بهینه سازی انتقال ژن به گوجه فرنگی با استفاده از آگروباکترویوم و ژن گزارشگر GUS

بهمن حسینی- فرج الله شهریاری- هاله هاشمی- حسن مرعشی- محمد فارسی[1]

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۰/۹

چکیده

گوجه فرنگی علاوه بر اینکه یکی از مهمترین سبزیجات میباشد همچنین به عنوان گیاه مدل جهت اصلاح سایر گیاهان دولپه ای نیز مورد استفاده قرار می گیرد. با این حال روش تراریختی گوجه فرنگی هنوز یک روش معمول و قابل تکرار برای همه ارقام آن نیست. در این تحقیق روش تراریختی سه ژنوتیپ گوجه فرنگی و دو ریزنمونه کوتیلدونی و هیپوکوتیلی در ۶ محیط باززایی مختلف توسط آگروباکتریوم تومفسینس حاوی پلاسمید pBI121 که دارای ژن gus تحت کنترل پروموتور 35SCaMV بود مقایسه وبهینه گردید. در این بین محیط های حاوی هورمون BAP به میزان ۲ میلی گرم در لیتر و زآتین به میزان ۲ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان باززایی را نشان دادند. اثرات متقابلی نیز در بین محیطهای کشت و ریزنمونه ها در کالوس زایی و باززایی مشاهده گردید. در بین ژنوتیپ ها، ژنوتیپ KalG و در بین ریزنمونه ها کوتیلدون بهترین باززایی و بیشترین تراریختی را نشان دادند. وضعیت تراریختی گیاهان از دو طریق رنگ آمیزی هیستوشیمیایی و واکنش زنجیره ای پلیمراز تأیید گردید.

واژه های کلیدی: گوجه فرنگی، تراریختی، آگروباکتریوم

مقدمه

سالهاست که انتقال ژنها بین گونه های گیاهی نقش مهمی در بهبود گیاهان زراعی ایفا کرده است. از سال ۱۹۷۰، پیشرفت قابل ملاحظه ای در ابداع ابزارهای لازم برای دستکاری اطلاعات ژنتیکی DNA نوترکیب رخ داده است(۱۹). لیست گونه های گیاهی که توسط ناقلین DNA گیاهی توسط روشهای آگروباکتریوم و روشهای دیگر تراریخت می شوند، به طور پیوسته در حال رشد بوده و در حال حاضر توانایی تراریختی به بیش از ۱۲۰ گونه گیاهی در حداقل ۳۵ خانواده گسترش پیدا کرده است (۱۹). گوجه فرنگی زراعی (*Lycopersicun esculentum*) یکی از مهمترین سبزیجات در دنیا میباشد، که به علت داشتن انواع ویتامینها، کاروتن، اسیدهای آمینه مفید، قند و املاح معدنی، نقش مهمی را در سلامت انسان ایفا می کند. در عین حال گوجه فرنگی یکی از مهمترین گیاهان مدل جهت اصلاح سایر گیاهان دولپه ای است (۱۵و۱۷). اولین مورد تراریختی گوجه فرنگی بوسیله مک کورمیک و همکاران (۱۷) گزارش گردید. از آن زمان گزارشهای متعددی در ارتباط با تراریختی ارقام متنوع گوجه فرنگی گزارش شده است (۲ ، ۶ ، ۹ ، ۱۰ ، ۱۱ و ۱۳) در مطالعات اساسی و کاربردی جهت اصلاح گوجه فرنگی، تراریختی موفق آن ضروری است. با این حال روش تراریختی گوجه فرنگی هنوز یک روش معمول و قابل تکرار برای همه ارقام آن نیست (۱۱ ، ۱۵ و۲۴). فقدان روش تراریختی و باززایی با کارایی بالا مهمترین مانع در کاربرد فنآوری انتقال ژن در ارقام اقتصادی گوجه فرنگی میباشد. جهت تراریختی گوجه فرنگی تاکنون از ریزنمونه های مختلفی نظیر، دیسک برگی(۱۷)، کوتیلدون (۲۴) و پروتوپلاست (۲۲) استفاده شده است و برای باززایی مستقیم گیاهان تراریخته تاکنون از غلظتهای مختلف دو هورمون BAP و زآتین (Zeatin) در مقادیر مختلف استفاده شده است (۳ ، ۱۲ ، ۱۸ ، ۱۹ و۲۵). تراریختی موفق اغلب وابسته به فاکتورهای مرتبط با استرین باکتریایی و غلظت باکتری (۶)، شرایط همکشتی

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بیوتکنولوژی شماره یک کرج

و باززایی سلولهای تراریخته (۵، ۸ و۲۵) و سیستم مؤثر انتخاب گیاهان تراریخته می باشد (۲۵). بنابراین توسعه روش تراریختی مؤثر و مستقل از ژنوتیپ ضروری می باشد. از عوامل دیگر افزایش میزان تراریختی، بهینه شدن غلظت کانامایسین در دوره آغازش ساقه، طویل شدن و ریشه زایی گیاهچه های باززایی شده میباشد (۱۳). رومرو وهمکاران (۲۱) به روش مؤثر باززایی پس از تلقیح ریزنمونه ها با آگروباکتریوم در محیط انتخابی حاوی کانامایسین دست یافتند ولی تنها ۱/۴ درصد گیاهان باززا شده تراریخت بودند و سایر گیاهچه ها بدون ادغام ژن معرفی شده، بدلیل فرار از شرایط انتخابی باززا گردیده بودند. در بعضی از آزمایشات غلظت کانامایسین در خلال طویل شدن ساقه بیش از ۲۰۰ میلی گرم در لیتر گزارش شده است (۱۳). از دیگر فاکتورهای مؤثر در افزایش کارایی انتخاب به افزایش سطح تماس ریزنمونه ها در محیط انتخابی اشاره گردیده است بطوریکه تا حد ۴۸ درصد مریستمهای تراریخته گزارش شده است (۲۱). میزان قابل توجهی از باززایی گیاهان غیرتراریخت و شیمریک در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک نیز گزارش گردیده است (۳ و۴).

در این تحقیق تراریختی سه ژنوتیپ گوجه فرنگی با استفاده از آگروباکتریوم تومفسینس از طریق مقایسه دو ریزنمونه کوتیلدونی و هیپوکوتیلی در شش محیط باززایی بررسی گردید. هدف از این مطالعه، بهینه سازی تراریختی گوجه فرنگی و انتخاب بهترین ژنوتیپ، ریزنمونه و محیط باززایی با توجه به ژنوتیپهای مورد استفاده بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در آزمایشات مقدماتی برای تعیین بهترین ژنوتیپ و محیط کشت مناسب برای کالوس زایی و باززایی، سه ژنوتیپ KalG ، Su2270 و Kal-early از بانک بذر گروه باغبانی دانشکده کشاورزی مشهد مورد مطالعه قرار گرفتند. این ژنوتیپ ها قبلاً توسط میرشمسی از حیث خصوصیات مورفولوژیکی و هیبریدی مورد مطالعه قرار گرفته بودند (۱).

باکتری و پلاسمید: در این آزمایش از *Agrobacterium tumefaciens* استرین GV3850، که دارای سیستم حاملی دوگانه بود جهت تراریختی ریزنمونه های گوجه فرنگی استفاده گردید. (اهدایی خانم دکتر هاله هاشمی - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی).

پلاسمید PBI121 به عنوان حامل ژنی مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید حاوی دو ژن نشانگر مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین و ژن گزارشگر *gus* می باشد (۱۴).

تکثیر گیاهچه ها: بذور پس از ضد عفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، در محیط کشت MS[1] حاوی ۳۰ میلیگرم در لیتر ساکارز قرار گرفتند، محیطهای کشت به اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی ($\mu m/s/m^2$ ۲۵۰-۲۰۰) به مدت ۱۱ روز منتقل گردیدند. جهت بدست آوردن دستورالعمل مناسب برای باززایی گیاهچه از ریزنمونه های هیپوکوتیلی و کوتیلدون، آزمایشات مقدماتی بر اساس دستورالعملهای منتشر شده انجام گردید (۱۶). باززایی ریزنمونه های هیپوکوتیلی و کوتیلدونی در محیط حاوی نمکهای حاوی ۲ میلیگرم در لیتر زآتین و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA[2] انجام گرفت.

به منظور بررسی اثر غلظتهای متفاوت کانامایسین (سیگما) بر روی باززایی و رشد گیاهچه ها، ریزنمونه ها به مدت ۲ هفته در محیط باززایی حاوی غلظتهای مختلف کانامایسین شامل ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم[3] (سیگما) قرار گرفتند. پس از ۲ هفته اثرآنتی بیوتیک بر روی ریزنمونه ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بررسی گردید.

کشت مقدماتی ریزنمونه ها: جهت ایجاد حداکثر آلودگی به آگروباکتریوم، ریزنمونه های کوتیلدونی و هیپوکوتیلی توسط اسکالپل و سرنگهای ۵ میلی لیتری زخمی شده و به صورت وارونه در داخل محیط کشت مقدماتی با نمکهای MS حاوی۱ میلی گرم در لیتر BAP[4] و ۱ میلی گرم در لیتر NAA[5] قرار گرفتند.

تهیه کشت خالص باکتری: بدین منظور تک کلونیهای باکتری در محیط LB[6] حاوی (۵۰ mg/l) کانامایسین، کشت شدند. پس از گذشت یک شب از کشت باکتری، محیط حاوی

1) Murshige and Skoog
2) Indole Acetic Acid
3) Cefotaxime
4) Benzyl- Amino- Purine
5) Naphtalene Acetic Acid
6) Luria- Bertani

باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm رسوب داده شده و روشناور دور ریخته شد. رسوب باقیمانده توسط ۱ میلی لیتر از محیط AIM[1] (محیط MSحاوی ۵۰ میلیگرم ساکارز با pH=۵/۵) رقیق گردید.

تلقیح جداکشتها: پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت مقدماتی، ریزنمونه ها به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری با OD = ۰/۸ تلقیح شدند. سطح برگها به طور کامل با تکانهای ملایم با باکتری آغشته و مرطوب گردید. قطعات آغشته به باکتری بر روی محیطی مشابه محیط پیش کشت منتقل گردیدند. پس از دو روز هم کشتی، ریزنمونه ها در طی یک فرایند سه مرحله ای در محیط MS مایع حاوی $500\ mgl^{-1}$ سفوتاکسیم شستشو داده شدند. در ادامه برگها بر روی کاغذ صافی استریل، خشک شده و به محیط انتخابی حاوی $50\ mgl^{-1}$ کانامایسین و $150\ mgl^{-1}$ سفوتاکسیم منتقل گردیدند.

بهینه سازی محیط کشت: به منظور انتخاب محیط کشت مناسب جهت القای کالوس و باززایی مستقیم شاخساره در ریزنمونه های تلقیح شده با باکتری، غلظتهای متفاوتی از سه هورمونBAP ، NAA و زآتین مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب نوع و غلظت هورمونهای مورد استفاده با توجه به نتایج سایر محققین (۳ ، ۱۸ و۱۹) صورت پذیرفت. در جدول شماره (۱) نوع و غلظت هورمونها در ۶ محیط باززایی مختلف نشان داده شده است. ریزنمونه های تلقیح شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرارگرفته و هر دو هفته یکبار واکشت گردیدند.

جدول (۱) ترکیبات هورمونی مورد استفاده برای بهینه سازی و انتخاب بهترین ترکیب هورمونی محیط کشت جهت القا و رشد گیاهچه ها

	محیط کشت (میلی گرم در لیتر)					
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6
BAP	۱	۲	۲	–	–	–
NAA	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	–
Zeatin	۰	–	–	۲	۲	۲

پس از گذشت ۵ هفته، ریزنمونه هایی که ۲ سانتی متر تولید ساقه کرده بودند به محیط طویل شدن ساقه حاوی سه تیمار هورمونی ۱) BAP به میزان ۲ میلیگرم در لیتر ۲) BAP و GA3 هر کدام به میزان ۱ میلی گرم در لیتر و ۳) محیط فاقد هورمون به همراه نمکهای MS و ۵۰ میلی گرم کانامایسین و ۱۵۰ میلی گرم سفوتاکسیم منتقل شدند. جهت القای ریشه و رشد آن ریزنمونه هایی که حداقل ۵ سانتیمتر طول داشتند به محیط MS بدون هورمون منتقل گردیدند.

تائید تراریختی: DNA برگهای گیاهان تراریخته با استفاده از روش CTAB (۷) استخراج گردید. جهت تأیید تراریختی گیاهان باززایی شده واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *gus* (آغازگر رو به جلو: 5´-GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3´[2] و آغازگر[3] 5´-CCGGCATAGTTAAAGAAATCAATG-3´) به صورت یک سیکل و دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در آخرین مرحله بسط به مدت ۵ دقیقه در دمای $72\ ^{\circ}C$ انجام گردید.

پس از گذشت ۷ ، ۱۵ و ۳۰ روز از تلقیح گیاهان با باکتری، آزمون GusAssay با توجه به دستورالعمل موجود انجام گرفت (۱۴). بافت تازه گیاه تراریخت درلوله های ۱/۵ میلی لیترحاوی محلول رنگ آمیزی(۴- متیل آمبلی فریل- بتا گلوکورونید) غوطه ور شدند. پس از آن نمونه در دمای ۳۷ درجه به مدت یک شب در روی heat block نگهداری گردید. به منظور حذف رنگیزه های گیاهی از اتانول ۷۰درصد استفاده شد.

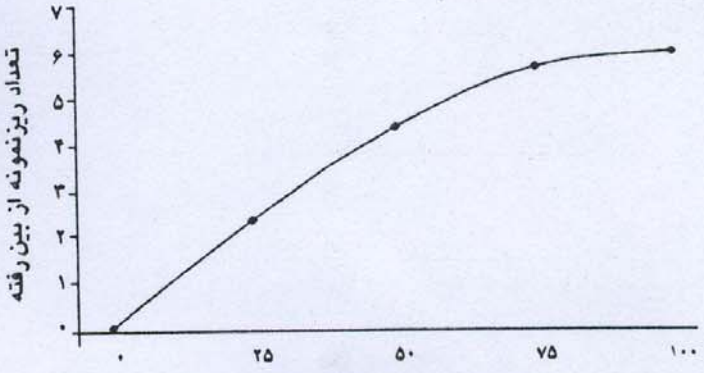
نتایج و بحث

پس از آزمایشات مقدماتی که برای کالوسزایی و باززایی ژنوتیپهای مورد استفاده انجام گرفت محیط کشت مناسب جهت باززایی مستقیم از ریزنمونه های کوتیلدونی و هیپوکوتیلی برای هر سه ژنوتیپ بهینه گردید.

نتایج آزمون تعیین سطوح مؤثر غلظت کانامایسین نشان داد که تیمارهای مختلف از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند ($p<\%5$). کمترین تعداد ریز نمونه ازبین رفته در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیترمشاهده گردید. در سطوح بالاتر از ۵۰ میلی گرم

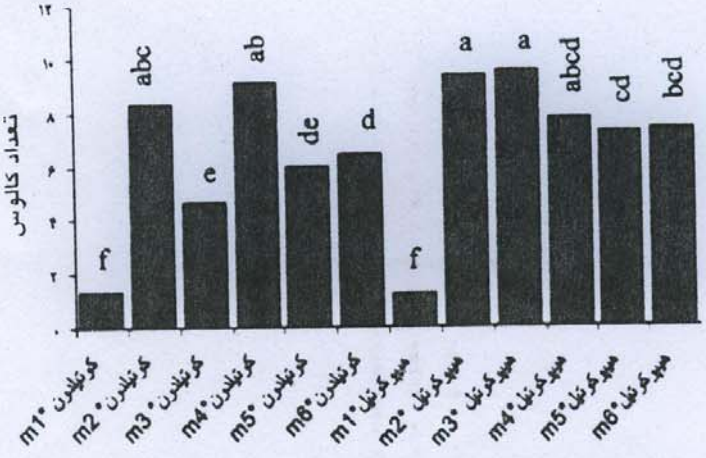
1) Agrobacterium Infection Medium 2) Froward Primer 3) Revers Primer

در لیتر کانامایسین، اکثر بافتها پس از ۳ هفته کاملاً سفید شده و از بین رفتند. سه غلظت انتهایی (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) از نظر تعداد ریز نمونه ازبین رفته با یکدیگر تفاوت معنی دار نداشتند، لذا غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین جهت استفاده در محیط انتخابی تعیین شد (شکل۱). با توجه به گزارشات مختلف (۱۸ و۱۹) میزان غلظت کانامایسین به کار رفته بین ۱۰۰-۵۰ میلی گرم در لیتر متفاوت بود که این تفاوت احتمالاً مربوط به نوع رقم و خلوص کانامایسین می باشد. در بعضی از آزمایشات غلظت کانامایسین مورد استفاده به بیش از ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در طول مراحل طویل شدن ساقه گزارش شده است (۱۲).



شکل (۱) اثر غلظت کشنده کانامایسین بر روی ریزنمونه ها

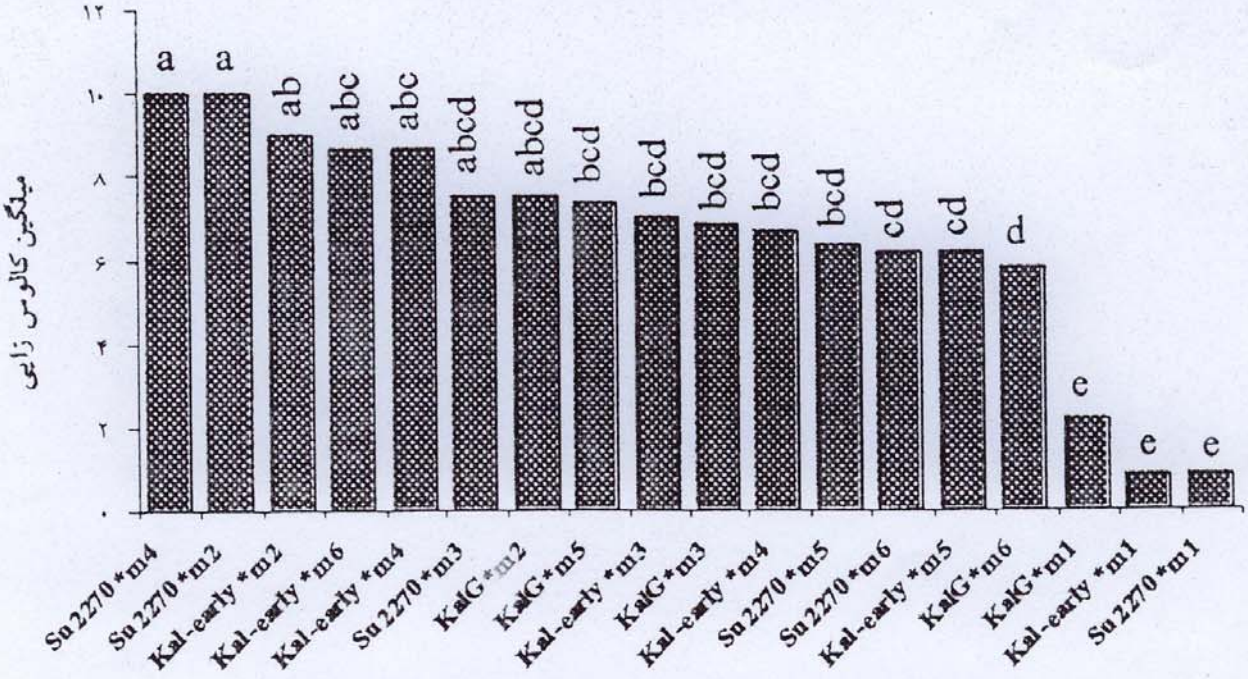
به علت رشد سریع باکتری، از OD پایین جهت تلقیح استفاده گردید. مدت زمان هم کشتی با باکتری در محیط Co-culture نیز، به ۳۶ تا ۴۸ ساعت کاهش داده شد و بدین ترتیب رشد باکتری در اطراف ریزنمونه ها تا حدود زیادی کنترل گردید. پارك و همکاران (۱۹) در استفاده از استرین LBA4404 جهت تلقیح ۵ ژنوتیپ از OD = ۱ و مدت ۳ روز هم کشتی استفاده نمودند. واکشت نمونه ها هر دو هفته یکبار در محیط های تازه علاوه بر اینکه برای رشد بافت های تراریخته مناسب بود، به علت فعال بودن آنتی بیوتیک کانامایسین در محیط کشت، از رشد باکتری در اطراف جداکشتها نیز جلوگیری نمود. لازم به ذکر است که با توجه به استرین باکتریایی، گونه گیاهی، ژنوتیپ و ریزنمونه های مورد آزمایش OD مورد استفاده می تواند متفاوت باشد (۲۴). معمولاً یک هفته پس از انتقال ریزنمونه ها به محیط رشد باززایی حاوی آنتی بیوتیک، تظاهر اولیه جوانه های تراریخته در انتهای بریده و نیز در اطراف رگبرگ اصلی برگهای کوتیلدونی و نیز در طرفین هیپوکوتیل قابل مشاهده بودند. زخمی کردن اطراف رگبرگ اصلی در موفقیت تراریختی اثر مستقیمی داشت. در رابطه با تأثیر محیط کشت روی کالوسزایی، نتایج تفاوت معنی داری را بین محیط کشتهای مختلف نشان داد. بهترین نتایج در محیطهای M_1 و M_2 بدست آمد در صورتی که حداقل پاسخ به کالوسزایی در محیط M_3 حاصل گردید به طوریکه اکثر نمونه ها در این محیط از بین رفتند. ریزنمونه هیپوکوتیلی و اثر متقابل هیپوکوتیل در محیط M_3 بیشترین میزان کالوسزایی را نشان داد (شکل ۲).



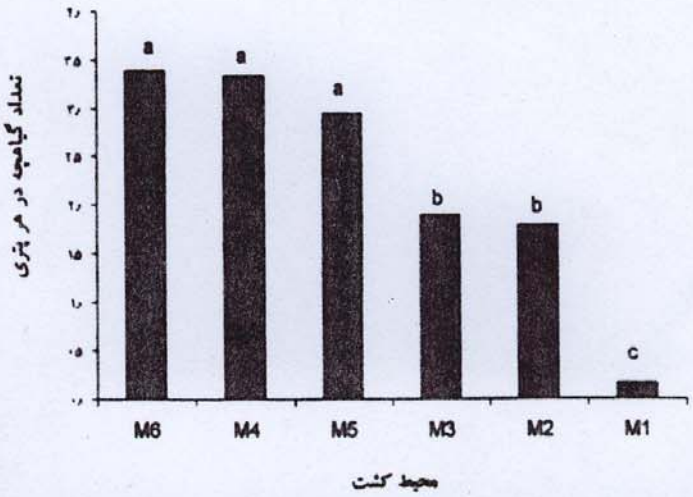
شکل(۲) اثرات متقابل ریزنمونه در محیطهای کشت مختلف در کالوس زایی

اثر متقابل ژنوتیپ در محیط کشت در مورد تعداد کالوس معنی دار گردید ($p<\%5$) ژنوتیپ Su2270 در محیط M_2 و M_4 و دو ژنوتیپ Su2270 و Kal-early در محیط M_1 به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد کالوس را دارا بودند (شکل۳).

باززایی گیاهچه: در انتقال ژن به گیاه ازطریق آگروباکتریوم، مهمترین مسأله باززایی گیاه کامل از تک سلولهایی است که ژن انتقالی را دریافت کرده اند. سه محیط، M_4، M_5، M_6 تفاوت معنی داری را با یکدیگر از لحاظ تأثیر در باززایی مستقیم شاخساره نشان ندادند. با توجه به هزینه بر بودن استفاده از هورمون زآتین به عنوان منبع سیتوکینین در باززایی گیاهان و به دلیل عدم مشاهده تفاوت معنی دار در بین محیطهای M_4، M_5 و M_6 امکان استفاده از هورمون BAP به عنوان جایگزین زآتین وجود دارد. دو محیط دیگر M_3 و M_2 نیز دارای اثرات یکسان در باززایی می باشند. بیشترین میزان تولید گیاهچه در ریزنمونه کوتیلدونی برای هر سه ژنوتیپ، در محیط M_6 مشاهده گردید(شکل۴). اثر متقابل



شکل(۳) اثرات متقابل ژنوتیپ در محیطهای مختلف کشت در روی کالوس زایی



شکل(۴) میانگین تعداد گیاهچه باززایی شده از ریز نمونه کوتیلدونی در ۶ سطوح مختلف هورمونی

ژنوتیپ در محیط کشت بر روی باززایی گیاهچه معنی دار نگردید. اما برای هیپوکوتیلها بیشترین میزان باززایی در محیط M_4 و M_5 وجود داشت.

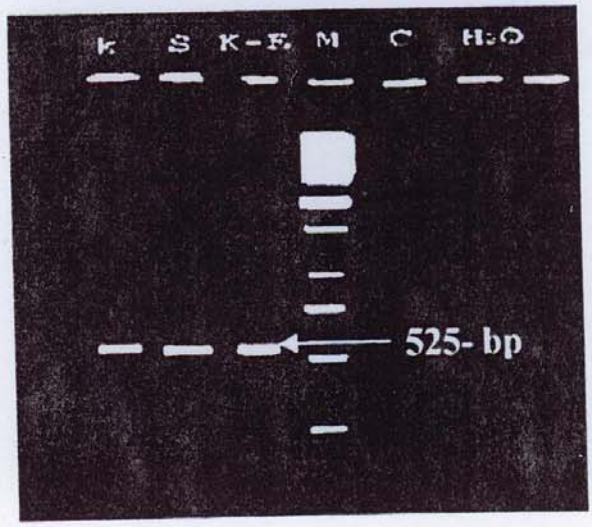
به دلیل بوجود آمدن واریانس ژنتیکی ناشی از باززایی گیاهچه از کالوسها، تنها شاخسارهایی که مستقیماً از ریزنمونه ها تولید شده بودند (شکل۵) جهت باززایی و تولید گیاهچه های تراریخت در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. ولچوا و همکاران (۲۵) جهت القای ساقه از ترکیب پیچیده ای استفاده نمودند بدین طریق که ترکیبات دیگری نظیر پلی وینیل پیرولیدین، دی تیو تریتول (DDT) و گلوکز را بکار بردند. پارك و همکاران (۱۹) از هورمون زآتین به میزان ۲ میلیگرم در لیتر همراه با IAA به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر و اکتام وهمکاران (۱۸) نیز از هورمون BAP به میزان ۲/۵ میلی گرم در لیتر جهت القای ساقه استفاده نمودند.

شکل(۵) باززایی مستقیم گیاهچه از ریزنمونه های کوتیلدونی

محیط فاقد هورمون مناسبترین محیط رشد و توسعه گیاهچه در سه ژنوتیپ شناخته شد. برخی از محققین (۱۹و۲۵) از هورمون زآتین به میزان ۱ میلی گرم در لیتر به مدت ۴ هفته جهت طویل شدن ساقه های اولیه استفاده نمودند. ریشه زایی گیاهچه های تراریخت احتمالی در محیط MS فاقد هورمون که حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر

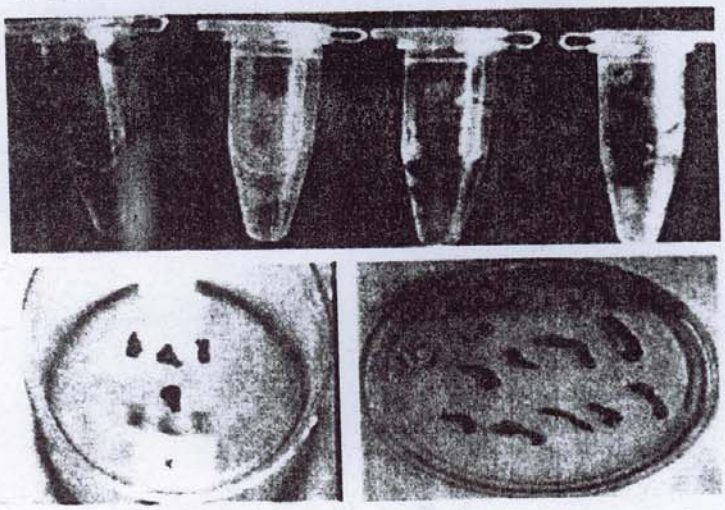
سفوتاکسیم بود بخوبی صورت گرفت در حالیکه در گیاهان شاهد و برخی از گیاهان تلقیح شده ریشه زایی صورت نگرفت. گیاهچه های تراریخت احتمالی در این محیط ریشه دار گردیده ولی گیاهان شاهد و برخی از گیاهان تلقیح شده فاقد ریشه زایی بودند. رشد گیاهچه های غیرتراریخت در محیط انتخابی تا میزان ۳۰ درصد نیز گزارش گردیده است (۳ و ۴). ضرورت استفاده از هورمون IAA جهت القای ریشه زایی توسط محققین دیگر نیز گزارش گردیده است(۱۹ و ۱۸). گزارش دیگری حاکی از آن است که بعضی از ارقام در محیط کشت MS فاقد هورمون قادر به ریشه زائی می باشند (۲۵).

تائید تراریختی: در واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن بتا-گلوکورونیداز یک باند ۵۲۵ کیلوبازی در گیاهان تراریخته احتمالی تکثیر گردید در حالیکه در گیاهان غیرتراریخته و نمونه آب به عنوان شاهدهای منفی باندی تکثیر نگردید (شکل۶).



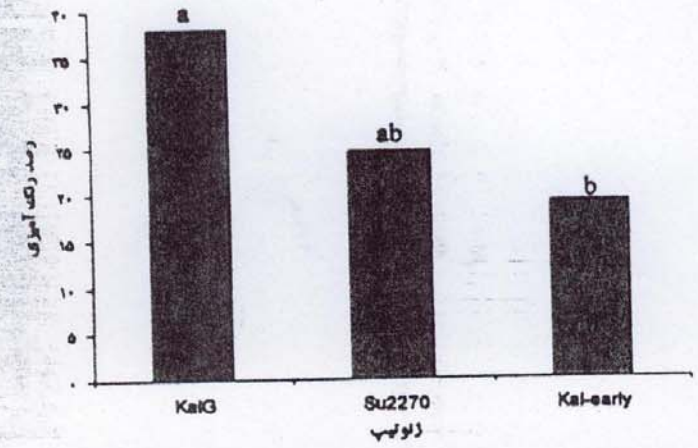
شکل(۶) الکتروفورز محصولات PCR گوجه فرنگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن *gus* که در آن DNA مورد استفاده به ترتیب عبارتند از: (K) به عنوان ژنوتیپ KalG، (S) به عنوان ژنوتیپ Su2270، (K-E) به عنوان ژنوتیپ Kal-early، (M) به عنوان مارکر استاندارد ۱bp، Fermentase، (C) به عنوان کنترل، (H2O) آب

نتایج رنگ آمیزی هیستوشیمیایی (شکل۷) نشان داد که مشاهدهء نقاط *gus* مثبت در حاشیه های بریده شده پس از ۱۵ روز ممکن میباشد. بین ژنوتیپها از لحاظ پاسخ به رنگ آمیزی تفاوت معنی داری مشاهده گردید ($p<\%5$). ژنوتیپ KalG بیشترین پاسخ را به رنگ آمیزی نشان داد. در مرتبه دوم نیز ژنوتیپ



شکل(۷) نتایج رنگ آمیزی هیستوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی: الف- تراریختها پس از ۱۵ روز، ب: پس از ۳۰ روز، ج: نمونه شاهد پس از ۷ روز

Su2270 قرار گرفت و ژنوتیپ Kal-early کمترین پاسخ را به رنگ آمیزی نشان داد. ژنوتیپ Su2270 از لحاظ آماری در پاسخ به رنگ آمیزی با دو ژنوتیپ دیگر تفاوت معنی داری نداشت (شکل۸). در هیپوکوتیل ها بیشتر دو طرف انتهایی رنگ گرفته و نقاط وسط کم رنگتر بودند.



شکل(۸) عکس العمل هیستوشیمیایی ژنوتیپ های مختلف گوجه فرنگی تراریخت شده با ژن *gus* (مقایسه میانگین در سطح ۵درصد)

در بسیاری از روشهای تراریختی اولیه از لایه مغذی توتون، میخک و گوجه فرنگی جهت موفقیت تراریختی استفاده شده است. نتایج یک تحقیق نشان داده است که پیش تیمار سلولهای مغذی، تراریختی سلولهای گوجه فرنگی را تحریک ولیکن باززایی سلولهای تراریخته را کاهش می دهد (۱۲). بر اساس نتایج بررسی حاضر هیچ نیازی به استفاده از لایه مغذی نبوده و بدون استفاده از محیطهای کشت مختلف و تنها در دو مرحله امکان باززایی و القای

ریشه وجود دارد، در عین حال میزان رشد گیاهچه های تراریخت نسبت به کنترل پایین بود و این با گزارشات کشت بافت گوجه فرنگی محققین دیگر مطابقت دارد (۱۸ و ۱۹). با توجه به داده های این بررسی، به نظر می رسد استفاده از جمعیت کم باکتری و روش شستشوی مکرر جهت حذف به موقع باکتری از محیط کشت بهتر باشد. بهترین محیط باززایی استفاده از هورمون BAP و زآتین به میزان ۲ میلی گرم در لیتر بود. جهت طویل شدن ساقه نیازی به استفاده از هورمون نبوده و در محیط فاقد هورمون بیشترین میزان رشد بوجود می آید. در القای ریشه زایی نیز، لزومی به استفاده از هورمون در این ژنوتیپها وجود نداشته و در محیط فاقد هورمون به خوبی ریشه تولید نمودند. در بین ژنوتیپهای به کار گرفته شده ژنوتیپKalG و ریزنمونه کوتیلدونی بیشترین میزان تراریختی و باززایی را نشان دادند.

منابع

۱. میر شمسی، ا. ۱۳۸۲، بررسی قابلیت ترکیب پذیری ده لاین گوجه فرنگی به منظور تولید بذر هیبرید با عملکرد بالا. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۸۲

2. Agharbaoui, Z., Greer, A. F., and Tabaeizadeh, Z., 1995. Transformation of the wild tomato *Lycopersicon chilense* Dun. by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 15, 102-105.
3. Arrillage, R., Mascarell, C., Gisbert, E., and Moren, V., 1998. Expression of the test HAL2 gene in tomato increase the *in vtiro* salt tolerance of transgenic progenesies. Plant Sci. 139, 219-229.
4. Chi, Y. S., and Philips. G. C., 1987. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Lycopersicon based on conditions favorable for regeneration. Plant Cell Rep. 19,105-108.
5. Costa, M. G. C., Noguera, F. T. S., and Cecon, P.R., 2000. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato *(Lycopersicon esculentum)*. Plant Cell Rep. 19, 327-332.
6. Dellanny, X., Lavalle, B. J., Proksch, R. K., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Dodson, R. B., Augustine, J. J., Layton, J.G., and Fischhoff, D.A., 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki insect control protein. Bio/Technology 5, 1265-1269.
7. Doyle, J. J and J. L.Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 11-15
8. Drorri, E., and A., Altman., 2001. Transformation of tomato with the betaA gene to confer osmotic stress tolerance (glycine-betaine production). Plant Sci. 49, 152-153.
9. Fillati, J. J., Kiser, J., Rose, R., and Comai, L., 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary Agrobacterium tumefaciens vector. Bio/ Technology 5, 726-730.
10. Fischhohh, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G., McCormick, S. M., Niedermayer, J. R., and Fraley, R. T., 1987. Insect tolarnt transgenic tomato plants. Bio/Technology 5, 807-813.
11. Frary, A., and Earle, E. D., 1996. An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium- mediated transformation of tomato. Plant Cell Rep. 16, 235-240.

12. Hamza, S., and Chupeau, Y., 1993. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and Agrobacterium- mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). J Exp Bot. 44, 1837-1845.
13. Hu, W., and Philips, G. C., 2001. A combination of overgrowth-control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). In vitro Cell Biol-Plant. 37, 12-18.
14. Jefferson, R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep. 5, 387-405.
15. Ling, H. Q., Kriseleit, D., and Ganal, M. G., 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in Agrobacterium-meiated transformation of tomato (*L. esculentum* Mill.). Plant Cell Rep. 17, 843-847.
16. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15, 473-497.
17. McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., and Fraley, R., 1986. Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 5, 81-84.
18. Oktem, H. A., Bulbul, Y., Oktem, E., and Yucel, M., 1999. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation studies in tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller). J of Botany.23, 345-348.
19. Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D., and Smith, R. H., 2003. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation. Plant Physiol. 200-257.
20. Potrycus, I., and Spangenberg, G., 1995. Gene transfer to plants. Berlin Heidelberg, Springer.
21. Romero, J. P., Houlne, G., Canas, L., Schantz, R., and Chamarro, J., 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell, Ttissue and Organ Culture 67, 173-180.
22. Roset, S., and J. W., Gilissen., 1989. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. Acta Bot. 38, 1-23.
23. Tabaeizadeh, Z., Agharbaoi, Z., Harrak, H., and Poysa, V., 1999. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chillense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae race* 2. Plant Cell Rep. 19, 197-202.
24. Van Roekel, J. S. C., Damm, B., Melchers, L.S., and Hoekema, A., 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*L. esculentum*). Plant Cell Rep. 12, 644-647.
25. Velcheva, M., Faltin, Z., Flaishman, M., Eshdat, Y., and and Perl, A., 2004. A liquid culture system for Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.). Plant Sci: 168, 121-130.

Optimization of gene transformation in tomato (Licopersicon escolentum) using Agrobacterium tumefaciens and GUS reporter gene.

B. Hosseini– F. Shahriari– H. Hashemi– H. Marashi– M. Farsi[1]

Abstract

Tomato (Licopersicon esculentum) is one of the most important vegetable crops which is normaly used as a model plant for improving of other dicotyledons crop plants. However, its transformation is quite genotype dependent and cannot be extended for other cultivars. Furthermore repeatability of the technique is relatively low. So in this research the transformation of three genotypes (KalG, Kal-early and Su2270) were examined using Agrobacterium tumefaciens strain GV3850 harboring the binary vector pBI121 with gus gene controlled by CaMV 35S promoter. Two types of explants (cotyledon and hypocotyls) were also tested for the transformation and regeneration under 6 different media. The results of this experiment showed that media containing BAP (2ml/l) and Zeatin (2mg/l) had the greatest rate of regeneration. The best regeneration and highest transformation was observed for KalG genotype and cotyledon explants respectively. There were also interaction effects between media and explants for callus production and transformants. Transformation were confirmed by Histochemical assay and PCR analysis.

Keywards: Tomato, Transformation, Agrobacterium

1- Contribution from NRCGEB and Ferdowsi University of Mashhad, Iran.