به منظور بررسی اثر استوسیرینگون بر میزان کارایی انتقال ژن کیتیناز شیمری به گوجه‌فرنگی این آزمایش انجام شد. بدین منظور اثر سطوح مختلف استوسیرینگون (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) با استفاده از غلظت OD_{600} =۰/٦ آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل وجود یک همبستگی مثبت بین کارایی تراریختی و غلظت استوسیرینگون تا ۱۵۰ میکرومولار را نشان داد، به طوریکه در غیاب استوسیرینگون، کارایی تراریختی خیلی پایین بود. با افزایش میزان استوسیرینگون تا ۱۵۰ میکرومولار به محلول باکتری، کارایی تراریختی نیز افزایش چشم‌گیری نشان داد. اما با بالاتر بردن غلظت استوسیرینگون به ۲۰۰ میکرومولار، کارایی تراریختی کاهش یافت (شکل۳e). استوسیرینگون از دیگر عوامل موثر در تراریختی گیاهان است که از طریق القاء بیان ژن‌های بیماری‌زای Vir در پلاسمید Ti و نفوذ چندگانه T-DNA کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، لذا تراریختی گیاهان را می‌توان با افزودن ترکیبات فنلی از قبیل استوسیرینگون در محیط هم‌کشتی یا محیط باکتریایی افزایش داد (Mehrizadeh *et al* ., 2021).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]



شکل۳- a) تاثیر زمان‌های مختلف پیش‌کت (روز) بر میانگین تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های تراریخته، b) تاثیر غلظت‌های (OD_{600}) مختلف آگروباکتریوم بر میانگین تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های تراریخته، C)تاثیر زمان‌های مختلف تلقیح (دقیقه) بر میانگین تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های تراریخته، d) تاثیر زمان‌های مختلف هم‌کشتی (روز) بر میانگین تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های تراریخته، e) تاثیر غلظت‌های مختلف استوسیرینگون (میکرومولار) بر میانگین تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های تراریخته *حرف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد

Figure 3. a) The effect of different pre-cultures (days) on the average number of regenerated shoots in transgenic explants b) The effect of different concentrations (OD_{600}) of *Agrobacterium* on the average number of regenerated shoots in transgenic explants, c) The effect of different inoculation times (minutes) on the average number of regenerated shoots in transgenic explants, d) The effect of different times of co-cultivation (days) on the average number of regenerated shoots in transgenic explants, e) The effect of different concentrations of acetosyringone (µM) on the average number of regenerated shoots in transgenic explants *The common denominator indicates that there is no significant difference in the 5% probability level based on Duncan's test

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

شکل٤- مراحل مختلف باززایی ریزنمونه‌های تراریخته a) جوانه‌زنی بذور استریل در محیط GM، b) باززایی ریزنمونه برگ لپه‌ایی در محیط کشت انتخابی RM،c) تولید ساقه و برگ از ریزنمونه برگ‌لپه،d) ریشه‌زایی در محیط RTM، e) سازگاری گیاه باززا شده به محیط بیرون، f) گیاه باززا شده

Figure 4. Various stages of regeneration of transgenic explants a) Germination of sterile seeds in the Germination Medium b) Regeneration of cotyledon explants in selected Regeneration Medium c) Production of stems and leaves from cotyledon explants d) Rooting of elongated shoots in the Rooting Medium e) Acclimated plantlet in the greenhouse f) Regenerated plant

غلظت مناسب استوسیرینگون برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است بطوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه نقش بسزایی در کارایی تراریختی گیاهان دارد. معمولا در غیاب استوسیرینگون، کارایی تراریختی اندک است اما در مقادیر بالای استوسیرینگون کارایی تراریختی به میزان زیادی کاهش می‌یابد، افزودن بیش از نیاز استوسیرینگون، ایجاد سمیت کرده و به نحوی از انتقال T-DNA یا تکثیر سلول‌های تراریخته جلوگیری می‌کند (Kazemi *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای از غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون در تراریختی گوجه‌فرنگی استفاده کردند (Jan *et al.*, 2018).

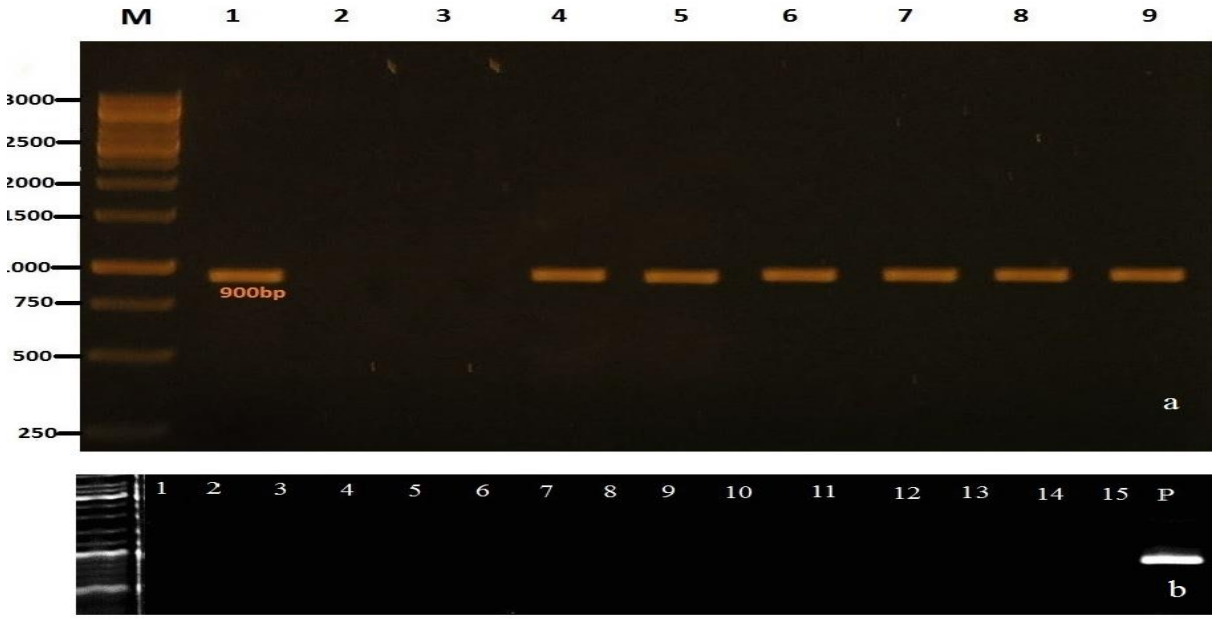
باززایی گیاهان تراریخته حامل ژن کیتیناز شیمری: معمولاً یک هفته بعد از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط رشد باززایی حاوی آنتی-بیوتیک تظاهر اولیه جوانه‌های تراریخت در انتهای بریده و لیز در اطراف رگبرگ اصلی برگ‌های کوتیلدونی قابل مشاهده بود. از این تعداد نوساقه‌های حاوی ژن NPTII نسبت به کانامایسین مقاوم بوده و سبز باقی ماندند و سایر نوساقه‌ها سفید یا زرد شده و در نهایت حذف شدند، ریزنمونه‌های سبز باقی مانده، واکشت شده و مجددا در محیط RM ذکر شده قرار گرفتند پس از ۳۰ روز تشکیل شاخساره مشاهده شد، پس از ٦٠ روز ریشه‌زایی در محیط RTM قابل مشاهده بود (شکل ٤).

بررسی مولکولی گیاهان تراریخت

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز شیمری (35s و CHIT42R) قطعه مورد انتظار حدود ۹۰۰ جفت باز تکثیر شد. از سازه کیتیناز شیمری (pBISM2) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، این در حالی بود که نتیجه PCR

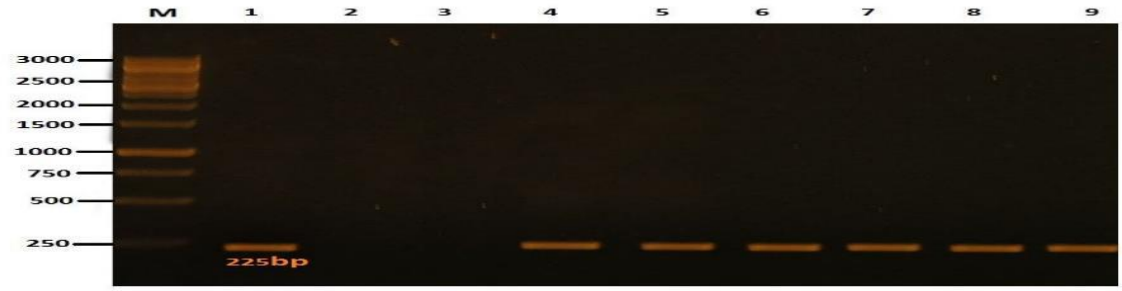
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

گیاه شاهد، منفی بود (شکل a۵). جهت تائید تراریختی گیاه با ژن موردنظر و عدم آلودگی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای ژن‌های بیماری‌زای مخصوص آگروباکتریوم (VirG) انجام شد. عدم حضور این باند در گیاه تراریخت نشان دهنده انتقال موفقیت‌آمیز ژن به ژنوم گیاه و عدم آلودگی به باکتری است (شکل b۵).



شکل۵– a) الگوی الکتروفورزی محصولات PCR گیاهان تراریخت حاوی ژن کیتینازشیمری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 35s و CHIT42R M- نشانگر وزن مولکولی (1 kb DNA ladder)، ۱– شاهد مثبت (قطعه تکثیر شده از پلاسمید حاوی ژن کیتینار) ۲– شاهد منفی (فاقد DNA)، ۳– شاهد منفی (محصول PCR از گیاه غیر تراریخت)، ٤ تا ۹– محصول PCR از گیاهان تراریخت. b) نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن VirG آگروباکتریوم تعدادی از گیاهان باززایی شده. M: نشانگر وزن مولکولی، ۱۵–۱گیاهان تراریخت حاوی ژن کیتیناز، P: محصول PCR مربوط به آگروباکتریوم به عنوان شاهد مثبت

Figure 5. a) Electrophoretic pattern of PCR product of transgenic plants containing chitinase-chimeric gene using 35s and CHIT42R specific primers M: Molecular marker (1 Kb DNA Ladder), 1: Positive control (the plasmid that is harboring chitinase gene), 2: Negative control (distilled water without DNA), 3: Negative control (PCR product from non-transgenic plant), 4-9: transgenic plants. b) Analysis of transgenic plants by PCR technique using specific primers of *Agrobacterium* VirG, M: Molecular marker (1 Kb DNA Ladder), 1-15: Electrophoretic pattern of PCR product of transgenic plants containing chitinase-chimeric gene, P: PCR product related to agrobacteria as a positive control



شکل٦– الگوی الکتروفورزی محصولات PCR گیاهان تراریخت حاوی ژن کیتینازشیمری با استفاده از آغازگرهای اختصاصیFchBD1 و RchBD. M نشانگر وزن مولکولی (1 kb DNA ladder)، ۱– شاهد مثبت (محصول PCR از سازه pBISM2) ۲– شاهد منفی (فاقد DNA) ۳– کنترل منفی (محصول PCR از گیاه غیر تراریخت)، ٤ تا ۹– محصول PCR از گیاهان تراریخت

Figure 6. Electrophoretic pattern of PCR product of transgenic plants containing chitinase-chimeric gene using FchBD1 and RchBD specific primers, M: Molecular marker (1 Kb DNA Ladder), 1: Positive control (PCR product of pBISM2), 2: Negative control (distilled water without DNA), 3: Negative control (PCR product from non-transgenic plant), 4-9: transgenic plants

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

از آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز شیمری حاوی کیتین بایندینگ دومین(ChBD)، (FchBD1 و RchBD) نیز برای تایید حضور ژن کیتیناز شیمری استفاده شد. انجام PCR با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت با ژن کیتیناز شیمری قطعه مورد انتظار حدود ۲۲۵جفت باز را تکثیر نمود. از سازه کیتیناز شیمری (pBISM2) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، این در حالی بود که نتیجه PCR گیاه شاهد، منفی بود (شکل ٦).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای انتقال ناقل پلاسمیدی حاوی ژن کیتیناز شیمری به گیاه گوجه‌فرنگی، برخی از عوامل تعیین کننده بهینه شدند، به طوریکه بیشترین میزان کارآیی تراریختی ریزنمونه برگ‌لپه شش روزه رقم بناب گوجه‌فرنگی در غلظت OD_{600} =۰/٦ سویه LBA4404 آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه و مدت زمان پیش کشت و هم‌کشتی دو روز به همراه ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون حاصل شد. تعدادی از لاین‌های تراریخته برای تجزیه و تحلیل‌های مولکولی تکمیلی و آزمون‌های زیست‌سنجی در نسل‌های پیشرفته انتخاب شده و در گلخانه کشت شدند.

منابع

Chang YC, Baker B, Kleifeld O, Chet I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145.

Chen M, Lung S, Du Z, Chye M. 2014. Engineering plants to tolerate abiotic stresses. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 3(1): 81-87.

Cole JS, Zvenyika Z. 1986. Integrating *Trichoderma harzianum* and triadimenol for the control of tobacco sore shin in zimbabwe. Bull. Spec. CORESTA Symposium, Taormina, p. 68,

Cortina C, Culiañez-Macia AF. 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 269–275.

Deeba F, Shakir HA, Irfan M, Khan M, Qazi JI. 2022. Utilization of Agro-Industrial Waste for Chitinase Production by Locally Isolated Bacillus subtilis using Response Surface Methodology. Pakistan Journal of Zoology 54(2): 551-560.

Finch-Savage W, Clay H, Budge S. 2003. Biological control of *Sclerotinia pseudotuberosa* and other fungi during moist storage of quercus robur seeds. European Journal of Plant Pathology 109: 615–624.

Gurusaravanan P, Vinoth S, Jayabalan N. 2020. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation method for cotton (*Gossypium hirsutum* L. 'KC3') assisted by microinjection and sonication. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 56(1): 111-121.

Hassann N, El-shafey NM, Khodary SEDA, El- shabrawi HATTEM, Badr A. 2021. Expression of OsDREB2A in transgenic tomato improves drought tolerance. Romanian Biotechnological Letters 26(6): 3145-3154.

Honda C, Ohkawa K, Kusano H, Teramura H, Shimada H. 2021. A simple method for in planta tomato transformation by inoculating floral buds with a sticky *Agrobacterium* tumefaciens suspension. Plant Biotechnology 38(1): 153-156.

Jan SA, Ali GM, Ali S, Shah SH, Ahmad N. 2018. Genetic improvement in tomato (*Solanum lycopersicum*) against salt stress. Indian Journal Biotechnology 17:459.

Keshavareddy G, Kumar ARV, Ramu VS. 2018. Methods of plant transformation-a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7(7): 2656-2668.

Lindsey DL, Barker R. 1976. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic condition. Phytopathology 57: 1262-1263.

Lopez E, Proano K, Jadan M, Mihai R. 2015. Callus tissue induction and analysis of GUS reporter gene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) transformed with *Agrobacterium* tumefaciens. Romanian Biotechnological Letters 20(2): 10205.

Matroodi S, Motallebi M, Zamani M, Moradyar M. 2013. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. World Journal of Microbiology Biotechnology 29:1517-1523.

Mehrizadeh V, Dorani E, Mohammadi SA, Ghareyazie B. 2021. Expression of recombinant human IFN-γ protein in soybean (*Glycine max* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 146(1): 127-136.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]

Mishra S. 2018. Conditions for efficient transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) cultivars with cry1a (c) gene of Bacillus thuringiensis. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7(2): 1772-1776.

Mohajel Kazemi E, Pazhouhandeh M, Jonoubi P, Kazemian M. 2020. The optimization of gene transfer to tomato and the study of expression possibility of salt-tolerance gene (SOS3). Nova Biologica Reperta 7 (1): 76-84.

Osmani Z, Jin S, Mikami M, Endo M, Atarashi H, Fujino K, Nakahara KS. 2019. CRISPR/Cas9-mediated editing of genes encoding rgs-CaM-like proteins in transgenic potato plants. In Antiviral Resistance in Plants. Humana, New York, NY. 153-165pp.

Paramesh H, Fakrudin B, Kuruvinashetti MS. 2010. Genetic transformation of a local variety of tomato using gus gene: an efficient genetic transformation protocol for tomato. Journal of Agricultural Technology 6: 87-97.

Raj SK, Singh R, Pandey SK, 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.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81: 8014-8018.

Secgin Z, Kavas M, Yildirim K. 2021. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration for CRISPR/Cas9 genome editing of commercial tomato cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 45(6): 704-716.

Senapati S. 2016. A Review on research progress on in vitro regeneration and transformation of tomato. Annual Research & Review in Biology 9(6): 1-9.

Sharma P, Kumar V, Ramesh V, Saravanan K, Deep S, Sharma M, Mahesh S, Dinesh S. 2011. Biocontrol genes from *Trichoderma* species. African Journal of Biotechnology 10(86): 19898-19907.

Singareddy V, Sheri VR, Muddanuru T, Tatineni R, Jain RK, Sankaraneni CR, Mulpuri S. 2018. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for resistance to necrosis disease through deployment of the TSV coat protein gene. Plant Cell Tissue and Organ Culture 135(2): 263-277.

Soare R, Maria D, Alexandru-Ioan A, Soare M. 2019. The evolution of some nutritional parameters of the tomato fruit during the harvesting stages. Horticultural Science 46(3): 132-137.

Stavridou E, Tzioutziou NA, Madesis P, Labrou NE, Nianiou-Obeidat I. 2019. Effect of different factors on regeneration and transformation efficiency of tomato (*Lycopersicum esculentum*) hybrids. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 55(3): 120-127.

Sujatha M, Vijay S, Vasavi S, Veera Reddy P, Chander Rao S. 2012. *Agrobacterium-mediated* transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 110: 275-287.

Tian PP, Lv YY, Wei S, Zhang SB, Zheng XT, Hu YS. 2022. Antifungal activity of puroindoline protein from soft wheat against grain molds and its potential as a biocontrol agent. Letters in Applied Microbiology. 75(1):114-125.

Yasmeen A. 2009. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). Acta Physiologiae Plantarum 31:1271-1277.

Zsögön A, Vicente MH, Reartes DS, Peres LEP. 2017. Understanding and improving water-use efficiency and drought resistance in tomato. Achieving sustainable cultivation of tomatoes. Burleigh Dodds Science Publishing, p26.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.4.1]