مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱٤، شماره ۱، بهار و تابستان ۱٤۰٤
صفحه ۱۰۱-۸۹

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 14, Number 1, Pages: 89-101

http://gebsj.ir/

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

10.61882/gebsj.14.1.7

انتقال ژن اینترفرون آلفای انسانی (*HU-IFN-α*) به گوجه فرنگی با استفاده از *آگروباکتریوم تومفاشینس*

Transformation of Human Interferon-α (*HU-IFN-α*) Gene into Tomato Using *Agrobacterium tumefaciens*

وحید مهری زاده[۱] و ابراهیم دورانی[*۲]
Vahid Mehrizadeh[1], Ebrahim Dorani[*2]

۱- دکترای بیوتکنولوژی گیاهی، ۲- استاد، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

1. Ph.D. Plant of Biotechnology, 2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۵- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۸/۶)
Received: 2025/03/11 | Accepted: 2025/08/27 | Published: 2025/10/28

چکیده

Abstract

Interferons, especially *human interferon Alpha*, have high therapeutic and economic value and there is a strong interest in producing them from stable, safe and inexpensive sources such as plants. The aim of this study was investigated the possibility of transformation of tomato with *human interferon Alpha2b*. For this purpose, some of the effective factors on the transfer of the human *IFN-α* gene to tomato, such as the type of explant, *Agrobacterium* concentration (OD_{600nm} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1), inoculation time (5, 10, 15, 20 and 25 minutes), co-cultivation time (1, 2, 3 and 4 days) and different concentration of the hygromycin (0, 7.5, 10, 15 and 20 mg/l) were investigated. The results showed that the cotyledon explants were the most suitable explant and 15 mg/L of hygromycin was the effective concentration of the antibiotic in transformation of tomato. Also, the highest percentage of transformation of tomato explants was observed in the OD_{600nm}= 0.6 of *Agrobacterium*, 20 minutes of inoculation and 3 days of co-cultivation. Finally, the presence of human *IFN-α* gene in the probable transgenic plants was confirmed by the PCR technique and specific primers.

Key words: *Agrobacterium*, Transformation, *Interferon Alpha*, Recombinant Protein, Tomato.

رفرانس دهی این مقاله Citation

Mehrizadeh V, Dorani E. (2025). Transformation of Human Interferon- α (HU-IFN- α) Gene into Tomato Using *Agrobacterium tumefacien*. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (1): 89-101. Doi: 10.61882/gebsj.14.1.7
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 1, 2025

خلاصه

اینترفرون‌ها به ویژه اینترفرون آلفای انسانی از جمله پروتئین‌هایی هستند که ارزش درمانی و اقتصادی بالای آنها باعث شده تا محققین به دنبال تولید اینترفرون‌ها از منابع دائمی، ایمن و ارزان مثل گیاهان برآیند. این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید اینترفرون آلفای انسانی در گیاه گوجه فرنگی انجام شد. بدین منظور برخی عوامل موثر در انتقال ژن اینترفرون آلفای انسانی (*HU-IFN-α*) به گوجه فرنگی از قبیل نوع ریزنمونه (کوتیلدون و هیپوکوتیل)، غلظت آگروباکتریوم (۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، ۰/۲=OD_{600nm})، مدت زمان تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه)، مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲، ۳ و ٤ روز) و غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (صفر، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد، ریزنمونه کوتیلدون به عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه و غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین به عنوان غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک در تراریختی گوجه فرنگی معرفی شدند. همچنین بیشترین میزان تراریختی ریزنمونه‌های گوجه فرنگی در غلظت آگروباکتریوم ۰/٦ =OD_{600nm} و مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی سه روز مشاهده شد. در نهایت آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی، حضور ژن اینترفرون آلفای انسانی را در گیاهان تراریخته تایید کرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، انتقال ژن، اینترفرون آلفا، پروتئین نوترکیب، گوجه فرنگی.

Introduction

مقدمه

پیشرفت‌های حاصل در روش‌های زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی به این دیدگاه منجر شده که بسیاری از داروهای مولکولی را می‌توان در گیاهان تولید نمود که به کشاورزی مولکولی معروف می‌باشد (Wang and Demires, 2023). اصطلاح کشاورزی مولکولی (Molecular Farming) به تولید زیست داروها و پروتئین‌های کاربردی از طریق گیاهان اطلاق می‌شود که برای اولین بار زمانی مطرح شد که گیاهان عالی با موفقیت تراریخت شدند. هدف آن فراهم نمودن یک ابزار ایمن و ارزان قیمت جهت تولید پروتئین‌های دارویی در مقیاس وسیع بوده و دامنه تولیدات آن از محصولات پزشکی تا صنعتی را در برمی‌گیرد (Bharathi *et al*., 2024). امروزه گیاهان تراریخته به عنوان سیستم‌های موفق در تولید پروتئین‌های نوترکیب شناخته شده‌اند. به طوریکه از گیاهان به عنوان بیوراکتور برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع استفاده می‌شوند (Zhu *et al*., 2022). تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از سیستم‌های گیاهی دارای مزایای مختلفی در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی مانند باکتری و مخمر می‌باشد، که از جمله آنها می‌توان به کیفیت بالای پروتئین تولید شده و هزینه پایین تولید اشاره کرد (Fischer and Buyel, 2020).

اینترفرون‌ها انواعی از پروتئین‌های شبه هورمونی تحت عنوان سیتوکین‌ها هستند که در تحریک سیستم ایمنی بدن پستانداران در برابر عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها نقش دارند. اینترفرون‌ها، به ویژه اینترفرون آلفا توسط سلول‌های ایمنی بدن مانند منوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها ترشح شده و معمولاً جهت درمان بیماری‌های ویروسی و برخی سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این پروتئین‌ها به دلیل داشتن فعالیت‌های ضد ویروسی و ضد توموری برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌های ویروسی و انواع مختلف سرطان‌ها از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Mikulecky *et al*., 2016). کاربردهای فراوان این دارو و ارزش اقتصادی بالای آنها، باعث شده تا محققین به دنبال تولید اینترفرون‌ها از منابع دائمی، ایمن و ارزان مثل گیاهان برآیند (Jiang *et al*., 2019). در حال حاضر از میان گیاهان، گوجه فرنگی به عنوان الگویی موفق در تولید گیاهان تراریخت و زیست داروها مطرح است (Schillberg and Finnern, 2021). گوجه فرنگی یکی از مهمترین سبزیجات دنیا است که به عنوان گیاه مدل ژنتیکی جهت اصلاح سایر گیاهان دو لپه‌ای نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه خودبارور، دیپلوئید با ۲n=۲x=۲٤

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

کروموزوم و ژنوم آن به طور کامل توالی یابی شده است. همچنین عملکرد بالا، طول رشد کوتاه و امکان کشت و نگهداری آن در گلخانه از دیگر مزیت‌های گوجه فرنگی می‌باشد (Gerszberg *et al*., 2015; Su *et al*., 2021).

تولید گیاهان تراریخته مستلزم بهینه‌سازی شرایط کشت بافت، آشنایی با روش‌های مختلف تراریختی سلول‌های گیاهی، بهینه‌سازی انتقال ژن و در نهایت دسترسی به یک سیستم گزینش کارآمد جهت انتخاب گیاهان تراریخته می‌باشد (Hassan *et al*., 2021). برای انتقال ژن به گیاهان روش‌های مختلفی وجود دارد ولی تراریختی به کمک آگروباکتریوم علی‌رغم محدودیت‌هایی که دارد هنوز هم یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تولید گیاهان تراریخته به شمار می‌آید (Kaul *et al*., 2025). گزارش‌های متعددی از تراریختی موفقیت آمیز گوجه فرنگی با استفاده از آگروباکتریوم وجود دارد (Ferdous *et al*., 2022; Vats *et al*.,2023). با این حال روش تراریختی گوجه فرنگی، یک روش معمول و قابل تکرار برای همه ارقام آن نیست (Paramesh et al., 2010). عوامل متعددی در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم به گیاهان موثرند که از آن جمله می‌توان به ژنوتیپ (Stavridou *et al.,* 2019)، نوع ریزنمونه (Kumar *et al*., 2017)، سویه باکتری (Mehrizadeh *et al.,* 2021; Rajesh *et al*., 2016)، غلظت باکتری (Bamishaiye *et al*., 2017)، مدت زمان تلقیح (Gadir *et al*., 2018)، مدت زمان هم‌کشتی (Sandhya *et a*l., 2022)، سیستم گزینشی (Prihatna *et al*., 2019)، سیستم باززایی (Ahmed *et al*., 2023) و غیره اشاره کرد.

بهینه‌سازی عوامل موثر در تراریختی گیاهان از طریق آگروباکتریوم، می‌تواند به طور قابل توجهی کارایی تولید گیاهان تراریخته را بهبود ببخشد (Kaul *et al*., 2025). انتقال ژن در گوجه فرنگی وابسته به ژنوتیپ است، حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه در موفقیت تراریختی به وسیله آگروباکتریوم موثر است (Sharma *et al*., 2009). 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 (Gadir *et al*., 2018). مدت زمان هم کشتی و مدت زمان تلقیح از دیگر عوامل موثر در تراریختی گیاهان هستند که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه‌ها کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Sandhya *et al*., 2022).

این پژوهش با هدف انتقال ژن اینترفرون آلفا۲b انسانی (*HU-IFN-α2b*) به رقم ارومیه کم رنگ گوجه فرنگی از طریق آگروباکتریوم اجرا شد. بدین منظور برخی از عوامل موثر در تراریختی گوجه فرنگی از قبیل نوع ریزنمونه، غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان هم‌کشتی، مدت زمان تلقیح باکتری و غلظت موثر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین مورد بررسی قرار گرفتند.

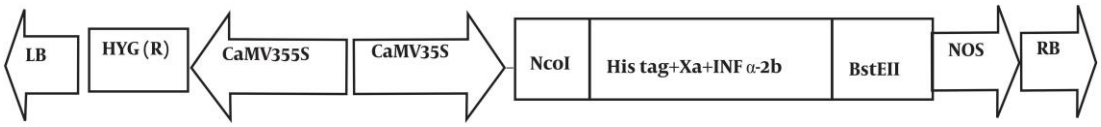
Materials and Methods

مواد و روش‌ها

موادگیاهی: در مطالعه حاضر از رقم ارومیه کم رنگ گوجه فرنگی به عنوان میزبان جهت انتقال و بیان پروتئین اینترفرون آلفای انسانی استفاده شد. بذور گوجه فرنگی بعد از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، به شیشه‌های مربا حاوی محیط کشت جوانه‌زنی شامل محیط کشت MS ۱/۲ تکمیل شده با ویتامین‌های محیط کشت B5 به همراه یک درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار منتقل شد و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ^{o}C ۲۵ نگهداری شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیلدون به ترتیب از گیاهچه‌های ۷ روزه و ۹ روزه تهیه شدند. به منظور افزایش کارایی تراریختی، ریزنمونه‌ها به مدت ٤٨ ساعت در محیط کشت باززایی پیش کشت شدند.

سویه باکتری: در این پژوهش از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 (شکل ۱) حاوی ژن اینترفرون آلفا جهت انتقال به گوجه فرنگی استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]



شکل ۱- ناحیه T-DNA ناقل pCAMBIA1304 حاوی ژن *INF-α2b*

Fig 1. T-DNA region of pCAMBIA1304 containing *hINF-α2b* gene.

تعیین حساسیت ریزنمونه‌ها به هیگرومایسین: برای ارزیابی میزان حساسیت ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل گوجه فرنگی به آنتی بیوتیک هیگرومایسین، ریزنمونه‌ها در محیط کشت باززایی دارای غلظت‌های مختلف هیگرومایسین (صفر، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از یک ماه اثر این آنتی‌بیوتیک بر باززایی و نکروز شدن ریزنمونه‌ها بررسی شد.

تراریختی باکتریایی: برای انتقال پلاسمید pCAMBIA1304 حاوی ژن اینترفرون آلفا به سویه LBA4404 آگروباکتریوم از روش استاندارد انجماد و ذوب (Sambrook and Russell, 2001) استفاده شد. در نهایت برای تایید کلنی‌های نوترکیب آگروباکتریوم از روش کلنی PCR استفاده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون آگروباکتریوم و تلقیح ریزنمونه ها با آگروباکتریوم: یک کلنی از آگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به محیط کشت باکتریایی LB مایع دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد روی شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) نگهداری شدند. بعد از ۲٤ ساعت وقتی که غلظت باکتری بین ۱-۰/۸=OD_{600nm} رسید، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (٤۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل در محیط MS مایع در غلظت‌های ۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، ۰/۲=OD_{600nm} رقیق شدند و به صورت سوسپانسیون درآمدند و برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شدند. بدین منظور، ریزنمونه‌های کوتیلدون (۷ روزه) و هیپوکوتیل (۹ روزه) در سوسپانسیون آگروباکتریوم تهیه شده با غلظت‌های مختلف (۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، ۰/۲=OD_{600nm}) به مدت (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده پس از خشک شدن با کاغذ صافی استریل به مدت ۱تا ٤ روز (۱، ۲، ۳ و ٤ روز) در محیط هم‌کشتی فاقد آنتی‌بیوتیک که همان محیط کشت باززایی بود کشت شدند.

گزینش ریزنمونه‌های تراریخته احتمالی در محیط گزینشگر: ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی شامل محیط کشت باززایی (برای ریزنمونه‌های کوتیلدون محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP و دو میلی‌گرم در لیتر IAA و برای هیپوکوتیل محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر IBA) تکمیل شده با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط جدید مشابه واکشت شدند. پس از دو دور واکشت، شاخه‌های باززا شده به محیط کشت طویل‌سازی ساقه (محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، به همراه ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. پس از دو هفته، شاخه‌های طویل شده به محیط ریشه‌زایی (محیط MS تکمیل شده با یک میلی گرم IBA، یک درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) انتقال یافتند. در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت و خاک استریل (۱:۱) انتقال یافته و به گلخانه منتقل شدند.

تأیید حضور ژن اینترفرون آلفای انسانی (*HU-IFN-α2b*) در گیاهان تراریخته احتمالی: برای تایید انتقال و حضور ژن *HU-IFN-α2b* در گیاهان تراریخته گزینش شده در محیط دارای آنتی بیوتیک از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. بدین منظور DNA ژنومی از گیاهان تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، با روش CTAB استخراج شدند (Saghai-Maroof *et al*., 1984) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، واکنشPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *hIFN-α2b* (جدول ۱) انجام گرفت. برای تکثیر DNA، واسرشت-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس واکنش در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی، اتصال و تکثیر هریک به مدت یک دقیقه به ترتیب در دماهای ۹٤، ٦۰ و ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ و به مدت دو ساعت انجام گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *INF-α2b*

Table 1. Specific primers sequence of *INF-α2b* gene.

Primer sequences	Primers of *INF-α2b*
5′-GAATGGTCTCTCATGTGTGATCTGCCTCAA-3′	Forward primer
5′- GCAGTCCTCGAGTTATTCCTTACTTCTTAAAC-3′	Reverse primer

طرح‌های آماری و آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش تعیین سطح مؤثر هیگرومایسین با استفاده از پنج سطح هیگرومایسین (صفر ، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و دو نوع ریزنمونه (کوتیلدون ۷ روزه و هیپوکوتیل ۹ روزه) در سه تکرار انجام شد. آزمایش تاثیر غلظت آگروباکتریوم با استفاده از سویه LBA4404 در پنج غلظت مختلف (۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، ۰/۲=OD_{600nm}) به همراه دو نوع ریزنمونه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در آزمایش اثر مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها از پنج مدت زمان مختلف ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه به همراه دو نوع ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل استفاده شد. در نهایت از چهار مدت زمان هم‌کشتی ۱، ۲، ۳ و ٤ روز به همراه دو نوع ریزنمونه برای تعیین مدت زمان هم‌کشتی مناسب در انتقال ژن به گوجه‌فرنگی استفاده شد. همه آزمایش‌های این پژوهش با استفاده از آزمایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا شد. برای تجزیه آماری داده‌های، ابتدا نرمال بودن آنها بررسی شد سپس تجزیه واریانس‌های لازم صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب از نرم افزارهای MSTATC و Excel استفاده گردید.

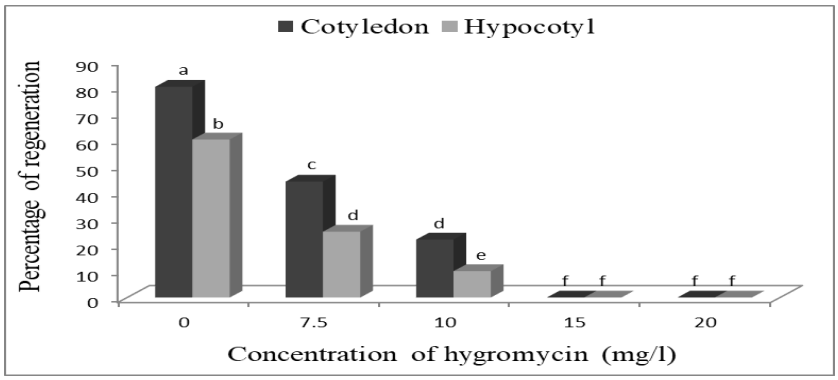
نتایج و بحث
Results and Discussion

آزمون حساسیت ریزنمونه‌های گوجه فرنگی به هیگرومایسین

تعیین میزان حساسیت گیاهان غیرتراریخته به آنتی‌بیوتیک به عنوان یک ماده گزینشگر، یک عامل مهم جهت تولید مطمئن گیاهان تراریخته به شمار می‌رود. بدین منظور ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل رقم ارومیه کم رنگ گوجه فرنگی بر روی محیط کشت باززایی حاوی غلظت‌های مختلف هیگرومایسین (صفر، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. نتایج حاصل نشان داد یک همبستگی منفی بین غلظت هیگرومایسین و میزان باززایی ریزنمونه‌های غیرتراریخته وجود داشت، به طوری که در غلظت‌های صفر تا ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل همچنان سبز رنگ باقی مانده و باززایی مشاهده شد. در حالی که در غلظت‌های ۱۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و بالاتر، ریزنمونه‌ها زرد و نکروز شده و هیچ باززایی مشاهده نشد (شکل ۲). بنابراین غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین به عنوان سطح مؤثر جهت گزینش گیاهان تراریخته گوجه فرنگی در نظر گرفته شد. مطالعات Sandhya و همکاران (Sandhya *et al*., 2022) نشان داد، از بین غلظت‌های مختلف هیگرومایسین، غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین به عنوان موثرترین غلظت برای تراریختی گوجه فرنگی بوده است. در حالی که Ferdous و همکاران (Ferdous *et al*., 2022) غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

هیگرومایسین و Soltanmohammadi و همکاران (Soltanmohammadi *et al*., 2014) غلظت ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین را مناسب برای گزینش گیاهان تراریخته گوجه فرنگی گزارش کرده‌اند.

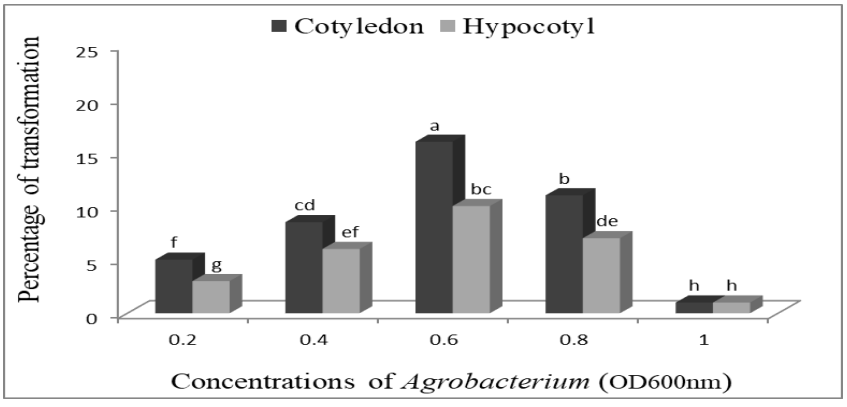


شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف هیگرومایسین روی ریزنمونه‌های مختلف گوجه فرنگی

Fig 2. Effect of different concentrations of hygromycin on different explants of tomato

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر تراریختی گوجه فرنگی

به منظور تعیین غلظت مناسب سویه LBA4404 آگروباکتریوم برای تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل رقم ارومیه کم رنگ گوجه فرنگی این آزمایش انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد بین غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم و انواع ریزنمونه‌ها از نظر میزان تراریختی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش غلظت آگروباکتریوم تا OD_{600nm}= ۰/٦ کارایی انتقال در هر دو ریزنمونه روند افزایشی داشت، ولی در غلظت‌های بالاتر (OD_{600nm}=۱) کارایی انتقال به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳). بیشترین درصد تراریختی در ریزنمونه کوتیلدون و OD_{600nm}= ۰/٦ بدست آمد. همچنین کمترین درصد تراریختی در هر دو ریزنمونه و OD_{600nm} =۱ مشاهده شد. می‌توان چنین استدلال کرد، استفاده از غلظت OD_{600nm}=۱ باعث رشد بیش از حد باکتری بر روی هر دو ریزنمونه شده و کنترل آنرا با مشکل روبرو کرد. و در نهایت باعث نابودی ریزنمونه‌ها شد. همچنین درصد تراریختی پایین در غلظت‌های کمتر باکتری (OD_{600nm}=۰/۲)، به دلیل غلظت پایین باکتری زنده در واحد حجم بود.



شکل ۳- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر میزان تراریختی گیاه گوجه فرنگی

Fig 3. Comparison the effect of different concentrations of *Agrobacterium* on tomato transformation

غلظت باکتری به عنوان یکی از مهمترین عوامل در بهبود کارایی تراریختی گیاهان محسوب می‌شود. تعیین غلظت مناسب باکتری در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم، به عوامل متعددی از جمله نوع ژنوتیپ گیاهی و سویه آگروباکتریوم بستگی دارد (Mohajel-Kazemi *et al.,* 2020;

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

Sujatha *et al.*, 2012). در این مطالعه با افزایش تراکم سلولی باکتری تا OD_{600nm}=۰/٦ کارایی تراریختی تا حدودی افزایش یافت ولی پس از آن در غلظت‌های بالاتر میزان تراریختی به طور قابل توجهی کاهش یافت. به طور کلی افزایش یا کاهش تراکم سلول‌های باکتری از حد مطلوب باعث کاهش فراوانی گیاهان تراریخته می‌شود (Kim *et al.*, 2009).

Van و همکاران (Van *et al*., 2010) بیشترین کارایی تراریختی گوجه فرنگی را در غلظت‌های ۰/۵ – ۰/۲=OD_{600nm} و کمترین کارایی تراریختی را در ۰/۹=OD_{600nm} مشاهده کرده‌اند. همچنین Qiu و همکاران (Qiu *et al*., 2007) غلظت‌های ۰/۸–۰/۲=OD_{600nm} آگروباکتریوم را غلظت مناسب برای تراریختی گوجه فرنگی اعلام کرده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر بیشترین فراوانی گیاهان تراریخته گوجه فرنگی در غلظت‌های ۰/۳ – ۰/۱=OD_{600nm} حاصل شده است (Lee *et al*., 2006). در حالیکه Sun و همکاران (Sun *et al*., 2015) بیشترین فراوانی تراریختی گوجه فرنگی را در غلظت ۱=OD_{600nm} گزارش کرده‌اند. در مطالعات مختلف بیشترین میزان تراریختی ریزنمونه‌های گوجه فرنگی در غلظت ۰/٦=OD_{600nm} آگروبـاکتریوم مشاهده شده است (Honda *et al*., 2021; Vats *et a*l., 2023)، که با نتایج ما مطابقت داشت.

علاوه بر ژنوتیپ، نوع و ماهیت ریزنمونه نیز در کارایی تراریختی گوجه فرنگی تاثیرگذار می‌باشد. برای تراریختی گوجه فرنگی از ریزنمونه‌های مختلف از جمله کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ، مریستم ساقه و غیره استفاده شده است (Prihatna *et al*., 2019). برخی گزارشات بر این نکته تاکید دارند مناسب‌ترین ریزنمونه برای باززایی و تراریختی گوجه فرنگی، ریزنمونه کوتیلدون می‌باشد (Ferdous *et al*., 2022). در مطالعه‌ای از بین ریزنمونه‌های مختلف گوجه فرنگی، کارایی تراریختی ریزنمونه کوتیلدون به مراتب بیشتر از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بود و کمترین میزان تراریختی از ریزنمونه برگ حاصل شده است (Sandhya *et al*., 2022)، که با نتایج ما مطابقت داشت. در حالیکه در برخی از مطالعات برای تراریختی برخی از ارقام گوجه فرنگی، ریزنمونه هیپوکوتیل را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها ارجح‌تر گزارش کرده‌اند (Manamohan *et al*., 2011; Kaul *et al*., 2025). همچنین Mathews و همکاران (Mathews *et a*l., 2003) اعلام کرده‌اند ریزنمونه هیپوکوتیل را به دلیل سهولت دستکاری و فراوانی تراریختی بالا برای تراریختی گوجه فرنگی انتخاب کرده‌اند.

اثر مدت زمان تلقیح آگروباکتریوم بر تراریختی گوجه فرنگی

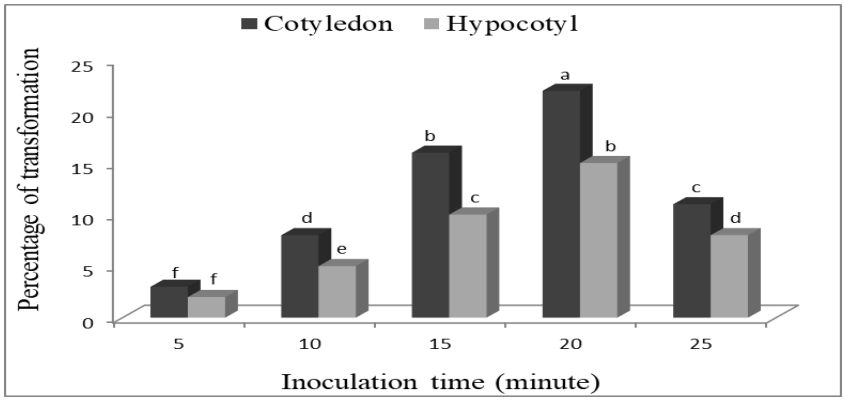
به منظور مقایسه مدت زمان‌های متفاوت تلقیح در افزایش کارایی انتقال ژن به گوجه فرنگی این آزمایش انجام شد. بدین منظور اثر پنج مدت زمان متفاوت تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) در تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل گوجه فرنگی با غلظت OD_{600nm}=۰/٦ سویه LBA4404 آگروباکتریوم مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد بین زمان‌های مختلف تلقیح و ریزنمونه‌ها از نظر میزان آلوده‌سازی و انتقال ژن به ریزنمونه‌های گوجه فرنگی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش مدت زمان تلقیح از ۵ به ۲۰ دقیقه، میزان کارایی تراریختی در هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل یک روند افزایش داشت. ولی در مدت زمان تلقیح بیشتر از ۲۰ دقیقه این روند کاهشی شد، به طوریکه بیشترین درصد تراریختی از ریزنمونه کوتیلدون در مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه و کمترین درصد تراریختی در مدت زمان تلقیح ۵ دقیقه و در هر دو ریزنمونه مشاهده شد (شکل ٤).

مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها یکی از عوامل موثر در کارایی تراریختی گیاهان می‌باشد. در این مدت زمان تلقیح، باکتری‌ها ریزنمونه‌های مورد نظر را آلوده کرده و در ادامه در محیط هم‌کشتی موجب انتقال T-DNA به گیاه می‌شوند (Jan *et al*., 2018). معمولا مدت زمان‌های تلقیح کوتاه یا طولانی باعث کاهش کارایی تراریختی می‌شوند که باید بهینه شوند. به طوریکه مدت زمان تلقیح هر قدر طولانی‌تر باشد، باعث نکروزه شدن ریزنمونه‌ها و در نهایت از بین رفتن کامل آن‌ها می‌گردد. همچنین در مدت زمان‌های تلقیح کوتاه، باکتری فرصت کافی برای آلوده سازی ریزنمونه‌ها نداشته و باعث کاهش کارایی تراریختی می‌شوند (Doranie-uliaie *et al.,* 2017; Sandhya *et a*l., 2022). مدت زمان‌های تلقیح متفاوتی برای ارقام مختلف گوجه فرنگی گزارش شده است، به‌طوریکه Lopez و همکاران (Lopez *et al*., 2015) بهترین مدت زمان تلقیح برای تراریختی گوجه فرنگی را ۱۰ دقیقه گزارش کرده‌اند. مطالعات Paramesh و همکاران (Paramesh *et al*., 2010) نشان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

داده مدت زمان تلقیح ۲۰-۱۵ دقیقه برای تراریختی ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی مناسب می‌باشد. همچنین Afroz و همکاران (Afroz *et al*., 2010) و Sandhya و همکاران (Sandhya *et al*., 2022) مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه را برای تراریختی ریزنمونه کوتیلدون گوجه فرنگی مناسب اعلام کرده‌اند، که با نتایج ما مطابقت داشتند. در حالیکه Ferdous و همکارن (Ferdous et al., 2022) برای انتقال ژن به گوجه فرنگی از طریق آگروباکتریوم از مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه استفاده کرده‌اند.

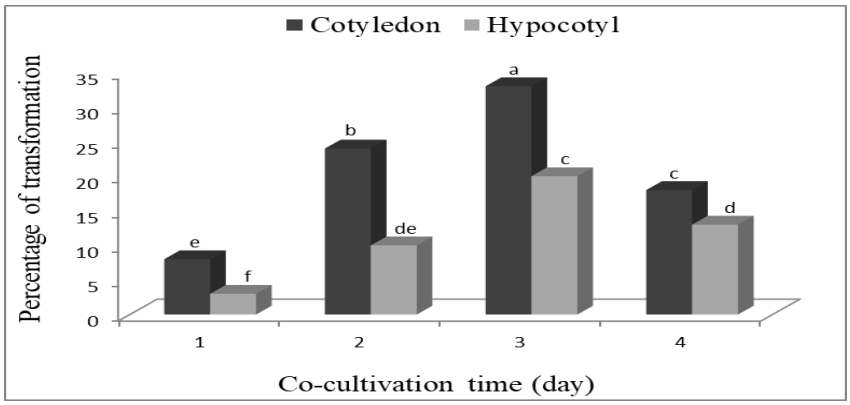


شکل ٤- مقایسه اثر مدت زمان‌های مختلف تلقیح بر میزان تراریختی گیاه گوجه فرنگی

Fig 4. Comparison the effect of different period of inoculation time on tomato transformation

اثر مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم بر تراریختی گوجه فرنگی

به منظور تعیین مدت زمان هم‌کشتی مناسب در انتقال ژن به گوجه فرنگی این آزمایش انجام شد. بدین منظور اثر چهار مدت زمان مختلف هم‌کشتی (۱، ۲، ۳ و ٤ روز) در تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل گوجه فرنگی با غلظت OD_{600nm}=۰/٦ سویه LBA4404 آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد بین مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی و ریزنمونه-ها از نظر میزان تراریختی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش مدت زمان هم‌کشتی تا ۳ روز، میزان درصد تراریختی هر دو ریزنمونه روند افزایش داشت. ولی با افزایش زمان هم‌کشتی از ۳ روز به بعد این روند کاهشی شد. در کل بیشترین درصد تراریختی از ریزنمونه کوتیلدون در مدت زمان هم‌کشتی ۳ روز و کمترین درصد تراریختی از ریزنمونه هیپوکوتیل در مدت زمان هم‌کشتی یک روز حاصل شد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه اثر مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی بر میزان تراریختی گیاه گوجه فرنگی.

Fig 5. Comparison the effect of different period of co-cultivation time on tomato transformation.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

عامل دیگری که می‌تواند کارایی تراریختی را تحت تأثیر قرار دهد، مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم است. مدت زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم در بهبود کارایی تراریختی به سلول‌های گیاهی بسیار موثر می‌باشد (Guo *et al.*, 2012). مطالعات مختلف نشان داده‌اند طولانی‌تر بودن زمان هم‌کشتی باعث رشد بیش از حد باکتری در اطراف ریزنمونه و به دنبال آن از بین رفتن ریزنمونه‌ها و کاهش کارآیی تراریختی می‌شود. همچنین مدت زمان هم‌کشتی کوتاه نیز به خاطر فرصت کم فرایند انتقال DNA موجب کاهش کارایی تراریختی می‌گردد. در نتیجه تعیین زمان مناسب هم‌کشتی برای به دست آوردن دستورالعمل‌های تراریختی حیاتی است (Yasmin and Debener, 2010; Stavridou *et al.*, 2019). مدت زمان هم‌کشتی در انتقال ژن به گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم از ۱ تا ۷ روز متغییر می‌باشد. معمولا بیشترین کارآیی تراریختی گیاهان در ۲ تا ۵ روز هم‌کشتی گزارش شده است (Somleva *et al.*, 2002). در مطالعات تراریختی ریزنمونه‌های مختلف گوجه فرنگی از مدت زمان‌های هم‌کشتی ۱ تا ٤ روز استفاده شده است (Sandhya *et al.*, 2022). همچنین Sharma و همکاران (Sharma *et al.*, 2009) گزارش کرده‌اند، مدت زمان هم‌کشتی ۳-۲ روز برای تراریختی گوجه فرنگی مناسب بوده است. Vats و همکاران (Vats *et al.*, 2023) و Ferdous و همکاران (Ferdous *et al.*, 2022) از مدت زمان هم‌کشتی ۲ روز برای تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل گوجه فرنگی استفاده کرده‌اند. در حالیکه Qiu و همکاران (Qiu *et al.*, 2007) مدت زمان هم‌کشتی ۳ روز را برای تراریختی گوجه فرنگی مناسب گزارش کرده‌اند. که با نتایج ما مطابقت داشت.

باززایی گیاهان تراریخته و استقرار در گلدان

ریزنمونه‌ها پس از طی مدت زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم، به محیط کشت باززایی تکمیل شده با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط جدید مشابه واکشت شدند. پس از دو هفته جوانه‌های باززا شده از حاشیه ریزنمونه‌ها مشاهده گردید. تعدادی از جوانه‌های باززا شده بر روی محیط انتخابی، سبز و زنده مانده و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به هیگرومایسین از بین رفتند. در حالی که ریزنمونه‌های شاهد روی محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک زرد شده و هیچگونه باززایی در آنها مشاهده نشد. پس از دو دور واکشت، شاخه‌های باززا شده به محیط طویل شدن ساقه حاوی ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. پس از دو هفته شاخه‌های طویل شده به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. شاخه‌های طویل شده در این محیط، ریشه دار شده و ریشه خود را به خوبی توسعه دادند. در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت و خاک استریل انتقال یافته و پس از سازگاری به گلخانه منتقل شدند (شکل ٦).

تایید حضور ژن *HU-IFN-α2b* در گیاهان تراریخته گوجه فرنگی

به منظور تایید حضور ژن *HU-IFN-α2b* در درون ژنوم گیاهان تراریخته گوجه فرنگی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. بدین منظور واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *HU-IFN-α2b* بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخته نسل اول (T0) و غیر تراریخته انجام شد. همچنین از گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی و از ناقل بیانی نوترکیب *pCAMBIA-hIFN-α2b* به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار (bp ۵۰۰) در گیاهان تراریخته مشابه با شاهد مثبت، حضور ژن *HU-IFN-α2b* در گیاهان تراریخته را تایید کرد. لازم به ذکر است عدم مشاهده باند مذکور در گیاه شاهد نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ۷).

در این پژوهش برای انتقال ژن اینترفرون آلفای انسانی (*Hu-IFN-α2b*) به گیاه گوجه فرنگی، برخی از عوامل تعیین کننده بهینه شدند، بطوریکه بیشترین میزان کارایی تراریختی در ریزنمونه‌های کوتیلدون هفت روزه در غلظت OD_{600nm}= ۰/٦ سویه LBA4404 آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی ۳ روز حاصل شد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که انتقال ژن اینترفرون آلفای انسانی

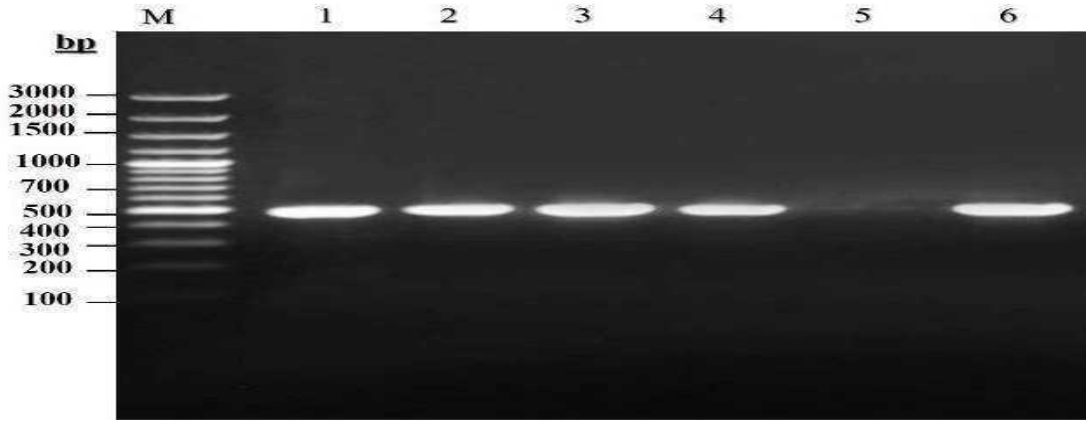
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

به گوجه فرنگی رقم ارومیه کم رنگ امکان‌پذیر است. در نهایت تعدادی از لاین‌های تراریخته برای تجزیه و تحلیل‌های مولکولی پیشرفته انتخاب شدند.



شکل ٦- مراحل مختلف تراریختی رقم ارومیه کم رنگ گوجه فرنگی با استفاده از سویه LBA4404 آگروباکتریوم حامل ناقل بیانی *pCAMBIA-hIFN-α2b*: a-b) هم‌کشتی ریزنمونه‌های تلقیح شده، c-d) باززایی شاخساره از ریزنمونه‌ها در محیط انتخابی، e) طویل شدن شاخساره‌های باززا شده، f) ریشه‌زایی شاخه‌های طویل شده، g-h) سازگاری و انتقال گیاهان تراریخته احتمالی به خاک.

Fig 6. Various stages of transformation of tomato by LBA4404 strain of *Agrobacterium* containing expression vector of *pCAMBIA-hIFN-α2b*. a-b) Co-cultivation of Inoculation of explants; c-d) Regeneration of shoots from explants after co-cultivation on selective medium; e) Shoot elongation; f) Rooting of elongated shoots; g-h) Acclimatization and transferred of transgenic plants to the soil.



شکل ٧- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته گوجه فرنگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *HU-IFN-α2b*. M: نشانگر وزن مولکولی، ١ تا ٤: گیاهان تراریخته، ٥: گیاه شاهد (گیاه غیرتراریخت)، ٦: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن مورد نظر).

Fig 7. The results of PCR on transgenic tomato plants using specific primers of *HU-IFN-α2b* gene. M: Molecular marker, 1-4: Transgenic plants, 5: Control plant (non-transgenic plant), 6: Positive control (the plasmid that is harboring *HU-IFN-α2b* gene).

منابع

References

Afroz, A., Chaudhry, Z., Rashid, U., Rashid, M. and Muhammad, C. (2010). Enhanced regeneration in explants of tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.) with the treatment of coconut water. African Journal of Biotechnology, 9(24), 3634-3644.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

Ahmed, S., Wan-Azizan, W.A.S., Akhond, M.A.Y., Juraimi, A.S., Ismail, S.I., Ahmed, R. and Md-Hatta, M.A. (2023). Optimization of in vitro regeneration protocol of tomato cv. MT1 for genetic transformation. Horticulturae, 9 (800), 1-21. doi.org/10.3390/horticulturae9070800

Bamishaiye, E.I., Balakrishnan, N., Udayasuriyan, V., Varanavasiappan, S. and Sudhakar, D. (2017). A rapid *Agrobacterium-mediated* transformation protocol for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. PKM-1. International Journal of Chemical Studies, 5(6), 1024-1030.

Bharathi, J.K., Suresh, P., Prakash, M.A.S. and Muneer, S. (2024). Exploring recent progress of molecular farming for therapeutic and recombinant molecules in plant systems. Heliyon, 10(18), 1-30. doi.org/10.1016/j.heliyon. 2024.e37634

Doranie-uliaie, E. and Mehrizadeh, V. (2017). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens-mediated* transformation of barley and production of fertile transgenic plants. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 5(2), 131-142. dor: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4

Ferdous, M.E.M., Datta, A. and Islam, A. (2022). Evaluation of factors influencing in vitro regeneration and transformation protocols to produce salinity tolerant tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Applied Biotechnology Reports, 9(3), 726-739. doi 10.30491/JABR.2022.336979.1519

Fischer, R. and Buyel, J.F. (2020). Molecular farming - The slope of enlightenment. Biotechnology Advances, 40(1), 1-16. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107519

Gadir, I.K.A., Wahid, H.H.A., El-Hussein, A.A. and El-Siddig, M.A. (2018). Effect of *Agrobacterium-mediated* transformation on regeneration efficiency of tomato explants. International Journal of Biotechnology and Bioengineering, 4 (5), 106–112.

Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T. and Kononowicz, A.K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 120(3), 881-902. doi:10.1007/ s11240-014-0664-4

Guo, M., Zhang, Y.L., Meng, Z.J. and Jiang, J. (2012). Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated transient expression of Micro-Tom tomatoes. Genetics and Molecular Research, 11(1), 661-671. doi: 10. 4238/2012.March.16.4

Hassan, N., El-Shafey, N.M., Khodary, S.E.D.A., El-Shabrawi, H. and Badr, A. (2021). Expression of OsDREB2A in transgenic tomato improves drought tolerance. Romanian Biotechnological Letters, 26(6), 3145-3154. doi: 10.25083/rbl/26.6/3145-3154

Honda, C., Ohkawa, K., Kusano, H., Teramura, H. and 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. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0707a

Jan, S.A., Ali, G.M., Ali, S., Shah, S.H. and Ahmad, N. (2018). Genetic improvement in tomato (*Solanum lycopersicum*) against salt stress. Indian Journal Biotechnology, 17(3), 459-465.

Jiang, M.C., Hu, C.C., Lin, N.S., and Hsu, Y.H. (2019). Production of human IFN-γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. Viruses, 11(509), 1-18. doi:10. 3390/v11060509

Kaul, R., Thangaraj, A., Sharda, S. and Kaul, T. (2025). Optimization of tissue culture and Cas9 transgene expression in tomato: A step towards CRISPR/Cas9-based genetic improvement. Plant Science, 352, 1-14. doi.org/10.1016/ j. plantsci.2024.112324

Kim, M.J., Baek, K. and Park, C.M. (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium-mediated* gene expression assays in Arabidopsis. Plant Cell Reports, 28(8), 1159-1167. doi: 10.1007/s00299-009-0717-z

Kumar, S., Jindal, S.K., Sarao, N.K. and Dhaliwal, M.S. (2017). Development of an efficient in vitro regeneration protocol in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Agriculture Research Journal, 54 (4), 475-479. doi:10.5958/2395-146X.2017.00091.6

Lee, H., Auh, C.K., Kim, D., Lee, T.K. and Lee, S. (2006). Exogenous cytokinin treatment maintains cyclin homeostasis in rice seedlings that show changes of cyclin expression when the photoperiod is rapidly changed. Plant Physiology and Biochemistry, 44(4), 248-52. doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.03.006

Lopez, E., Proano, K., Jadan, M. and 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), 10205-10211.

Manamohan, M., Prakash, M.N., Sharath Chandra, G., Asokan, R. and Nagesh, S.N. (2011). An improved protocol for rapid and efficient *Agrobacterium mediated* transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Applied Horticulture, 13(1), 3-7. doi:10.37855/jah. 2011.v13i01.01

Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Wagner, D.R. (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. The Plant Cell, 15(8), 1689-1703. doi:10. 1105/tpc.012963

Mehrizadeh, V., Dorani, E., Mohammadi, A. and Ghareyazi, B. (2021). Study on the factors affecting *Agrobacterium-mediated* transformation of soybean. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 9(2), 225-236. dor:20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

Mikulecky, P., Zahradnik, J., Kolenko, P., Cerny, J., Charnavets, T., Kolarova, L., Necasova, I., Pham, P.N., Schneider, B. (2016). Crystal structure of human interferon-gamma receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 72(9), 1017-1025. doi: 10.1107/ S2059798316012237

Mohajel-Kazemi, E., Pazhouhandeh, M., Jonoubi, P. and Kazemian, M. (2020). The optimization of gene transfers to tomato and the study of expression possibility of salt-tolerance gene (SOS3). Nova Biologica Reperta, 7(1), 76-84. doi: 10.29252/nbr.7.1.76

Paramesh, H., Fakrudin, B. and Kuruvinashetti, M.S. (2010). Genetic transformation of a local variety of tomato
using gus gene: an efficient genetic transformation protocol for tomato. Journal of Agricultural Technology, 6(1), 87-97.

Prihatna, C., Chen, R., Barbetti, M.J. and Barker, S.J. (2019). Optimisation of regeneration parameters improves transformation efficiency of recalcitrant tomato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 137, 473-483. doi:10.1007/s11240-019-01583-w

Qiu, D., Diretto, G., Tavarza, R. and Giuliano, G. (2007). Improved protocol for *Agrobacterium mediated* transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. Scientia Horticulturae, 112 (2), 172-175. doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.015

Rajesh, N., Siva-Kumar, J., Prashanth, J.E.P. and Osman-Basha, P. (2016). An establishment of efficient *Agrobacterium-mediated* transformation in tomato (*Solanum lycopersicum*). International Journal of Recent Scientific Research, 7(1), 8583-8591.

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. (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.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 16.1-16.62

Sandhya, D., Jogam, P., Venkatapuram, A.K., Savitikadi, P., Peddaboina, V., Allini, V.R. and Abbagani, S. (2022). Highly efficient *Agrobacterium-mediated* transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(6), 1-13. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103292

Schillberg, S. and Finnern, R. (2021). Plant molecular farming for the production of valuable proteins – Critical evaluation of achievements and future challenges. Journal of Plant Physiology, 258, 1-7. doi.org/10.1016/j. jplph.2020.153359

Sharma, M.K., Solanke, A.U., Jani, D., Singh, Y. and Sharma, A.K. (2009). A simple and efficient *Agrobacterium-mediated* procedure for transformation of tomato. Journal of Biosciences, 34(3), 423-433. doi: 10.1007/s12038-009-0049-8

Soltanmohammadi, B., Jalali-Javaran, M., Rajabi-Memari, H. and Mohebodini, M. (2014). Cloning, transformation and expression of proinsulin gene in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 9(1), 9-15. doi: 10.17795/jjnpp-7779

Somleva, M.N., Tomaszewski, Z. and Conger, B.V. (2002). *Agrobacterium mediated* transformation of switchgrass. Crop Science, 42(6), 2080-2087. doi. 10.2135/cropsci2002.2080

Stavridou, E., Tzioutziou, N.A., Madesis, P., Labrou, N.E. and 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. doi.org/10.17221/61/2018-CJGPB

Su, X., Wang, B., Geng, X., Du, Y., Yang, Q., Liang, B., Meng, G., Gao, Q., Yang, W., Zhu, Y. and Lin, T. (2021). A high-continuity and annotated tomato reference genome. BMC Genomics, 22(1), 1-12. doi: 10.1186/s12864-021-08212-x

Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Veera-Reddy, P. and 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(2), 275-287. doi:10.1007/s11240-012-0149-2

Sun, S., Kang, X.P., Xing, X.J., Xu, X.Y., Cheng, J., Zheng, S.W. and Xing, G.M., (2015). *Agrobacterium-mediated* transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 29(5), 861-868. doi.org/10.1080/13102818.2015.1056753

Van, D.T., Ferro, N. and Jacobsen, H.J. (2010). Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens mediated* leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. GM crops and food, 1(5), 312-321. doi:10.4161/gmcr.1.5.14703

Vats, S., Shivaraj, S.M., Sonah, H. Patil, G. Roy, J., Sharma, T.R. and Deshmukh, R. (2023). Efficient regeneration and *Agrobacterium-mediated* transformation method for cultivated and wild tomato. Plant Molecular Biology Reporter, 41, 405-416. doi.org/10.1007/s11105-023-01374-w

Wang, Y. and Demirer, G. S. (2023). Synthetic biology for plant genetic engineering and molecular farming. Trends

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]

Zhu, Q., Tan, J. and Liu, Y.G. (2022). Molecular farming using transgenic rice endosperm. Trends in Biotechnology, 40(10), 1248-1260. doi: 10.1016/j.tibtech.2022.04.002

in Biotechnology, 41(9), 1182-1198. doi: 10.1016/j.tibtech.2023.03.007

Yasmin, A. and Debener, T. (2010). Transient gene expression in rose petals via Agrobacterium infiltration. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 102(2), 245-250. doi:10.1007/s11240-010-9728-2

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.7]