مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 online الکترونیکی
دوره ۱۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳
صفحه ۳۰-۲۲

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 13, Number 1, Pages: 22-30

http://gebsj.ir/

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

10.61186/gebsj.13.1.9

تراریختی گوجه‌فرنگی 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: * نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی
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 compression using Duncan multiple rang 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 pomp

رفرانس دهی این مقاله Citation

Dorani E, Toorchi M. (2024). Transformation of tomato with vacuolar phyrophosohatade 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

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 نوترکیب pPZP حامل ژن AVP1 ابتدا به باکتری اکولای جهت تکثیر و سپس به باکتری آگروباکتریوم جهت تاریختی گیاه گوجه‌فرنگی انتقال یافت. ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل تلقیح یافته با آگروباکتریوم حاوی وکتور نوترکیب 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 ۵درصد نشان داد که از محیط تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم 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 ٤٤٠ 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

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.

در کشاورزی مهم‌ترین عامل کاهش عملکرد، تنش‌های غیرزنده (دمای بالا، سرما، یخ‌زدگی، کمبود آب ناشی از خشکی‌یا شوری، شدت تابش نور خورشید، غرقاب شدن، نور ماورای بنفش و فلزات سنگین) معرفی شده است. اکثر این تنش‌های محطی به طور مستقیم یا غیرمستقیم موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش‌پذیر شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می-شوند (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. باتوجه 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

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 جمع آوری 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 دربرابر تنش شوری افزایش می‌دهد (Bao *et al*. 2009. Zhang *et al*. 2011). هدف از این بررسی بهینه سازی انتقال ژن پیروفسفاتاز واکوئلی (AVP1) به گیاه گوجه فرنگی رقم ارومیه با استفاده از سویه GV3101 آگروباکتریوم می‌باشد.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

در این پژوهش از پلاسمید pBZP مبتنی بر ناقل عمومی pBI121 دارای گزینشگر گیاهی و باکتریایی نئومایسین فسفوترانسفراز 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 DH5α به منظور تکثیر پلاسمید و از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 برای انتقال ژن استفاده شد.

برای تکثیز 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-GGCTCTGTTGAGGGATTCAG-3 و پرایمر رورس با توالی 5-GCAATGACAGCTGGGTTTCTT-3 با PCR تایید شد. در مرحله بعد، پلاسمید نوترکیب به سلول‌های سه سویه مستعد (AGL1، GVG3101 و LBA4404) اگروباکتریوم منتقل و در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک‌های ریفامپسین و کانامایسین کشت شد. از کلونی های حاصل استخراج پلاسمید انجام گرفت و سپس مجددا حضور ژن با استفاده از PCR و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد تایید گردید.

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 و۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۳۰ درصد ساکاروز قرار داده شدند. همچنین ریزنمونه هیپوکوتیل، دقیقا 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 ٤٨ ساعت به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انتقال یافتند و در محیط کشت باززایی پیش کشت شدند.

اگروباکتریوم در محیط مایع حاوی آنتی بیوتیک۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شد و در

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه قرار داده شد تا OD_{600} 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 ٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. رسوب باکتریایی در محیط کشت مایع MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم 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 ٤ میلی‌گرم 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 گرفته‌شد. 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 ، ریزنمونه-ها به محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ٤۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. پس از ۳ تا ٤ هفته، ریزنمونه‌های با نوساقه‌های باززا شده در محیط کشت جدید مربوط به ترکیب خود واکشت شدند. پس از حدود ٦ تا ۷ هفته، تعداد ریزنمونه‌های باززا شده برای هر تکرار شمارش شدند و نوساقه‌های باززا شده (مرحله دو تا چهار برگی)، از محل اتصال به ریزنمونه‌ی اصلی قطع و به محیط کشت ساقه‌زایی که محیط کشتMS تکمیل شده با ۰/۲ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم 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 پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AVP1صورت 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.

نتایج و بحث
Results and Discussion

پس از تراریختی موفق هر سه سویه آگروباکتریوم با پلاسمید نوترکیب (شکل ۱- الف) جهت مدیریت حجم کار، تنها از سویه GV3101 برای تراریختی گیاه استفاده شد. کوتیلدون‌ها درگیاهچه‌های 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 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 ١٤ 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

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

باززایی، شاخه زایی و ریشه زایی نمونه ها

ریزنمونه‌های شاهد تلقیح 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 تقریبا همه زیز نمونه‌ها 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).

شکل۱- تراریختی گوجه با ژن AVP1 و گزینش گیاهان تراریخته: الف) کشت بذر برای تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدونی و کوتیلدونی؛ ب) اندام زایی در شرایط بدون گزینش از ریزنمونه‌های بدون تلقیح؛ ج) باززایی پایین تراریخت‌ها از ریزنمونه‌های هیپوکوتیلدون؛ د) باززایی تراریخت‌ها از ریزنمونه‌های کوتیلدون؛ ه) واکشت ریزنمونه-های با نوساقه های تراریخت در محیط جدید؛ و) رشد و تکامل ساقه‌ها در محیط ساقه زایی؛ ی) القای ریشه در محیط ریشه زایی؛ م) سازگاری گیاهچه‌های تراریخته به حیط 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 a 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

در محیط گزینشی گیاهچه‌های تراریختی 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 نمونه‌های غیر تراریخته در محیط گزینش، با از دست دادن کلروفیل پس از دو هفته، به رنگ سفید در آمدند، این ریزنمونه ها فاقد رشد بوده و پس از مدتی از بین رفتند (شکل ۱–ج و د).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

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

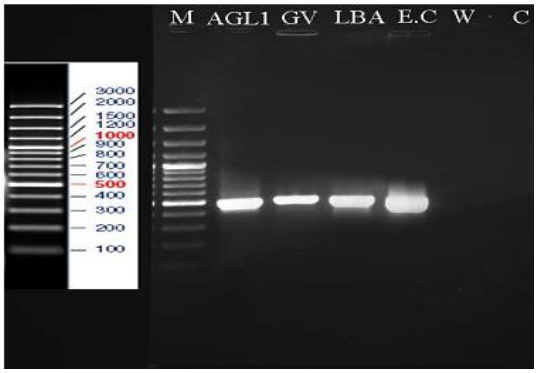
جوانه‌های سبز شده برای افزایش طول ساقه آنها به محیط کشت جدید با میزان ۱میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند اکثر جوانه‌های تراریخته در این محیط توسعه ساقه دادند و پس از یک ماه طول ساقه‌ی آنها به بیش از ۳ سانتی‌متر رسید. گیاهانی که احتمالا تراریخته نبودند و حاصل فرار از آنتی بیوتیک بودند در این محیط قادر به 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 (شکل۱-ی).

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی دارای ژن AVP1

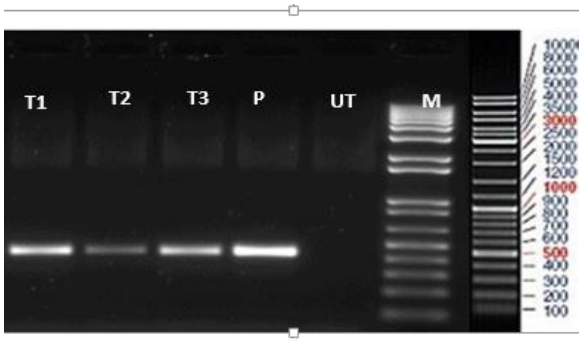
نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AVP1، در نمونه شاهد و پلاسمید استخراج شده از آگروباکتریوم وجود یک باند در ناحیه ٤٤٠ جفت بازی را نشان داد در حالی‌که شاهد منفی (آب) و پلاسمید شاهد فاقد باند بود که این امر پلاسمید نوترکیب و حضور ژن را تایید کرد (شکل ۲- ب).

اثر ریزنمونه و سیتوکنین 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 عامل مهم مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول۱)، بین ریزنمونه و تنظیم کننده رشد BAP از لحاظ باززایی اثر متقابل معنی‌دار مشاهده نشد اما اثرات اصلی دارای تأثیر معنی‌دار بر درصد باززایی بودند.



الف



ب

شکل۲- الف) تکثیر ژن AVP1 با آغازگرهای اختصاصی در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم تراریخت شده با پلاسمید pBZP : M ، 100 bp DNA ladder؛ GV،AGL1 و LBA، سویه های 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 میلی‌گرم در لیتر BAP، بدست آمد و کمترین درصد باززایی در محیط تکمیل شده با یک میلی‌گرم در لیتر اتفاق

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

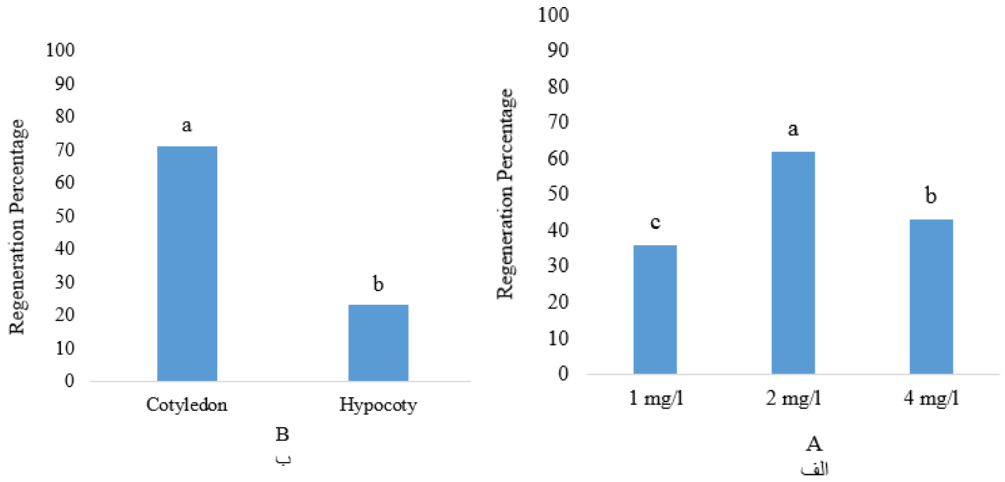
افتاد (شکل ۳ الف). تنظیم کننده‌های رشدی مورد استفاده در این مطالعه یعنی IAAو BAP متداول‌ترین تنظیم کننده‌ها در کشت بافت گوجه فرنگی بوده‌اند و ترکیب این دو باززایی از ریزنمونه-های گوجه فرنگی را بهبود بخشیده است (Sherkar, H.D. and Chavan, 2014 and Rashid, 2012).

جدول۱- 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.



شکل۳- 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

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 *Pentanema indicum* بهترین تنظیم‌کننده رشدی محیط ٤ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA گزارش شد (Sivanesan, and Jeong, 2007). بایهان و یوچسان (Bayhan and yuchesan, 2024) نشان دادند هرچند میزان اندام زایی درون شیشه‌ای در گیاه گیلاس 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 بسزائی در باززائی داشت که با نتایج اگاندار و همکاران (Ugandhar *et al.* 2011) که بیشترین میزان باززایی را از ریزنمونه‌های کوتیلدون

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

خیار 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 (شکل۱- 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 یه دلیل وجود سلول‌های مریستمی تولید کننده ساقه در سطح رویی کوتیلدون نسبت داد (Motamedi *et al*. 2010).

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 تراریخته 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.

منابع

References

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 (Lycopersiconesculentum). 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., Zebarjadi, 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). Arevised medium for rapid grawth and bioassays with tobacco tissue cultures.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]

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 oftransgenic lines expressing tomato leafcurl virus coat protein gene forresistance 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). Calluse 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 calluse 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 invitro flowering in *pentanema indicum* ling. Plant Biotechnology, 24(5), 527-532.

Ugandhar, T., Venkateshwarrlu, M., Begum, G., Srilatha, T. and Jaganmohanreddy, K. (2011). In vitro plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativum* L.) from cotyledon and hypocotyls 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-20]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.9]