افزایش کارایی انتقال ژن به ارقام تجاری میخک با استفاده Agrobacterium tumefaciens

امید اعلمی[1]، پژمان آزادی[2]، هانیه هادیزاده[2]، دیتون وایلد[3]، زهرا کریمیان[1]، حسین نعمتی[1]،
لیلا سمیعی[1*]
[1]گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[2]بخش تحقیقات مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان ترویج و آموزش کشاورزی، کرج
[3] دپارتمان باغبانی، دانشگاه جورجیا، آتن، آمریکا
samiei@um. ac. ir

در حال حاضر تقاضا برای ارقام جدید میخک که یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی می‌باشد افزایش یافته است. تکنیک انتقال ژن بوسیله *Agrobacterium tumefaciens* یکی از روش‌های رایج جهت ایجاد تغییرات ژنتیکی هدفمند در گیاهان می‌باشد. هدف از انجام این آزمایش افزایش کارایی انتقال ژن به ارقام میخک با استفاده از روش‌های مختلف بود. در این تحقیق کالوس‌های حاصل از برگ گیاه میخک توسط *Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA4404* حاوی پلاسمید *pCambia2301* حامل ژن‌های *uidA* و *npt*II تلقیح شد. در آزمایش اول اثر تغییر در ترکیب محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) و در آزمایش دوم تاثیر استفاده از آنتی اکسیدان‌های مختلف در محیط‌های تلقیح و هم کشتی جهت افزایش کارایی انتقال ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد انتقال ژن در محیط‌های کشت MS فاقد NH4NO3 و KNO3 به میزان ۸/۳۳ برابر (۵ درصد) در مقایسه با محیط MS تغییر نیافته به عنوان شاهد افزایش پیدا کرد. در آزمایش دوم کارایی انتقال ژن به میزان بالایی تا ۲۴/۴ درصد با استفاده از ۲ میلی گرم بر لیتر ملاتونین در محیط‌های کشت MS فاقد نیتروژن افزایش پیدا کرد. علاوه بر این درصد باززایی شاخساره از کالوس‌های تلقیح شده نیز تا ۲ برابر افزایش یافت. حضور ژن‌های جدید نیز در شاخه‌های باززایی شده این گیاهان توسط آزمون‌های PCR و هیستوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. در مجموع تکنیک‌های مورد استفاده در این تحقیق به میزان مؤثری کارایی انتقال ژن در ارقام میخک را افزایش داد که این امر می‌تواند فرایند تولید ارقام جدید میخک از طریق اصلاح مولکولی را تسریع نماید.

کلمات کلیدی: اگروباکتریوم تومیفاشینس، انتقال ژن، آنتی اکسیدان

Improving the Efficiency of Gene Transformation to Commercial Carnation Cultivars Using *Agrobacterium tumefaciens*

Omid Aalami[1], Pejman Azadi[2], Hanieh Hadizadeh[1], H. Dayton Wilde[3], Zahra Karimian[1], Hossein Nemati[1], Leila Samiei[1*]

[1]Department of Horticulture and Landscape architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[2]Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

[3]Horticulture Department, University of Georgia, Athens, GA, USA

*samiei@um. ac. ir

Abstract

At the present there is a great demand for new forms of carnation, which is one of the most popular plants for ornamental purposes. One of the approaches to obtain specific genetic modifications in plants is gene transformation using Agrobacterium tumefaciens. The purpose of the experiment was to enhance the efficiency of gene transformation to carnation cultivars using various approaches. In this research, the calli originated from carnation's leaf tissues were infected with Agrobacterium *tumefaciens* strain LBA4404 with *pCambia2301* plasmid harboring *uidA* and *npt*II genes. The first experiment aimed at identifying the influence of altering the composition of the Murashige and Skoog (MS) culture media, while the second experiment assessed the use of different antioxidants in both the inoculation and co-cultivation media to optimize the gene transformation process. The findings of the study demonstrated that the gene transformation percentage was higher in the MS media devoid of NH4NO3 and KNO3 by about 8. 33-fold (5%) compared to the unchanged MS medium which was used as the control. The gene transformation efficiency was improved up to 24. 4% in the second experiment of the study using 2 mg/L melatonin in nitrogen-free MS culture media. Besides, the rate of shoot regeneration from the inoculated calli was doubled. PCR and histochemical analysis of the regenerated shoots confirmed the presence of the introduced genes. Overall, the approache employed in this study enhanced the efficiency of gene constructs delivery in carnation cultivars, which, in turn, will boost the generation of new carnation varieties using molecular breeding.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Gene transformation, Antioxidant