

باززایی درون شیشه‌ای گیاه تاجریزی قرمز از ریزنمونه‌های مختلف و بررسی پتانسیل انتقال ژن به روش ریزپرتابی

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۶۷-۱۷۷

In vitro regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun

نرگس پشم فروش^۱، محمد احمدآبادی^{۲*}
Narges Pashmforosh¹, Mohammad Ahmadabadi^{2*}

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
- ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

1- MSc. Student, 2-Associate Professor, Biotechnology Dept. Agriculture Fac.
Azarbaijan Shahid Madani University, Km35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.ahmadabadi@azaruniv.edu

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۵)

چکیده

تاجریزی قرمز (*Solanum alatum* Moench.) یکی از گیاهان دارویی مهم خانواده سولاناسه است. فن آوری کشت بافت بزرگ‌ترین کاربرد بیوتکنولوژی محسوب می‌شود و می‌توان از آن برای نگهداری، تکثیر سریع و اصلاح ژنتیکی گیاهان در جهت اصلاح مولکولی و یا بهینه سازی تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد. در این مطالعه، باززایی گیاه کامل از ۳ نوع ریزنمونه شامل هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، دستورالعمل‌هایی برای باززایی گیاه تاجریزی قرمز از هر ۳ نوع ریزنمونه گزارش می‌شود. بهترین پاسخ باززایی ساقه (۱۰۰٪) در غلظت ۰/۵ mg/l BAP در ریزنمونه برگ بدست آمد. گیاهچه‌های حاصل با کارایی بالا (۱۰۰٪) به محیط گلخانه سازگار شده و گل‌ها و میوه‌های طبیعی تولید کردند. ریزنمونه برگ نیز به عنوان بهترین ریزنمونه برای حداکثر شاخه‌زایی (با میانگین ۲۹/۹۳ ساقه‌چه در هر ریزنمونه) معرفی می‌شود. همچنین، پتانسیل ریزنمونه‌های برگ برای انتقال و بیان ژنهای خارجی با استفاده از تفنگ ژنی (فشارهای پرتاب ۱۱۰۰ یا ۱۳۵۰ psi)، از طریق بیان موقت ژن GUS ارزیابی شده و به عنوان ریزنمونه مناسب برای انتقال ژن گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تاجریزی قرمز،
ریزازدیادی،
باززایی درون شیشه‌ای،
Solanum alatum

مقدمه

تاجریزی قرمز با نام علمی *Solanum alatum* Moench. یک گیاه دارویی مهم از خانواده سولاناسه است. این گونه به داشتن آلکالوئیدهای استروئیدی، به ویژه سولاسونین، سولاسودین، و سولامارژین شناخته شده است (Gunana) (Sundari et al. 2013, Yogananth et al. 2009). مواد بارزش زیادی با خواص آنتی‌اکسیدانت، ضد درد، ضداسپاسم، ضد باکتری و ادرارآور در این گیاه شناسایی شده و در درمان بیماری‌هایی از قبیل ورم پستان، گردن رحم، برونشیت مزمن، سرطان معده، و کبد استفاده می‌شود. همچنین دارای یک اثر محافظتی در برابر آسیب حاد کبدی ناشی از ترا کلرید کربن (CCl_4) بوده و عصاره آبی آن هر دو اثر ضد التهابی و محافظت کبدی را نشان داده است (Lin Ch. Ch. et al. 1995, Lin S. C. et al. 2000). استفاده از فن‌آوری کشت بافت برای تکثیر رویشی گیاهان در سطح وسیع، بزرگ‌ترین کاربرد بیوتکنولوژی محسوب می‌شود. مهم‌ترین مزیت این تکنولوژی برای گیاهان دارویی، ارائه یک منبع گیاهی مطمئن است که می‌تواند برای کشت بافت گیاه مورد نظر در مقیاس وسیع برای استخراج ماده موثره از آن در سطح انبوه استفاده شود. پیشرفت در کشت بافت، همراه با بهبود در روش‌های مهندسی ژنتیک به ویژه فن‌آوری انتقال ژن، راه‌های جدیدی برای تولید مواد دارویی، افزودنی‌های بیولوژیکی فعال، و دیگر مواد مفید، باز کرده‌اند. با توجه به ارزش بالای برخی گیاهان گونه سولانوم از نظر دارویی، مطالعاتی روی کشت درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلفی از آن از قبیل *S. nigrum* (Xu et al. 2014)، *S. aethiopicum* (Gisbert et al. 2006)، *S. virginum* (Borgato et al. 2007)، *S. americanum* (O'Connor-), *S. villosum* (Sánchez et al. 2010) و Hussein and

(Aqlan 2011)، و برخی دیگر گزارش شده است. کشت و تکثیر و تولید ترکیبات فیتوشیمیایی در محیط درون‌شیشه‌ای می‌تواند به وسیله فاکتورهای از قبیل نوع ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد تحت تاثیر قرار گیرد (Su and Zhang 2014). پاسخ به باززایی درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلف خانواده سولاناسه از ریزنمونه‌های متنوعی از قبیل برگ (Ahmadabadi et al. 2007, Mohammed et al. 2015, Mohana Priya et al. 2011, Naing et al. 2014, O'Connor-Sánchez et al. 2010, Ramesh et al. 2008, Wang et al. 2009)، نوک ساقه (Ahmed et al. 2001, Babaei et al. 2014, Mythili et al. 2001, Misra 1996)، گره (Syamala and Devi 2003)، کوتیلدون (Sommer et al. 2012)، پروتوپلاست (Jones 2003, Singh and Chand 2007)، Karamian 2007, Yuan et al. 2000, Zhang et al. 2006)، و ... گزارش شده است که در این بین، باززایی از قطعات برگ به دلیل تهیه آسان مطلوب‌تر بوده است. با توجه به ارزش بالای اقتصادی و دارویی گیاه تاجریزی قرمز و ضرورت وجود یک سیستم کارآمد کشت بافت و باززایی برای فراهم کردن بستر لازم برای اصلاح مولکولی این گیاه از طریق مهندسی ژنتیک، در این پژوهش، ایجاد پروتکل‌های کارآمد باززایی از ریزنمونه‌های مختلف بررسی شد. نتایج این بررسی می‌تواند در پژوهش‌ها مختلف روی این گیاه مهم دارویی از قبیل حفاظت ژنتیکی، ریزازدیادی، تولید ترکیبات دارویی و اصلاح مولکولی از طریق دستکاری ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه گیاهچه‌های استریل

بذرهای تاجریزی قرمز (*Solanum alatum* Moench.) از شهر خسروشاه استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شدند. ضدعفونی سطحی بذور با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، و سپس هیپوکلریت سدیم ۲/۶٪ به اضافه یک قطره Tween20 به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از ۳-۴ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بذور روی محیط MS (Murashige and Skoog 1962) تکمیل شده با ۳٪ ساکارز کشت شدند. pH محیط روی ۵/۸ تنظیم شده و برای جامد کردن محیط از ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. بذور استریل پس از ۲ هفته جوانه زده و پس از ۱ تا ۴ هفته رشد، برای تهیه ریزنمونه استفاده شدند.

تهیه ریزنمونه و نحوه کشت روی محیط

آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۴ در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. ریزنمونه‌های محور زیرلپه (هیپوکوتیل) و لپه از گیاهچه‌های یک هفته‌ای و جداکشت‌های برگ از گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای تهیه شدند. هیپوکوتیل به قطعات ۰/۵ سانتیمتری و لپه و برگ به قطعات حدود ۳ میلی‌متر مربعی تقسیم شدند. سپس، جداکشت‌ها در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای با ارتفاع ۲ سانتی‌متر روی محیط‌های کشت مورد نظر کشت شدند. برای آزمایش جابجایی و انتقال هورمون‌ها، قطعات ۱ یا ۲ سانتی‌متری از پایین ساقه (محور زیرلپه) گیاهچه‌های استریل یک هفته‌ای، تهیه شد. سپس، جداکشت‌ها به صورت عمودی از ناحیه پایه و یا نوک در داخل شیشه مرباهای حاوی محیط کشت‌های مورد نظر کشت شدند.

محیط‌های کشت و غلظت تنظیم کننده های رشد استفاده شده

برای بررسی باززایی ریزنمونه‌های مختلف، از محیط MS تکمیل شده با ۳٪ ساکارز استفاده شده و چهار غلظت

مختلف هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در آزمایش بررسی جابجایی هورمون‌ها در دو جهت پایه به نوک و نوک به پایه، همان چهار غلظت ذکر شده از دو نوع سیتوکنین BAP و زآتین (Zeatin) مورد بررسی قرار گرفتند.

شرایط رشد و یادداشت‌برداری از نمونه‌های کشت شده

تمامی کشت‌ها در اتاق رشد با چرخه روزانه ۱۶ ساعت روشنایی ۲۵ μE/m²s با درجه حرارت ۲۵ °C و ۸ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۲۲ °C قرار داده شدند. پس از ۶ هفته کشت (بدون واکشت) پارامترهایی از قبیل درصد کالوس‌زایی و اندام‌زایی، و تعداد شاخه‌های باززا شده در هر ریزنمونه، ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک و تولید بذر

گیاهچه‌های باززا شده برای ریشه‌زایی روی محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند. پس از ۲ هفته، تمام گیاهچه‌ها با کارایی بالا ریشه‌زایی کرده و سپس به گلدان‌های کوچک حاوی خاک برگ و خاک معمولی به نسبت ۱:۱ منتقل شدند. تمام گیاهچه‌ها پس از یک هفته با محیط گلخانه سازگار شده، گل و میوه حاوی بذور سالم تولید کردند.

انتقال ژن به نمونه‌های برگ به روش ریزپرتابی

انتقال ژن در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی مدل PDS-1000/He (BioRad-آمریکا) و به روش شرح داده شده توسط قربان‌زاده و احمدآبادی (Ghorbanzade and Ahmadabadi 2015) انجام گرفت. برای آماده‌سازی مواد گیاهی لازم برای انتقال ژن به روش ریزپرتابی، تمام

شکل ۱-الف و ب). باززایی هم بصورت اندام‌زایی مستقیم و هم بصورت غیرمستقیم و با واسطه تشکیل کالوس انجام شد (شکل ۱، ج-ه). با این حال، در غلظت-های بالاتر سیتوکینین، از میزان کالوس‌زایی کاسته شده و اندام‌زایی بیشتر بطور مستقیم و بدون واسطه کالوس انجام گرفت. اندام‌زایی مستقیم در محیط درون شیشه ای با کاربرد سیتوکینین‌ها، در مقالات متعددی گزارش شده است (Aremu et al. 2015, Malik et al. 2007, Milazzo et al. 1999, Montalban et al. 2013, Soniya and Das 2002) که کنترل آن بیشتر از طریق تنظیم توزیع حامل اکسین PIN1 انجام می‌شود (Marhavy et al. 2011). در ریزنمونه برگ، بالاترین درصد باززایی در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که ۱۰۰٪ ریزنمونه‌ها به باززایی پاسخ دادند. با این حال، در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، میانگین تعداد شاخسارهای تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه بطور معنی داری بیشتر بود (جدول ۲). برای ریزنمونه کوتیلدون، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از لحاظ درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخسارهای تشکیل شده بهترین تیمار تشخیص داده شد. برای ریزنمونه هیپوکوتیل که بر خلاف دو ریزنمونه دیگر در محیط بدون هورمون نیز تا حدودی کالوس‌زایی و باززایی نشان داد، افزودن BAP تا ۰/۵ گرم در لیتر اثر مثبت در کالوس‌زایی، باززایی و تعداد شاخسارهای تشکیل شده نشان داد (جدول ۲)، ولی افزایش سطح هورمون تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، تا حدودی اثر منفی روی درصد باززایی داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نسبت سیتوکینین‌های داخلی در بافت‌های مختلف گیاهچه‌های تاجریزی شامل برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون یکسان نیست و مثلاً، غلظت‌های بالاتری از آن در هیپوکوتیل تجمع یافته و به همین دلیل، این بافت روی محیط فاقد هورمون نیز قادر به باززایی بوده و یا زودتر از سایر ریزنمونه‌ها به سطح اشباعی از سیتوکینین می‌رسد. مطالعات نشان می‌دهند که نه تنها غلظت هورمون‌های داخلی روی باززایی تاثیر دارند، بلکه غلظت آنها نیز در طول پاسخ باززایی در

برگهای یک گیاهچه جوان چهار هفته‌ای شامل ۹ الی ۱۰ برگ، قطع شده و از قسمت فوقانی و یا تحتانی برگ در مرکز یک پتری‌دیش حاوی محیط پایه MS گذاشته شدند. پلاسמיד pFF19G حاوی ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پیشبر و پایانبر 35S (Ghorbanzade and Ahmadabadi 2015) روی ذرات طلا با قطر ۰/۶ میکرومتر رسوب داده شده و با فشار پرتاب ۱۱۰۰ و یا ۱۳۵۰ psi روی برگ‌ها شلیک شدند. نمونه‌ها سپس برای بیان ژن *GUS* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند.

رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی *GUS*

برای رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی *GUG*، برگ‌های شلیک شده با ذرات طلای پوشیده شده با پلاسמיד pFF19G، پس از یک روز قرار گرفتن در ۲۵ °C، به روش ذکر شده در قربان‌زاده و همکاران (۲۰۱۵)، رنگ‌آمیزی شدند. بطور خلاصه، برگ‌ها به مدت یک شب در محلول رنگ‌آمیزی *GUS* [5 mM potassium, 1 mM EDTA (pH=8), 5 mM potassiumferrocyanide, ferricyanide 200, 5 mM potassium phosphate (pH=7.0), 1% Triton-X-, 100, 1 mg/ml X-Gluc] و در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس برای حذف رنگدانه‌های طبیعی، برگ‌های رنگ‌آمیزی شده به مدت یک ساعت با محلول ۵۰٪ اتانول و سپس چندین ساعت با اتانول خالص در دمای اتاق تیمار شدند.

نتایج و بحث

برای بررسی قابلیت باززایی گیاه تاجریزی قرمز از ۳ نوع ریزنمونه برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون، از چهار سطح مختلف هورمون سیتوکینین بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که BAP تقسیم سلولی و باززایی ساقچه از هر ۳ نوع ریزنمونه را به شدت تحریک می‌کند، به طوری‌که در تمام ریزنمونه‌ها اضافه کردن سطوح مختلف BAP تاثیر معنی‌داری روی باززایی نشان داد (جدول ۱ و ۲، و

با توجه به بالاتر بودن تعداد شاخسارهای تشکیل شده در هر ریزنمونه برگ و ساده‌تر بودن تهیه و آماده‌سازی آن، این ریزنمونه برای آزمایش‌های انتقال ژن و مهندسی ژنتیک توصیه می‌شود.

کشت درون شیشه‌ای تغییر می‌کند (Montalban et al. 2013, Perez-Jimenez et al. 2014a, Perez-Jimenez et al. 2014b). روی هم رفته می‌توان گفت، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای باززایی کارآمد از هر ۳ نوع ریزنمونه کافی است (جدول ۲ و شکل ۱). با این حال،

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BAP روی میزان کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های متنوع گیاه تاجریزی قرمز
Table 1. Variance analysis on the effect of different concentrations of BAP on callus induction and regeneration frequency from various explants of red nightshade

میانگین مربعات (Mean of squares)			درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation
تعداد شاخسارها در ریزنمونه Number of shoots per explant	درصد باززایی ساقه Shoot regeneration (%)	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)		
1422.922**	12309.028**	2656.250**	3	هورمون BAP
15.551 ^{ns}	4843.750**	15950.521**	2	ریزنمونه
54.811**	1944.444**	638.021 ^{ns}	6	ریزنمونه×BAP
8.475	243.056	694.444	36	خطای آزمایش

** : اختلاف در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است. ^{ns} : اختلاف معنی دار نیست.

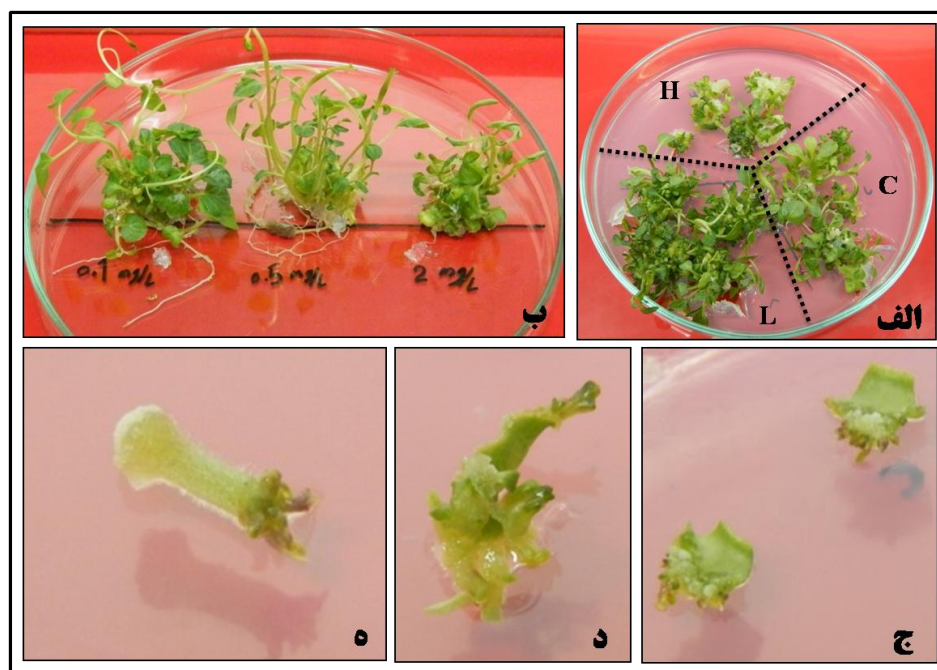
** : Differences are significant at the 1% probability level. ^{ns} : Differences are not significant.

جدول ۲- میزان کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های متنوع گیاه تاجریزی قرمز شامل برگ (L)، کوتیلدون (C) و هیپوکوتیل (H) روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP

تعداد شاخسارها در ریزنمونه Number of shoots per explant	درصد باززایی ساقه Shoot regeneration (%)	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	نوع ریزنمونه Explants type	غلظت BAP BAP concentration
1.93 ^{de}	81.25 ^{bc}	50 ^c	H	0
0 ^e	0 ^e	0 ^f	C	
0 ^e	0 ^e	0 ^f	L	
5.68 ^c	87.5 ^{abc}	62.5 ^{bc}	H	0.1
2.9 ^d	50 ^d	25 ^{cd}	C	
1.31 ^{de}	75 ^c	18.75 ^{ef}	L	
18.18 ^b	100 ^a	87.5 ^a	H	0.5
19.56 ^b	93.75 ^{ab}	56.25 ^c	C	
29.93 ^a	100 ^a	12.5 ^{ef}	L	
18.18 ^b	93.75 ^{ab}	81.25 ^{ab}	H	2
18.56 ^b	81.25 ^{bc}	43.75 ^{cd}	C	
17.68 ^b	100 ^a	0 ^f	L	

حروف روی اعداد در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین اعداد آن ستون نسبت به هم در سطح احتمال ۵٪ است.

The letters on the numbers in each column represents a significant difference between the values at the 5% probability level.

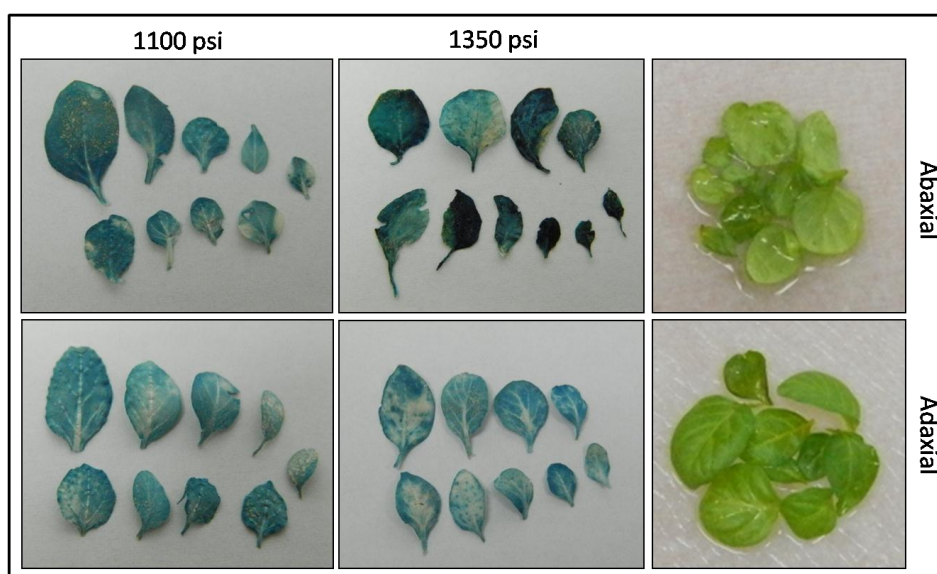


شکل ۱- باززایی گیاه تاجریزی از ۳ نوع ریزنمونه برگ (L)، کوتیلدون (C) و هیپوکوتیل (H) پس از ۶ هفته کشت روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP (الف). ب: تصویری از تعداد و رشد شاخسارهای حاصل از باززایی قطعات برگ روی محیط MS حاوی غلظتهای مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر (به ترتیب از چپ به راست). بزرگ نمایی از ریزنمونه های در حال باززایی از قطعات برگ (ج)، کوتیلدون (د) و هیپوکوتیل (ه) پس از ۳ هفته کشت روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP نشان داده شده اند.

Fig. 1. Regeneration of red nightshade from 3 different explants including leaf (L), cotyledon (C) and hypocotyl (H) after 6 weeks culture on MS medium containing 0.5 mg/l BAP (A). B: A picture of the number and growth of the plantlet derived from leaf regeneration on MS medium containing different BAP concentration including 0.1, 0.5 and 2 mg/l (from left to right, respectively). A close-up from regenerating leaf (C), cotyledon (D) and hypocotyl (E) explants after 3 weeks culture on MS medium containing 0.5 mg/l BAP are shown.

تولید می‌شوند، ویژگی‌های مطلوب برای نفوذ ذرات طلای حاوی پلاسمید را پیدا کرده و با توجه به پتانسیل بالای این سلولها برای باززایی (شکل ۱) به احتمال زیاد بافت مناسبی برای انتقال پایدار ژنهای خارجی به این گیاه هستند. همچنین، بافت برگ به ویژه با توجه به تجمع تعداد زیادی کلروپلاست در سلولهای مزوفیل، مناسب‌ترین ریزنمونه برای انتقال ژن به اندامک کلروپلاست نیز است و دستورالعمل‌های موجود برای انتقال ژن به اندامک‌ها در گیاهان خانواده سولاناسه از قبیل توتون، گوجه‌فرنگی، و سیب‌زمینی با استفاده از بافت برگ به عنوان ریزنمونه توسعه یافته‌اند (Ruf and Bock 2014, Svab and Maliga 1993, Valkov et al. 2014).

با توجه به اینکه ریزنمونه برگ بهترین پاسخ را از نظر باززایی نشان داد، در ادامه، قابلیت این ریزنمونه برای انتقال و بیان ژن با استفاده از بیان موقت ژن گزارشگر GUS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های برگ حاصل از گیاهچه‌های استریل، برای انتقال و بیان ژنهای خارجی بسیار مناسب هستند (شکل ۲). تمام برگ‌های گیاهچه‌ای با سن و اندازه‌های متفاوت و در هر دو جهت پشت و روی برگ، در هر دو فشار پرتاب ۱۱۰۰ و ۱۳۵۰ psi بطور نسبتاً یکنواخت رنگ آبی حاصل از فعالیت آنزیم GUS را تولید کردند و بنابراین، اختلافی از نظر کارایی انتقال ژن در دو فشار پرتاب آزمایش شده مشاهده نشد (شکل ۱). این نشان می‌دهد که سلولهای برگ گیاه تاجریزی قرمز که در محیط درون شیشه‌ای

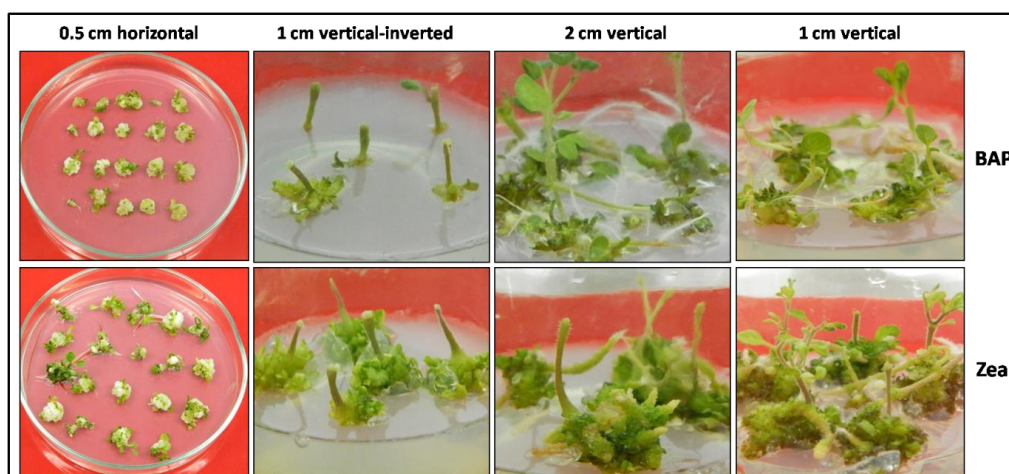


شکل ۲- بررسی پتانسیل انتقال ژن به ریزنمونه های برگ گیاه تاجریزی به روش تفنگ ژنی از طریق بیان موقت GUS. نمونه های برگی از قسمت رو (Adaxial) و یا پشت (Abaxial) با فشار پرتاب ۱۱۰۰ یا ۱۳۵۰ psi شلیک شدند.

Fig. 2. Evaluation of gene transfer potential to the leaf explants of red nightshade by the gene gun using transient GUS expression method. Leaves were bombarded on their Adaxial or Abaxial side with a 1100 or 1350 psi pressure.

کالوس‌زایی و یا باززایی، در تمام تیمارها نسبتاً مشابه و تشکیل ۱ یا تعداد محدودی گیاهچه و مقداری کالوس بود (شکل ۲). این نتایج با گذاشتن قطعات هیپوکوتیل بصورت افقی روی محیط کشت نیز تایید شد، که در این حالت کالوس‌زایی و باززایی از هر دو انتهای برش‌یافته هیپوکوتیل قابل مقایسه بود (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد که حداقل، جابجایی این دو نوع هورمون سیتوکنین از طریق آوندهای چوبی و آبکش گیاه تاجریزی قرمز امکان‌پذیر نبوده و تماس محل‌های برش یافته با محیط حاوی هورمون یک فاکتور تعیین کننده در آغاز فرآیند القای کالوس‌زایی و باززایی است. پیش از این، ترانس-زآتین، که بطور طبیعی در گیاه تولید می‌شود، به عنوان فرم اصلی سیتوکنین‌ها با قابلیت جابجایی در آوند چوبی و آبکش معرفی شده بود (Davey and van Staden 1976, Hirose et al. 2008).

با توجه به باززایی گیاه تاجریزی قرمز از نمونه‌های هیپوکوتیل روی محیط فاقد هورمون و عدم باززایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون و برگ، برای اثبات امکان یا عدم امکان جابجایی هورمون سیتوکنین در طول آوندهای چوبی و آبکش بدون نیاز به کنترل سلولی و صرفاً بر اساس شیب غلظت، آزمایشی با استفاده از دو نوع سیتوکنین زآتین (سیتوکنین طبیعی گیاه) و BAP (سیتوکنین مصنوعی) انجام شد. برای اینکار ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با اندازه ۱ تا ۲ سانتی‌متر، بصورت عمودی و در دو جهت بالا به پایین یا بالعکس، روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف از این دو سیتوکنین کشت شد. نتایج نشان داد که صرفنظر از جهت ریزنمونه، هر دو نوع هورمون فقط در محل تماس ریزنمونه با محیط کشت روی شدت باززایی تاثیر می‌گذارند و واکنش ریزنمونه‌ها در قسمت برش‌یافته دور از محیط، از نظر پاسخ به



شکل ۳- باززایی گیاهچه از قطعات هیپوکوتیل با اندازه های مختلف پس از ۳ هفته کشت بصورت عمودی (vertical)، عمودی وارونه (vertical-inverted) و افقی (horizontal) روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و یا زآتین (Zea).

Fig. 3. Plant regeneration from hypocotyl segments with different size after 3 weeks culture in vertical, vertical-inverted and horizontal orientations on MS medium containing 0.5 mg/l BAP or zeatin (Zea).



شکل ۴- ریشه زایی (الف)، سازگاری به محیط گلخانه (ب)، گلدهی (ج)، و تشکیل میوه و بذر (د) از گیاهچه های حاصل از باززایی در شرایط درون شیشه ای.

Fig. 4. Root induction (A), adaptation to the greenhouse condition (B), flowering (C), and fruit and seed production (D) from *in vitro* regenerated plants.

کوچک کشت شدند و پس از حدود ۱۰ روز همه آنها به شرایط گلخانه سازگار شدند (شکل ۳-ب). رشد همه گیاهان در گلخانه طبیعی بوده و گل‌ها و میوه‌های طبیعی حاوی بذور بارور تولید کردند (شکل ۳-ج و د). تولید گیاهان بارور با بذور سالم، یکی از عوامل تعیین کننده در معرفی یک دستورالعمل باززایی به شمار می‌رود، به ویژه

در نهایت، برای بررسی قابلیت گیاهچه‌های حاصل از باززایی برای سازگار شدن به محیط گلخانه و تولید گل و دانه سالم، تعدادی از گیاهچه‌های باززا شده روی محیط فاقد هورمون منتقل شدند. پس از حدود ۲ هفته، همه گیاهچه‌ها ریشه‌های سالم و کافی برای انتقال به خاک تولید کردند (شکل ۳-الف). پس از شستشوی محیط کشت از ریشه‌ها با آب شیر، گیاهچه‌ها در گلدان‌های

و مهندسی ژنتیک در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به مناسب بودن ریزنمونه برگ برای آزمایش‌های انتقال ژن به کلروپلاست (Ruf et al. 2001)، می‌توان از این دستورالعمل در توسعه این تکنولوژی ارزشمند (Maliga and Bock 2011) برای گیاه دارویی تاجریزی قرمز استفاده کرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- اگر هدف از آن، استفاده در آزمایشهای مهندسی ژنتیک و انتقال ژن باشد.
- بطور کلی، در این پژوهش دستورالعمل‌های کارآمد برای کشت بافت و باززایی درون شیشه‌ای گیاه تاجریزی قرمز از سه نوع ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ ایجاد شد. ریزنمونه برگ با توجه به سهولت تهیه و باززایی بهتر، مناسب‌ترین ریزنمونه برای آزمایش‌های انتقال ژن تشخیص داده شد. گیاهان باززا شده رشد طبیعی داشته، گل و میوه طبیعی تولید کردند. کارایی برگ‌ها در دریافت ژنهای خارجی از طریق تغنگ ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که بافت برگ برای انتقال و بیان ژنهای خارجی بسیار مناسب است. نتایج این پژوهش میتواند علاوه بر استفاده در حفاظت و تکثیر سریع گیاه تاجریزی قرمز به عنوان یک گیاه دارویی مهم در محیط درون شیشه‌ای، در انجام آزمایش‌های آتی برای انتقال ژن
- Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res* 16:437-448.
- Ahmed G, Roy PK, Mamun AN. 2001. High frequency shoot regeneration from nodal and shoot tip explants in *Holarrhena antidysenterica* L. *Indian J Exp Biol* 39:1322-1324.
- Aremu AO, Stirk WA, Masondo NA, Plačková L, Novák O, Pěnčík A, Zatloukal M, Nisler J, Spíchal L, Doležal K, Finníe JF, Van Staden J. 2015. Dissecting the role of two cytokinin analogues (INCYDE and PI-55) on *in vitro* organogenesis, phytohormone accumulation, phytochemical content and antioxidant activity. *Plant Sci* 238:81-94.
- Babaei N, Abdullah NA, Saleh G, Abdullah TL. 2014. An efficient *in vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. *ScientificWorld Journal* 2014:275028.
- Borgato L, Pisani F, Furini A. 2007. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:247-252.
- Davey JE, van Staden J. 1976. Cytokinin translocation: Changes in zeatin and zeatin-riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development. *Planta* 130:69-72.
- Detrez C, Ndiaye S, Dreyfus B. 1994. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. *Plant Cell Rep* 14:87-93.
- Ghorbanzade Z, Ahmadabadi M. 2015. Stable transformation of *Saintpaulia ionantha* by particle bombardment. *Iranian Journal of Biotechnology* 13:11-16.
- Gisbert C, Prohens J, Nuez F. 2006. Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:55-62.
- Gunana Sundari S, Rekha S, Parvathi A. 2013. Phytochemical evaluation of three species of *Solanum* L. . *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 4:420-425.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* 59:75-83.
- Hussein EA, Aqlan EM. 2011. Regeneration of *Solanum villosum* Mill., via Direct Organogenesis *in vitro*: A Novel Study. *International Journal of Botany* 7:177-182.

- Jones AM, Shukla MR, Biswas GC, Saxena PK. 2015. Protoplast-to-plant regeneration of American elm (*Ulmus americana*). *Protoplasma* 252:925-931.
- Karamian R. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast culture of *Crocus pallasii* subsp. *haussknechtii*. *Pak J Biol Sci* 10:659-663.
- Lin CC, Lin WC, Yang SR, Shieh DE. 1995. Anti-inflammatory and Hepatoprotective effects of *Solanum alatum*. *American Journal of Chinese Medicine* 13:65-69.
- Lin SC, Chung TC, Ueng TH, Lin YH, Hsu SH, Chiang CL, Lin CC. 2000. The hepatoprotective effects of *Solanum alatum* Moench. on acetaminophen-induced hepatotoxicity in Mice. *American Journal of Chinese Medicine*. 28:105-114.
- Maliga P, Bock R. 2011. Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiol* 155:1501-1510.
- Malik S, Zia M, Riaz ur R, Chaudhary MF. 2007. *In vitro* plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Memordica charantia*. *Pak J Biol Sci* 10:4118-4122.
- Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev Cell* 21:796-804.
- Milazzo MC, Zheng Z, Kellett G, Haynesworth K, Shetty K. 1999. Stimulation of benzyladenine-induced *in vitro* shoot organogenesis and endogenous proline in melon (*Cucumis melo* L.) by fish protein hydrolysates in combination with proline analogues. *J Agric Food Chem* 47:1771-1775.
- Misra M. 1996. Regeneration of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plants from leaf and node callus, and evaluation after growth in the field. *Plant Cell Rep* 15:991-994.
- Mohammed A, Chiruvella KK, Namsa ND, Ghanta RG. 2015. An efficient *in vitro* shoot regeneration from leaf petiolar explants and *ex vitro* rooting of *Bixa orellana* L.- A dye yielding plant. *Physiol Mol Biol Plants* 21:417-424.
- Mohana Priya A, Karutha Pandian S, Ramesh M. 2011. Efficient *in vitro* plant regeneration through leaf base derived callus cultures of abiotic stress sensitive popular Asian Indica rice cultivar IR 64 (*Oryza sativa* L.). *Acta Biol Hung* 62:441-452.
- Montalban IA, Novak O, Rolcik J, Strnad M, Moncalean P. 2013. Endogenous cytokinin and auxin profiles during *in vitro* organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physiol Plant* 148:214-231.
- Mulwa RM, Bhalla PL. 2006. *In vitro* plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson). *Plant Cell Rep* 25:1281-1286.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.
- Mythili PK, Madhavi A, Reddy VD, Seetharama N. 2001. Efficient regeneration of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) from shoot tip cultures. *Indian J Exp Biol* 39:1274-1279.
- Naing AH, Jeon SM, Han JS, Lim SH, Lim KB, Kim CK. 2014. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of Chrysanthemum. *C R Biol* 337:383-390.
- O'Connor-Sánchez A, Domínguez-May ÁV, Keb-Llanes MA, González-Estrada TA, Peña-Ramírez YJ. 2010. Efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum americanum*. *African Journal of Biotechnology* 9:5830-5835.
- Perez-Jimenez M, Cantero-Navarro E, Perez-Alfocea F, Cos-Terrer J. 2014a. Endogenous hormones response to cytokinins with regard to organogenesis in explants of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and rootstocks (*P. persica* x *Prunus dulcis*). *Plant Physiol Biochem* 84:197-202.
- Perez-Jimenez M, Cantero-Navarro E, Perez-Alfocea F, Le-Disquet I, Guivarc'h A, Cos-Terrer J. 2014b. Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* x *Prunus dulcis* rootstocks. *J Plant Physiol* 171:619-624.
- Ramesh M, Murugiah V, Gupta AK. 2009. Efficient *in vitro* plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J Exp Biol* 47:68-74.
- Ruf S, Bock R. 2014. Plastid transformation in tomato. *Methods Mol Biol* 1132:265-276.
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870-875.
- Shyamali S, Hattori K. 2007. Effect of polyamines and silver nitrate on the high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*; sp. asiatica). *Pak J Biol Sci* 10:1288-1293.
- Singh AK, Chand S. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. *J Plant Physiol* 160:415-421.
- Sommer T, Buettner M, Bruns F, Breves G, Hadamitzky C, Pabst R. 2012. Improved regeneration of autologous transplanted lymph node fragments by VEGF-C treatment. *Anat Rec (Hoboken)* 295:786-791.
- Soniya EV, Das MR. 2002. *In vitro* organogenesis and genetic transformation in popular *Cucumis sativus* L. through *Agrobacterium tumefaciens*. *Indian J Exp Biol* 40:329-333.
- Su YH, Zhang XS. 2014. The hormonal control of regeneration in plants. *Curr Top Dev Biol* 108:35-69.

- Svab Z, Maliga P.** 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:913-917.
- Syamala D, Devi P.** 2003. Efficient regeneration of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from shoot-tip explant. *Indian J Exp Biol* 41:1482-1486.
- Valkov VT, Gargano D, Scotti N, Cardi T.** 2014. Plastid transformation in potato: *Solanum tuberosum*. *Methods Mol Biol* 1132:295-303.
- Wang QQ, Liu H, Zhu JQ, Wang CT, Zhang HX.** 2008. *In vitro* culture and direct shoot regeneration from leaf explants of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*). *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 41:227-232.
- Xu K, et al.** 2014. Regeneration of *Solanum nigrum* by somatic embryogenesis, involving frog egg-like body, a novel structure. *PLoS One* 9:e98672.
- Yogananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, Parvathi S, Palanivel S.** 2009. Comparative analysis of Solasodine from *in vitro* and *in vivo* cultures of *Solanum nigrum* Linn. *Journal of Science, Engineering and Technology* 5:99-103.
- Yuan ZH, Wei ZM, Xu SP, Sun HT, Wu CB, Ji YR, Song SM, Yu L.** 2000. [Plant regeneration from protoplast culture in flax (*Linum usitatissimum*)]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 33:163-169.
- Zhang GN, Wang YH, Wang XR, He T, Hao JG, Jia JF.** 2006. Protoplast culture and plant regeneration of the methionine resistant variant of *Astragalus cicer* L. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 39:191-198.