یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۱، صفحات ۷۶الی ۸۴ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Nova Biologica Reperta 7(1): 76-84 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.1.76

بهینه سازی انتقال ژن به گیاه گوجه فرنگی و بررسی امکان بیان ژن مقاومت به شوری (SOS3)

الهام محجل کاظمی[۱]، مقصود پژوهنده[۲]، پریسا جنوبی[۳]، مینا کاظمیان[۱]

[۱]گروه علوم گیاهی دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛ [۲]گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران؛[۳]گروه زیست شناسی گیاهی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: الهام محجل کاظمی؛ e.mohajelkazemi@tabrizu.ac.ir

چکیده. یکی از روش‌هایی که از طریق آن می‌توان مقاومت به شوری در گیاه را بهبود بخشید بیان بیشینه ژن‌هایی است که به وسیله تنش شوری القا می‌شوند و در برقراری تعادل یونی و اسمزی در گیاه نقش ایفا می‌کنند. ژن SOS3 یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر SOS است، بنابراین افزایش بیان این ژن می‌تواند قدم مهمی در تولید گیاهان مقاوم به شوری باشد. در این پژوهش رقم‌های متفاوت گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) به واسطه آگروباکتریوم دارای پلاسمید حاوی ژن SOS3 تراریخت شد که بیشترین درصد تراریختی مربوط به برگ لپه‌ای رقم Falat CH بود. استفاده همزمان لپه‌ها و هیپوکوتیل در محیط کشت در هنگام آغشتگی بهترین نتیجه را حاصل کرد. علاوه بر این بهترین زمان برای همکشتی، یک روز بعد از تلقیح مشخص گردید و همچنین بهترین سویه آگروباکتریوم جهت تراریختی، سویه GV3101 تشخیص داده شد که می‌توان این امر را به دلیل اثر متقابل نژاد آگروباکتریوم و رقم گوجه‌فرنگی دانست. استفاده از آهن سکسترون در محیط کشت گیاهان تراریخت به طور مشخص باعث سبزی گیاهان و تسریع در رشد آن‌ها گردید. در نهایت با توجه به نتایج مولکولی، حضور ژن SOS3 در گیاهان تراریخت به وسیله PCR و RT-PCR تایید شد که نشانگر حضور و بیان ژن مذکور در این گیاهان است.

واژه‌های کلیدی. آگروباکتریوم، باززایی، تراریخت، لپه، هیپوکوتیل

The optimization of gene transfer to tomato and the study of expression possibility of salt-tolerance gene (SOS3)

Elham Mohajel Kazemi[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2], Parisa Jonoubi[3], Mina Kazemian[1]

[1]Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Iran; [2]Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran; [3]Department of Plant Biology, Faculty of Biology Sciences, University of Kharazmi, Iran

Correspondent author: Elham Mohajel Kazemi; e.mohajelkazemi@tabrizu.ac.ir

Abstract. One of the main strategies to improve plant tolerance is the expression of stress-induced genes, which play a significant role in the ionic balance of plants. SOS3 is one of the important components of SOS-regulated ionic homeostasis pathway. Therefore, the expression of this gene could be an important step towards producing salt-resistant plants. In this work, we have transformed tomato (*Solanum lycopersicum*) by Agrobacterium (GV3101 and LBA4404) containing plasmids with SOS3 genes. The maximum regeneration rate was determined in cotyledons of CH genotype. The simultaneous use of cotyledons and hypocotyls in the culture medium had the best outcome. In addition, the best time was found to be one day after inoculation. Also, the best transgenic variety was detected for Agrobacterium GV3101, which can be attributed to the interaction between the genus Agrobacterium and the tomato variety. Transgenic plants were transferred to a culture medium containing sequestrene, which caused the acceleration of the seedling growth in particular. The presence of the SOS3 in the transgenic plants was verified by PCR and RT-PCR methods.

Keywords. agrobacterium, cotyledon, hypocotyl, regeneration, transgene

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰/اصلاح: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱/پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۴/انتشار: ۱۳۹۹/۰۱/۱۶ Received 21.11.2018/ Revised 01.02.2019/ Accepted 04.01.2019/ Published 04.04.2020

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)، از جمله گیاهان گل‌دار دو لپه‌ای و متعلق به تیره بادنجانیان (Solanaceae) است که واریته‌های بسیاری از این گیاه جهت استفاده از میوه آن کشت می‌شوند (Wei et al., 2017). گوجه‌فرنگی هم‌چنین دارای یکی از قوی‌ترین انواع طبیعی، و چند نوع از خانواده کاروتنوئیدها از جمله بتاکاروتن است که بر ارزش این گیاه می‌افزاید (Sarwarkhan et al., 2006). در کشور ایران بنابر دارا بودن اقلیم‌های مختلف در تمام فصول، محصول گوجه‌فرنگی در فصل کشت و خارج از فصل کشت به بازار عرضه می‌گردد. استان‌های فارس، خراسان، خوزستان، هرمزگان و آذربایجان شرقی، بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گوجه‌فرنگی در کشور به شمار می‌روند (Ahmadi et al., 2016). تشکیل میوه در گوجه‌فرنگی تابع چندین عامل محیطی از جمله مواد غذایی، درجه حرارت و طول مدت روز است که بر یکدیگر تاثیر متقابل دارند (Fei et al., 2006).

تولید محصولات زراعی در جهان تحت تاثیر شرایط محیطی از جمله تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرد (Afroz et al., 2010). از بین این تنش‌ها، تنش‌های غیر زیستی نظیر شوری، خشکی و سمیت فلزی از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Sreenivasulu et al., 2007). در مناطق خشک و نیمه خشک که تقریبا یک سوم زمین‌های دنیا را به خود اختصاص داده‌اند شوری بزرگترین معضل زمین‌های زراعی است (Archibold, 1995). به‌نظر می‌رسد که مقاومت به تنش‌های محیطی مانند خشکی، دمای کم یا زیاد، شوری و عناصر سنگین توسط چندین ژن کنترل شوند (صفات پلی‌ژنی) (Deinlein et al., 2014). تحمل تنش یا حساسیت به تنش شوری در یک ژنوتیپ گیاهی به برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آن نیز بستگی دارد (Asch et al., 2000). ژن‌های مقاوم به شوری از لحاظ عملکردی به چند دسته تقسیم می‌شوند: ژن‌هایی که در متابولیسم کربن، تولید انرژی و فتوسنتز نقش دارند (Palavalasa et al., 2017)، ژن‌های مسئول سنتز ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و غشا سلولی، ژن‌های ناقل‌های یونی، ژن‌های دخیل در برابر تنش اکسیداتیو؛ ژن‌های کدکننده کانال آبی، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های سم‌زدا، ژن‌های مربوط به پروتئینازها، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در پیام رسانی سلولی و ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی(Deinlein et al., 2014).گیاهان شورزی عمدتا از سدیم و کلر به‌منظور تنظیم اسمزی در واکوئل خصوصا در غلظت نمک بالاتر از ۲۰۰ میلی-مولار استفاده می‌کنند (Huazhong et al., 2000). این گیاهان توانایی انتقال سدیم را در عرض سیتوپلاسم تا رسیدن به واکوئل در مقدار مناسب برای حفظ تنظیم اسمزی سلول‌های در حال رشد و تقسیم دارا هستند، بدون اینکه تجمع نمک در سیتوپلاسم به حد سمیت برسد. حذف سدیم از سیتوپلاسم یا انتقال به واکوئل از طریق آنتی‌پورت Na^+/H^+ صورت می‌گیرد که در مسیر SOS قرار دارد (Palavalasa et al., 2017). مسیر SOS از سه ترکیب کلیدی تشکیل می‌شود: SOS3 که به عنوان حسگر Ca^{2+} عمل می‌کند، SOS2 که یک سرین/ترئونین پروتئین کیناز است و SOS1 که آنتی‌پورتر Na^+/H^+ است (Shi et al., 2000). در سال‌های اخیر مشخص شده که افزایش بیان ژن AtSOS1 در گیاه توتون نیز سبب افزایش تحمل تنش شوری گردیده است (Yue et al., 2012). ژن SOS2، علاوه بر فعالیت کینازی، فعالیت اتوفسفریلازی دارد که در مقاومت به شوری نقش ایفا می‌کند. همانند SOS1، رونویسی از SOS2 در اثر تیمار شوری افزایش می‌یابد (Gong et al., 2002).

با توجه به اهمیت زراعی گوجه فرنگی و حساسیت این گیاه زراعی نسبت به بیشتر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نیاز به استفاده از روش‌های نوین در اصلاح این گیاه بیش از پیش احساس می‌شود. به‌این‌منظور علاوه بر روش‌های سنتی اصلاح نباتات، امروزه شناسایی ژن‌های مقاومت به تنش و انتقال آن به گیاهان روشی جدید برای ایجاد گیاهان مقاوم به تنش است. در این پژوهش انتخاب رقم‌های مناسب جهت انتقال ژن و در نهایت بهینه‌سازی انتقال ژن SOS3 به رقم‌های انتخابی به عنوان یکی از اجزای اصلی مسیر SOS به این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

در این بررسی بذرهای شش رقم گوجه‌فرنگی با نام‌های CaljN3, Falat CH, Falat Vana, Super strain B از مرکز نهال و بذر کرج و ارقام محلی Laleh و Urmia از مرکز تحقیقات کشاورزی تبریز و ارومیه تهیه شدند. سپس بذرها به مدت دو دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، همچنین به مدت ۱۵ دقیقه در وایتکس ۱۰ درصد (حاوی یک میلی‌لیتر Tween ۲۰) استریل سطحی شدند. نخست بذرها در محیط کشت جوانه‌زنی قرار داده شدند تا گیاهچه استریل حاصل شود و سپس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، برگ لپه‌ای و برگ جوان به انواع محیط کشت باززایی، جهت انتخاب مناسب‌ترین محیط کشت و ریزنمونه انتقال یافتند (جدول ۲ و ۳). از محیط کشت انتخاب شده برای تاریختی دانه‌رست‌های ۱۴ روزه و ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و هیپوکوتیل استفاده شد.

انتقال ناقل pBin61-SOS3 به گیاه گوجه‌فرنگی

در این پژوهش وکتور بیانی pBin61-SOS3 (Sharghi et al., 2015) مورد استفاده قرار گرفت. این ناقل دارای دو ژن مربوط به مقاومت کانامایسین است که انتخاب گیاه و باکتری واجد پلاسمید را فراهم می‌کند. در این ناقل ژن SOS3 در بین پروموتر و ترمیناتور CaMV35S قرار گرفته است. در ادامه از باکتری‌های *Escherichia coli* سویه TOP10 و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌های LBA4404 و GV3101 استفاده گردید و کشت آن‌ها در محیط کشت آگار LB انجام گرفت. تراریزش باکتری به روش الکتروپوراسیون با استفاده از دستگاه مولتی‌پوراتور(Eppendorf، آلمان) با ولتاژ ۲۵۰۰ میلی‌ولت و در زمان پنج میلی‌ثانیه، گزینش کلونی‌های تراریخت شده دارای وکتور حاوی ژن SOS3 و استخراج پلاسمید مطابق روش Birnboim و Doly در سال ۱۹۷۹ صورت گرفت. دو روز قبل از تلقیح ریزنمونه‌ها، تک کلونی‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در ۳ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین تلقیح شده و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری‌ها به ۲۵ میلی لیتر از محیط LB مایع حاوی همان آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافته و به مدت یک شب در شرایط قبلی رشد داده شدند (جدول ۱). در مرحله بعد کشت‌های آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و رسوب سلول‌های باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت مایع دوباره حل شد. در نهایت از غلظت‌های باکتری با OD برابر با ۰/۴-۰/۵ برای تراریختی گیاهان گوجه فرنگی استفاده شد. بعد از دو روز پیش‌کشت، تلقیح ریزنمونه‌ها توسط افزودن ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اگروباکتریوم به محیط کشت همزمان (حاوی ریزنمونه‌ها) و قرار دادن آن‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سپس سوسپانسیون اگروباکتریوم اضافی توسط سمپلر جمع‌آوری شد. در انتها پتری‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت سه روز قرار داده شدند. جهت انتخاب گیاهان تراریخت گوجه‌فرنگی، ریزنمونه‌های خشک شده به محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک گزینش‌گر(کانامایسین) و سفوتاکسیم منتقل شدند و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، شرایط دوره نوری ۱۶:۸ به مدت دو ماه قرار داده شدند. بعد از دو ماه ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس کرده و سپس باززا شدند به محیط‌کشت رشد گیاهچه بدون آنتی بیوتیک منتقل گردیدند تا رشد گیاه رخ دهد. درواقع ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای از گیاه‌چه‌های چهارده روزه تهیه و از قطعات نیم تا یک سانتی‌متری ریزنمونه‌های مذکور، جهت تلقیح با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pBIN61-SOS3 استفاده گردید. گیاهان بعد از یک ساعت هم-کشتی در محیط MS مایع با سلول‌های اگروباکتریوم و دو روز قرارگیری در محیط هم‌کشتی جامد، برای باززایی به محیط کشت MS + ۰/۱ میلی‌لیتر بر لیتر IAA + ۲ میلی‌لیتر بر لیتر Zeatin همراه با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و کانامایسین برای حذف اگروباکتریوم و انتخاب گیاهان تراریخت منتقل شدند. گیاهان گزینش شده جهت رشد به محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین منتقل شدند. پس از دو هفته رشد در محیط مذکور گیاهان رشد یافته به طول ۵-۳ سانتی‌متر به محیط ریشه‌زایی انتقال پیدا کردند (شکل۳ D). وقتی اندازه جوانه‌های باززا شده به ۲ سانتی‌متر رسید، در محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند و در همان شرایط نگهداری شدند. بعد از اینکه سیستم ریشه گیاهان به خوبی تشکیل شد (حدود ۳۰ روز بعد از انتقال به محیط ریشه‌زایی)، به گلدان منتقل و تحت شرایط گلخانه نگهداری شدند. جهت تایید وجود ژن در گیاهان انتخاب‌شده آنالیزهای مولکولی انجام گرفت.

آنالیز مولکولی

استخراج DNA از بافت گیاهی با روش CTAB و واکنش PCR با پرایمرهای SOS3 به منظور تایید تراریزش انجام گرفت و نتایج بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد (جدول ۴). همچنین از گیاهان رشد یافته که از نظر حضور ترانسژن در درون DNA ژنومی با PCR تایید شده بودند، استخراج RNA از بافت‌های تازه برگ‌های جوان با استفاده از روش مبتنی بر Trizol انجام شد. سپس به‌منظور حذف مولکول‌های DNA از RNA استخراج شده، تیمار DNase توسط کیت Qiagen انجام گرفت. برای سنتز cDNA از کیت Superscript III (ساخت شرکت Invitrogene) استفاده گردید. همچنین از ژن اکتین جهت نرمال سازی استفاده شد.

نتایج

تراریزش و انتخاب گیاهان تراریخت شده

بدون شک بهینه‌سازی سیستم کشت بافت ژنوتیپ‌هایی که مورد تراریزش قرار می‌گیرند، یکی از مهم‌ترین عوامل موفقیت در تراریزش گیاهان است. بنابراین جهت انتخاب بهترین محیط‌کشت سه نوع سیتوکینین شامل Kin, BAP و Zeatin مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که توان باززایی در گیاه گوجه‌فرنگی به شدت وابسته به رقم است، همچنین داده‌ها معنی داری اثر متقابل محیط کشت× رقم را برای این صفت نشان می‌دهد. در محیط کشت M1 که فاقد هورمون است، ریزنمونه‌ها کلروزه شده و از بین رفته و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

جدول ۱- غلظت آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این تحقیق.

Table 1. The antibiotics used in this study.

نام ماده Material	محلول ذخیره Stock concentration ($mg.ml^{-1}$)	اگروباکتریوم Final concentration for Agrobactrium ($mg.\ l^{-1}$)	باکتری *E.coli* Final Concentration for *E.coli* ($mg\ l^{-1}$)	گیاه Final concentration for seedling ($mg.\ l^{-1}$)
کانامایسین Kanamycin	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
ریفامایسین Rifamycin	۱۰۰	۱۰۰	-	-
سفوتاکسیم Cefotaxime	۲۵۰	-	-	۲۵۰

جدول ۲- محیط کشت‌های بهینه جهت تراریختی گوجه‌فرنگی.

Table 2. Optimum media for the transformation of *Solanum lycopersicum*.

نوع محیط کشت	ترکیب محیط کشت
جوانه‌زنی بذر	محیط کشت MS+ ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ویتامین + ۸ گرم بر لیتر آگار
کشت همزمان	محیط کشت MS + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Zeatin +۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ویتامین + ۸ گرم بر لیتر آگار
انتخابی	محیط کشت MS + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA + ۲ میلی‌گرم بر لیتر Zeatin و۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم و کانامایسین+ ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ویتامین + ۸ گرم بر لیتر آگار
محیط ریشه‌زایی	محیط کشت MS + کانامایسین و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA.

جدول ۳- غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی محیط کشت‌های مورد استفاده (mg/L).

Table 3. Plant growth regulators concentration (mg/L).

نام محیط (Media)	BA	Kin	Zeatin	IAA
M1	۰	۰	۰	۰
M2	۰	۱	۰	۰/۱
M3	۰	۱/۵	۰	۰/۱
M4	۰	۲	۰	۰/۱
M5	۱	۰	۰	۰/۱
M6	۱/۵	۰	۰	۰/۱
M7	۲	۰	۰	۰/۱
M8	۰	۰	۱	۰/۱
M9	۰	۰	۱/۵	۰/۱
M10	۰	۰	۲	۰/۱

جدول ۴- توالی آغازگرها.

Table 4. Primer sequences.

(Sequence)
Forward: 5'ATCCATGGTCTAGAGGATGGGCTGCTCTGTATCGAA 3'
Reverse: 5' ATGAATTCAGATCTTTAGGAAGATACGTTTTGCAA 3'

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

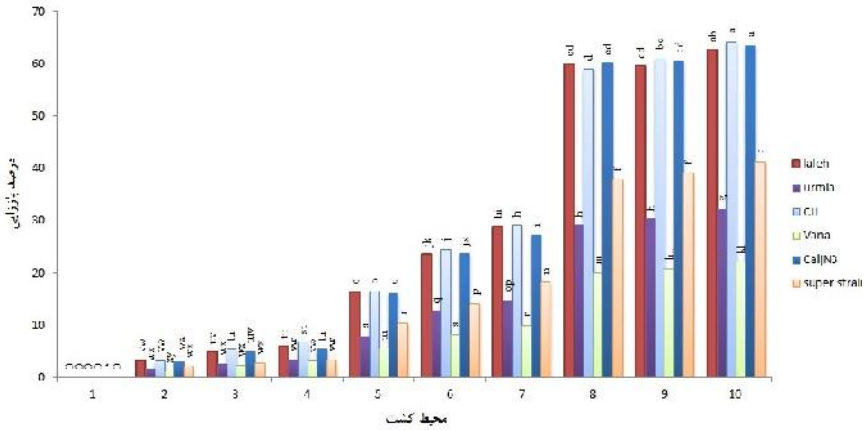
نمونه‌ها هیچ‌گونه باززایی نشان ندادند. همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود بیشترین میانگین درصد باززایی مربوط به ارقام CH، CaljN3 و رقم محلی لاله بود. بعلاوه این ارقام در تمام سطوح هورمون زاتین (محیط‌های M8, M9 و M10) پاسخ مطلوبی را از نظر میانگین باززایی داشتند. همچنین این ارقام نسبت به ارقام دیگر در محیط‌های کشت حاوی BAP (M5, M6 و M7) نیز باززایی قابل توجهی را نشان دادند. کمترین درصد باززایی مربوط به رقم وانا است. با اینکه کمترین درصد باززایی در ارقام وانا و ارومیه دیده شد، اما این ارقام نیز در محیط‌های کشت حاوی زاتین درصد باززایی بیشتری نسبت به محیط‌های کشت حاوی کینتین و BAP داشتند (شکل ۱). با توجه به شکل۲، بین ریزنمونه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر درصد باززایی وجود دارد. اثربخشی ریزنمونه به چند فاکتور ازجمله سن ریزنمونه، رقم و اندازه ریزنمونه وابسته است. با توجه به شکل ریزنمونه، برگ لپه‌ای در تمام رقم‌ها نتیجه بهتری داشته است. سه رقم CH، CaljN3 و لاله در ریزنمونه برگ لپه‌ای بیشترین درصد باززایی را نشان می‌دهند که وابستگی اثر ریزنمونه با رقم را به خوبی مشخص می‌کند. کمترین درصد باززایی در ریزنمونه برگ لپه‌ای مربوط به رقم وانا بود. ریزنمونه برگ در کلیه رقم‌ها نسبت به برگ لپه‌ای و هیپوکوتیل کمترین درصد باززایی را به خود اختصاص داد که به نظر می‌رسد این امر به دلیل تمایزیافتگی بیشتر برگ نسبت به دو ریزنمونه مذکور باشد. بنابراین در مطالعه حاضر بعد از بررسی رقم‌های مختلف و ریزنمونه‌های متفاوت، بیشترین باززایی مربوط به برگ لپه‌ای رقم Falat CH بود، درنتیجه این رقم برای مطالعات بعدی انتخاب شد. با توجه به نتایج بهترین زمان برای همکشتی، یک روز بعد از تلقیح مشخص گردید و همچنین بهترین سویه GV3101 تشخیص داده شد. همچنین مشخص شد که پس از ۱۵-۱۰ روز ریزنمونه‌هایی که ژن مورد نظر را دریافت نکرده بودند سفید شده و از بین رفتند، قطعات باقی مانده واکشت شده و مجددا در محیط ذکر شده قرار گرفتند. پس از ۳۰-۲۵ روز تشکیل شاخساره مشاهده شد (شکل ۳ C-A). در محیط انتخابی حاوی کانامایسین گیاهان تراریخت نشده به طور کامل سفید شدند اما گیاهان تراریخت احتمالی نیز رنگ متمایل به زرد پیدا کردند که احتمالا به دلیل اثرات منفی آنتی بیوتیک‌های استفاده شده در محیط بود. گیاهان تراریخت احتمالی به محیط دارای آهن سکسترون منتقل شدند که این امر به طور مشخص باعث سبزی گیاهان و تسریع در رشد آن‌ها شد (شکل ۴). به طور معمول پس از سپری شدن یک ماه علاوه بر اینکه سیستم ریشه‌ای گیاهان گسترش خوبی پیدا کرد اندازه گیاهان نیز افزایش یافته که جهت انجام آنالیزهای مولکولی مناسب بودند.

آنالیزهای مولکولی گیاهان تراریخت مقاوم به کانامایسین

جهت تایید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن SOS3 استفاده شد و نتیجه بر روی ژل آگاروز یک درصد در شکل ۵ نشان داده شده است.

بررسی بیان ژن در گیاه گوجه‌فرنگی با مطالعه حضور mRNA ژن SOS3 انجام شد. بعد از استخراج RNA از هر ۸ گیاه تراریخته و یک گیاه تیپ وحشی، سنجش کمی غلظت و نسبت OD_{260} /OD_{280} تعیین گردید و بهترین نسبت به دست آمده ۱/۹ بود که کیفیت RNA استخراج شده را نشان داد.

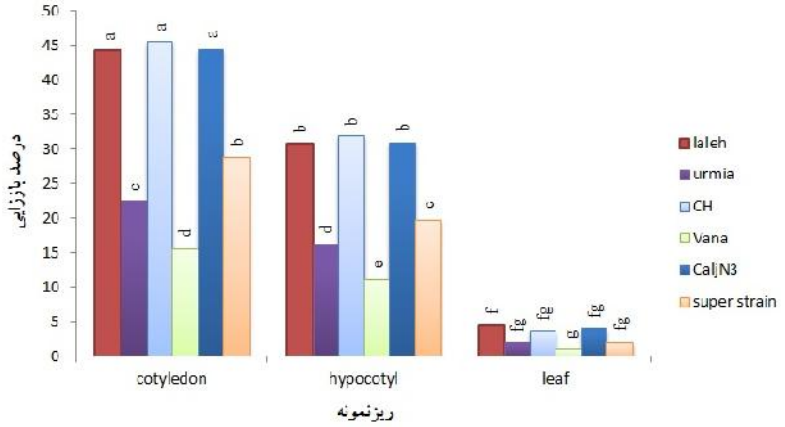
همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، استفاده از cDNA برای تمام نمونه‌ها در واکنش PCR باعث ایجاد باندهای ژن اکتین شده است. از آنجا که ژن house keeping باید در تمام نمونه‌ها به



شکل ۱- مقایسه میانگین محیط کشت×رقم.

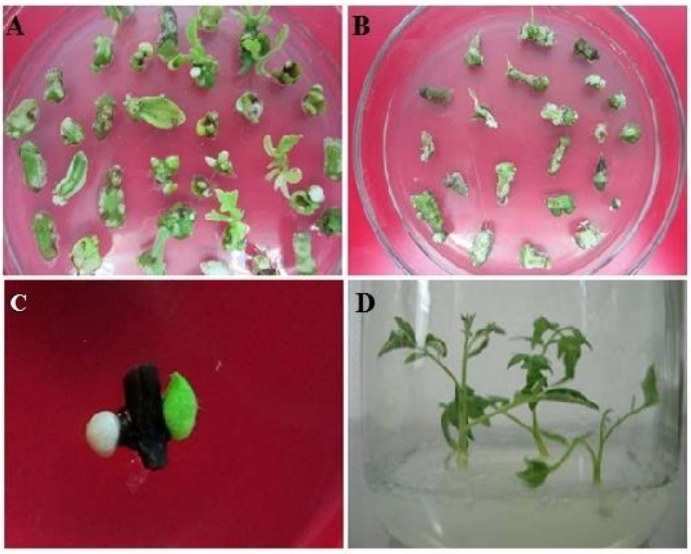
Fig. 1. Comparison of average scores of Media×varieties.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]



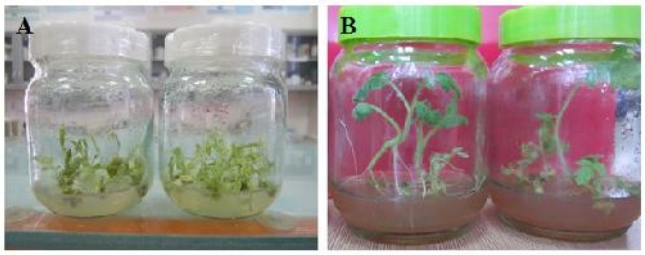
شکل ۲- مقایسه میانگین رقم× ریزنمونه.

Fig. 2. Comparison of average scores of varieties×explant.



شکل ۳- مراحل تشکیل گیاه تراریخت. **A**. باززایی بخش‌های تراریخت شده برگ لپه‌ای در محیط کشت انتخابی، **B**. باززایی بخش‌های تراریخت شده هیپوکوتیل در محیط کشت انتخابی، **C**. تشکیل کالوس از جوانه‌های بغل برگی که یک مورد آن تراریخت شده و یک مورد در محیط انتخابی سفید شده است، **D**. انتقال گیاهان تراریخت احتمالی به محیط ریشه زایی.

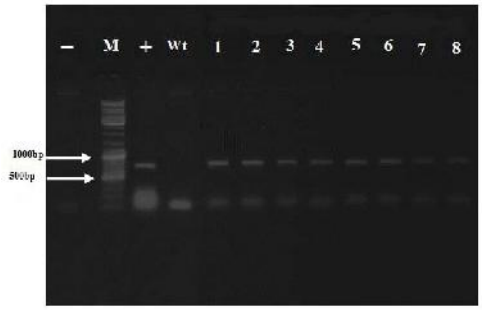
Fig. 3. Transgenic plant formation. **A.** regeneration of the transgenic parts of cotyledon in selective medium. **B.** regeneration of the transgenic parts of hypocotyl in selective medium. **C.** Callus formation from lateral buds which were shown in green and the other one in white in selective media. **D.** Transfer of transgenic plants to the rooting medium.



شکل ۴- اثرات آهن سکسترون در سبز شدن و افزایش رشد گیاهچه‌ها. **A**: محیط بدون آهن سکسترون، **B**: محیط دارای آهن سکسترون.

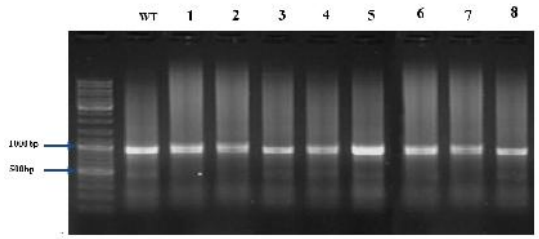
Fig. **4.** The effects of sequestrene on seedlings growth. **A.** Medium without sequestrene. **B.** Medium with sequestrene.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]



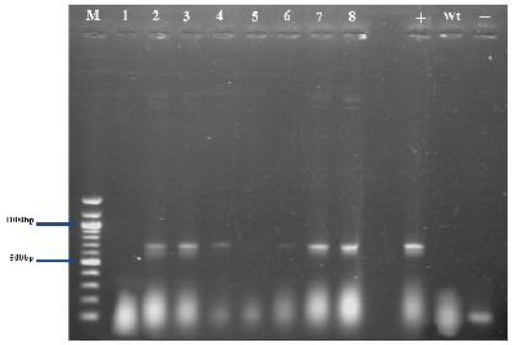
شکل ۵- محصول واکنش با جفت آغازگر SOS3 در هشت گیاه تراریخت. باند موجود در ستون‌های ۱-۸، ۶۶۹ جفت باز است. کنترل مثبت (+)، کنترل منفی (-) و Wt : گیاه غیر تراریخت یا شاهدکه باند موردنظر مشاهده نشد.

Fig. **5.** PCR product (669 bp) of 8 transgenic plants (1-8) with SOS3 primers on DNA. Positive control (+), Negative control (-) and Wt: wild type, without any products.



شکل ۶- محصول واکنش PCR توسط جفت آغازگرهای ژن اکتین بر روی cDNA های ساخته شده گیاهان گوجه‌فرنگی. WT گیاه شاهد و ۱-۸ گیاهان تراریخت.

Fig. **6.** PCR product (actin gene) on cDNA. Wt: control, 1-8: 8 transgenic plants.



شکل ۷- واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن SOS3 بر روی cDNA های سنتزشده گیاهان تراریخت (۸-۱). در نمونه‌های ۱ و ۵ RNA ژن SOS3 بیان نشده است. گیاه تیپ وحشی: (WT)، (-)کنترل منفی بدون cDNA ، کنترل مثبت + (ناقل pBIN61-SOS3) و M: مارکر.

Fig. **7.** PCR product of 8 transgenic plants (1-8) with SOS3 primers on cDNA. The gene has not been expressed in samples 1 and 5. Wt: wild type, Negative control: -, Positive control: +, M: marker.

میزان یکسانی بیان گردد، بنابراین باند حاصل از واکنش PCR روی cDNA آن هم باید به یک اندازه و یکدست باشند. بنابراین با اطمینان از cDNAهای سنتز شده از همین شرایط برای واکنش-های PCR بعدی با سایر پرایمرها استفاده گردید. سپس بررسی حضور mRNA های حاصل از رونویسی ژن SOS3 صورت گرفت. نتایج، حضور cDNA این ژن را در ژل مشخص می‌کند که این امر نشانگر بیان SOS3 و حضور mRNA در نمونه‌های گیاهی به جز نمونه ۱ و ۵ است، همچنین گیاهان غیر تراریخت نیز هیچ باندی را نشان ندادند (شکل ۷).

بحث

تنش شوری یکی از تنش‌های محیطی است که گیاهان با آن مواجهند (Palavalasa et al., 2017) و امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی رشد گیاهان را تحت تاثیر قرار می-دهد (Demir Kaya *et al*, 2006). تولید گیاهان مقاوم به شوری برای فراهم کردن نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از اهمیت بالایی برخوردار است (Wei et al., 2017). یک رویکرد مهم برای تولید گیاهان زراعی مقاوم به شوری انتقال ژن-های عامل مقاومت به شوری به گیاهان زراعی از طریق مهندسی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

ژنتیک است (Zhang & Blumwald, 2001). روش‌های مختلفی در ارتباط با تراریختی گوجه‌فرنگی توسط گروه‌های تحقیقاتی زیادی به دست آمده است (Afroz, 2010)، بنابراین سهولت، کاهش زمان به دست آوردن گیاه تراریخته،کاهش هزینه، قابلیت تکرار و رسیدن به کارایی بالای تراریختی در گیاه گوجه‌فرنگی هنوز نیاز اساسی برای تولید گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی است.

به منظور موفقیت‌آمیز بودن عمل انتقال ژن در مرحله اول می‌بایست شرایط انتقال ژن بهینه شود. در انتقال ژن به گیاه مهم‌ترین مساله باززایی گیاه کامل از سلول‌هایی است که ژن انتقالی را دریافت کرده‌اند. به دلیل وابستگی زیاد باززایی گیاهان به ژنوتیپ، انتخاب ژنوتیپ مناسب نیز درصد تراریختی را افزایش می‌دهد (Van Oosten et al., 2013). حصول یک روش کارآمد جهت بالابردن درصد بازایی گوجه‌فرنگی مهم‌ترین ابزار در تراریختی آن است. باززایی گیاهان در محیط درون شیشه به عوامل متعددی از جمله ژنوتیپ، ریزنمونه، هورمونها و فتوپریود بستگی دارد (Reed et al., 1996). بر اساس بیشترین تحقیقات ترکیب هورمونی زاتین و ایندول استیک اسید بهترین نتیجه را در باززایی و تراریختی گوجه‌فرنگی داشته است (Gubis et al., 2004).

زمان هم کشتی، یکی از عوامل بسیار مهم در انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم است (Jelili, 2006). در این پژوهش بهترین زمان برای هم‌کشتی، یک روز بعد از تلقیح مشخص گردید. طولانی‌تر شدن زمان هم‌کشتی موجب بافت مردگی و کاهش فراوانی تراریختی، و زمان کم هم‌کشتی نیز به خاطر فرصت کم فرایند انتقال DNA موجب کاهش کارایی تراریختی می‌گردد. بنابراین زمان مناسب هم کشتی برای به دست آوردن پروتکل تراریختی حیاتی است (Wei et al., 2017)، به گونه‌ای که تغییر زمان هم کشتی از ۷۲ ساعت به ۴۸ ساعت فراوانی تراریختی را در کلزا از چهار به ۲۵ درصد افزایش داد (Rezaei Moshaei et al., 2014). مدت زمان‌های هم کشتی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت در گوجه‌فرنگی توسط Roy و همکاران در سال ۲۰۰۶ مورد مطالعه قرار گرفتند که بهترین زمان هم کشتی را ۴۸ ساعت ذکر کردند. غلظت سلول‌های اگروباکتریوم مورد استفاده برای تلقیح با گیاه یکی دیگر از عوامل مهم در تراریختی گیاهان محسوب می‌شود (Rezaei Moshaei et al., 2014). در تراریختی گوجه‌فرنگی معمولا غلظت آگروباکتریوم بین محدوده ۰/۱ تا ۱ است (Van et al., 2010). در گیاه ذرت نیز بهترین میزان تراریختی در غلظت ۰/۶ تا ۱ نژاد LBA به دست آمد. مناسب ترین غلظت آگروباکتریوم نژاد LBA جهت تلقیح با ریز نمونه‌های گندم به دست آمد که در غلظت‌های بالا و پائین اگروباکتریوم، بیان پایدار و همچنین بیان زودگذر ژن‌های انتقالی کاهش یافت. در این تحقیق غلظت‌های بالاتر از ۱ موجب آسیب به سلول‌های گیاهی مورد تلقیح شده و میزان نهایی گیاهان به دست آمد را شدیدا کاهش می‌دهد (Zhang et al., 2004). لازم به ذکر است که در نتایج حاصل از تحقیق حاضر بهترین سویه جهت تراریختی، سویه GV3101 آگروباکتریوم تشخیص داده شد که می‌توان این امر را به دلیل اثر متقابل نژاد آگروباکتریوم و رقم گوجه‌فرنگی دانست.

مسیر پیام رسانی SOS نقش مهمی در برقراری هوموستازی یونی ایفا می‌کند (Palavalasa et al., 2017). مطالعات نشان داده افزایش بیان اجزای دخیل در این مسیر، مقاومت گیاهان را در تنش شوری بهبود می‌بخشد (Shi et al., 2003). افزایش بیان ژن‌های SOS1, SOS2 وSOS3 به تنهایی یا مجموعا در آرابیدوپسیس سبب افزایش تحمل به تنش شوری می‌شود (Yang et al., 2009). نتایج مولکولی پژوهش حاضر انتقال ژن SOS3، ژن نشانگر مقاومت به تنش شوری، را در گیاه گوجه‌فرنگی تائید کرد.

نتیجه‌گیری

اهمیت بهره گیری از اراضی زراعی در تولید محصول ایجاب می‌کند تا علاوه بر اقداماتی که در زمینه معرفی ارقام متحمل یا مقاوم به شوری صورت گرفته فعالیت‌های جهت‌دار و کامل‌تری در زمینه اصلاح ارقام برای این قبیل اراضی انجام شود. از میان رقم‌های مورد مطالعه، بیشترین باززایی مربوط به برگ لپه‌ای رقم Falat CH بود. با توجه به اهمیت ژن SOS3، این ژن به رقم مذکور گیاه گوجه فرنگی منتقل شد و تا مرحله بیان در سطح RNA بررسی‌ها انجام گرفت و گیاهان تراریخت انتخاب شدند. جالب توجه است که گیاهان گوجه فرنگی با سویه LBA4404 تراریخت نشدند و تنها سویه GV3101 موجب ایجاد گیاهان تراریخت گردید. این امر نشان می‌دهد که این سویه قابلیت انتقال ژن به گوجه‌فرنگی را دارا بوده است. همچنین نتایج نشان داد که محیط دارای آهن سکسترون به طور مشخص باعث سبزی گیاهان و تسریع در رشد آن‌ها می‌شود. بنابراین، رشد گیاهان تراریخت تا رسیدن به مرحله زایشی و گرفتن بذر و همچنین آنالیزهای فیزیولوژیکی و مولکولی جهت تایید پروتئین SOS3 در گیاهان تراریخت پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از همکاری مسئولان آزمایشگاه زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و آزمایشگاه سیتوشیمی گیاهی دانشگاه تبریز سپاسگزاری می‌شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.9.1]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.76]

REFERENCES

Afroz, A., Chaudhry, Z., Rashid, U., Khan, M.R &Ali, G.M. 2010. Enhanced regeneration in explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with the treatment of coconut water. AJB. 24: 3634-3644.

Archibold, O. 1995. Ecology of World Vegetation. Chapman and Hall, London. pp: 430-436.

Asch, F., Dingkuhn, M. &Dorffling, K. 2000. Salinity increases CO2 assimilation but reduces growth in field grown, irrigated rice. Plant Soil 218: 1-10.

Birnboim, H.C. &Doly J. 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.

Deinlein, U., Stephan, A., Horie, T., Luo, W., Xu, G. &Schroeder, J. 2014 Plant salt-tolerance mechanisms. Trends Plant Sci. 19: 371-379.

Demir Kaya, M., Gamze Okc, U., Atak, M. &Yakup, C. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Europ. J. Agron. 24: 291-295.

Fei, Z., Tang, X., Alba, R. &Giovannoni, J. 2006. Tomato expression database: a suite of data presentation and analysis tools. Nucleic Acids Res. 34: 766-770.

Gong, D., Jagendorf, G.Y. &Zhu, J. 2002. Biochemical characterization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. Plant Physiol. 130: 256-264.

Gubis, J., Lajchova, Z., Farago, J. &Jurekova, Z. 2004. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Bio. Bratislava. 59: 405-408.

Huazhong, S., Cheolsoo, M. &Zhu, J. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene encodes a putative na1H1 antiprter. PNAS. 97: 6896-6901.

Jelili, T.O. 2006. Agrobacteium-mediated transformation of plant: emerging factors that influence efficiency. Biotech. Mol. Bio. Reviw 1: 12-20.

Palavalasa, H., Narasu, L., Varshney, R. &Kavi Kishor, P. 2017. Genome wide analysis of sodium transporters and expression of Na+/H+-antiporter-like protein (SbNHXLP) gene in tomato for salt tolerance. Inter. Drought 9: 417-126.

Reed, A., Kretzmer, K., Naylor, M., Finn, R., Magin, K., Hammond, B., Leimgruber, R., Rogers, S. &Fuchs, R. 1996. Safety assessment of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase protein expressed in delayed ripening tomatoes. J. Agric. Food Chem. 44: 388-394.

Rezaei Moshaei M., Nematzadeh, G.A., Askari, H., Nejad, A.S. &Pakdin, A. 2014. Quantitative gene expression analysis of some sodium ion transporters under salinity stress in *Aeluropus littoralis*. Saudi J. Biol. Sci. 21: 394-399.

Roy, R., Purty, R.S., Agrawal, V. &Gupta, S.C. 2006. Transformation of tomato cultivar *'Pusa ruby'* with bspA gene from *Populus tremula* for drought tolerance. PCTOC. 84: 55-67.

Sarwarkhan, M., Usman, M. &Lilla, M. 2006. Facile plant regeneration from tomato leaves induced with spectinomycin. Pak. J. Bot. 38: 947-952.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. &Zhu, J.K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. PNASA. 97: 6896-6901.

Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. &Zhu, J.K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Biotechnol. 21: 81-85.

Sreenivasulu, N., Sopory, S.K. &Kavi Kishor, P.B. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene 388: 1-13.

Van Oosten, M., Sharkhuu, A., Batelli, G., Bressan, R. &Maggio, A. 2013. The *Arabidopsis thaliana* mutant air1 implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. Plant Mol. Biol. 83: 405-415.

Van, D. T., Ferro, N. &Jacobsen, H.J. 2010. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. GM Crops J. 32: 312-321.

Wei, D., Zhang, W., Wang, C., Meng, Q., Li, G., Chen, T. &Yang, X. 2017. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to alleviate salt-induced potassium efflux and enhances salt tolerance in tomato plants. Plant Sci. 257: 74-83.

Yang, Q., Chen, Z., Zhou, X., Yin, H., Li, X. &Xin, X. 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increase salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Mol. Plant 2: 22-31.

Yue, Y., Zhang, M., Zhang, J., Duan, L. &Li, Z. 2012. *SOS1* gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K/Na ratio. J. Plant Physiol. 169: 255-261.

Zhang, X., Dong, F.C., Gao, J.F. &Song, C.P. 2001. Hydrogen peroxide induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. Cell Res. 11: 37–43.

Zhang, H. &Blumwald, E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nat. Biotechnol. 19: 765-768.

Zhang, J., Creelman, R. &Zhu, J. 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. Plant Physiol. 135: 615-621.

*****

How to cite this article:

Mohajel Kazemi, E., Pazhouhandeh, M., Jonoubi, P. & Kazemian, M. 2020. The optimization of gene transfer to tomato and the study of expression possibility of salt-tolerance gene (SOS3). Nova Biologica. Reperta 7: 76-84. (In Persian).

محجل کاظمی، ا.، پژوهنده، م.، جنوبی، پ. و کاظمیان، م. ۱۳۹۹. بهینه سازی انتقال ژن به گیاه گوجه فرنگی و بررسی امکان بیان ژن مقاومت به شوری (SOS3). یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۸۴-۷۶.