مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۲ شماره ۲ صفحه‌های ۲۳۷ تا ۲۴۸ (۱۴۰۰)
مقاله پژوهشی

بهبود روش باززایی و انتقال ژن به گیاه زینتی بنفشه آفریقایی در شرایط کشت درون شیشه‌ای[1]

Improving the Method of *In Vitro* Regeneration and Gene Transfer to the African Violet (*Saintpaulia ionantha*)

امیر رجبی، لیلا فهمیده*، مجتبی کیخاصابر، ولی اله قاسمی عمران*[2]

چکیده

بنفشه آفریقایی یک گیاه زینتی تجاری با رنگ‌های مختلف است. به‌منظور باززایی مستقیم، این گیاهچه، ابتدا در آزمایش اول که به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی اجرا شد. اثر ریزنمونه‌های برگ، گره، دمبرگ، ریشه، گلبرگ و کاسبرگ در چهار رقم در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP+NAA و BAP+IBA برای تولید شاخساره بررسی شد. سپس در آزمایش دوم آستانه تحمل ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ به آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و کانامایسین با کشت در محیط کشت‌های انتخابی دارای غلظت‌های مختلف از این دو آنتی‌بیوتیک ارزیابی گردید. پس از مشخص شدن غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک برای محیط کشت انتخابی، انتقال ژن‌های *AS1* و *4'CGT* به ترتیب با استفاده از آگروباکتریوم سویه *LBA4404* حاوی پلاسمیدهای pCAMBIA1304 و pBI121 انجام شد. از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای شناسایی گیاهان تراریخته استفاده شد. نتیجه‌های آزمایش اول مشخص نمود که ریزنمونه برگ مناسب‌ترین ریزنمونه و محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA و BAP در هر چهار رقم، بهترین ترکیب بود. نتیجه‌های آزمایش دوم نشان داد که محیط M4 (به ترتیب حاوی ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و هیگرومایسین) به‌طور کامل از باززایی نمونه‌های غیرتراریخت جلوگیری می‌کند. در انتها گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد آزمایش انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: بنفشه آفریقایی، ریزنمونه، دست ورزی ژنتیکی، شاخه‌زایی مستقیم، کشت بافت.

مقدمه

بنفشه آفریقایی (African violet) گیاهی چندساله با نام علمی *Saintpaulia ionantha* از تیره Gesneriaceae است (۴). این جنس دارای گل و برگ‌های جذاب می‌باشد. گل‌ها به‌صورت نامنظم یا زیگومورف با دو لوب در بالا و سه لوب در پایین در رنگ‌های متنوع وجود دارند (۱۷). جنس *Saintpaulia* بومی کنیا و تانزانیا بوده و شامل ۲۵ گونه است (۱۹). گزارش شده است که هشت گونه *Saintpaulia* شامل *S. ionantha* در فهرست گیاهان در معرض تهدیدIUCN قرار دارند (۸). ارزش اقتصادی این جنس به‌دلیل ویژگی‌هایی همچون داشتن رنگ و شکل متنوع، قابلیت رشد در شرایط اتاق، توانایی گلدهی تحت نور مصنوعی و افزایش رویشی آسان در تمام فصول سال می‌باشد (۱۱).

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۶

۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه زابل، استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل و استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (l.fahmideh@gau.ac.ir و ghasemiomran@yahoo.com).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

جمعیت‌های طبیعی این گونه به علت از بین رفتن جنگل‌ها برای توسعه کشاورزی در معرض خطر قرار دارند و برخی گونه‌های وحشی آن در معرض خطر انقراض قرار دارند (۲). به‌علاوه تکثیر بنفشه آفریقایی از راه روش سنتی قلمه برگ بسیار وقت‌گیر است و تعداد محدودی گیاه از طریق این روش تولید می‌شود؛ هم‌چنین در این روش مشکلاتی مانند ظهور گیاهان نامتقارن، نیاز به فضای زیاد جهت تکثیر و توسعه بیماری‌ها وجود دارد (۲۱). در نتیجه، توسعه یک روش تکثیر سریع برای این گونه‌های گیاهی، یک منفعت بزرگ اقتصادی در صنعت گیاهان زینتی خواهد بود. یکی از بهترین روش‌ها برای تکثیر سریع گیاهان، تکنولوژی کشت بافت است که در حفظ و تکثیر گونه‌های وحشی سودمند می‌باشد و زمان کوتاه و فضای محدود را ممکن می‌سازد (۳). یک مزیت مهم دیگر این است که گیاهان مشتق شده از کشت بافت نسبت به گیاهان تولید شده با روش‌های معمولی از کیفیت بیشتر و سلامت بهتری برخوردار می‌باشند (۱۲).

آئورون[۱] یک کلاس از فلاونوئیدهای کمیاب می‌باشد که در تعداد محدودی از گونه‌ها مانند گل شاه اشرفی یا ستاره (*Cosmos bipinnatus*)، گُل شَصت‌عَروسان (لیمونیوم) و گل میمونی (*Antirrhinum majus*) یافت می‌شود (۱۸). *AS1*[۲] و *4'CGT*[۳] ژن‌های مهم درگیر سنتز آئورون از گیاه گل میمون زرد رنگ است، بیان این ژن‌ها با همدیگر و یا همراه با خاموشی یکی از ژن‌های فلاونون ۳ بتا-هیدروکسیلاز[۴] (*F3H*) یا دی‌هیدروفلاونول ۴-ریداکتاز[۵] (*DFR*) با تکنیک RNAi باعث ایجاد رنگدانه زرد در گل تورنیا (۱۳) و نیلوفر (۶) شده است. مهندسی صفات جدید در گیاهان به امکان باززایی از گیاه تراریخته بستگی دارد که خوشبختانه در حال حاضر این تکنیک به‌طور قابل‌توجهی خصوصاً در گیاهان زینتی رو به گسترش است. برای استفاده از دست ورزی ژنتیکی در اصلاح گیاه زینتی بنفشه آفریقایی نیاز به بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال ژن به این گیاه می‌باشد به‌طوری که بتوان یاخته‌های گیاهی را تراریخته کرده و با استفاده از محیط کشت مناسب از یاخته‌های تراریخته، گیاه کامل در حداقل زمینه ممکن به دست آورد. مطالعاتی به‌منظور بررسی امکان انتقال ژن توسط آگروباکتریوم از طریق ریزنمونه‌های دمبرگ و سوسپانسیون یاخته‌ای به گیاه بنفشه آفریقایی انجام شده است (۱۰). اولین گزارش انتقال ژن به گیاه بنفشه آفریقایی توسط رزمی و همکاران (۱۴) ارائه شد. این گروه پژوهشی ژن لوسیفراز مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین را با استفاده از آگروباکتریوم به بنفشه آفریقایی منتقل کردند و در آن از ریزنمونه‌های برگی و دمبرگ برای تلقیح با آگروباکتریوم استفاده شد (۱۴). قربانزاده و همکاران باززایی گیاه تراریخته بنفشه آفریقایی را در محیط حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین گزارش دادند (۳).

این پروژه به‌منظور دست‌یابی به دو هدف انجام شد. ابتدا برای یافتن بهترین محیط کشت جهت تکثیر انبوه بنفشه آفریقایی، باززایی شاخساره از ریز نمونه‌های مختلف (برگ، گره، دمبرگ، ریشه، گلبرگ و کاسبرگ) از چهار رقم در شرایط درون شیشه‌ای و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه جهت رسیدن به پروتکل کارآمد و اقتصادی به‌منظور امکان انتقال ژن به بنفشه آفریقایی، آستانه تحمل ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ این گیاه به آنتی‌بیوتیک‌های (هیگرومایسین+کانامایسین) با کشت روی محیط کشت‌های انتخابی دارای غلظت‌های مختلف ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها، گندزایی

در پژوهش حاضر از چهار رقم بنفشه آفریقایی ('*Jolly Diamond*'، '*LE-Polina viardo*'، '*LE-karusel*' و '*Streamer*') به ترتیب با گل‌های به رنگ سفید، بنفش، آبی و صورتی استفاده شد. کلیه نژادگان‌های *Saintpaulia* بخشی از مجموعه نژادگان پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان بود. تمام مراحل گندزایی در زیر هود لامینار و در شرایط به‌طورکامل استریل انجام گرفت. ابتدا ریز نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با آب شسته شدند. سپس ریز نمونه ریشه و گلبرگ به مدت ۳۰ ثانیه و ریز نمونه‌های برگ، گره، دمبرگ و کاسبرگ یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد گندزایی و به‌وسیله آب مقطر شستشو داده شد و جهت تکمیل گندزایی سطحی، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیدروژن پراکسید ۲ درصد غوطه‌ور شدند. در تمام مراحل

۱- Aurone ۲- Aureusidin synthase ۳- Chalcone 4'-O-glucosyltransferase ۴- Flavanone 3-hydroxylase
۵- Dihydroflavonol 4-Reductase

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

گندزایی ظرف حاوی ریزنمونه‌ها تکان داده شد تا مراحل گندزایی بهتر صورت گیرد. ریز نمونه‌های مورد استفاده در آزمایش شامل: ۱- برگ (از برگ‌های سالم، جوان و توسعه یافته از قسمت مریستمی گیاه در ابعاد ۱×۱ سانتی‌متری)، ۲- گره، ۳- دمبرگ (حاصل از برگ‌های سالم، جوان و به‌طورکامل توسعه‌یافته با اندازه‌های یک سانتی‌متری)، ۴- ریشه، ۵- گلبرگ (شامل کل جام گل که از دمگل جدا شده بود) و ۶- کاسبرگ (کاسبرگ کامل یا کاسه گل از گل‌ها جدا شد) بودند.

بهینه‌سازی سیستم کشت بافت بنفشه آفریقایی

این قسمت از آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. به این ترتیب که نمونه‌ها بعد از گندزایی روی محیط کشت MS (Murashige 1978) حاوی BAP (بنزیل آمینو پورین) به غلظت‌های (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه NAA (۱-نفتالن استیک اسید) با غلظت‌های (صفر، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و یا IBA (ایندول ۳- بوتریک اسید) با غلظت‌های (صفر، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) به‌منظور به دست آوردن بهترین محیط‌ها برای ایجاد شاخساره در باززایی مستقیم منتقل شدند. سپس به اتاقک رشد در دمای ۲۱°C±۳ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای ریز ازدیادی و تشکیل گیاه کامل انتقال داده شدند. برای هر ریزنمونه درون هر پتری دیش ۱۲ عدد نمونه قرار داده شد و با سه تکرار انجام شد. واکشت نیز تقریباً ۲۰ روز یک بار در محیط‌های تازه تهیه شده صورت گرفت. بعد از حدود ۳ هفته از کشت اولیه، اولین آثار تولید شاخساره نمایان شد. درصد تولید شاخساره نیز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در ادامه بهترین ریزنمونه جهت به دست آوردن گیاهچه استریل کشت داده شد و به‌عنوان ماده گیاهی جهت تلقیح مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین آستانه تحمل ریزنمونه برگ و دمبرگ بنفشه آفریقایی به آنتی‌بیوتیک‌ها

از آنجا که کارآیی تولید گیاهان تراریخته وابسته به انتخاب دقیق یاخته‌های و بافت‌های تراریخته است، لازم است که آستانه تأثیر آنتی بیوتیک‌ها مشخص شود. جهت تعیین غلظت مناسب از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و هیگرومایسین ذکر شده در جدول (۱) در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۲۰ نمونه داخل هر تکرار (پتری دیش) استفاده شد.

جدول ۱- غلظت آنتی بیوتیک‌های کانامایسین+ هیگرومایسین مورد استفاده در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ.

Table 1. List of Kanamycin+Hygromycin antibiotics used in leaf and petiole explants.

محیط کشت Culture medium	کانامایسین + هیگرومایسین (میلی‌گرم بر لیتر) Kanamycin (Kan) +Hygromycin (Hyg) (mg L^{-1})
M1	MS+0 Kan+0 Hyg (without antibiotic)
M2	MS+25 Kan+25 Hyg
M3	MS+25 Kan+50 Hyg
M4	MS+50 Kan+75 Hyg
M5	MS+75 Kan+75 Hyg
M6	MS+75 Kan+100 Hyg

سویه باکتری و پلاسمیدهای نوترکیب

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده در این پژوهش سویه *LBA4404* بود که دارای ژن مقاومت به ریفامپیسین می‌باشد. پلاسمیدهای مورد استفاده نیز pCAMBIA1304 و pBI121 بود. این پلاسمیدها حاوی ژن مقاومت به کانامایسین خارج از بخش منتقل شونده به گیاه و به ترتیب ژن انتخاب‌گر مقاومت به هیگرومایسین و کانامایسین داخل بخش منتقل شونده می‌باشد. از دو آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین و کانامایسین در محیط‌های کشت باکتری به ترتیب برای جلوگیری از احتمال آلودگی و حفظ پلاسمیدهای pCAMBIA1304 و pBI121 در باکتری آگروباکتریوم استفاده شد و از آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین+کانامایسین با هم برای انتخاب نوساقه‌های تراریخته (حاوی ژن‌های مورد مطالعه *AS1* و *4'CGT*) استفاده شد. در این پروژه پژوهشی ژن‌های مورد مطالعه *AS1* و *4'CGT* پس از تکثیر از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی، به ترتیب در ناقل‌های pCAMBIA1304 و pBI121، مابین پیشبرنده CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS همسانه‌سازی گردید و با همدیگر پس از تأیید آزمون کلونی PCR به آگروباکتریوم ذکر شده منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم به منظور تلقیح استفاده شد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

انتقال ژن‌های *AS1* و *4'CGT* به ریزنمونه‌های چهار رقم بنفشه آفریقایی

ریزنمونه‌های برگی و دمبرگی جدا شده از گیاهان باززایی شده چهار رقم بنفشه آفریقایی به‌صورت جدا از هم با آگروباکتریوم تلقیح شدند. به منظور تلقیح نمونه‌ها، ابتدا تک کلون از باکتری آگروباکتریوم برداشته شده و به محیط کشت باکتری (LB مایع) دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین منتقل شد. سپس یک شبانه‌روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شد. پس از رسیدن OD باکتری در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۵ تا ۰/۸، یاخته‌های‌ها را در دور ۳۰۰۰ rpm در دمای ۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب حاصل را با استفاده از محیط MS مایع به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ریز نمونه‌های برگی و دمبرگی به‌اندازه تقریبی ۱×۱ را آماده کرده و بعد از ایجاد زخم‌های سطحی روی آن‌ها، جهت آلوده‌سازی به مدت ۳۰ دقیقه در داخل این محیط رقیق شده اگروباکتریوم قرار داده شدند. بعد از تلقیح، دیسک‌های برگی و دمبرگی را روی کاغذ صافی اتوکلاو خشک نموده و سپس به محیط هم‌کشتی منتقل شدند و در دمای ۲۴ ±۱°C در تاریکی به مدت سه روز نگهداری شدند. در ادامه نمونه‌ها به محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند. نوساقه‌های باززایی شده به محیط کشت‌های MS جدید حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده و فاقد هورمون‌های گیاهی، انتقال داده شدند. در نهایت گیاهان پس از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های حاوی پیت ماس و پرلیت منتقل و در گلخانه تا زمان گلدهی نگهداری شدند.

آغازگرهای استفاده شده و شرایط PCR

برای طراحی آغازگرها از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای توالی ژن *AS1* با توجه به توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Nco* I و *Bst*E II در ناقل pCAMBIA1304 و ژن *4'CGT* با توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Sac* I و *Bam*H I در ناقل pBI121 از نرم‌افزار Oligo 7 استفاده شد. عدم تشکیل حلقه و تشکیل دو رشته‌ای از این آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. توالی آغازگرها عبارت‌اند از:

آغازگرهای پیشرو ژن *AS1*: 5′-GGCCATGGATGTTCAAAAATCCTAATATC -3′

آغازگرهای معکوس ژن *AS1* : 5′-GGGGTTACCTTAGCCATCAAGCTCAATCTT -3′

آغازگرهای پیشرو ژن *4'CGT* : 5′-GGGGATCCATGGGAGAAGAATACAAGAAA-3′

آغازگرهای معکوس ژن *4'CGT*: 5′- GGGAGCTCTTAACGAGTGACCGAGTTGAT-3′

برای تکثیر ژن‌ها ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس واسرشته‌سازی، اتصال و طویل شدن به ترتیب در درجه حرارت‌های ۹۴ و ۶۰ درجه سلسیوس هر کدام به مدت یک دقیقه و طویل شدن در درجه حرارت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه در ۳۵ سیکل انجام شد و در نهایت طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت.

واکاوی آماری

طرح آزمایشی برای تعیین غلظت‌های مناسب هورمون در محیط کشت و همچنین تعیین مناسب‌ترین ریزنمونه برای تولید شاخساره به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. در هر تکرار آزمایشی ۱۲ ریزنمونه قرار داده‌شده بودند. میزان شاخه‌زایی مستقیم بعد از ۳ هفته برای ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف محاسبه شد. با استفاده از تجزیه واریانس معنی‌داری اثرات اصلی ترکیب‌های هورمونی و برهمکنش آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.00 انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار (Microsoft Office 2013) رسم گردیدند.

نتایج

بررسی اثر NAA در ترکیب با BAP بر میزان تولید شاخساره

با توجه به نتیجه‌های آزمایش‌های باززایی مستقیم برای تولید شاخساره مشخص شد که ریزنمونه برگ در هر چهار رقم گیاه بنفشه آفریقای مناسب‌ترین ریزنمونه بود و سرعت رشد و میزان باززایی بالاتری نسبت به بقیه ریزنمونه‌ها داشت (داده‌ها

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

آورده نشده‌اند). نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان داد (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است) که در این بررسی اثر NAA بر میزان تولید شاخساره از ریز نمونه برگ در سطح احتمال (P≤۰/۰۱) معنی‌دار بود و بین سطوح مختلف BAP به تنهایی اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

نتیجه‌های مقایسه میانگین نشان داد که ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP همراه با غلظت صفر NAA بالاترین میانگین شاخساره (۶/۷۵ سانتی‌متر) را به همراه داشت (شکل ۱). بنابراین با حضور BAP میزان تأثیر NAA بر میزان تولید شاخساره به نحو قابل‌توجهی تغییر کرد. به‌طوری که با حضور و افزایش غلظت NAA، در هر دو سطح از BAP، از میزان تولید شاخساره به مقدار کمی کاسته شد. در غلظت‌های پایین NAA (صفر، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش BAP از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش تعداد شاخساره شد. مقایسه میانگین سطوح NAA مشخص نمود که حضور و افزایش میزان NAA موجب کاهش تولید شاخساره شده و استفاده از آن در تکثیر بنفشه آفریقایی از لحاظ اقتصادی و عملکردی مقرون به صرفه نمی‌باشد و توصیه نمی‌شود؛ بنابراین با توجه به شکل ۱، ترکیب تیماری NAA صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP مناسب‌ترین محیط برای تکثیر شاخساره تعیین شد.

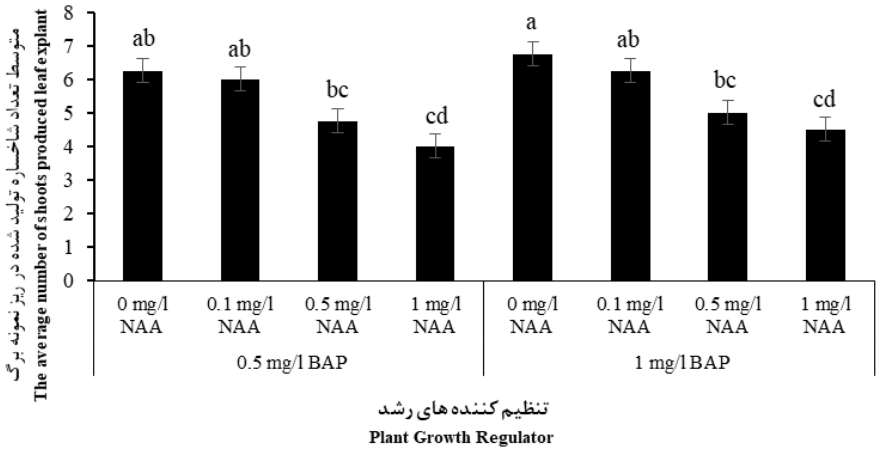

Fig. 1. Comparison of average interaction NAA and BAP treatment compounds on shoot production from leaf explants. In each column, the averages that have the same letter are not significantly different at the 5% probability level.

شکل ۱- مقایسه میانگین برهمکنش NAA و BAP بر تولید شاخساره از ریز نمونه برگ. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بررسی اثر IBA در ترکیب با BAP بر میزان تولید شاخساره

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است) نشان‌دهنده معنی‌داری اثر IBA در ترکیب با BAP بر میزان تولید شاخساره بود. نتیجه‌های مقایسه میانگین نشان داد (شکل ۲) که استفاده از غلظت‌های مختلف IBA در ترکیب با BAP موجب افزایش تولید شاخساره شد. به بیان دیگر برهمکنش IBA و BAP وجود داشته و نتیجه‌ها نشان داد که BAP به میزان ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با IBA ۱ میلی‌گرم بر لیتر اثر معنی‌داری بر میزان تولید شاخساره (به ترتیب با میانگین ۸/۵، ۱۱/۵ سانتی‌متر) داشت؛ بنابراین آنچه اهمیت دارد برهمکنش این دو تنظیم‌کننده رشد و بررسی ترکیبات تیماری حاصل از آن‌هاست. با توجه به شکل ۲، بالاترین غلظت IBA در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP نقش مثبت و افزایش‌دهنده بر تعداد شاخساره داشت. در واقع برهمکنش غلظت‌های بالاتر IBA با میزان بیشتر BAP در این پروژه نتیجه مطلوب‌تر و معنی‌داری داشته است. بنابراین استفاده از محیط کشت MS حاوی IBA یک میلی‌گرم بر لیتر به همراه BAP با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار هورمونی تعیین گردید (شکل ۳).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

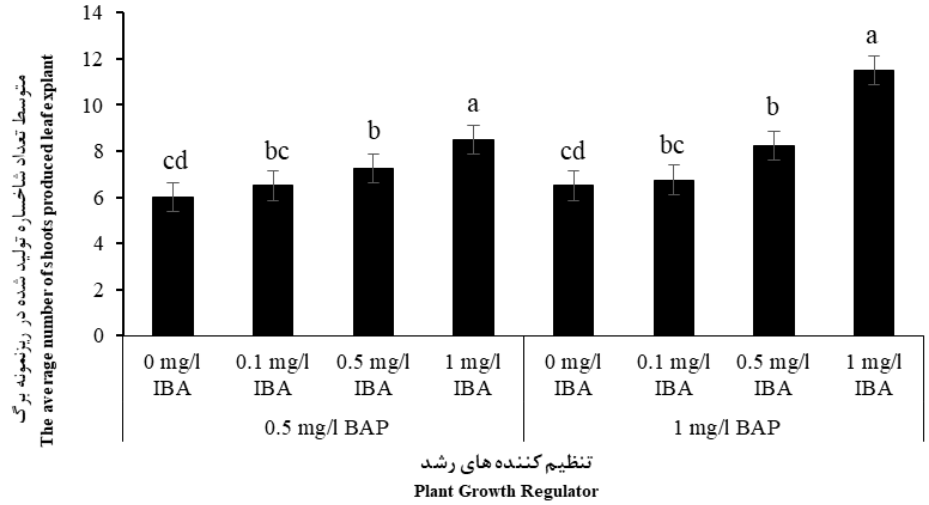

Fig. 2. Comparison of average interaction IBA and BAP treatment compounds on shoot production from leaf explants. In each column, the averages that have the same letter are not significantly different at the 5% probability level.

شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش IBA و BAP بر تولید شاخساره از ریز نمونه برگ. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

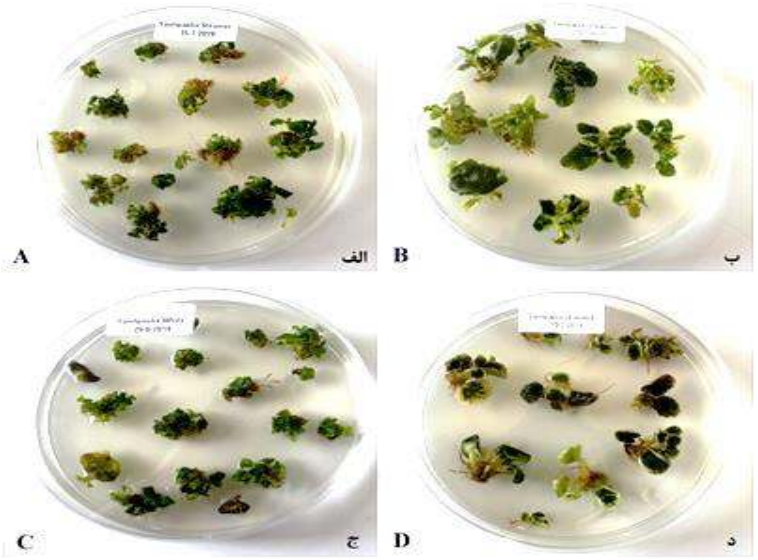

Fig. 3. Effect of IBA in combination with BAP (1 mg L^{-1}) on shoot production in all four cultivars of African violet leaf Explants. A) *Saintpaulia 'Streamer'*, B) *Saintpaulia'LE-karusel'*, C) *Saintpaulia 'Jolly Diamond'* and D) *Saintpaulia 'LE-Polina viardo'*.

شکل ۳- تأثیر IBA در ترکیب با BAP (یک میلی‌گرم بر لیتر) بر میزان تولید شاخساره در هر چهار رقم ریز نمونه برگ بنفشه آفریقایی. الف) رقم *S. 'Streamer'*، ب) رقم *S. 'LE-karusel'*، ج) رقم *S. 'Jolly Diamond'* و د) رقم *S. 'LE-Polina viardo'*

تعیین آستانه تحمل یاخته‌های‌های تراریخت به آنتی‌بیوتیک‌ها

بر اساس نتیجه‌های آزمایش مشخص شد که غلظت محیط کشت M4 (حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین+ ۷۵ میلی‌گرم هیگرومایسین بر لیتر) به‌طور کامل از پینه‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم ریز نمونه برگ و دمبرگ جلوگیری کرد. به‌طور کلی بررسی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده برای انتخاب گیاهان احتمالی تراریخته نشان داد که محیط کشت M4 یک فشار انتخابی مناسب ایجاد می‌کند. غلظت محیط کشت M4، M5 و M6 به‌طور کامل باعث مرگ و میر ریزنمونه‌ها و

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

مانع از باززایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی شد، درحالی‌که در غلظت M1، M2 و M3 به ترتیب ۱۰۰، ۹۵ و ۹۰ درصد باززایی مشاهده شد و به‌طور کامل مؤثری از باززایی شاخه جلوگیری نشد (جدول ۲)؛ بنابراین استفاده از محیط کشت M4 (MS حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین+ ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین) به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار هورمونی جهت تلقیح ریزنمونه برگ و دمبرگ تعیین گردید (شکل ۴).

جدول ۲- میزان درصد مرگ و میر ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ تحت غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت.

Table 2. Percentage of mortality of explants under different concentrations of antibiotics for selection of potential transgenic plants.

محیط کشت Culture medium	درصد مرگ و میر ریزنمونه‌ها Percentage of mortality of explants
M1	0
M2	5 c
M3	10 ab
M4	100 a
M5	100 a
M6	100 a

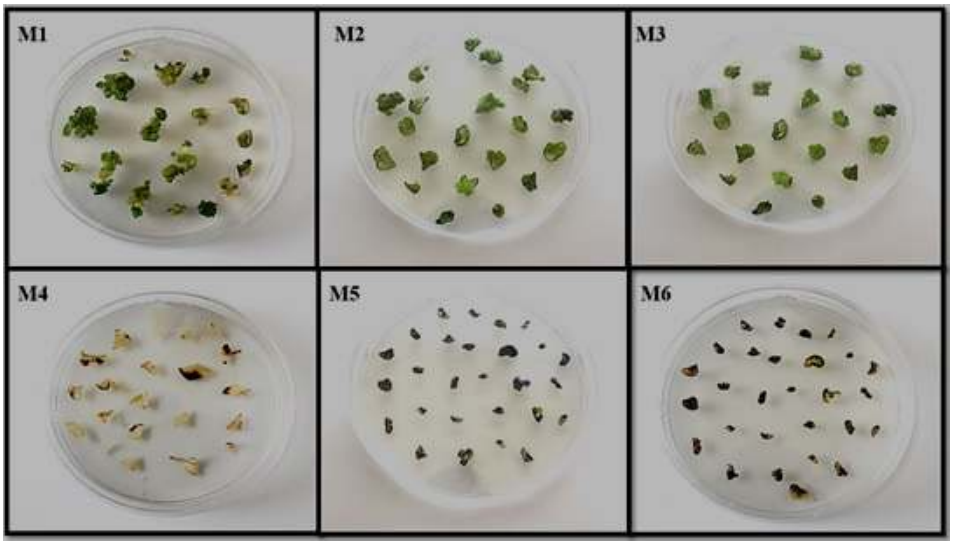

Fig. 4. Study of the results of different concentrations of antibiotics (Kanamycin and Hygromycin) in African violet leaf and petiole explants.

شکل ۴- مطالعه نتیجه‌های غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک‌های (کانامایسین و هیگرومایسین) در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ بنفشه آفریقایی.

انتقال ژن‌های *AS1* و *4'CGT* به ریزنمونه‌های چهار رقم بنفشه آفریقایی

پس از آلوده‌سازی ریزنمونه‌های برگی و دمبرگی چهار رقم بنفشه آفریقایی با آگروباکتریوم حاوی ژن‌های *AS1* و *4'CGT*، ابتدا نمونه‌ها به محیط هم‌کشتی بدون هورمون منتقل شدند. بر اساس نتیجه‌های حاصل از آزمایش مشخص گردید که نگهداری محیط‌های کشت هم‌کشتی در شرایط تاریکی یا روشنایی به مدت ۳ روز تفاوت چندانی از لحاظ تولید نوساقه‌های تراریخته نداشتند. بعد از ۷۲ ساعت هم‌کشتی، نمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و IBA، آنتی بیوتیک ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین+ ۷۵ میلی‌گرم هیگرومایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. یک ماه بعد از انتقال نمونه‌ها به محیط‌های هورمون‌دار، نمونه‌ها متورم و اندازه آن‌ها کمی بزرگ‌تر شد و بخش‌هایی از برگ و دمبرگ که ژن انتخاب‌گر را دریافت نکرده بودند شروع به زرد شدن کردند. قسمت‌های غیرتراریخته از بین رفتند و به رنگ قهوه‌ای

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

درآمدند (شکل ۵ الف). مرگ یاخته‌های‌های برگی و دمبرگی باعث ترشح ترکیبات فنولیک به محیط رشد شده و محیط کشت‌ها زرد رنگ می‌شدند. برای جلوگیری از این ترشح، پلی وینیل پیرولیدین به محیط کشت اضافه شد. بعد از ۲ ماه نوساقه‌های تراریخته مقاوم (به آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین+کانامایسین) و هم‌چنین پینه‌های مقاوم روی برگ و دمبرگ هر چهار رقم مورد مطالعه ظاهر شدند (شکل ۵ ب). زمانی که اندازه نوساقه‌ها به حدود ۵ میلی‌لیتر رسید به محیط‌های جدید حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از حدود ۳ ماه از نتیجه‌های اولیه، گیاهچه‌های مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک مورد نظر به دست آمدند (شکل ۵ ج).

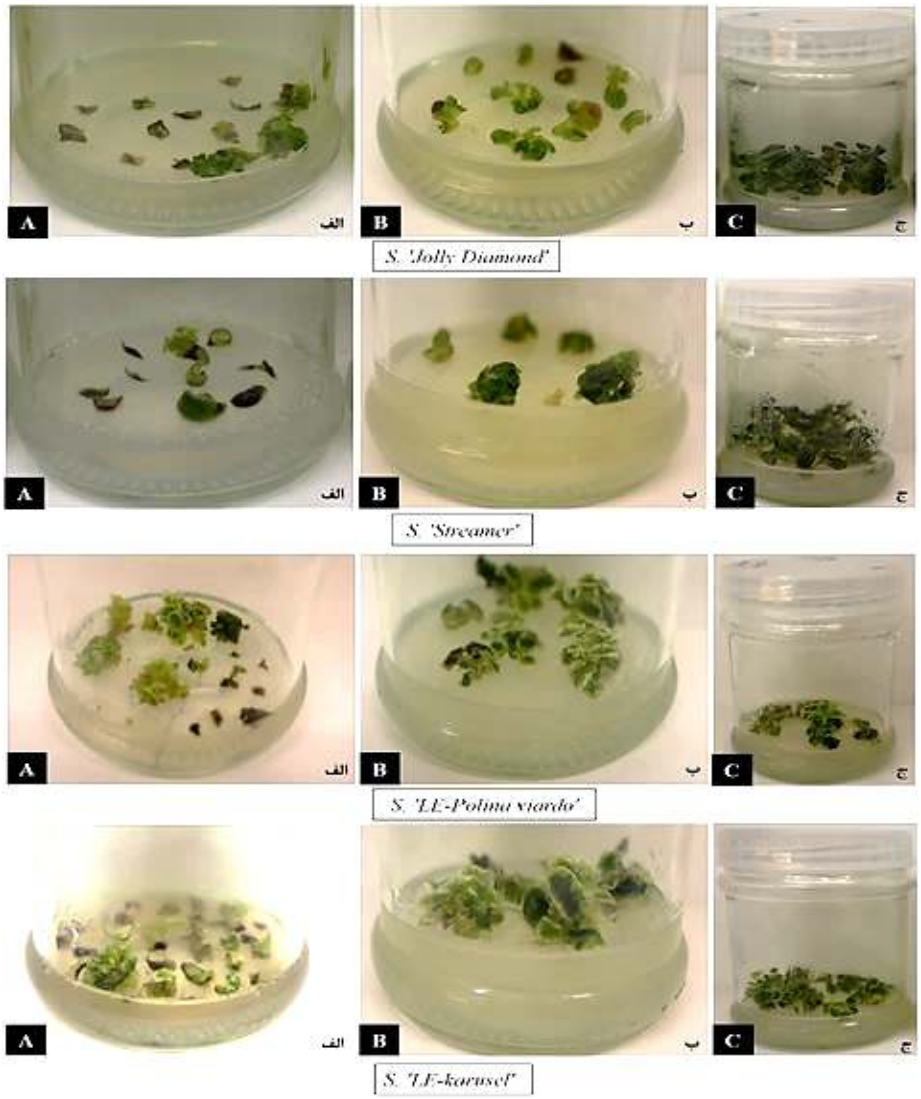

Fig. 5. Stages of tissue culture of leaf and petiole explant after inoculation with *Agrobacterium* in four African violet cultivars. A) one month after transfer of samples to hormonal environments (yellowing of leaf and petiole Explant that did not receive the desired gene, browning of non-transgenic parts of leaf and petiole Explant), B) appearance of resistant transgenic shoots (To the antibiotics Hygromycin+kanamycin) as well as calluses resistant to the leaves and petioles of all four cultivars, C) Plants resistant to both antibiotics.

شکل ۵- مراحل کشت بافت ریز نمونه برگ و دمبرگ بعد از تلقیح با آگروباکتریوم در چهار رقم بنفشه آفریقایی. الف) یک ماه بعد از انتقال نمونه‌ها به محیط‌های هورمون‌دار (زرد شدن ریز نمونه برگ و دمبرگ که ژن مورد نظر را دریافت نکرده‌اند، قهوه‌ای شدن قسمت‌های غیرتراریخت ریزنمونه برگ و دمبرگ)، ب) ظاهر شدن نوساقه‌های تراریخته مقاوم (به آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین+کانامایسین) و هم‌چنین پینه‌های مقاوم روی برگ و دمبرگ هر چهار رقم، ج) گیاهچه‌های مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

واکاوی مولکولی گیاهان تراریخته

برای تأیید حضور و درج T-DNA حاوی ژن‌های *AS1* و *4'CGT* در ژنوم چهار رقم بنفشه آفریقایی، بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز روی گیاهان مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین+کانامایسین انجام شد. با انجام این واکنش روی DNA ژنومی استخراج شده از هر چهار رقم بنفشه آفریقایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مذکور، مشخص شد که در سه رقم بنفشه آفریقایی تراریخته (*Saintpaulia*, '*LE-Polina viardo*', '*LE-karusel*' & '*Streamer*') تنها یک ژن *AS1* با اندازه ۱۶۸۹ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۶). درحالی‌که در رقم (*Saintpaulia 'Jolly Diamond'*) هر دو قطعه ژنی مربوطه *AS1* و *4'CGT* به ترتیب با اندازه ۱۶۸۹ و ۱۳۷۴ تکثیر گردید؛ بنابراین این رقم بنفشه آفریقایی برای پژوهش‌های بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

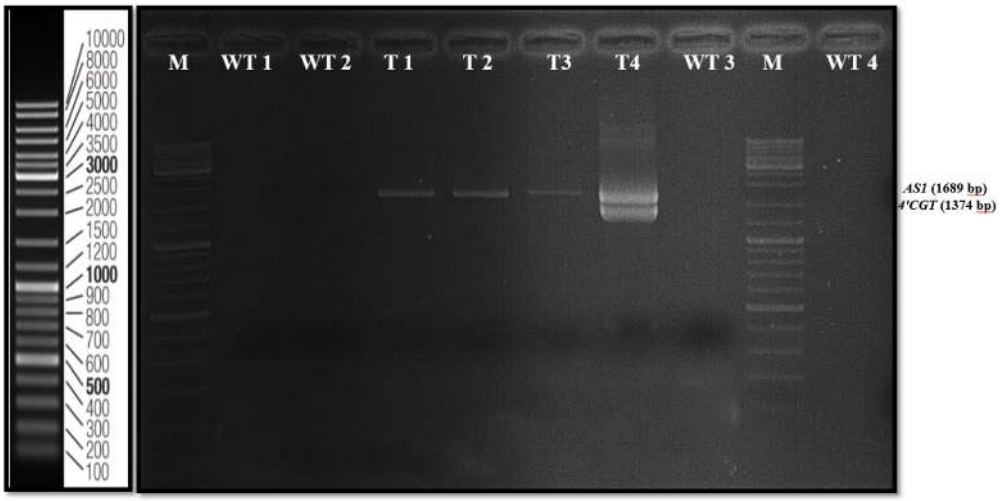

Fig. 6. Confirmation of the presence of *AS1+4'CGT* genes in four cultivars of African violet transgenic plants. M: Marker 1Kb, WT1 and T1: non-transgenic and transgenic plants of *S. Streamer*, WT2 and T2: non-transgenic and transgenic plants of *S. LE-kar*usel, WT3 and T3: non-transgenic and transgenic plants of *S. 'LE-Polina viardo*'. WT4 and T4: non-transgenic and transgenic plants of *S. Jolly Diamon*, respectively.

شکل ۶- تأیید حضور ژن‌های *4'CGT+AS1* در چهار رقم گیاهان تراریخته بنفشه آفریقایی. M: مارکر Kb ۱، WT1 و T1: به ترتیب گیاهان غیرتراریخت و تراریخت رقم *S. Streamer* ، WT2 و T2: به ترتیب گیاهان غیرتراریخت و تراریخت رقم *S. LE-karusel* ، WT3و T3: به ترتیب گیاهان غیرتراریخت و تراریخت رقم *S. LE-Polina* ، WT4 و T4: به ترتیب گیاهان غیرتراریخت و تراریخت رقم *S. Jolly Diamond*'.

بحث

در آزمایش حاضر به‌منظور تکثیر شاخساره بنفشه آفریقایی، ریزنمونه‌های برگ، مناسب‌ترین ریزنمونه در هر چهار رقم مورد مطالعه بود و سرعت رشد بالاتری نسبت به بقیه ریزنمونه‌ها داشت. بهترین محیط برای باززایی مستقیم که بالاترین میزان ارتفاع شاخساره را تولید کرد، محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. از طرف دیگر حضور BAP به تنهایی تأثیر قابل‌توجه و مثبتی بر تولید شاخساره برگ‌های بنفشه آفریقایی داشت و این تأثیر در غلظت‌های مختلف IBA و NAA متفاوت است. نتیجه‌های این پژوهش نقش موثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پاسخ ریزنمونه‌ها را مشخص کرد. نقش سیتوکینین‌ها در تحریک تقسیم یاخته‌ای، رفع درمانسی، القای تشکیل جوانه‌ی نابجا، رشد جوانه‌های جانبی و کنترل چرخه یاخته‌هایی به خوبی اثبات شده است. به‌عنوان قاعده‌های کلی به‌منظور انجام هرچه بهتر رشد، اکسین یا سیتوکینین یا هر دو با هم به محیط کشت افزوده می‌شوند، ولی نسبت مناسب اکسین به سیتوکینین به نوع گونه و ریز نمونه بستگی دارد (۲۲). شیرزادیان‌خرم‌آباد (۱۵) در پژوهشی اقدام به باززایی این گیاه از ریز قطعات برگ نمودند که بیشترین میزان تولید شاخساره در ترکیب‌های تیماری NAA با غلظت‌های ۰/۱ و صفر میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۱

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

میلی‌گرم بر لیتر از BAP، IAA صفر میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد و به‌عنوان مناسب‌ترین ترکیبات تیماری تعیین شدند. هم‌چنین گزارش دادند که BAP نقش بسزایی بر تولید شاخساره از برگ‌های بنفشه آفریقایی دارد (۱۵). پژوهش ایرانبخش و همکاران (۷) نشان داد که تنظیم‌کننده‌ی BAP به تنهایی توانایی بیشتری نسبت به NAA در افزایش تعداد شاخه و برگ‌های تشکیل شده دارد. غلظت‌های BAP (۰/۱۲ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر) بدون NAA مناسب‌ترین سطح برای اندام‌زایی در آزمایش آن‌ها بود و غلظت‌های بالای BAP و NAA بخصوص غلظت‌های بالا NAA اثر بازدارنده بر شاخساره‌زایی داشت (۷). نتیجه‌های آزمایش‌های فوق با نتیجه‌های ارائه‌شده در این مطالعه نیز مطابقت دارد.

مطالعه‌ی Hussein-Al و همکاران (۱) نشان داد، محیط MS حاوی NAA µM ۰/۵۴ و یا BA µM ۳۰ و ۲۰، ۱۰ بهترین تیمارهای مناسب برای باززایی شاخساره از ریزنمونه برگ بنفشه آفریقایی است. نتیجه‌های پژوهشی نشان داد که استفاده از غلظت‌های ۱ میلی‌گرم و بیشتر از NAA با کاسته شدن میزان وزن و تولید جوانه‌های نابجا و گیاهچه بنفشه آفریقایی همراه می‌باشد (۲۱). زبرجدی و همکاران گزارش دادند که هورمون BAP به تنهایی یا در ترکیب با NAA در گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea L.*) موجب تولید نوساقه‌های متعدد می‌گردد (۲۵) که با نتیجه‌های گزارش شده در پژوهش حاضر همسو می‌باشد. Sunpui و Kanchanapoom (۱۶) نشان دادند که محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر از BAP به تنهایی و یا به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین درصد باززایی شاخساره را در گیاه زینتی بنفشه آفریقایی دارد که با نتیجه‌های حاصله از این آزمایش تطابق نداشته و افزایش NAA نیز تأثیر بازدارنده بر شاخساره داشت. پژوهش Godo و همکاران (۵) روی قسمت‌های برگی لیسیانتوس، جنس دیگری از خانواده Gesneriaceae نیز نشان داد که بیشترین ساقه از ریزنمونه برگ در محیط حاوی غلظت کم (۲، ۰/۵ میکرومولار) از NAA القاء می‌شود. مطالعه‌ی Kaviani روی شاخساره انتهایی لیسیانتوس نشان داد که تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN بدون NAA بهترین محیط شاخساره‌سازی است؛ درحالی‌که در تیمارهای حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA، بدون KIN هیچ شاخساره‌زایی صورت نگرفت (۹).

این پژوهش اولین گزارش استفاده از دو ناقل با آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در داخل بخش منتقل شونده می‌باشد که جهت تلقیح از ریز نمونه برگ و دمبرگ استفاده شد. در بررسی غلظت‌های مختلف کانامایسین و هیگرومایسین با همدیگر برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت در این پژوهش نشان داد که مقادیر کانامایسین (۵۰) به همراه هیگرومایسین (۷۵) میلی‌گرم بر لیتر فشار انتخابی مناسبی ایجاد کردند و این سطح به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار هورمونی جهت تلقیح ریز نمونه برگ و دمبرگ تعیین گردید. رزمی و همکاران (۱۴) در پژوهشی غلظت‌های پایین هیگرومایسین ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر را مورد استفاده قرار داده بودند ؛ اما در مطالعه‌ی دیگر تقریباً مشابه با نتیجه‌های مطالعه حاضر غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین را برای فرایند انتخاب مناسب تشخیص داده بودند (۲۳). ازدیاد باکتری بر روی قطعات برگی بنفشه آفریقایی کشت‌شده در محیط هم کشتی در مقایسه با توتون بسیار با تأخیر اتفاق می‌افتد (۱۰) و وقتی این قطعات در روی محیط ساقه‌زایی قرار می‌گرفتند از ناحیه بریده شده، به‌طور آهسته شروع به قهوه‌ای شدن نموده و هیچ‌گونه باززایی مشاهده نگردیده است. این واکنش می‌تواند به دلیل پاسخ فوق حساسیت یا واکنش نکروز شدگی در مقابل استقرار آگروباکتریوم باشد یا به عبارتی به دلیل شناسایی آگروباکتریوم به‌عنوان پاتوژن گیاهی است که در مقابل آن واکنش نشان می‌دهد (۱۰). میزان غلظت‌های پایین دو آنتی‌بیوتیک با هم در پژوهش حاضر تأثیری روی ریز نمونه‌های برگ و دمبرگی نداشت، درحالی‌که غلظت‌های بالای این آنتی‌بیوتیک اثر بالعکسی داشته و باعث گردید ریزنمونه‌ها قهوه ای شده و از بین بروند.

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان بالقوه تراریخته با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در چهار رقم بنفشه آفریقایی به‌وسیله آغازگرهای اختصاصی (*AS1* و *4'CGT*) مشخص نمود که تنها رقم *Saintpaulia 'Jolly Diamond'* با گلبرگ‌های سفید هر دو قطعه ژنی مذکور را تکثیر نمودند و در بقیه رقم‌ها نیز تنها یک ژن *AS1* تأیید شد. رزمی و همکاران (۱۴) به مطالعه انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* به ناقل بیانی pCAMBIA1304 جهت نشر نور قرمز در گیاه زینتی بنفشه آفریقایی پرداختند. آنالیز PCR حضور ژن در ژنوم گیاه را تأیید کرد. هم‌چنین نتیجه‌های حاصل از سنجش لومینومتری، فعالیت آنزیم لوسیفراز را در بافت‌های برگی بعضی از گیاهان نشان داد. با نتیجه‌های این

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

مطالعه همسو گزارش شده است که ژن‌های چالکون ایزومراز[1] (*CHI*) و *DFR* از الگوی cDNA گیاه پتونیا در ناقل‌های pBI121 و pCAMBIA1304 به ترتیب کلون شدند و سپس با استفاده از هم‌کشتی (اگروباکتریوم) به گیاه توتون انتقال داده شدند. نتیجه‌های حاصل از آن گیاهان تراریخته همگوزیگوس T2 پایدار که دارای یک نسخه واحد از تراریخته‌ها بودند را نشان داد. مرحله بعدی با استفاده از یک رویکرد مولکولی، ترانسفورماتورهای T3 پایدار را به وجود آورد که الگوهای مختلفی را با توجه به رنگ گل نسبت به توتون غیرتراریخت ایجاد نمودند (۲۰).

در مطالعه‌ی به انتقال جداگانه ژن‌های درگیر بیوسنتزی آئورون در گل میمون به پتونیا با گلبرگ‌های آبی رنگ جهت تغییر رنگ گلبرگ پرداختند و نتیجه‌های واکنش مشخص نمود که ۴ عدد از ۹ گیاه تراریخته، ژن *SRY4'CGT* گل‌های آبی-سفید رنگ را نشان دادند و با گذشت زمان بخش‌های سفیدرنگ به‌تدریج افزایش یافته تا در نهایت گلبرگ‌های گل به‌طور کامل سفید شدند. آنالیزهای PCR حضور ژن *4'CGT* در ژنوم گیاه را با اندازه ۱۳۷۴ جفت بازی تأیید کرد و درحالی‌که تعداد کمی از گل‌ها یعنی تنها ۳ عدد از ۱۳ گیاه تراریخته دارای ژن *SRYAS1* در بخش‌های آبی-سفید رنگ بودند (۲۴). نتیجه‌های ذکر شده در تحقیق فوق با نتیجه‌های مطالعه حاضر همخوانی نداشت. قربانزاده و همکاران (۲۰۱۴) انتقال و بیان موقت ژن گزارشگر GUS در نمونه‌های برگی استریل گیاه زینتی بنفشه آفریقایی با روش ریزپرتابی را مورد بررسی قرار دادند که باززایی روی محیط حاوی کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. جهت افزایش فشار گزینش، گیاهان باززایی شده به محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شد. آنالیز PCR از DNA استخراج شده گیاهان تراریخته بالقوه حضور ژن Ech42را در گیاهان تأیید کرد. نتیجه‌های حاصل برای اولین بار در بنفشه آفریقایی کارایی تراریزش از قطعات برگ را نشان داد (۳) این نتیجه‌ها با تعیین تحمل آستانه ریزنمونه‌ها نیز همسو می‌باشد. براساس پژوهش تاناکا و همکاران (۱۸) انتقال موفقیت‌آمیز ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در مهم‌ترین گیاهان زینتی ازجمله ارکیده، گل داودی، گل میخک و گل رز جهت اصلاح رنگ گلبرگ‌ها گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر جهت به‌دست آوردن ترکیب تیماری مناسب برای رشد و افزایش گیاه بنفشه آفریقایی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد که با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده می‌توان پیشنهاد کرد که ریزنمونه برگ مناسب‌ترین ریزنمونه و محیط کشت BAP+IBA حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر از هرکدام از هورمون‌ها در هر چهار رقم، بهترین ترکیب بودند. بنابراین نتیجه‌های این مطالعه می‌تواند در راستای تکثیر صنعتی این گیاه زینتی محبوب مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین نتیجه‌های آزمایش نشان داد که به‌ترتیب مقدار ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و هیگرومایسین برای انتخاب گیاهان تراریخته مناسب بود. بررسی گیاهان تراریخته در سطح DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و فن PCR نشان داد که ژن‌های هدف مورد نظر تنها به یک رقم بنفشه آفریقایی پیوند خورده است و درحالی‌که در سه رقم دیگر تنها ژن *AS1* ادغام گردید. بنابراین فن باززایی مستقیم و روش انتقال ژن مطرح شده در این پژوهش می‌تواند جهت وارد کردن ژن‌های خارجی مختلف به ژنوم گیاه بنفشه آفریقایی بسیار کارا و مؤثر باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با کمک مالی شماره ۹۸۰۹۰۱ ستاد توسعه زیست‌فناوری انجام شده است. بدین‌وسیله از حمایت مالی ستاد توسعه زیست‌فناوری و همچنین از تمامی همکاران محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان که صمیمانه در اجرای این پژوهش مساعدت نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

References

1. Al-Hussein, S., R.A. Shibli and N.S. Karam. 2010. Regeneration in African violet (*Saintpaulia ionantha Wendl.*) using different leaf explants, cytokinins sources, and light regimes. Int. J. Agr. Sci. 2: 361-371.
2. Eastwood, A., B. Bytebier, H. Tye, A. Tye, A. Robertson and M. Maunder. 1998. The conservation status of *Saintpaulia*. J. Cur. Bot. Mag. Jst. 21: 462–471.

۱- Chalcone Isomerase

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

3. Ghorbanzade, Z. and M. Ahmadabadi. 2014. An improved system for rapid *In vitro* regeneration of *Saintpaulia ionantha*. J. Plant. Tiss. Cul. Bio. 1: 37-45 (In Persian).
4. Grout, B. 1990. African violet. Handbook of plant cell culture. 15: 181-205.
5. Godo, T., Y. Lu and M. Mii. 2010. Micropropagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim (Gesneriaceae). In Protocols for *In vitro* Propagation of Ornamental Plants. Humana Press. 127-139.
6. Hoshino, A., T. Mizuno, K. Shimizu, S. Mori, S. Fukada-Tanaka, K. Furukawa, K. Ishiguro, Y. Tanaka and S. Iida. 2019. Generation of Yellow Flowers of the *Japanese Morning Glory* by Engineering Its Flavonoid Biosynthetic Pathway toward Aurones. J. Plant. Cell. Phy. 60(8):1871-1879.
7. Iranbakhsh, A., M. Ebadi and M.M. Hamidi. 2009. The Semi-Industrial proliferation of of *Saintpaulia ionantha* Wendl by micro propagation method. J. Dev. Bio. 1 :1-10 (In Persian).
8. IUCN, 2014. SSC East African Plants Red List Authority. *Saintpaulia ionantha*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T158153A763135 (http://dx.doi.org/10.2305/ IUCN.UK.2014-1.RLTS.T158153A763135.en., last accessed: 30 March, 2017).
9. Kaviani, B. 2014. Micropropagation of ten weeks (*matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (KIN), naphthalene acetic acid (NAA) and 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D). J. Act. Sci. Pol-Hor. Cul. 13: 141-154.
10. Kushikawa, S., Y. Hoshino and M. Mii. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. J. Plant. Sci. 161: 953–960.
11. Miranto, M. 2006. Living collections of botanic gardens as a means of ex situ conservation: A case study of African Violets (*Saintpaulia*) in Europe .
12. Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. J. Fron. plant. Tiss. Cul. 15- 26.
13. Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. J. Pro. Nati. Aca. Sci. 103: 11075-11080.
14. Razmi, A., M. Jalali Javaran and S. Hosseinkhani S. 2013. Transformation of iranian firefly Lampyris turkestanicus luciferase gene with red emitting light into African violet plant. J. Cell. Mol. Res. 26: 314-325 (In Persian).
15. Shirzadian-khorramabad, R. and F. Taghipour. 2019. Assessment of hormonal effects on test tube micropropagation of *Saintpaulia 'Pretty Miss Kelly'* using micro leaf segments. J. Plant. Res. 32: 166-176 (In Persian).
16. Sunpui, W. and K. Kanchanapoom. 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *In vitro*. J. Sci. Tech. 24: 357-364.
17. Tatsuzawa, F. and M. Hosokawa. 2016. Flower colors and their anthocyanins in *Saintpaulia* cultivars (Gesneriaceae). J. Hort. 85: 63–69.
18. Tanaka, Y., N. Sasaki and A. Ohmiya. 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. J. Plant. 54: 733–749.
19. The plant List. 2017. *Saintpaulia*. http://www. The plant list. org/tpl1.1/search?q= *Saintpaulia*.
20. To, K.-Y. and C.K. Wang. 2006. Molecular Breeding of Flower Color. J. Flori. Orna. Plant. Bio. 1: 300-310.
21. Torres K. 1988. *In vitro* Propagation of African Violets. J. Tis. Cul. Tech. Hort. Crops. 80-85.
22. Vessal, S.R. and A. Bagheri. 2004. Plant Tissue Culture Techniques. Astan Quds Razavi Publishing. 200 pp (In Persian).
23. Vinskiene, J., G. Staniene and V. Stanys. 2016. Influence of cefotaxime, kanamycin, mannose for shoot regeneration of African violet (*Saintpaulia ionantha*) *in vitro*. J. Sod. Darz. 35: 16–28.
24. Wang, C.K., Y.C. Chin, C.Y. Lin, P. Chen and K.Y. To. 2015. Transforming the *Snapdragon* Aurone Biosynthetic Genes into *Petunia* Alters Coloration Patterns in Transgenic Flowers. J. Adv. Biosci. Bio. 6: 702–722.
25. Zebarjadi, A.R., M.J. Motamedi, E. Taravat and A. Ismaili. 2013. Micropropagation of Medicinal Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Using Cotyledon and Hypocotyl Segments. J. Plant. Res. 26: 311-319 (In Persian).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 22 (2): 237-248 (2021)
Research article

Improving the Method of *in Vitro* Regeneration and Gene Transfer to the African Violet (*Saintpaulia ionantha*)

A. Rajabi, L. Fahmideh*, M. Keykhasaber and V. Ghasemi Omran*[1]

African violet is a commercial ornamental plant with various colors. For direct regeneration, in the first experiment, the effect of leaf, node, petiole, root, petal and sepal explants of four African violet cultivars were evaluated on MS medium containing different concentrations of NAA+BAP and IBA+BAP hormones, which was performed as a factorial in a completely randomized design. In the second experiment, the tolerance threshold of leaf and petiole explants to Hygromycin and Kanamycin antibiotics was evaluated by culturing on selective media supplemented with different concentrations of given antibiotics. After determining the suitable concentrations of the antibiotics for selective medium, the transformation of *AS1* and *4'CGT* genes was conducted with *Agrobacterium LBA4404* strain containing pCAMBIA1304 and pBI121 plasmids, respectively. PCR method was used for the detection of transgenic plants. First experiment revealed that the leaf explant was the best sample and MS medium containing 1 mg L^{-1} IBA+1 mg L^{-1} BAP was the best combination for *in vitro* regeneration of all genotypes. The results of the second experiment showed that the M4 medium (containing 50 and 75 mg L^{-1} Kanamycin and Hygromycin, respectively) completely inhibited the regeneration of non-transformed samples. Finally, transgenic plants were selected using PCR with specific primers for transferred genes.

Keywords: African violet, Explants, Genetic manipulation, Directs branching, Tissue culture.

1. Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources and University of Zabol, Assistant Professor, Department of Plant Pathology, University of Zabol and Assistant professor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture Science and Natural Resources, Sari, Iran, respectively.
*Corresponding authors, Email: (l.fahmideh@gau.ac.ir & ghasemiomran@yahoo.com)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.2.3.6]