

## **Optimization of tissue culture and transformation of construct contain GDP-mannose-3', 5'-epimerase (GME) gene from actinidia deliciosa L. into Lactuca sativa L.**

**Behnaz Aghayani**

M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

Email: [behnazaghayani@yahoo.com](mailto:behnazaghayani@yahoo.com)

**Alireza Zebarjadi** 

\* Corresponding Author: Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

Email: [zebarjadiali@yahoo.com](mailto:zebarjadiali@yahoo.com)

**Zeinab Chaghakaboodi**

PhD in Agricultural Biotechnology, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. Email:

[z\\_chaghakaboodi@yahoo.com](mailto:z_chaghakaboodi@yahoo.com)

### **Abstract**

#### **Objective**

Lettuce is considered as a model plant for biotechnology because of its compatibility with stable genetic transformation and tissue culture. GDP-mannose-3',5'-epimerase (GME) is one of the key genes in ascorbic acid biosynthesis pathway in plants. The present study aims to transfer GME gene from *Actinidia deliciosa* L. into *Lactuca sativa* L.

#### **Materials and Methods**

To investigate callus induction rate using the effects of explant (cotyledon and true leaves) and 16 plant growth regulator combination including concentrations of 0.02, 0.04, 0.05, and 0.1 mg/l NAA and 0.1, 0.2, 0.4, and 0.6 mg/l BAP, and also direct regeneration rate using the effects of explant (cotyledon and true leaves) and 6 plant growth regulator

combination including concentrations of 0.02 and 0.05 mg/l NAA and 0.2, 0.4, and 0.6 mg/l BAP, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications was conducted. In order to transform GME into *Lactuca sativa* L. using *L. sativa* L. cv. Setareh and *Agrobacterium tumefaciens* strain (C58) on two types of explants (cotyledon and true leaves), a factorial experiment with three replications and 2 min and 8 min inoculation was done.

### Results

The results revealed that the highest percentage of callus induction and indirect regeneration (100%) were observed on leaf and cotyledon explants and MS medium containing 0.1 mg/l BAP and 0.04 mg/l NAA. The results also confirmed the presence of pBI121+GME in transgenic plants.

### Conclusions

The explant true leaves and 2 min inoculation (with 18 percent transformation ratio) were more suitable for transformation.

**Keywords:** GME, Lettuce, Micro-propagation, Transformation, Vitamin C

**Citation:** Aghayani B, Zebarjadi A, Chaghakaboodi Z (2020) Optimization of tissue culture and transformation of construct contain GDP-mannose-3',5'-epimerase (GME) gene from *Actinidia deliciosa* L. into *Lactuca sativa* L. *Agriculture Biotechnology Journal* 12 (2), 81-102.

*Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 81-102.

DOI: 10.22103/jab.2020.14549.1160

Received: March 18, 2020; Accepted: May 6, 2020

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

## بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال سازه حاوی ژن GME کیوی به گیاه کاهو (Lactuca sativa L.)

### بهناز آقایی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، ایمیل: [behnazaghayani@yahoo.com](mailto:behnazaghayani@yahoo.com)

### علیرضا زبرجدی

\* نویسنده مسئول، دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، ایمیل: [zebarjadiali@yahoo.com](mailto:zebarjadiali@yahoo.com)

### زینب چقاابودی

دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، ایمیل: [z\\_chaghakaboodi@yahoo.com](mailto:z_chaghakaboodi@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۷

### چکیده

**هدف:** کاهو به دلیل سازگاری با کشت بافت و انتقال پایدار ژن، یک گیاه مدل برای پژوهش‌های علوم بیوتکنولوژی محسوب می‌گردد. ژن GDP-mannose-3',5'-epimerase (GME) یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ویتامین ث در گیاهان می‌باشد. در این تحقیق این ژن که از منبع کیوی جداسازی شده است به گیاه کاهو منتقل شد.

**مواد و روش‌ها:** به‌منظور بهینه‌سازی کشت بافت کاهو آزمایش‌هایی جهت بررسی میزان کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم با استفاده از اثرات نوع ریز نمونه (برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی) و ۱۶ ترکیب تنظیم‌کننده رشد مختلف شامل غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر BAP جهت بررسی باززایی غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر BAP با سه تکرار به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. جهت انتقال ژن GME به این گیاه نیز آزمایشی با استفاده از رقم ستاره و سویه آگروباکتریوم (C58) روی دو نوع ریز نمونه

(برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی) و با مدت زمان تلقیح دو و هشت دقیقه با سه تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

**نتایج:** نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در ریز نمونه‌های برگ حقیقی و برگ لپه‌ای غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم را به میزان ۱۰۰ درصد داشتند. نتایج حاصل از آزمایش انتقال ژن به کاهو حضور سازه موردنظر را در گیاهان تراریخته تأیید کرد.

**نتیجه‌گیری:** در آزمایش انتقال ژن، ریز نمونه برگ‌های حقیقی و مدت زمان تلقیح دو دقیقه با میزان ۱۸ درصد تراریختی مناسب‌تر بودند.

**کلیدواژه‌ها:** تراریختی، ریزازدیادی، کاهو، ویتامین ث، GME.

#### مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) از سبزیجات برگ‌ی مهم و قدیمی در دنیاست که به خانواده چتریان (Asteraceae) تعلق دارد (Armas et al. 2017; Darqui et al. 2018). این گیاه، یکساله، خودگشن و دارای  $2n=2x=18$  کروموزوم است (Armas et al. 2017; Mohebodini et al. 2011b). برگ‌های این گیاه حاوی مقدار کمی کالری، مواد مغذی و منبع مهمی از ویتامین‌های A، K، E و C می‌باشد، به علاوه کاهو دارای پتاسیم و غنی از مانیتول<sup>۱</sup>، لاکتوسین<sup>۲</sup> و لاکتوپیسرین<sup>۳</sup> است (Mohebodini et al. 2011b; Ismail & Mirza 2015; Ismail et al. 2017; Song et al. 2017). این گیاه به دلیل سازگاری با کشت بافت و انتقال پایدار ژن، یک گیاه مدل برای پژوهش‌های علوم بیوتکنولوژی محسوب می‌گردد (Darqui et al. 2018). در فرآیند انتقال ژن جهت دستیابی به گیاه تراریخته، اولین قدم بهینه‌سازی کشت بافت است تا در حداقل زمان ممکن بتوان گیاه را باززا نمود (Mohebodini et al. 2011a; Honari et al. 2013). آسکوربیک اسید<sup>۴</sup> یک آنتی‌اکسیدان اصلی است که سلول‌های گیاهی را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۵</sup> (ROS) محافظت می‌کند (Ma et al. 2014) و تولید آن (آسکوربیک اسید) در گیاهان می‌تواند باعث بهبود محصول و مقاومت در برابر تنش شوری شود (Najjar-khodabakhsh & Chaparzadeh 2015). کیوی (گونه‌های Actinidia) حاوی غلظت بسیار زیاد ویتامین ث بیش از ۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تازه در ارقام تجاری و بیش از ۸۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تازه در بعضی از گونه‌های وحشی است (Bulley & Laing 2016). در سنتز آسکوربیک اسید در شرایط تنش، تغییر بیان ژنی به نام GME می‌تواند تأثیرگذار باشد

1. Mannitol
2. Lactucin
3. Lactupicrin
4. Ascorbic acid
5. Reactive oxygen species

(Zhang et al. 2011). نام کامل این ژن GDP-mannose-3',5'-epimerase (GME) است و ژنی کلیدی در مسیر بیوسنتز ویتامین ث محسوب می‌گردد که به‌عنوان کاتالیزور عمل می‌کند و GDP-D-mannose را به GDP-L-galactose تبدیل می‌کند که تقریباً تمام آن برای تولید آسکوربیک اسید استفاده می‌شود (Ma et al. 2014; Bulley & Laing 2016). در پژوهشی برای بهینه‌سازی سیستم کشت بافت کاهو از ریز نمونه‌های لپه سه روزه و پنج رقم کاهوی ایرانی و ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید<sup>۱</sup> (NAA) و ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین<sup>۲</sup> (BAP) استفاده شد و لپه به‌عنوان بهترین ریز نمونه برای کشت بافت کاهو معرفی شد (Honari et al. 2009). در پژوهشی دیگر، از دو ژنوتیپ بومی یزد و اهواز، دو نوع ریز نمونه لپه سه روزه و هفت روزه و ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل غلظت‌های ۰/۱، ۰/۴، ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین<sup>۳</sup> (BA) و ۰/۱، ۰/۰۶، ۰/۰۲ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌منظور بررسی تأثیر ژنوتیپ، سن ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد روی القا کالوس و باززایی مستقیم کاهو استفاده شد (Mohebodini et al. 2011b). در تحقیق دیگری که اثر متقابل ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی مستقیم کاهو بررسی شد القا کالوس و درصد ریز نمونه‌های تولیدکننده ساقه به‌وسیله بررسی تأثیرات ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف NAA و BAP مورد مطالعه قرار گرفت (Latif et al. 2014). در مطالعه دیگری، بهینه‌سازی باززایی مستقیم ریز نمونه‌های لپه و برگ‌های حقیقی کاهو با استفاده از ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی شامل ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱، ۰/۴، ۰/۷ و ۰/۸۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بررسی شدند (Gómez-Montes et al. 2015).

در پژوهشی ژن GMP<sup>f</sup> به دست آمده از آرآبیدوپسیس به‌واسطه آگروباکتریوم با استفاده از ریز نمونه‌های برگ‌های کاهو انتقال یافت (Wang et al. 2011). نتایج نشان داد که گیاهان تراریخته ویتامین ث بیشتری نسبت به غیر تراریخته‌ها داشتند. در پژوهشی دیگر، شش ژن (GLDH<sup>۱</sup> و GMP, GME, GGT<sup>۴</sup>, GPP<sup>۶</sup>, GDH<sup>۷</sup>) که آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ویتامین ث را رمزگذاری می‌کنند، به آرآبیدوپسیس منتقل شدند (Zhou et al. 2012). در پژوهشی لپه‌های سه روزه کاهو به‌واسطه آگروباکتریوم سویه C58 حاوی پلاسمید ژن GCHI<sup>۸</sup> و با مدت زمان تلقیح دو دقیقه تراریخته شدند (Fallah-Ziarani et al. 2013). در مطالعه دیگری، به‌منظور بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه کاهو از اثرات نوع ریز نمونه (لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگ‌ی)، نوع رقم کاهو (TN-96-39 و TN-96-41) و نوع سویه آگروباکتریوم (C58, LBA4404)، سه زمان

1. Naphthaleneacetic acid
2. 6-Benzylaminopurine
3. Benzyl adenine
4. GDP-mannose pyrophosphorylase
5. GDP-L-galactose transferase
6. L-galactose-1-phosphate phosphatase
7. L-galactose dehydrogenase
8. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase
9. Guanosine triphosphate cyclohydrolase I

تلقیح (دو، چهار و هفت دقیقه) و ژن گزارشگر gus استفاده شد و نتایج نشان داد که حداقل یک نسخه از این ژن در ژنوم گیاه جای گرفته بود (Honari et al. 2013). در پژوهشی به منظور انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم به گیاه کاهو از لپه هفت روزه به عنوان ریز نمونه، سویه آگروباکتریوم LBA4404 با مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه استفاده شد (Mohebodini et al. 2014). در پژوهشی، افزایش بیان ژن GME یونجه<sup>۱</sup> در آراییدوپسیس تراریخته منجر به افزایش مقاومت به اسیدیت، شوری و خشکی با افزایش تجمع آسکوربات شد (Ma et al. 2014). در مطالعه‌ای به منظور انتقال ژن‌های rolABC از آگروباکتریوم سویه C58 و مدت زمان تلقیح پنج دقیقه با دو نوع ریز نمونه گره و میانگره استفاده شد (Ismail et al. 2017). با توجه به نقش ویتامین ث در تنش‌های اُکسیداتیو و بهبود کیفیت محصول، بعد از انتقال این ژن به گیاه کاهو انتظار می‌رود که این گیاه در برابر تنش‌های مذکور مقاوم شود و کیفیت آن بهبود یابد. انتقال ژن GME جداسازی شده از میوه کیوی (Zakari & Zebarjadi 2017) به کمک آگروباکتریوم به گیاه کاهو به عنوان هدف این پژوهش مورد توجه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از بذور رقم اصلاحی ستاره که از پژوهشکده سبزی و صیفی کشور تهیه شد، استفاده گردید. از محیط کشت MS<sup>۲</sup> (نمک‌های MS، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول و هشت گرم بر لیتر آگار) به منظور جوانه‌زنی بذور، کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم کاهو استفاده شد. pH محیط‌های کشت روی ۵/۷ تنظیم شد و همه محیط‌ها جهت استریل شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. به منظور جوانه‌زنی، بذور کاهو به مدت پنج دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد، ضد عفونی شدند و سپس سه مرتبه با مدت زمان‌های یک، سه و پنج دقیقه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند در ادامه با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک شدند و به کمک پنس استریل در زیر هود لامینار درون شیشه‌های کوچک حاوی محیط کشت MS قرار گرفتند و شیشه‌ها به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سه تا چهار روز پس از جوانه‌زنی، ریز نمونه‌های لپه و پس از مدت زمان ۳۰ روز بعد از جوانه‌زنی، ریز نمونه‌های برگ‌های حقیقی از گیاه اصلی جدا و به تکه‌های کوچکی تقسیم شدند و درون پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط MS و جهت کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم حاوی غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر BAP و جهت باززایی مستقیم حاوی غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر BAP قرار داده شدند. این پتری دیش‌ها هم درون اتاقک رشد با همان شرایط ذکر شده قبل قرار گرفتند. ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط جدید واگشت شدند. پس از گذشت یک ماه، صفات درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی غیرمستقیم و رشد نسبی کالوس اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد. درصد کالوس‌زایی و

1. *Medicago sativa* L.
2. Murashige and Skoog

باززایی غیرمستقیم کاهو با استفاده از تعداد کالوس‌های تولید شده و تعداد ریز نمونه‌های باززا نسبت به تعداد کل ریز نمونه‌ها در هر تکرار به دست آمد. جهت برآورد رشد نسبی کالوس<sup>۱</sup> (RFGW) فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفت (Akbari et al. 2016).

$$\text{RFGW} = [(W2-W1)/W1] \quad \text{فرمول (۱)}$$

که در آن  $W_2$  وزن تر نهایی کالوس و  $W_1$  وزن تر اولیه کالوس می‌باشد. وزن تر اولیه بعد از اینکه کالوس‌ها به‌طور کامل شکل گرفتند (کالوسها طی یک هفته الی ۱۰ روز از کشت ریزنمونه‌ها آماده توزین شدند) و وزن تر نهایی کالوس یک ماه پس اندازه‌گیری اولیه با استفاده از ترازو اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد. آزمایش‌های کالوس‌زایی و باززایی با سه تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. ریز نمونه‌های باززا به‌منظور ریشه‌دهی به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند. بعد از ریشه‌دهی گیاهچه‌ها به منظور سازگاری با محیط پس از حذف برگ‌های پایینی و زرد، شست‌وشوی ریشه و حذف آگار به لیوان‌های کوچک پلاستیکی شفاف سوراخ‌دار حاوی خاک استریل منتقل شدند و سپس درون اتاقک رشد قرار گرفتند. پس از سازگاری، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند و در محیط طبیعی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین داده‌های آزمایش به روش آزمون چند دامنه ای دانکن با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد. در این پژوهش از پلاسמיד بیانی pBI121 حاوی ناحیه T-DNA دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای انتخاب گیاهان تراریخت و ژن GME تحت کنترل پروموتور CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS استفاده گردید. آزمایش انتقال ژن با استفاده از رقم ستاره و سویه آگروباکتریوم (C58) روی دو نوع ریز نمونه (برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی) و با مدت زمان تلقیح دو و هشت دقیقه با سه تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. گیاهان تراریخت احتمالی از طریق آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

بعد از بهینه‌سازی کشت بافت از بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی به دست آمده در محیط‌های پیش‌کشت، هم‌کشت و محیط انتخابی جهت تراریختی استفاده شد. در ابتدا ریز نمونه‌ها روی محیط پیش‌کشت (نمک‌های MS، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، هشت گرم آگار، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA) به مدت یک روز در اتاقک رشد با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. هم‌زمان یک تک کلون از آگروباکتریوم تومه فاشینس سویه (C58) حامل سازه موردنظر در محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور با شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا OD<sub>260</sub> آن به ۰/۸ برسد. بعد از این مدت سوسپانسیون باکتری تحت شرایط ۵۲۰۰ دور در دقیقه، دمای چهار درجه سانتی‌گراد (Honari et al. 2013) و به مدت هفت دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی در شرایط استریل حذف و محیط کشت تلقیح

## 1. Relative fresh weight growth (RFGW)

(نمک‌های MS، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز با pH ۵/۲) به رسوب افزوده شد و امولسیون به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور با شرایط تاریکی، ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

### جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی ژن مقاومت به کانامایسین (nptII)

**Table 1. Kanamycin resistance gene specific primers (nptII)**

نام پرایمر Primer	توالی پرایمر Primer Sequence	طول پرایمر (Mer) Size	درصد GC %GC	دمای ذوب (TM) Temperature Melting
npt (Forward)	5' CAC TGA CGT TCC ATA AAT TC3'	20	40	53.2
npt (Reverse)	5' AAG AAC TCC AGC ATG AGA TC3'	20	45	55.2

ریز نمونه‌ها تحت شرایط استریل با مدت زمان‌های دو و هشت دقیقه به امولسیون فوق افزوده و سپس با کاغذ صافی استریل خشک شدند و روی محیط هم‌کشت (کاملاً شبیه پیش‌کشت) به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ریز نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (نمک‌های MS، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، هشت گرم بر لیتر آگار، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین) منتقل شدند. واکشت ریز نمونه‌ها هر دو هفته یک بار روی محیط انتخابی انجام گرفت. رشد گیاهان تراریخت روی محیط حاوی کانامایسین دلیلی بر دریافت ژن مقاومت به کانامایسین در این گیاهان می‌باشد. در ادامه برای تأیید گیاهان تراریخت از PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از ژن مقاومت به کانامایسین (nptII) استفاده شد. شرایط واکنش PCR و تعداد سیکل‌ها، مدت زمان و دمای هر مرحله برای این آنالیز در (جدول ۲ و ۳) نشان داده شده‌اند. بعد از آزمون PCR و تکثیر DNA گیاهان تراریخت و شاهد برای آشکارسازی آن‌ها از ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای صفات درصد کالوس‌زایی، رشد نسبی کالوس و درصد باززایی غیرمستقیم نشان داد که برای صفت درصد کالوس‌زایی اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) و اثر متقابل نوع ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA در سطح احتمال یک درصد و مابقی اثرات اصلی و اثر متقابل‌های دوگانه دیگر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شدند (جدول ۴). در خصوص صفات رشد نسبی کالوس و درصد باززایی غیرمستقیم اثر متقابل همه تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده‌اند و اثر فاکتورهای اصلی نوع ریز نمونه و BAP



برای صفت رشد نسبی کالوس در سطح احتمال یک درصد و برای باززایی غیرمستقیم در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شدند. در مورد صفات فوق فقط مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA در سطح احتمال یک درصد با استفاده از روش مقایسه میانگین دانکن انجام شد.

### جدول ۲. شرایط واکنش PCR جهت تکثیر ژن nptII

Table 2. PCR conditions for amplification of nptII gene

ماده Material	میزان (میکرولیتر) Rate (μl)
DNA Template	2.0
dNTP (10mM)	1.0
Primer ( <i>nptII</i> ) F (10 pmol)	1.0
Primer ( <i>nptII</i> ) R (10 pmol)	1.0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.0
Taq DNA Polymerase PCR Buffer (10X)	2.5
Taq DNA Polymerase (5 u/μl)	1.0
DDW	15.5
Total	25.0

### جدول ۳. تعداد سیکل‌ها، مدت زمان و دمای مورد استفاده در واکنش PCR

Table 3. Number of cycles, duration and temperature used in PCR

دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه) Time (Minutes)	تعداد چرخه Number of cycles
94	5	1
94	1	30
50	1	
72	1:15	1
72	10	

## جدول ۴. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در آزمایش کالوس‌زایی

Table 4. Analysis of variance for studied traits in callus induction experiment

میانگین مربعات (MS) Mean Squares				
درصد باززایی غیرمستقیم Indirect Regeneration	رشد نسبی کالوس Relative Fresh Weight Growth	درصد کالوس‌زایی Callus Induction	درجه آزادی Degree of Freedom	منابع تغییرات Source of Variation
1204.16*	1.65**	16.67*	1	ریز نمونه Explant
1080.55*	0.81**	16.67*	3	BAP
802.77 <sup>ns</sup>	0.14**	16.67*	3	NAA
3506.94**	0.47**	16.67*	3	ریز نمونه × BAP
4229.16**	0.19**	16.67*	3	ریز نمونه × NAA
1103.70**	0.18**	16.67**	9	BAP × NAA
1361.57**	0.10**	16.67**	9	ریز نمونه × × BAP
292.70	0.01	4.16	64	NAA خطای آزمایش Experimental Error
25.19 %	50.07 %	2.05 %		ضریب تغییرات (%CV) Coefficient of Variation

<sup>ns</sup>، \* و \*\* به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

<sup>ns</sup>، \* and \*\*: Non-significant, Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

تمامی صفات شامل درصد کالوس‌زایی، رشد نسبی کالوس و درصد باززایی غیرمستقیم در اثر متقابل نوع ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین صفات درصد کالوس‌زایی، رشد نسبی کالوس و درصد باززایی غیرمستقیم نشان داد که ترکیب تیماری ریز نمونه برگ لپه‌ای در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA با میزان ۸۶/۶۷ درصد کمترین میزان کالوس‌زایی و بقیه ترکیبات همه بیشترین میزان این صفت (۱۰۰ درصد) را داشتند (جدول ۵).

جدول ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA برای تمام صفات

مورد مطالعه

Table 5. Mean comparison of interactions among explant, BAP and NAA phytohormons for studied traits

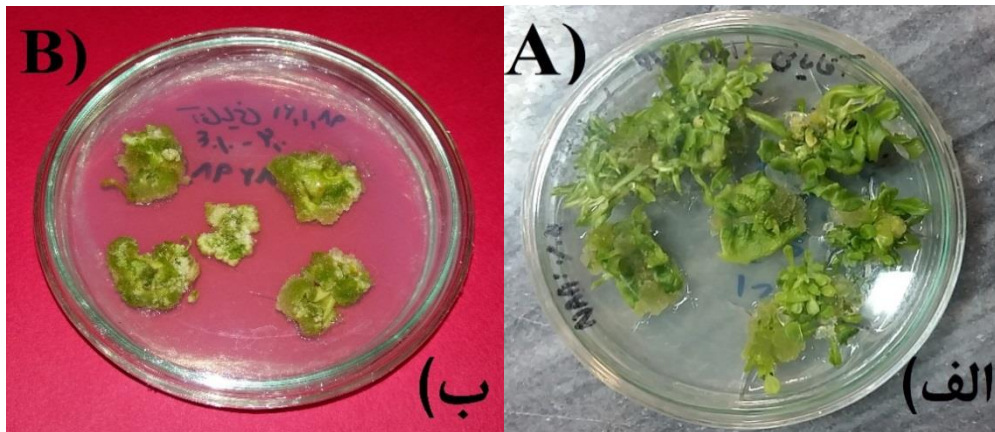
درصد باززایی غیرمستقیم Indirect Regeneration	رشد نسبی کالوس Relative Fresh Weight Growth	درصد کالوس‌زایی Callus Induction	صفات Characteristics		ترکیب تیماری Combination Treatment	
			BAP	NAA		نوع ریز نمونه Explant Type
80.00 <sup>abcde</sup>	3.10 <sup>abc</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.02	برگ Leaf	
100.00 <sup>a</sup>	3.76 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.04	برگ Leaf	
100.00 <sup>a</sup>	2.77 <sup>abcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.05	برگ Leaf	
53.32 <sup>bcdefgh</sup>	0.74 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.1	برگ Leaf	
100.00 <sup>a</sup>	4.53 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.02	برگ Leaf	
80.00 <sup>abcde</sup>	3.80 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.04	برگ Leaf	
70.00 <sup>abcdefgh</sup>	4.87 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.05	برگ Leaf	
36.67 <sup>efgh</sup>	0.71 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.1	برگ Leaf	
90.00 <sup>abc</sup>	2.45 <sup>bcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.02	برگ Leaf	
80.00 <sup>abcde</sup>	1.83 <sup>cd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.04	برگ Leaf	
46.67 <sup>cdefgh</sup>	2.63 <sup>bcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.05	برگ Leaf	
30.00 <sup>gh</sup>	3.12 <sup>abc</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.1	برگ Leaf	
76.67 <sup>abcdet</sup>	3.06 <sup>abcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.02	برگ Leaf	
70.00 <sup>abcdefgh</sup>	1.85 <sup>cd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.04	برگ Leaf	
30.00 <sup>gh</sup>	1.72 <sup>de</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.05	برگ Leaf	
66.67 <sup>abcdefgh</sup>	2.38 <sup>bcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.1	لپه Cotyledon	
26.67 <sup>h</sup>	3.05 <sup>abc</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.02	لپه Cotyledon	
100.00 <sup>a</sup>	2.58 <sup>bcd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.1	0.04	لپه Cotyledon	
43.33 <sup>defgh</sup>	0.49 <sup>g</sup>	86.67 <sup>b</sup>	0.1	0.05	لپه Cotyledon	
53.33 <sup>bcdefgh</sup>	0.78 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.1	لپه Cotyledon	
33.33 <sup>fgh</sup>	1.01 <sup>ef</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.02	لپه Cotyledon	
73.33 <sup>abcdefg</sup>	0.60 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.04	لپه Cotyledon	

86.67 <sup>abcd</sup>	1.02 <sup>ei</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.2	0.05	لپه Cotyledon
60.00 <sup>abcdefgh</sup>	0.64 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.1	لپه Cotyledon
66.67 <sup>abcdefgh</sup>	0.58 <sup>g</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.02	لپه Cotyledon
53.33 <sup>bcdefgh</sup>	0.77 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.04	لپه Cotyledon
73.33 <sup>abcdefg</sup>	0.63 <sup>fg</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.4	0.05	لپه Cotyledon
93.33 <sup>ab</sup>	3.53 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.1	لپه Cotyledon
53.33 <sup>bcdefgh</sup>	3.90 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.02	لپه Cotyledon
46.67 <sup>cdetgh</sup>	1.76 <sup>cd</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.04	لپه Cotyledon
100.00 <sup>a</sup>	3.47 <sup>ab</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.6	0.05	لپه Cotyledon
0.0001	0.0000	0.0004			P
2.78	0.14	0.29			خطای استاندارد (SE) Standard Error

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد است.

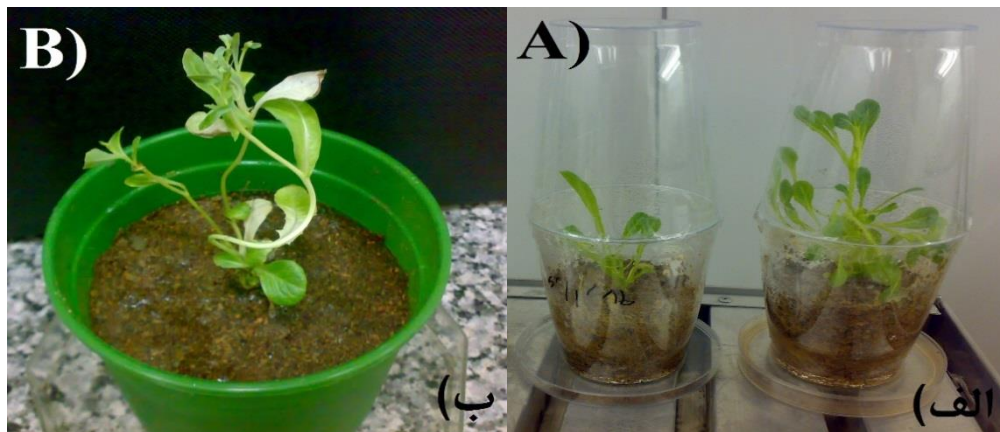
The different letters in each column represent a significant level at a probability level of 1%.

تیمار ریز نمونه برگ در ترکیب محیط کشت تکمیل شده با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA بیشترین (۴/۸۷) و تیمار ریز نمونه برگ لپه‌ای در ترکیب محیط کشت تکمیل شده با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA کمترین میزان رشد نسبی کالوس (۰/۴۹) را با توجه به جدول ۵ برای مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA داشتند. باززایی غیرمستقیم در تیمار برگ لپه‌ای در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۲ میلی گرم بر لیتر NAA کمترین میزان (۲۶/۶۷) و در تیمار ریز نمونه برگ در ترکیب محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و (۰/۱، ۰/۰۴، ۰/۰۵) میلی گرم بر لیتر NAA، تیمار ریز نمونه برگ در ترکیب با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۲ میلی گرم بر لیتر NAA، ریز نمونه برگ لپه‌ای و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر NAA و ریز نمونه برگ لپه‌ای و ۰/۶ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA بیشترین میزان (۱۰۰ درصد) را داشتند. تیمار ریز نمونه برگ لپه‌ای در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA دارای کمترین درصد کالوس‌زایی و رشد نسبی کالوس بودند. همچنین، باتوجه به نتایج این مقایسه میانگین غلظت‌های ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر NAA در هر دو ریز نمونه برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی مناسب‌تر بودند. باززایی غیرمستقیم و کالوس‌زایی ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی کاهو در شکل ۱، نشان داده شده است. همچنین، شکل ۲، گیاهچه‌های تولید شده در انتهای آزمایش را که جهت سازگاری با محیط به گلدان منتقل شده‌اند، نشان می‌دهد.



شکل ۱. الف) باززایی غیرمستقیم و ب) کالوس‌زایی در ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی.

Figure 1. A) Indirect regeneration and B) callus induction in cotyledon and true leaves explants.

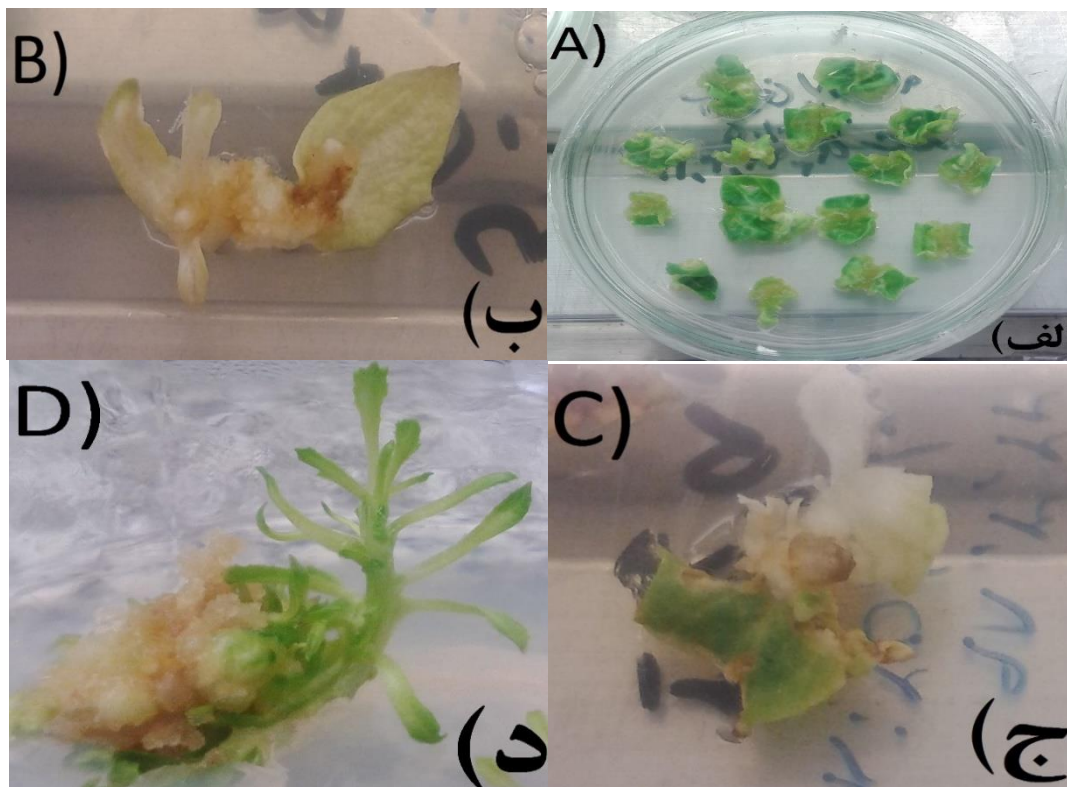


شکل ۲. انتقال گیاهچه‌های باززا در شرایط کنترل شده به گلدان کوچک (شکل الف) و سپس به گلدان (شکل ب) جهت سازگاری با محیط.

Figure 2. Seedlings transmission to glass (A) and then to pot (B) under controlled condition for environmental adaptivity.

باتوجه به نتایج آزمایش کشت بافت از غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA در محیط‌های هم‌کشتی و انتخابی جهت انتقال ژن استفاده گردید. بعد از دو روز هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها به محیط انتخابی منتقل و بعد از حدود دو هفته کالوس‌ها تشکیل شدند (شکل ۳. الف). البته در این مرحله، غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط انتخابی جلوی رشد بیشتر کالوس‌ها و تشکیل نوساقه‌ها را گرفت. کالوس‌های مقاوم بعد از دو هفته باززا شدند و تعدادی

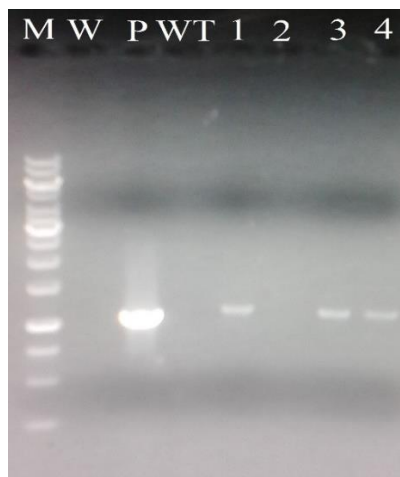
از آن‌ها در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و سفوتاکسیم به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفید شدند که نشان از غیر تراریخت بودن آن‌ها بود (شکل ۳. ب و ج) و گیاهان تراریخت سبز تولید شده در این محیط شناسایی و به‌منظور تأیید نهایی آزمون PCR روی آن‌ها انجام گرفت (شکل ۳. د). گیاهان تراریخت تولید شده با استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن مقاومت به کانامایسین در پلاسمید بیانی pBI121 تأیید شدند (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۳. مراحل تراریختی کاهو. الف) کالوس‌های تولید شده از ریز نمونه‌های تراریخت، ب) و ج)

گیاهچه‌های سفید تولید شده غیر تراریخت و د) گیاهچه تراریخت کاهو.

**Figure 3. Transgenic stages of lettuce. A) Produced callus from transgenic explants, B) and C) non-transgenic produced white seedlings, and D) transgenic lettuce seedling.**

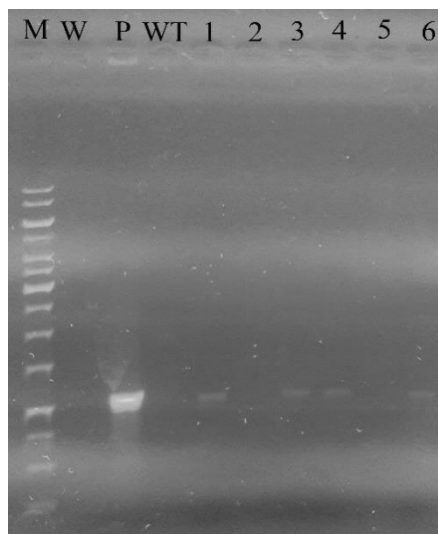


شکل ۴. تأیید حضور سازه موردنظر با استفاده از PCR در ریز نمونه‌های لپه. M (لدر یا سایز مارکر یک کیلوبازی)، W (کنترل منفی، PCR بدون DNA الگو)، P (محصول PCR پلاسمید pBI121+GME)، WT (گیاهان شاهد غیر تراریخت)، ۱، ۳ و ۴ (نمونه‌های تراریخت از ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای) و ۲ (نمونه غیر تراریخت از ریز نمونه برگ لپه‌ای).

**Figure 4. Confirmation of presence of transgene by PCR in cotyledon explants. DNA size marker (lane M), negative control (lane W), plasmid PCR product (lane P), non-transgenic control plants (lane WT), transgenic samples from cotyledon explants (lanes 1, 3, and 4), and non-transgenic samples from cotyledon explants (lane 2).**

طرح آزمایشی انتقال ژن به صورت فاکتوریل با استفاده از دو زمان تلقیح دو و هشت دقیقه و دو نوع ریز نمونه اعمال شد. نتایج آنالیز PCR نشان داد هیچ یک از ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای و برگ‌های حقیقی در مدت زمان تلقیح هشت دقیقه تراریخت نشده‌اند، بنابراین برای مقایسه بین دو نوع ریز نمونه از آنالیز t-test استفاده شد (جدول ۶).

بین دو ریز نمونه از نظر تراریختی اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد وجود داشت و ریز نمونه‌های برگ‌های حقیقی درصد تراریختگی (۱۸ درصد) بیشتری نسبت به برگ‌های لپه‌ای (۱۵/۵ درصد) داشتند (جدول ۶). تحقیقات متعدد دیگری در خصوص کالوس‌زایی و باززایی در کاهو منتشر شده است. در پژوهشی برای بهینه‌سازی سیستم کشت بافت کاهو، بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA برای کالوس‌زایی و جنین‌زایی به ترتیب ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد (Honari et al. 2009). آن‌ها همچنین غلظت‌های ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر BA را برای باززایی مناسب دانستند. نتایج تحقیقات آن‌ها، محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA را برای ریشه‌زایی مناسب نشان داد.



شکل ۵. تأیید حضور سازه موردنظر با استفاده از PCR در ریز نمونه‌های برگ‌های حقیقی. M (لدر یا سایز مارکر یک کیلوبازی)، W (کنترل منفی، PCR بدون DNA الگو)، P (محصول PCR پلاسمید (pBI121+GME)، گیاهان شاهد غیر تراریخت)، ۱، ۳، ۴ و ۶ (نمونه‌های تراریخت از ریز نمونه برگ‌های حقیقی) و ۲ و ۵ (نمونه‌های غیر تراریخت از ریز نمونه برگ‌های حقیقی)

**Figure 5. Confirmation of presence of transgene by PCR in true leaves explants. DNA size marker (lane M), negative control (lane W), plasmid PCR product (lane P), non-transgenic control plants (lane WT), transgenic samples from true leaves explants (lanes 1, 3, 4, and 6), and non-transgenic samples from true leaves explants (lane 2 and 5)**

#### جدول ۶. نتایج آنالیز T-test

**Table 6. Results of T-test analysis**

صفت مورد مطالعه Studied traits	میانگین ریز نمونه برگ‌های حقیقی Mean true leaves explant	میانگین ریز نمونه برگ لپه‌ای Mean cotyledon explant	t	P
درصد تراریختی % Transformation	18	15.5	4.33*	0.04

\* معنی‌دار در سطح ۵٪

\*: Significant at 5% probability levels

در صورتی که نتایج تحقیق حاضر در خصوص صفت ریشه‌زایی نشان داد که این صفت در محیط MS بدون تنظیم کننده رشد حاصل شد. در پژوهش دیگری، بالاترین فراوانی القا کالوس در محیط کشت MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک میلی‌گرم بر لیتر BA برای لپه‌های سه روزه و ژنوتیپ یزد و کمترین میزان القا کالوس در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم



بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA برای لپه‌های سه روزه و ژنوتیپ اهواز به دست آمد. آن‌ها همچنین بالاترین میزان باززایی مستقیم را در غلظت‌های پایین BA و محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آوردند (Mohebodini et al. 2011b). نتایج این پژوهش نشان دهنده وابستگی القاء کالوس به ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد و سن ریز نمونه‌ها بود. در پژوهشی دیگر، محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA با دو غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیش‌ترین باززایی مستقیم را نشان دادند. علاوه بر این، نتایج نشان دادند که تشکیل کم کالوس و افزایش ساقه‌زایی مستقیم از ریز نمونه‌های کاهو در غلظت‌های پایین NAA و BAP حاصل شد. همچنین باززایی مستقیم در کاهو بسیار وابسته به ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بود (Latif et al. 2014). نتایج پژوهش حاضر با این پژوهش از نظر غلظت‌های مناسب جهت باززایی البته از نوع غیرمستقیم مطابق بود. در مطالعه دیگری، بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد برای باززایی مستقیم ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر BA معین شد و در محیط‌های کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر BA بیشترین کالوس‌زایی را به دست آوردند از طرفی ریز نمونه‌های لپه نیز بهتر از برگ‌های حقیقی کاهو برای باززایی مستقیم مشخص شدند (Gómez-Montes et al. 2015). باتوجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های فوق‌الذکر می‌توان گفت که صفات مورد مطالعه در کشت بافت از جمله کالوس‌زایی و باززایی تحت تأثیر نوع ژنوتیپ یا رقم و ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار دارند و نتایج یک پژوهش را نمی‌توان به سایر پژوهش‌های مربوط به کشت بافت کاهو از نظر صفات مذکور برای ژنوتیپ‌ها یا ارقام جدید تعمیم داد یعنی بهتر است که برای هر ژنوتیپ یا رقم جدیدی از هر گیاه بهینه‌سازی کشت بافت آن صورت گیرد تا بهترین ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی و بهترین نوع ریز نمونه در ارتباط با آن رقم یا ژنوتیپ به دست آید و برای پژوهش‌های بعدی از جمله انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهش حاضر بین دو نوع ریز نمونه از لحاظ صفات کالوس‌زایی و باززایی تفاوتی مشاهده نشد حال آن‌که در سایر پژوهش‌ها همان‌طور که ذکر شد یکی از آن‌ها بهتر از دیگری شناخته شده بودند این مسئله را نیز می‌توان به نوع رقم یا ژنوتیپ متفاوت مورد استفاده در پژوهش نسبت داد که باعث ایجاد تفاوت در نتایج حاصل شده است. چنانچه در نتایج نیز ذکر شد هیچ یک از ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی استفاده شده در این پژوهش منجر به باززایی مستقیم نشدند حال آن‌که در سایر پژوهش‌ها همین ترکیبات باززایی مستقیم را برای کشت بافت کاهو در پی داشتند در این خصوص هم نمی‌توان دلیلی به جز تغییر نوع رقم مورد استفاده در این پژوهش در نظر گرفت.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز درج ژن را در گیاهان تراریخت تأیید کرد. علی‌رغم این که هدف این پژوهش تنها انتقال ژن GME توسط آگروباکتریوم به گیاه کاهو بود انتظار می‌رود که بعد از انتقال این ژن به کاهو کیفیت آن بهبود یافته و به تنش‌های غیر زیستی مقاوم شود. نتایج پژوهش مشابهی نشان داد که بیان ژن GMP جداسازی شده از آرآبیدوپسیس در گیاهان تراریخته کاهو افزایش یافته بود (Wang et al. 2011). همچنین این مطالعه نشان داد که افزایش بیان ژن GMP یک روش

تأثیرگذار برای افزایش محتوای ویتامین ث در کاهو بود. نتایج پژوهشی نشان داد که محتوای آسکوربیک اسید در لاین‌های تراریخته حاوی ژن GGT تقریباً سه برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود (Zhou et al. 2012). در پژوهشی مدت زمان تلقیح دو دقیقه برای تراریختی مناسب معرفی شد (Fallah-Ziarani et al. 2013). در پژوهش حاضر نیز این نتیجه تأیید شد. همچنین در این پژوهش غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط کشت انتخابی بهینه شده بود و غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر برای گیاه کاهو مناسب تشخیص داده شد، در پژوهش حاضر نیز غلظت‌های بالا مانع از تشکیل نوساقه‌های جدید و باززایی غیرمستقیم بود این مورد می‌تواند به دلیل ناخالصی‌های موجود در آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در پژوهش باشد بنابراین هر چه غلظت بالاتر رود جلو رشد و توسعه گیاه گرفته می‌شود. در پژوهشی دیگر، به منظور انتقال ژن سویه آگروباکتریوم LBA4404، مدت زمان تلقیح دو دقیقه و همچنین جوانه‌های برگ‌ها و لپه‌های سه روزه جهت انتقال ژن مناسب‌تر بودند (Honari et al. 2013). در پژوهش حاضر نیز مدت زمان تلقیح دو دقیقه مناسب‌تر بود اما برگ‌های حقیقی (یکماهه) جهت انتقال ژن مناسب‌تر بودند این نتیجه متفاوت در خصوص نوع ریز نمونه مناسب جهت تراریختی می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع رقم مورد استفاده در این پژوهش‌ها باشد. در پژوهشی، یک قطعه cDNA که پروتئین GME را کد می‌کند از یونجه (*Medicago sativa L.*) جداسازی و به آراییدوپسیس منتقل شد. نتایج نشان داد که GME می‌تواند به طور مؤثر، مقاومت آراییدوپسیس تراریخته را نسبت به اسیدیت، شوری و خشکی به‌وسیله انباشت آسکوربات افزایش دهد (Ma et al. 2014). در مطالعه دیگری، سویه آگروباکتریوم C58، مدت زمان تلقیح پنج دقیقه و ریز نمونه‌های گره و میان‌گره در رقم Grand Rapids جهت تراریختی مناسب بودند (Ismail et al. 2017). در خصوص نتایج حاصل از پژوهش می‌توان چنین عنوان کرد که نوع رقم یا ژنوتیپ مورد استفاده در پژوهش و حتی نوع ریز نمونه می‌تواند در فرآیند تراریختی مؤثر باشد. در پژوهش‌های مشابه جهت انتقال ژن همان طور که ذکر شد مدت زمان‌های تلقیح متفاوتی از جمله دو، پنج و ده دقیقه جهت انتقال ژن به کاهو مناسب شناخته شده‌اند که ممکن است این مورد به نوع رقم یا ژنوتیپ، سویه آگروباکتریوم و نوع ریز نمونه مورد استفاده در پژوهش بستگی داشته باشد.

**نتیجه‌گیری:** در این پژوهش غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر از تنظیم کننده رشد BAP و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA جهت کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم مناسب تشخیص داده شدند. بنابراین این دو غلظت از تنظیم کننده‌های رشد در محیط‌های انتخابی جهت انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین حضور سازه موردنظر (T-DNA+GME) در گیاهان تراریخته توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن مقاومت به کانامایسین تأیید شد.

## منابع

- اکبری لیلا؛ چقامیرزا کیانوش؛ فرشادفر عزت اله (۱۳۹۵) بررسی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط درون شیشه‌ای. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۹، ۲۸۵-۲۷۳.
- محب‌الدینی مهدی؛ جلالی جواران مختار؛ علیزاده هوشنگ؛ مهبودی فریدون؛ خسروی حسین (۱۳۸۹) بهینه‌سازی روش کشت بافت و سیستم انتقال ژن در گیاه کاهو (*Lactuca sativa L.*). نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۴، ۱۹۵-۲۰۲.
- نجار خدابخش آزاده؛ چاپارزاده نادر (۱۳۹۴) نقش آسکوربیک اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی. مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۸، ۱۷۵-۱۸۵.
- هنری حسین؛ علیزاده هوشنگ؛ شاه نجات بوشهری علی اکبر؛ پیغمبری سید علی؛ جلالی جواران مختار؛ براهمیپور روح اله (۱۳۹۱) عوامل موثر در انتقال ژن گزارشگر uidA با استفاده از آگروباکتری به گیاه کاهو (*Lactuca sativa L.*). مجله علوم باغبانی ایران ۴۳، ۹۱-۱۰۱.
- هنری حسین؛ علیزاده هوشنگ؛ شاه نجات بوشهری علی اکبر؛ پیغمبری سید علی؛ جلالی جواران مختار (۱۳۸۷) باززایی درون شیشه‌ای ارقام کاهوی (*Lactuca sativa L.*) ایرانی. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۳۹، ۱۷۳-۱۸۰.

## References

- Akbari L, Cheghamirza K, Farshadfar E (2016) In vitro evaluation of drought tolerance in durum wheat genotypes (*Triticum durum L.*). J of Plant Res (Iranian J of Biol) 29, 273-285 (In Persian).
- Armas I, Pogrebnyak N, Raskin I (2017) A rapid and efficient in vitro regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa L.*). Plant Meth 13, 58-66.
- Bulley SM, Laing W (2016) Ascorbic Acid-Related Genes. In: The Kiwifruit Genome. Testolin R, Huang HW, Ferguson AR (eds). Springer, Switzerland pp, 163-177.
- Darqui FS, Radonic LM, López N et al. (2018) Simplified methodology for large scale isolation of homozygous transgenic lines of lettuce. Elect J of Biotechnol 31, 1-9.

- Fallah-Ziarani M, Haddad R, Garoosi Gh, Jalali M (2013) Agrobacterium-mediated transformation of cotyledonary leaf of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the GCHI gene. *Iranian J Gen Plant Breed* 2, 47-55.
- Gómez-Montes EO, Oliver-Salvador C, Durán-Figueroa N et al. (2015) Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (*Lactuca sativa* L.) by surface response methodology. *Plant Growth Regul* 77, 327-334.
- Honari H, Alizade H, Shah Nejat Booshehri AA et al. (2009) In vitro regeneration of Iranian varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Iranian J Field Crop Sci* 39, 173-180 (In Persian).
- Honari H, Alizade H, Shah Nejat Booshehri AA et al. (2013) Factors affecting agrobacterium-mediated transformation of uida gene into lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Iranian J Hort Sci* 43, 91-101 (In Persian).
- Ismail H, Dilshad E, Waheed MT, Mirza B (2017) Transformation of lettuce with rol ABC genes: Extracts show enhanced antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, antidepressant, and anticoagulant activities in rats. *Appl Biochem and Biotechnol* 181, 1179-1198.
- Ismail H, Mirza B (2015) Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, anti-depressant and anti-coagulant properties of *Lactuca sativa* (CV. Grand Rapids) plant tissues and cell suspension in rats. *BMC Comp and Altern Med* 15, 199-205.
- Latif B, Jalali Javaran M, Alizadeh H et al. (2014) Interactions of genotype and plant growth regulators affecting direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Int J Biosci* 5, 315-322.
- Ma L, Wang Y, Liu W, Liu Zh (2014) Overexpression of an alfalfa GDP-mannose 3, 5-epimerase gene enhances acid, drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* by increasing ascorbate accumulation. *Biotechnol Lett* 36, 2331-2341.
- Mohebodini M, Jalali Javaran M, Alizadeh H et al. (2011a) Optimization of tissue culture and gene transfer in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Hort Sci* 24, 195-202 (In Persian).
- Mohebodini M, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Alizadeh H (2011b) Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Aust J Crop Sci* 5, 92-95.

- Mohebodini M, Jalali-Javaran M, Alizadeh H et al. (2014) Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to express IgG-binding protein A and human pro-insulin as a fusion protein. *J Hort Sci Biotechnol* 89, 719-725.
- Najjar-Khodabakhsh A, Chaparzadeh N (2015) The role of ascorbic acid in reduction of oxidative effects of salinity on *Lepidium sativum* L. *J Plant Res* 28, 175-185 (In Persian).
- Song D, Xiong X, Tu WF et al. (2017) Transfer and expression of the rabbit defensin NP-1 gene in lettuce (*Lactuca sativa*). *Gen Mol Res* 16, 1-9.
- Wang WP, Guo XB, Tang KX (2011) Transformation of GDP-mannose pyrophosphorylase gene from *Arabidopsis thaliana* L. into *Lactuca sativa* L. *J Shanghai Jiaotong Uni* 29, 43-49.
- Zakari SM, Zebarjadi A (2017) Isolation and characterization of GDP-D-mannose 3, 5-epimerase (GME) gene impressive in vitamin C biosynthesis pathway. *J of Appl Biotechnol Reps* 4, 687-693.
- Zhang Ch, Liu J, Zhang Y et al. (2011) Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reps* 30, 389-398.
- Zhou Y, Tao QC, Wang ZN et al. (2012) Engineering ascorbic acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis* leaves by single and double gene transformation. *Biolog Planta* 56, 451-457.

