Archive of

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Optimization of *gus* gene transferring to *Begonia soli-mutata*

Fateme Hosseini

MSc. of Agricultural Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: fatemehosseini12@yahoo.com

Nasrin Moshtaghi

Associate Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: moshtaghi@um.ac.ir

Ahmad Sharifi

*Assistant Professor, Ornamental Plant Biotechnology Department, Academic Center for Education, Culture and Research: ACECR, Khorasan Razavi Province, Mashhad, Iran. Tel: +985131997456, Email: ahmadsharifi66@yahoo.com

Abdolreza Bagheri

Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: abagheri@um.ac.ir

Hasan Marashi

Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: marashi@um.ac.ir

Abstract

Objective

Begonias are popular ornamental plants in the world so introducing of various forms of this plant is very important. Nowadays plant modification through biotechnology and genetic engineering for production of new genotypes with varied forms is highlighted in this genus. So optimization of regeneration in *in vitro* culture condition and gene transferring is in priority to provide a suitable condition for gene transferring in this plant specially those responsible in flower color.

www.SID.ir

Archive of SID

Materials and methods

In the first step, thin cell layer (TCL) explants from petioles of *B. soli-mutata* were assayed in MS medium containing Kin or TDZ (0.2, 1 and 2 mg/l) in combination with NAA (0 and 0.2 mg/l). For co-culturing of petiole TCL explants with *Agrobacterium tumefacians* strain LBA_{4404} containing *GUS* and *NPTII* genes MS medium supplemented with 1 mg/l Kin and 0.2 mg/l NAA was used. Transformed plantlets were confirmed by PCR and Gus assay test.

Results

Based on the regeneration results, Kin was better than TDZ, also adding NAA to the medium has positive effect on both of cytokinins. In transformation process, out of 2000 explants which infected with *Agrobacterium*, after 4 months of culture only 17 plantlets were adopted. Of these 17 plantlets, only 7 plantlets were confirmed by Gus assay test and PCR as transgenic plants.

Conclusions

The result showed in this species transformation percentage is low and optimization of transformation condition is important.

Keywords**:** *Agrobacterium*, Regeneration, Begonia, Transformation.

Citation: Hosseini F, Moshtaghi N, Sharifi A, Bagheri A, Marashi H (2019) Optimization of *gus* gene transferring to *Begonia soli-mutata* . Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 87-104.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 87-104

DOI: 10.22103/jab.2019.12975.1086

Received: July 5, 2019; Accepted: October 8, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

انتقال ژن *GUS* به گیاه زینتی *Begonia soli-mutata*

فاطمه حسینی

کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل: fatemehosseini12@yahoo.com

نسرین مشتاقی

دانشیار گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل: moshtaghi@um.ac.ir

احمد شریفی

* نویسنده مسئول، استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی. تلفن: 05131997456، ایمیل: ahmadsharifi66@yahoo.com

عبدالرضا باقری

استاد گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل: abagheri@um.ac.ir

حسن مرعشی

استاد گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل: marashi@um.ac.ir

تاریخ دریافت: 1398/04/14، تاریخ پذیرش: 1398/07/16

چکیده

هدف: بگونیا یکی از رایج‌ترین گیاهان زینتی در جهان است و امروزه توجه ویژه ای به استفاده از بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در تولید اقام جدید با فرم های متنوع در این جنس شده است. این آزمایش با هدف بهینه سازی باززایی و انتقال ژن در این گیـاه انجام شد تا زمینه ی لازم برای انتقال ژنهای ارزشمند را فراهم کند.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها: ابتدا شاخه‌زایی ریزنمونه¬های لایه سلولی نازک دمبرگ گونه *B. soli-mutata* در محیط کشت MS حاوی سیتوکینین¬های Kin یا TDZ (0/2، 1 و 2 میلی گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (0 و 0/2 میلی گرم در لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای همکشتی و تولید گیاهان تراریخته، ریزنمونه دمبرگ بگونیا با باکتری *A. tumefacians* نژاد LBA4404 حاوی ژن *GUS* و ژن گزینشگر *NPTII* در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شد. برای تایید تراریختی گیاهچه‌های بدست آمده، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای ژنهای *GUS* و *VIR* و آزمون ارزیابی Gus استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد به لحاظ باززایی شاخه سیتوکینین Kin نسبت به TDZ برتری دارد و اضافه کردن NAA به محیط کشت در هر دو تیمار سیتوکینین باعث بهبود تمام صفات شد. لذا برای همکشتی از محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. طی فرایند تولید گیاهان تراریخته، بعد از 4 ماه همکشتی 2000 ریزنمونه با باکتری در محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، در مرحله سازگاری 17 گیاهچه بدست آمد که تراریختی 7 گیاهچه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آزمون ارزیابی Gus تایید شد.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی نشان داد درصد تراریزش در این گیاه پایین است و بهینه کردن شرایط برای افزایش کارایی انتقال ژن در آن از اهمیت زیادی برخوردار است.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم، باززایی، بگونیا، تراریختی.

مقدمه

بگونیا یکی از بزرگترین جنس¬ها در بین بازدانگان و از خانواده Begoniaceae می‌باشد (Frodin 2004). تا به امروز تعداد گونه¬های ثبت شده در این جنس به 1835 مورد می‌رسد، علاوه براین حدود 15000 هیبرید هم در این جنس گزارش شده¬است (Sandgrind 2017). هیبریداسیون درون این جنس به راحتی انجام می‌شود و بیشتر بگونیاهایی که امروزه به صورت تجاری تولید می‌شوند هیبرید هستند. بگونیا یکی از رایج‌ترین گیاهان زینتی در سراسر جهان است که به عنوان گیاه باغی، گلدانی، آویز و گلخانه‌ای پرورش داده می شود (Hvoslef-Eide & Munster 2006). از لحاظ اهمیت کشور بلژیک در سال 2015 بیش از 2/75 میلیون، هلند در سال 2013 بیش از 13 میلیون، آمریکا در سال 2013 بیش از 27/9 میلیون و سوئد در سال 2011 بیش از 2/7 میلیون گلدان بگونیا تولید کردند (International Statistics Flower and Plants 2014). ارزش تجاری گیاهان زینتی اغلب به طور مستقیم مربوط به رنگ گل، فرم بوته، ساختار گل، زمان گلدهی، کیفیت پس از برداشت و مقاومت به تنشهای زیستی و غیرزیستی می باشد (Sharifi et al. 2017). ایجاد تنوع در این گونه زینتی نیز مانند سایر گیاهان با روش¬های اصلاح کلاسیک و مهندسی ژنتیک امکان پذیر است. به هرحال مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی امکاناتی را برای

www.SID.ir

Archive of SID

تولید ارقامی با خصوصیات جدید از طریق بیان ژنهای خارجی یا تغییر هدفمند ژنهای موجود فراهم می‌کند. در گیاهانی مانند داوودی، کوکب، میخک و رز از طریق مهندسی ژنتیک گیاهان تراریخته با خصوصیات جدید و با ارزش تجاری تولید شده¬است (Sharifi et al. 2017).

اگرچه تاحدودی روش¬های کشت بافت برای انواع گونه¬های بگونیا مشابه است و بیشتر از ریزنمونه های برگ و دمبرگ برای القای باززایی استفاده می شود (Burritt & Leung 1996; Burritt 2008; Nhut et al. 2010) اما نیاز این گونه¬ها به تنظیم کننده¬های رشد متفاوت می¬باشد. به طور کلی، سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده اغلب عامل پیچیده‌ای برای کالوس‌زایی، باززایی یا رشد و تمایز ریزنمونه کشت شده هستند و تقسیم سلولی را تحریک و تمایز سلولی و اندام زایی را کنترل می‌کنند. نوع و غلظت مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (Kumari et al. 2015). در کشت بافت بگونیا جهت القای باززایی بیشتر از سیتوکنین‌هایی نظیر BA، Kin و TDZ در ترکیب با NAA و IAA استفاده شده است (Nada et al. 2011; Kabirnataj et al. 2012; Shobi and Viswanathan 2017).

اولین مقالات درباره تراریزش ژنتیکی بگونیا توسط Einset & Kopperud (1995) منتشر گردید. آنها گونه‌ای را که تراریخته نموده بودند به اشتباه *B. heimalis* می¬نامیدند که در حقیقت *B. cheimantha* بود (Hvoslef-Eide & Munster 2006). در این گیاه آنها ژن ACC اکسیداز از مسیر بیوسنتز اتیلن را خاموش کردند با این حال دوام گل در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد تفاوتی نداشت (Einset & Kopperud 1995; Hvoslef-Eide & Munster 1995). Kiyokawa et al. (1996) تراریزش ژنتیکی *B. tuberhybrida* را با ژنهای *GUS* و *ROL* گزارش نمودند. این تراریزش ژنتیکی با استفاده از اگروباکتریوم تومی فاشینس سویه‌ی LBA4404 صورت گرفت. Kishimoto et al. (2002) تراریزش ژنتیکی *B. hiemalis* با ژن *GUS* را با استفاده از همین باکتری با سویه‌ی AGL0 گزارش نمودند. در این سه مورد فراوانی تراریزش خیلی متفاوت بود، به‌طوری که Einset & Kopperud (1995) فقط یک گیاه تراریخته بدست آوردند، Kishimoto et al. (2002) درصد تراریزش را حداکثر 3/2 درصد گزارش کردند و Kiyokawa et al. (1996) 24 درصد گیاهان تراریخته تولید نمودند. Hoshi et al. (2003) به منظور تراریزش *B. semperflorens* با استفاده از *A. tumefacience* از قطعات برگ این گیاه استفاده کردند. Ping-qu & Lei (2010) ژن *IPT* (*Isopentenyl pyrophosphate*) را به همین گیاه منتقل کردند. گیاهان تراریخته تولید شده نسبت به گیاهان شاهد از مقاومت بهتری نسبت به شرایط خشکی برخوردار بودند. Xu et al. (2011) ژن *KNOX* که نقش مهمی در حفظ خصوصیت مریستمی و الگوگیری مناسب اندام¬ها دارد را با کمک *A. tumefacience* به *B. maculate* منتقل کردند و توانستند در این گیاه یک فنوتیپ جدید گل تولید کنند. در این بررسی حداکثر درصد تراریزش 5/8 درصد گزارش شد. همچنین Sandgrind (2017)، به منظور تولید رنگ آبی در *B. tuberhybrida* ژن *F3'5'H* را با استفاده از *A. tumefacience* به این گیاه منتقل کرد. وی 1692 ریزنمونه را تیمار کرد و در کل 18 گیاه تراریخته تولید نمود که هیچ یک از آنها رنگ آبی قابل توجهی تولید نکردند.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به ارزش تجاری بالای بگونیا لازم است شرایط مناسب برای دستیابی به روش¬های سریع و قابل اطمینال تولید فرم¬های جدید در این گیاه فراهم شود. لذا پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن به گونه *B. soli-mutata* مبتنی بر ژن گزارشگر *GUS* انجام شده است. این پژوهش به عنوان پیش‌نیاز ضروری برای انتقال ژن‌های مطلوب بویژه ژنهای دخیل در رنگ گل در این گیاه می باشد.

مواد و روش‌ها

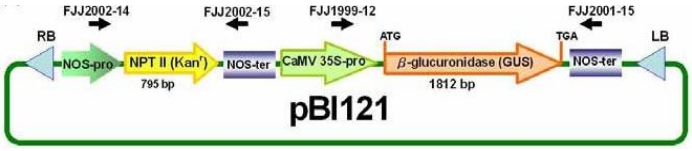
اثر ترکیب هورمونی محیط کشت بر باززایی *B. soli-mutata*: با توجه به اهمیت انتخاب نوع ریزنمونه در موفقیت کشت بافت گیاهان، در آزمایش مقدماتی اثر نوع ریزنمونه (دمبرگ، برگ و ساقه) در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر TDZ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ریزنمونه دمبرگ نسبت به سایر ریزنمونه ها از لحاظ استقرار ریزنمونه در شرایط کشت بافت و باززایی وضعیت بهتری داشت با این حال درصد باززایی بسیار پایین بود (داده ها نشان داده نشده). لذا به منظور بهبود شرایط باززایی در آزمایش اصلی ریزنمونه دمبرگ انتخاب شد و اثر ترکیب تنظیم کننده های رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای اجرای این تحقیق ابتدا ریزنمونه‌های دمبرگ گیاه شاداب و در حال رشد *B. soli-mutata* جدا و به مدت 30 دقیقه زیر آب‌جاری شستشو شد. برای ضدعفونی آنها از محلول هیپوکلریت سدیم 1/5 درصد به مدت 15 دقیقه استفاده و سپس زیر هود لامینار با آب استریل شستشو شدند. پس از جدا نمودن دو انتهای دمبرگ از قسمت باقیمانده برای تهیه TCLهایی (Thin Cell Layer) به ضخامت دو میلی‌متر استفاده شد. ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS حاوی سیتوکنین TDZ یا Kin با غلظت های 0/2، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با اکسین NAA (0 و 0/2 میلی‌گرم در لیتر)، 3 درصد ساکارز و 0/8 درصد آگار با 5/ 8 =pH در ویال های 50 میلی لیتری حاوی 12 میلی لیتر محیط کشت، کشت شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور سیتوکینین و اکسین (دو نوع سیتوکینین با سه غلظت و اکسین با دو سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. ریزنمونه‌ها در اتاق رشد با دمای2 ± 25 درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از آن هر 4 هفته، واکشت ریزنمونه‌ها به محیط کشت جدید انجام شد. پارامترهای باززایی شامل درصد زنده‌مانی ریزنمونه، درصد شاخه زایی، درصد کالوس‌زایی و درصد ریشه‌زایی در پایان واکشت دوم و تعداد برگ، تعداد ریشه (بزرگتر از 3 میلی متر طول) و طول آن (با میانگین گیری طول تمام ریشه های بزرگتر از 3 میلی متر) در پایان واکشت چهارم یادداشت برداری شدند.

مشخصات باکتری و پلاسمید مورد استفاده: در این آزمایش از آگروباکتریوم تومی¬فاشینس نژاد LBA4404 حامل پلاسمیدpBI121 دارای ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین *NPTII* و ژن گزارشگر *GUS* جهت تراریختی استفاده¬شد (شکل 1). برای تایید باکتری آگروباکتریوم تومی¬فاشینس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده¬شد. سه واکنش جداگانه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GUS*، *VIR* و *NPTII* (جدول1) جهت تکثیر و تایید استفاده¬شد. دمای

www.SID.ir

Archive of SID

اتصال برای ژن *VIR* حدود 64 درجه سانتی گراد و برای ژن¬های *GUS* و *NPTII* حدود 55 درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد و PCR استاندارد در 35 چرخه انجام شد.



شکل1. تصویر پلاسمید pBI121 حاوی ژن *GUS*.

Figure 1. *pBI121* plasmid containing *GUS* gene.

جدول 1. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GUS*، *VIR* و *NPTII*

Table 1. The sequences of specific primer for *GUS*, *VIR* and *NPTII* genes

طول محصول (جفت باز) Length of fragment (bp)		توالی الیگونوکلئوتیدی Nucleotide sequence	نام آغازگر Name of primer
1056	Forward	5′- CTCATCAGGCACGCTTG-3′	Primer for *VIR* gene
	Reverse	5′- GCGGATGCTTCAAATGG-3′	
1100	Forward	5′- ACGTCCTGTAGAAACCCCAA-3′	Primer for *GUS* gene
	Reverse	5′- CCCGCTTCGAAACCAATGCC-3′	
900	Forward	5′- CAGGTTCTCCGGCCGCT-3′	Primer for *NPTII* gene
	Reverse	5′- GAACTCGTCAAGAAGGC-3′	

شرایط همکشتی و محیط کشت انتخابی: برای تعیین غلظت مناسب کانامایسین جهت گزینش ریزنمونه‌های تراریخته، ریزنمونه‌های TCL گیاه *B. soli-mutata* در محیط‌کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin و غلظت‌های مختلف کانامایسین شامل 0، 25، 50، 75 و 100 میلی‌گرم در لیتر کشت و پارامترهای باززایی بعد از شش هفته یادداشت برداری شدند.

برای همکشتی ریزنمونه‌های TCL از گیاهچه‌های استریل *B. soli-mutata* رشد یافته در شرایط این‌ویترو، ابتدا ریزنمونه ها به صورت پیش تیمار در محیط‌کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin کشت شدند. بعد از یک هفته جهت هم‌کشتی با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند. زمانی که OD باکتری در طول موج 600 نانومتر به 0/8 تا یک رسید برای همکشتی استفاده شد. ریزنمونه‌های TCL یک هفته‌ای، به مدت 30 دقیقه در درون سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند سپس در محیط‌کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA، یک میلی‌گرم در لیتر Kin، 100 میکرومولار

www.SID.ir

Archive of SID

استوسرینگون (Kishimoto et al. 2002)، سه درصد ساکارز و 0/8 درصد آگار کشت شدند. 2000 ریزنمونه TCL در همکشتی با اگروباکتریوم تومی فاشینس مورد استفاده قرار گرفت. بعد از طی مدت 48 و 72 ساعت از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط‌کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA، یک میلی‌گرم در لیتر Kin، 500 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتقال یافتند و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از 6 هفته گیاهچه‌های تولید شده جهت طویل شدن به همین محیط‌کشت فاقد کانامایسین منتقل شدند. با توجه به اینکه گیاهچه‌ها در همین محیط کشت باززایی تولید ریشه نمودند، برای سازگاری به بستر حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت 1:1 انتقال یافتند.

تایید تراریختی با استفاده از PCR و ارزیابی Gus: پس از سازگاری گیاهچه ها برای سنجش بیان ژن بتا – گلوکورونیداز در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی آزمون ارزیابی Gus انجام شد. برای تهیه محلول gus و مشاهده فعالیت آنزیم β-گالاکتورونیداز از دستورالعمل .Jefferson et al (1987) استفاده¬شد. چند شاخه تراریخته احتمالی تهیه و دیسک های کوچکی از برگ آنها در محلول gus غوطه‌ور شدند. این نمونه‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز نگهداری شدند. پس از طی این مدت به منظور حذف رنگیزه‌های گیاهی، پنج بار با الکل 70 درصد شستشو شدند. در صورت تراریخته بودن، رنگ آبی در زمینه سفید قابل مشاهده است.

پس از گزینش شاخه‌های تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون ارزیابی Gus، لازم بود آزمون تایید مولکولی ژن انتقال یافته بر روی این شاخه‌ها صورت گیرد. بنابراین از این شاخه‌ها استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از آغازگرهای ژن¬های *GUS* و *VIR* بطور جداگانه PCR انجام و سپس الکتروفورز محصول PCR انجام شد. به منظور استخراج DNA از نمونه‌های برگی گیاهان تراریخته و غیرتراریخته از روش CTAB استفاده شد (Doyle & Doyle 1987).

نتایج و بحث

اثر ترکیب هورمونی محیط کشت بر باززایی *B. soli-mutata*: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده ها (جدول 2)، اثر سیتوکینین بر تمام صفات مورد ارزیابی بجز درصد کالوس زایی و اثر میزان اکسین NAA در تمام صفات مورد بررسی در سطح 5 درصد معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که حضور 0/2 میلی گرم در لیتر NAA در هر دو تیمار سیتوکینین باعث بهبود تمام صفات شد (جدول 3). همچنین Kin در تمام صفات مورد بررسی بویژه درصد زنده مانی ریزنمونه و درصد شاخه زایی اثر بهتری نسبت به TDZ داشت. اثر متقابل سیتوکینین و غلظت اکسین در تمام صفات بجز درصد باززایی و تعداد برگ تولید شده در سطح پنج درصد معنی دار نبود (جدول 2). مقایسه میانگین داده¬ها نشان داد که بیشترین درصد زنده مانی ریزنمونه (100)، درصد کالوس زایی (42/5)، درصد شاخه زایی (100) و تعداد برگ تولید شده به ازای هر ریزنمونه (26/25 عدد) در محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد. همچنین بیشترین تعداد ریشه

www.SID.ir

Archive of SID

(46 عدد) و طول ریشه به ازای هر ریزنمونه (35/75 میلی متر) در محیط کشت حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد (جدول 3). شکل 2 القای باززایی شاخه در ریزنمونه دمبرگ و تولید گیاهچه کامل در شرایط این ویترو را نشان می دهد.

جدول 2. تجزیه واریانس صفات مربوط به باززایی گونه *B. soli-mutata* در شرایط این ویترو

Table 2. Analysis variance for regeneration characteristics of *B. soli-mutata* in *in vitro* condition

طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)	تعداد ریشه Root number	تعداد برگ Leaf number	درصد شاخه زایی Shoot regeneration percentage	درصد کالوس زایی Callogenesis percentage	درصد زنده مانی Survival percentage	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
172.93*	77.34*	18.25*	860.82*	209.35 ns	0.13*	5	سیتوکینین Cytokinin
7482.25*	12191.84*	5220.06*	69086.61*	70201.59*	4.30*	1	اکسین Auxin
372.96*	228.84*	27.52*	248.44*	229.41*	0.12*	5	سیتوکینین* اکسین Cytokinin* Auxin
3.37	2.39	8.78	48.8	84.39	0.02	36	خطا Error
15	10	4.7	19	8.3	0.3		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3. اثر سیتوکینین و میزان اکسین NAA بر میانگین شاخه زایی و ریشه زایی *B. soli-mutata* در شرایط این ویترو

Table 3. Effect of cytokinin and concentration of NAA on mean of shoot regeneration and rooting of *B. soli-mutata* in *in vitro* culture codition

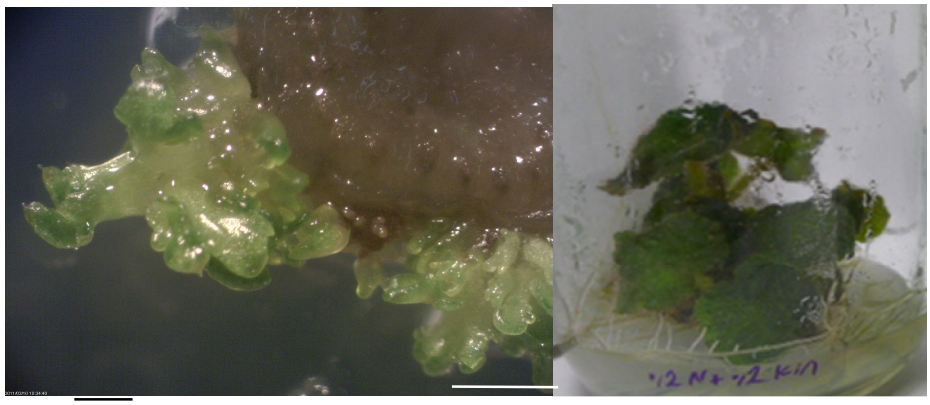
طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)	تعداد ریشه Root number	تعداد برگ Leaf number	درصد شاخه زایی Shoot regeneration percentage	درصد کالوس زایی Callogenesis percentage	درصد زنده مانی Survival percentage	غلظت اکسین Concentration of auxin	غلظت سیتوکینین Concentration of cytokinin	سیتوکینین Cytokinin
0.00 d	0.00 i	0.00 h	0.00 g	0.00 b	0.00 i	0	0.2	TDZ
13.25 c	12.00 fg	0.00 h	0.00 g	8.25 b	37.00 g	0.2		
0.75 d	0.75 i	1.50 fg	16.50 fg	5.50 b	27.50 h	0	1	
19.75 b	20.75 d	0.00 h	0.00 g	23.25 ab	57.00 cd	0.2		
0.00 d	0.00 i	0.00 h	0.00 g	0.00 b	37.00 g	0	2	
13.00 c	16.50 e	0.25 fg	1.50 g	16.50 ab	57.00 cd	0.2		
2.50 d	0.75 i	0.75 fg	11.00 fg	0.00 b	49.50 def	0	0.2	Kin
35.75 a	46.00 a	15.75 c	83.00 bc	0.00 b	61.25 c	0.2		
12.75 c	9.50 gh	5.25 de	49.50 de	22.00 ab	53.50 cdef	0	1	
19.75 b	40.50 b	26.25 a	100 a	42.50 a	100.00 a	0.2		
12.00 c	11.25 fg	3.50 ef	70.75 bc	16.50 ab	54.50 cde	0	2	
13.75 c	23.75 c	21.50 b	100 a	0.00 b	77.50 b	0.2		

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% probability level.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2. مراحل باززایی شاخه در گیاه *B. soli-mutata* (راست) القای باززایی در ریزنمونه دمبرگ (چپ) گیاهچه باززا شده

Figure 2. Shoot regeneration in *B. soli-mutata,* right) regeneration induction in petiole explant, left) regenerated plantlet

برای تولید جنین‌های سوماتیکی در بگونیا Castillo and Smith (1997) از محیط کشت MS غنی شده با 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و دو درصد شیره نارگیل استفاده کردند. بیشترین تعداد جنین (60 تا 70 عدد به ازای هر ریزنمونه) از کالوس¬های بدست آمده از ریز نمونه‌های برگ بدست آمد. Nhut et al. (2005) جهت ریزازدیادی *B. tuberous* از ریز نمونه‌های TCL دمبرگ در محیط کشت غنی شده با 0/2 میلی‌گرم بر لیتر TDZ استفاده¬کردند و جهت ریشه‌دار نمودن شاخه‌های تشکیل شده از محیط کشت MS تکمیل شده با 0/5 میلی‌گرم بر لیتر BA،0/1 میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک گرم بر لیتر زغال فعال استفاده¬کردند. Shobi and Viswanathan (2017) سیتوکنین¬های BAP، Kin و TDZ در ترکیب با اکسین¬های IAA، IBA و NAA در محیط کشت پایه MS را بر باززایی *B. fallax* مورد بررسی قرار¬دادند. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی 0/5 میلی¬گرم در لیتر BA و 0/5 میلی¬گرم در لیتر NAA بهترین ترکیب است. شواهد از باززایی در گونه¬های مختلف بگونیا حاکی از این است که ساختار¬های ژنتیکی متفاوت گونه¬ها می تواند باعث پاسخ¬های متفاوت به ترکیبات هورمونی محیط کشت شده¬باشد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی گونه *B. soli-mutata* در شرایط این‌ویترو: نتایج جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی گونه *B. soli-mutata* در شرایط این‌ویترو نشان داد که بین غلظت‌های مختلف از نظر درصد زنده‌مانی و درصد باززایی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی (100 درصد) و باززایی (100 درصد) در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کانامایسین مشاهده شد (جدول 4). با توجه به درصد شاخه زایی (11 درصد) و زنده‌مانی (25 درصد) ریزنمونه ها در غلظت 50 میلی‌گرم در لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

کانامایسین، از این غلظت در محیط کشت‌های انتخابی برای گزینش ریزنمونه‌های تراریخته استفاده شد. Einset & Kopperud (1995)، Kiyokawa et al. (1996)، Kishimoto et al. (2002) و Ping-qu & Lei (2010) از غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین جهت گزینش گیاهچه‌های تراریخته گونه‌های دیگر بگونیا استفاده کردند در حالی که این غلظت در گونه *B. soli-mutata* نامناسب بوده و موجب سوختگی تمام ریز نمونه‌ها گردید (شکل 3).

شکل 3. گیاهچه‌های *B. soli-mutata* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین. راست) 50 میلی‌گرم در لیتر. وسط) 25 میلی‌گرم در لیتر. چپ) صفر میلی‌گرم در لیتر.

Figure 3. *B. soli-mutata* plantlets in media containing different concentration of Kanamycin. Right) 50 mg/l; Middle) 25 mg/l; Left) 0 mg/l.

جدول4. اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی *B. soli-mutata* در شرایط این‌ویترو

Table 4. Effect of Kanamycin concentrations on regeneration of *B. soli-mutata* in *in vitro* culture codition

درصد شاخه زایی Shoot regeneration percentage	درصد زنده مانی Survival percentage	غلظت کانامایسین (میلی گرم در لیتر) Concentration of Kanamycin (mg/l)
100 a	100 a	0
66.25 b	81.25 a	25
11.00 c	25.00 b	50
0.00 c	15.00 b	75
0.00 c	7.50 b	100

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

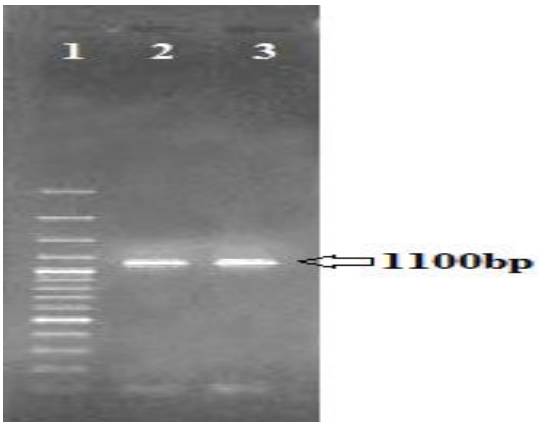
Means within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% probability level.

www.SID.ir

Archive of SID

تایید حضور پلاسمید و ژنهای *VIR* ، *GUS* و *NPT*II در باکتری اگروباکتریوم تومی فاشینس

پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای ژن *GUS* ، *VIR* و *NPT*II حضور این ژنها در باکتری مورد نظرتایید شد. در شکل 4 نمونه ای از نتیجه واکنش PCR برای ژن *GUS* در دمای اتصال 53 و 55 درجه سانتی گراد نشان داده شده است.



شکل 4. باند 1100 جفت بازی مربوط به حضور ژن *GUS* در *Agrobacterium*. چاهک 1) سایز مارکر ، 2) دمای اتصال 53 درجه سانتی گراد و 3) دمای اتصال 55 درجه سانتی گراد

Figure 4. The 1100 bp fragment for the presence of *GUS* gene in the *Agrobacterium*. well 1) Ladder, well 2) annealing temperature in 53°C, well 3) annealing temperature in 55°C.

تایید گیاهان تراریخته: استخراج DNA از بافت برگ گیاهچه‌های شاهد *B. soli-mutata* به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle 1987). ولی به دلیل وجود میزان بالای اگزالیک اسید در برگ‌های بگونیا مقدار DNA استخراج شده بسیار اندک بود. مقدار DNA استخراج شده با نانودراپ اندازه گیری شد و در بهترین وضعیت مقدار 38 نانوگرم DNA در ماکرولیتر بدست آمد. لذا این دستورالعمل بنا به پیشنهاد ارائه شده در روش Einset & Kopperud (1995) مبنی بر شستشو با بافر نمکی T10E10 (Tris 10 mM, EDTA 10 mM) اصلاح شد که باعث بهبود کیفیت DNA استخراج شده گردید. Forrest et al. (2005) در استخراج DNA از برگ‌های تازه و خشک شده بگونیا در ژل سیلیکا، از روش Doyle & Doyle (1987) استفاده کردند. Chen & Mii (2012) به مشکل استخراج DNA از برگ‌های بگونیا اشاره کردند و در استخراج DNA از برگ‌های بگونیا طبق روش Einset & Kopperud (1995) از بافر T10 E10 (10 mM Tris Hcl + 10 mM EDTA) برای شستشو استفاده کرده و سپس از روش CTAB براساس دستورالعمل Murray & Thompson (1980) در استخراج DNA استفاده کردند.

پس از همکشتی 2000 ریزنمونه ی TCL گونه *B. soli-mutata* با باکتری اگروباکتریوم تومی فاشینس، تعداد 58 عدد از ریزنمونه¬ها در محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی گرم در لیتر کانامایسین باززا شدند که 32 عدد زمان 48 ساعت و 26

www.SID.ir

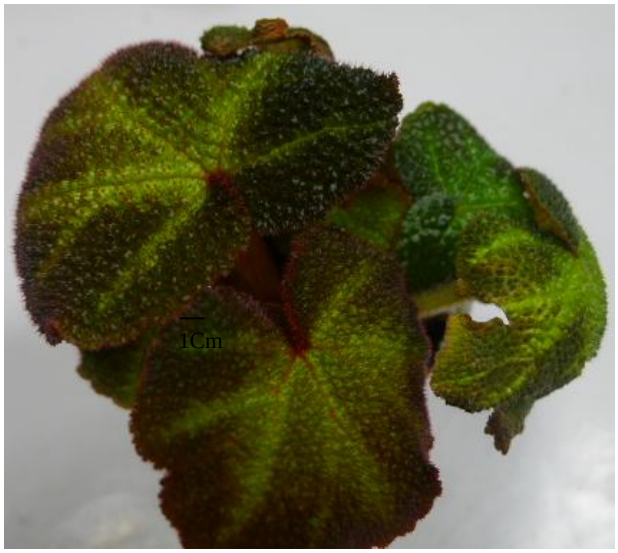
Archive of SID

عدد زمان 72 ساعت همکشتی با باکتری را طی نموده بودند. در کلیه گیاهچه¬های باززا شده از این ریزنمونه¬ها در مقایسه با گیاهچه¬های شاهد کندی رشد مشاهده گردید. بنابراین پس از 12 هفته گزینش در محیط کشت انتخابی، گیاهچه¬ها جهت افزایش رشد به محیط کشت MS فاقد آنتی بیوتیک کانامایسین انتقال یافتند. پس از گذشت 14 هفته از تاریخ همکشتی تنها 17 گیاهچه به مرحله سازگاری رسیدند. برای سازگاری گیاهچه ها از بستر کوکوپیت همراه با پرلیت به نسبت 1:1 استفاده شد. پس از گذشت 60 روز از سازگاری و رشد مناسب گیاهان (با حداقل 8 برگ جدید) از برگ های جوان که در وضعیت فعال رشد بودند DNA استخراج شد و در بررسی های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل 5). از 17 گیاهچه سازگار شده، در ارزیابی بیان ژن *GUS* تنها در 7 گیاه رنگ آبی مشاهده شده و بیان آن تایید شد (شکل 6). واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر¬های ژن *GUS* و *VIR* بر روی تمام این 17 گیاهچه انجام شد و تنها همان 7 گیاهچه باند 1100 جفت بازی مربوط به حضور ژن *GUS* را نشان دادند (شکل7) و هیچ کدام باند 1056 جفت بازی مربوط به حضور ژن *VIR* را نشان ندادند.

Kiyokawa et al. (1996) برای انتقال ژن *GUS* به *B. tuberhybrida* از نژاد باکتری LBA4404 استفاده کردند و درصد تراریختی را 22/5 درصد گزارش کردند. Einset & Kopperud (1995) برای خاموشی ژن ACC اکسیداز از همین نژاد استفاده کردند اما اشاره ای به درصد تراریختی نکردند. Kishimoto et al. (2002) نیز با استفاده از این نژاد ژن *GUS* را به *B. hiemalis* منتقل کردند. آنها توانستند از 628 ریزنمونه مورد استفاده در همکشتی تنها 2 گیاه تراریخته بدست آورند که درصد تراریزش در آن نزدیک به 1/6 درصد بود. Xu et al. (2011) درصد تراریزش نسبت به ریزنمونه اولیه در گیاه *B. maculata* را بسته به تراکم باکتری بین 1/7 تا 5/8 گزارش کردند. Sandgrind (2017) برای تولید رنگ آبی در گیاه *B. tuberhybrida* ژن F3'5'H را با استفاده از نژاد GV3101 اگروباکتریوم تومی فاشینس به این گیاه منتقل کردند و درصد تراریزش 1 درصدی را گزارش کردند. در مجموع نتایج کار سایر محققان مبین این است که درصد تراریزش در گیاه بگونیا پایین است و برای تولید گیاه تراریخته لازم است تعداد زیادی ریزنمونه اولیه همکشتی داده شوند که با نتایج بدست آمده در این آزمایش مطابقت دارد. در بررسی حاضر نیز از دو هزار ریزنمونه ی هم کشتی حدود هفت گیاهچه با بیان مثبت ژن حاصل شد و درصد تراریزشی پایین تر از یک درصد را حاصل نمود. البته طبیعت سرسخت این گیاه در انتقال ژن وابسته به خصوصیات بیوشیمیایی و ترکیباتی در گیاه است که بعضا نقش بازدارندگی در آلودگی باکتریایی ایفا می کنند. با این حال به منظور افزایش کارایی انتقال ژن در این گیاه بهتر است عوامل دیگری چون نژاد های مختلف باکتری، ریزنمونه های دیگر، زمان همکشتی و عوامل القا کننده تلقیح مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

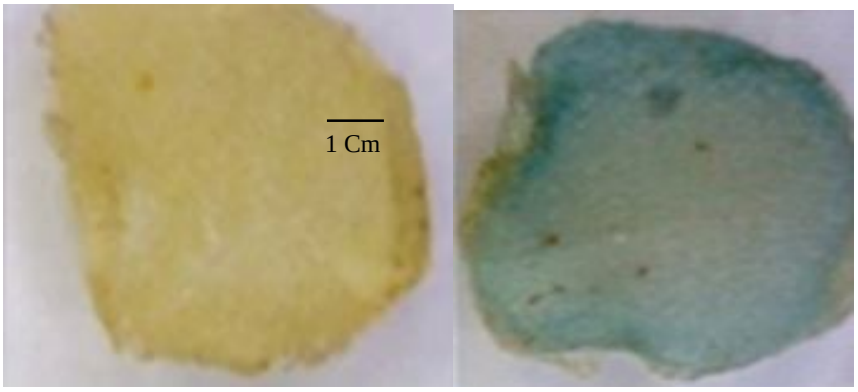
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 5. گیاه تراریخته *B. soli-mutata* در بستر کوکوپیت + پرلیت

Figure 5. Transgenic *B. soli-mutata* in CocoPeat and perlite medium

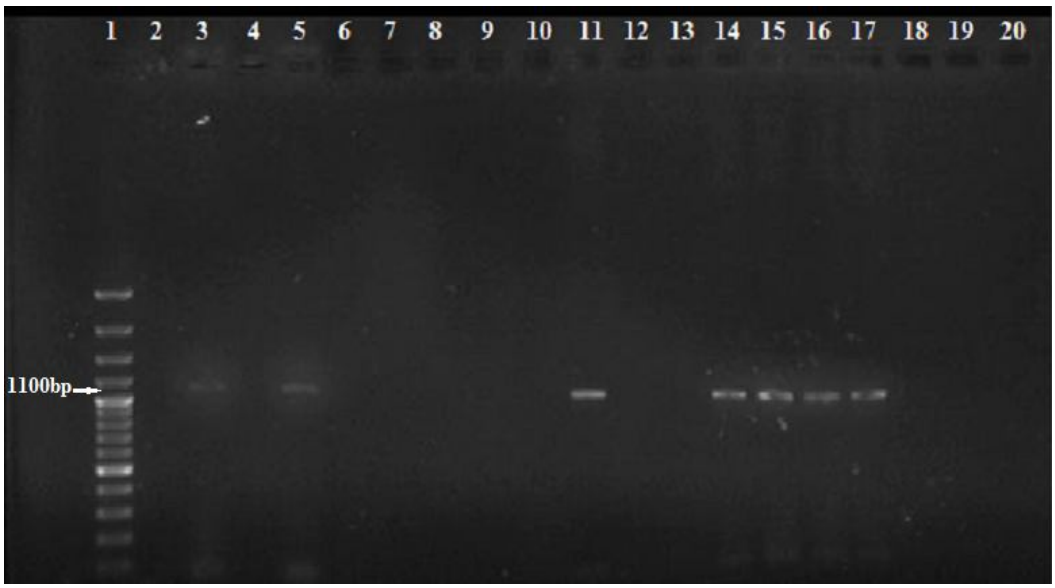


شکل 6. مشاهده رنگ آبی در ارزیابی بیان ژن *gus* در دیسک برگی گیاه تراریخته (سمت راست) و فقدان رنگ آبی در گیاه شاهد غیرتراریخته (سمت چپ)

Figure 6. Blue color in gus assay of leaf disk in transgenic plant (right) and non-transgenic plant (left)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 7. باند 1100 جفت بازی ژن *gus* در گیاهان تراریخته . چاهک 1) سایز مارکر، چاهک 2و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 و 12 و 13 و 14 و 15 و 16 و 17 18) گیاهان گزینش شده در محیط کشت حاوی کانامیسین، 19) شاهد غیر تراریخته، 20)کنترل منفی

Figure 7. The 1100 bp fragment for the presence of *GUS* gene in the transgenic plants. Well 1) Ladder, wells 2-18) Selected plantlets in media containing Kanamycin, Well 19) Control, Well 20) Negative control

نتیجه گیری: با توجه به ارزش تجاری بالای بگونیا و لزوم دستیابی به روش¬های سریع و قابل اطمینال تولید فرم¬های جدید در این گیاه، در پژوهش حاضر در دو مرحله شرایط باززایی و انتقال ژن به گونه *B. soli-mutata* مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله اول شرایط باززایی گیاه از ریزنمونه دمبرگ در شرایط این ویترو بهینه شد و بهترین محیط کشت، محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی گرم در لیتر NAA معرفی گردید. در مرحله دوم شرایط انتقال ژن به این گونه مبتنی بر ژن گزارشگر *GUS* بهینه شد. برای گزینش گیاهان تراریخته از محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی گرم در لیتر کانامایسین استفاده شد. در مجموع نتایج آزمایش تراریختی نشان داد که درصد تراریزش در این گونه بگونیا پایین است و برای تولید گیاه تراریخته لازم است تعداد زیادی ریزنمونه اولیه همکشتی داده شوند. همچنین به منظور افزایش کارایی انتقال ژن در این گیاه بهتر است عوامل دیگری چون نژاد های مختلف باکتری، ریزنمونه های دیگر، زمان همکشتی و عوامل القا کننده تلقیح مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Burritt DJ (2008) Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. Plant Cell Tiss Organ Cult 95, 209-215.

Burritt DJ, Leung DWM (1996) Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia x erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. J Exp Botany 47, 557-567.

Castillo B, Smith MAL (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. Plant Cell Rep 16, 385-388.

Chen YM, Mii M (2012) Interspecific hybridization of *Begonia semperflorens* (section Begonia) with *B. pearcei* (section Eupetalum) for introducing yellow flower color. Plant Biotech 29, 77-85.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19,11-15.

Einset JW, Kopperud C (1995) Antisense ethylene genes for Begonia flowers. ISHS Acta Hort 405, 24.

Forrest LL, Hughes M, Hollingsworth PM, Zomlefer WB (2005) A Phylogeny of *Begonia* Using Nuclear Ribosomal Sequence Data and Morphological Characters. Systematic Bot 30, 671-682.

Frodin DG (2004) History and concepts of big plant genera. Taxon 53, 753-776.

Hoshi Y, Kondo M, Kobayashi H (2003) Transformation of *Begonia semperflorens* by using Agrobacterium. J Jpn Soc Hort Sci 72, 373.

Hvoslef-Eide AK, Fjeld T, Einset JW (1995) Breeding Christmas begonia (*Begonia cheimantha* Everett) for increased keeping quality by traditional and biotechnological methods. Acta Hort 405,197-204.

Hvoslef-Eide AK, Munster C (2006) Begonia. History and Breeding. In: Flower Breeding and Genetics (1st edn). Anderson NO (ed). Springer, Netherlands, pp. 241-275

International Statistics Flowers and Plants (2014) Center for Business Management in Horticulture and Applied Research (1st edn). Leibniz University Hanover, Germany, Volume 62.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS Fusions: Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. EMBO J 6, 3901-3907.

www.SID.ir

Archive of SID

Kabirnataj S, Ghasemi Y, Nematzadeh G et al. (2012) Effect of explant type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Begonia rex*. Int Res J Appl Basic Sci 3, 896-901.

Kishimoto S, Aida R, Shibata M (2002) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of Elatior Begonia (*Begonia. Hiemalis* Fotsch). Plant Sci 162, 697-703.

Kiyokawa S, Kikuchi Y, Kamada H, Harada H (1996) Genetic transformation of *Begonia tuberhybrid*a by *Rirol* genes. Plant Cell Rep 15, 606-609.

Kumari A, Baskaran P, Van Staden J (2017) *In vitro* regeneration of *Begonia homonyma* - A threatened plant. South Afri J Bot 109, 174-177.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8, 4321-4326.

Nada S, Chennareddy S, Goldman S et al. (2011) Direct shoot bud differentiation and plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *Begonia tuberhybrida*. HortSci 46, 759-76.

Nhut D, Hai N, Huyen P et al. (2005) Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from begonia petiole transverse thin cell layer culture. Propag Orn Plants 5, 151-157.

Nhut DT, Hai NT, Phan MX (2010) A Highly Efficient Protocol for Micropropagation of *Begonia tuberous* (1st edn). In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Jain SM, Ochatt SJ (eds). Methods in Molecular Biology book series 589, Humana Press.

Ping-qu B, Lei Z (2010) Study on genetic transformation of *ipt* gene to *Begonia semperflorens* and its drought resistant ability. Hubei Agri Sci 2, 265-270.

Sandgrind S (2017) Breeding of *Begonia tuberhybrida* using modern biotechnology. MS Thesis. Norwegian University of Life Science, Norway.

Sharifi A, Khykha Akhar F, Kharazi M, Khadem A (2017) Biotechnology of Ornamental Plant Jahad Daneshgahi Mashhad press, pp 95. (in Persian)

Shobi TM, Viswanathan MBG (2017) Micropropagation of an Important Medicinal Plant, *Begonia fallax* (Begoniaceae). Int J Curr Res Biosci Plant Biol 4,94-99.

Xu QL, Dong JL, Gao N et al. (2011) Transgenic lines of *Begonia maculata* generated by ectopic expression of *PttKN1*. Biol 66: 251-257.

www.SID.ir