گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۰)، ۶(۲): ۱۴۷-۱۶۴
مقاله پژوهشی
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147

اثر نوع محیط مایه‌زنی در انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn) برای ایجاد مقاومت به بیماری قارچی *Fusarium solani*

محمد مهدی فخرائی[۱]، علیرضا مطلبی آذر[۱*]، حسن صالحی[۲]، ناصر مهنا[۱]، مصطفی مطلبی[۳]

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲. بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۳. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

motallebiazar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۰، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱

چکیده

لیسیانتوس در رده ده گل برتر دنیا می‌باشد و در سال ۲۰۱۷ رتبه پنجم صادرات و فروش گیاهان زینتی دنیا را به خود اختصاص داده است. ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی به‌ویژه فوزاریوم از مهم‌ترین هدف‌های بهنژادی لیسیانتوس می‌باشد. کارهای کمی در مورد بهنژادی برای مقاومت به بیماری‌های قارچی در این گیاه زینتی صورت گرفته است؛ از این رو انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس دستاورد بزرگی در رسیدن به این مهم خواهد بود. انتقال و بیان ژن کیتیناز در گیاهان سطوح بالای مقاومت به آلودگی قارچی و تاخیر در بروز نشانه‌های بیماری را در زمان رویارویی با بیمارگرهای قارچی باعث می‌شود. پژوهشگران ثابت کرده‌اند که فعالیت کیتیناز کایمری در تخریب دیواره‌های قارچ‌ها تفاوت قابل توجهی نسبت به کیتیناز *Chit42* دارد. هدف از این پژوهش انگیزش مقاومت به بیماری قارچی *Fusarium solani* در لیسیانتوس از راه انتقال ژن کیتیناز کایمری با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* بود. در این پژوهش اثر انواع محیط کشت MS، ½MS و LB، دو میزان pH ۵/۲ و ۵/۸ و همچنین سوکروز با غلظت‌های ۳۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر و مالتوز ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر، در محیط مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار B شامل محیط مایه زنی MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز با pH=۵/۲ بهترین پاسخ را در انتقال این ژن به لیسیانتوس داد و در کنار محیط گزینشی سرسخت‌تر دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین با میانگین باززایی ۱۱/۱۳ گیاهچه از هر قطعه برگ به‌طور معنی‌داری برتر از سایر تیمارها بود. نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS نسبت به محیط کشت LB در محیط مایه زنی انتقال ژن به لیسیانتوس کارآمدتر است و کاهش pH و تغییر منبع کربوهیدارت از سوکروز به مالتوز در محیط مایه زنی کارایی تراریختی این گیاه را افزایش داد. در این پژوهش در طی انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس در محیط گزینشی سرسخت‌تر، شمار ۴۷۱ گیاهچه از ۴۵ قطعه برگ، ایجاد شد و از شمار ۲۱ گیاهچه و لاین به‌طور تصادفی گزینش شده، شمار ۱۰ لاین به آزمون PCR و ۸ لاین به آزمون زیست‌سنجی پاسخ مثبت نشان دادند. این نخستین گزارش انتقال ژن کیتیناز کایمری در لیسیانتوس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، زیست‌سنجی، فوزاریوم، لاین تراریخته، مقاومت به بیماری قارچی.

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

مقدمه

لیسیانتوس[۱] گیاهی چند ساله، علفی و زینتی و از تیره Gentianaceae و بومی نواحی گرم جنوب آمریکا و شمال مکزیک است (Halevy AH, 1984; Semeniuk and Griesbach, 1987; Wang *et al*., 2020). این گل در رده ده گل برتر دنیا می‌باشد و یکی از محبوب‌ترین گل‌های بریدنی ژاپن است که در سال ۲۰۱۷ رتبه پنجم گیاهان زینتی دنیا را به خود اختصاص داده است (Harbaugh, 2006; Kuronuma, Ando, *et al*., 2020; Kuronuma, Kinoshita, *et al*., 2020). از سال ۱۹۸۷ تاکنون بررسی‌های فراوانی در مورد انواع روش‌های کشت درون شیشه‌ای لیسیانتوس از جمله ریزافزایی، کشت بافت، رویان‌زایی بدنی، تولید بذر مصنوعی و کشت تک‌گان صورت گرفته است که این نشانه از اهمیت این موضوع می‌باشد (Semeniuk and Griesbach, 1987). در کارهای پیشین ما برای نخستین بار در دنیا انگیزش تک‌گانی و نرزایی لیسیانتوس از راه کشت ریزهاگ گزارش شد (Fakhraei *et al*., 2014a, 2014b).

بهنژادی گیاه لیسیانتوس در آینده متمرکز بر بهنژادی کلاسیک و زیست فناوری[۲] روی مقاومت به بیماری (به ویژه فوزاریوم[۳])، ایجاد ارقام متحمل به گرما و روز خنثی، زود گلدهی، بقا و ماندگاری گیاهچه پس از انتقال خواهد بود. با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در بهنژادی گیاه لیسیانتوس صورت گرفته است، پیشرفت اساسی در زمینه ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی در این گیاه زینتی با ارزش اقتصادی انجام نشده است. لیسیانتوس مستعد سه نوع بیماری فوزاریومی پوسیدگی ریشه، طوقه و ساقه می‌باشد (Harbaugh, 2006) که گونه‌های *Fusarium avenaceum* و *F. oxysporum* خسارات فراوانی برای پرورش‌دهندگان لیسیانتوس به بار می‌آورند. نشاهای لیسیانتوس حساسیت بسیار فراوانی به *F. solani* دارند (McGovern, 2018). بهنژادی لیسیانتوس برای دستیابی به ارقام مقاوم به فوزاریوم، مشکل‌های تولید آن را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. از مهم‌ترین چشم اندازهای بهنژادی لیسیانتوس انگیزش مقاومت به بیماری‌ها (به‌ویژه بیمارهای قارچی) است (Harbaugh, 2006). عامل بیماری‌زای *F. solani* می تواند به بذر، دانهال و گیاه بالغ لیسیانتوس حمله کند. نشانه‌های آغازین *F. solani*، قهوه‌ای شدن نواحی فرو رفته ساقه در خاک می‌باشد و در ادامه پوسیدگی به سیستم ریشه گسترش یافته و گیاه پژمرده می‌شود و در پایان می‌میرد. در شرایط با رطوبت بالا شکل جنسی *F. solani*، با نام *Haematonectria haematococca* ممکن است روی ساقه دیده شود. دمای بهینه برای فعالیت و رشد *F. solani*، ۲۸ درجه سلسیوس می‌باشد (McGovern, 2018). جدایه اختصاصی فوزاریوم برای گیاه لیسیانتوس با نام *F. oxysporum* f. sp. *eustomae* و جدایه *F. solani* تهدید مهمی برای تولید لیسیانتوس در چین، ایتالیا و ژاپن به‌شمار می‌آید.(Bertoldo *et al*., 2015; Gilardi and Gullino, 2006; Hahm, 1998; Tomioka *et al*., 2011) پوسیدگی ریشه ناشی از *F. solani* مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری لیسیانتوس است که در ژاپن و سراسر دنیا باعث مرگ‌ومیر جدی این گیاه می‌شود؛ با این حال بررسی‌های کمی برای ایجاد مقاومت به این بیماری در این گیاه شده است (Onozaki *et al*., 2020). نشان داده شده است که گیاهان تراریخته با بیان ساختاری کیتیناز، سطوح بالای مقاومت به آلودگی قارچی و تاخیر در بروز نشانه‌های بیماری را در زمان رویارویی با بیمارگرهای قارچی نشان می‌دهند (Broglie *et al*., 1991; Grison *et al*., 1996; Jach *et al*., 1995). نخستین گزارش از جداسازی و انتقال ژن کیتیناز مربوط به گیاه توتون است که یک ژن کیتیناز

۱- *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. ۲- Biotechnology ۳- *Fusarium*

باکتریایی به‌دست آمده از باکتری خاکزی *Serratia marcescens*، به‌طور پایدار تلفیق و در برگ‌های توتون بیان گردیده است (Jones *et al*., 1988). گیاهان توتون تراریخته[1] بیان کننده گروه I کیتینازها، نسبت به قارچ بیماری‌زای *Rhizoctonia solani* مقاومت بیشتری نشان دادند و بروز نشانه های بیماری در گیاهان تراریخته به تاخیر افتاد (Broglie *et al*., 1991). Bezirganoglu و همکاران (2013) با انتقال ژن کیتیناز به طالبی[2] لاین‌های تراریخته طالبی مقاوم به بیماری‌های قارچی تولید کردند که در برابر قارچ‌های *R. solani* و *F. oxysporum* مقاوم بودند (Bezirganoglu *et al*., 2013). به‌تازگی، با انتقال ژن کیتیناز جدا شده از گیاه *Leymus chinensis* به گیاهان ذرت و تنباکو، مقاومت به تنش‌های زیوا به‌ویژه مقاومت به بیماری‌های قارچی و همچنین مقاومت به شوری در این دو گیاه به‌دست آمد (Liu *et al*., 2020). کارهای کمی در مورد بهنژادی برای مقاومت به بیماری‌های قارچی (به ویژه فوزاریوم) در لیسیانتوس صورت گرفته است (Harbaugh, 2006; Onozaki *et al*., 2020) و تا کنون انتقال ژن مقاومت به بیماری‌های قارچی به این گیاه زینتی تجاری در هیچ مقاله‌ای گزارش نشده است و در ضمن هیچ گزارشی در مورد انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس وجود ندارد. هدف از این پژوهش انگیزش مقاومت به فوزاریوم در لیسیانتوس با انتقال ژن کیتیناز کایمری با استفاده از *A. tumefaciens* بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در این پژوهش، از بذر F_1 لیسیانتوس سری Mariachi و رقم 'Mariachi Pure White' (تولید شده در شرکت Sakata ژاپن) استفاده شد. یک شبانه روز پیش از کشت، بذرها در زیر جریان آب قرار گرفتند. برای سترون‌سازی بذرها، در زیر هود لامینار از اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و در ادامه بذرها سه مرتبه با آب مقطر گندزدایی‌شده آبکشی شدند. بذرها در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) دارای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۸ گرم بر لیتر آگار با pH ۵/۸ کشت شدند و در پایان در اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۱±۲۵ قرار گرفتند.

قارچ

در این پژوهش جدایه بیمارگر *F. solani* از کلیکسیون قارچ بخش گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اهدایی دکتر بنی هاشمی تهیه شد. قارچ‌ها در محیط PDA[3] که دارای ۲۰۰ گرم بر لیتر سیب‌زمینی خرد شده، ۲۰ گرم بر لیتر دکستروز و ۱۵ گرم بر لیتر آگار بود، در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس رشد کردند.

سویه باکتری

سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* از پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه گردید. برای تکثیر *A. tumefaciens* از محیط LB (Miller, 1972) دارای ۱۰ گرم بر لیتر باکتو پپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم بر لیتر نمک طعام با pH ۷ و از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ریفامپسین به مقدار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر برای

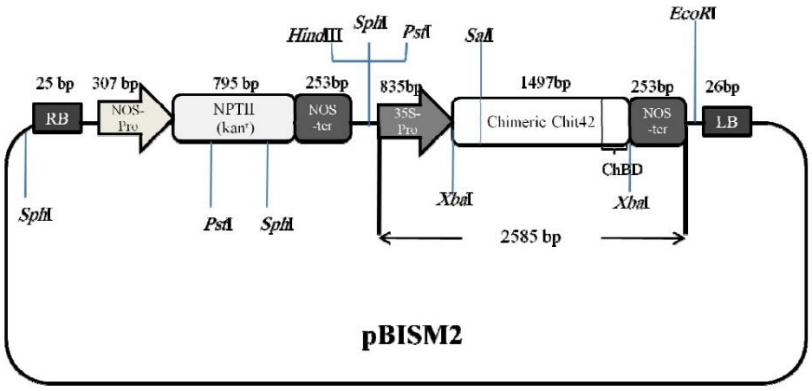
۱- Transgenic
۲- *Cucumis melo* L. var. *makuwa* cv. 'Silver Light'
۳- Potato Dextrose Agar

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

ایجاد محیط گزینشی برای باکتری‌های همگروه شده استفاده شد. تکثیر *A. tumefaciens* در طول کمتر از یک شبانه روز با دور ۱۸۰ rpm در دمای ۲۷ – ۲۸ درجه سلسیوس درون شیکر اینکوبیتور صورت گرفت.

پلاسمید و سازه ژنی (ساختار مولکولی *Agrobacterium*)

پلاسمید مورد استفاده در این پژوهش pBI121 (محصول شرکت Clontech) و یک ناقل دوتایی بود. این پلاسمید از تغییر pBin19 و بر اساس پلاسمید pRK252 با دامنه میزبانی وسیع تهیه شده است که هم در *Escherichia coli* و هم در *A. tumefaciens* قادر به تکثیر می‌باشد. این ناقل دارای دو ژن مقاومت به کانامایسین است که یکی در باکتری و دیگری در گیاه بیان می‌شود، که ژن ایجاد مقاومت نسبت به کانامایسین در گیاه تحت کنترل پیشبر و پایان‌دهنده نوپالین سینتیز[۱] (NOS) می‌باشد. نام سازه مورد استفاده pBISM2 است و دارای قطعه ژنی Chimeric *Chit42* می‌باشد که وارد ژنوم گیاه می‌شود و شامل یک کاست ژنی ۲۵۸۵ جفت باز است و اندازه ژن ۱۴۹۷ جفت باز است که جایگزین ژن گزارشگر GUS شده و تحت پیشبر دائمی CaMV35S و پایان‌دهنده NOS قرار دارد (شکل ۱). این سازه در گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری توسط دکتر محمد رضا زمانی و دکتر مصطفی مطلبی تهیه شده است.



شکل ۱- پلاسمید pBI121 دارای قطعه ژنی Chimeric *Chit42*.

Figure 1- pBI121 plasmid containing the Chimeric *Chit42* gene fragment.

بهینه‌سازی غلظت کانامایسین برای ریزنمونه‌ها

در یک آزمایش آغازین از غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین برای تعیین غلظت مناسب کانامایسین برای ریزنمونه قطعه برگ رقم 'Mariachi Pure White' لیسیانتوس در قالب طرح به‌طورکامل تصادفی با سه تکرار و چهار زیرتکرار استفاده گردید. محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۸ گرم بر لیتر آگار با pH ۵/۷ و شامل ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA)[۲] داخل پتری‌های ۸ سانتی‌متری گندزدایی شده یک‌بار مصرف ریخته شد. آنتی‌بیوتیک کانامایسین پیش از افزودن به محیط کشت با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون گندزدایی شد و در غلظت‌های بیان شده به محیط‌های کشت گزینشی افزوده شدند. سپس در اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۱±۲۵ قرار گرفتند. غلظت‌های ذکر شده کانامایسین در کشت آغازین به کار رفت و ریزنمونه‌های مورد آزمایش پس از مدت سه هفته با همان

۱- Nopaline Synthase

۲- Benzyl Adenine

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

غلظت کانامایسین به زیرکشت بعدی منتقل شدند. در پایان، پس از شش هفته ریزنمونه‌های برگ از نظر شاخص‌های رنگ‌پریدگی، زرد شدن، و سفید شدن و نبود باززایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مایه زنی

قطعه‌های ۵×۵ میلی‌متر برگ در محیط مایه زنی دارای سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* با پلاسمید دارای ژن Chimeric *Chit42* که در کشت شبانه به چگالی نوری (OD_{600nM}) ۰/۸ رسیده بودند و با دور سانتریفیوژ ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شده بودند، در چهار نوع محیط، بدون تنظیم کننده‌های رشد و آنتی‌بیوتیک، به مدت ۳۰ دقیقه مایه زنی شدند. در این پژوهش اثر چهار نوع محیط مایه زنی برای بررسی کارآمدترین نوع محیط مایه زنی، مقدار pH در محیط مایه زنی و همچنین نوع و میزان کربوهیدارت در محیط مایه زنی بر انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس با روش *Agrobacterium* در قالب طرح به‌طورکامل تصادفی با سه تکرار و ۵ زیرتکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. چهار تیمار اصلی این پژوهش شامل چهار نوع محیط مایه زنی زیر بود:

A. MS با pH ۵/۸ به‌همراه ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز

B. MS با pH ۵/۲ به‌همراه ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز

C. ½MS با pH ۵/۸ به‌همراه ۱۵ گرم بر لیتر سوکروز

D. LB دارای ۱۰ گرم بر لیتر باکتو پپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم بر لیتر نمک طعام با pH ۷

هم‌کشتی

قطعه های برگ پس از مایه زنی روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار داده شدند تا به نسبت خشک شوند. سپس قطعه های برگ به محیط هم‌کشتی MS جامد دارای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۸ گرم بر لیتر آگار با pH ۵/۷ و شامل ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین در شرایط به طور کامل تاریک و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند.

شستشو و کشت برگ در محیط گزینشی

پس از گذشت سه روز از هم‌کشتی، قطعه های برگ با محیط شستشو MS مایع دارای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز با pH ۵/۷ به همراه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس سه مرتبه با آب مقطر گندزدایی شده آبکشی شدند و پس از آن قطعه های برگ روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار داده شدند تا کمی رطوبت آن گرفته شود.

در ادامه قطعه های برگ به محیط گزینشی انگیزش شاخساره MS جامد دارای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۸ گرم بر لیتر آگار با pH ۵/۷ و شامل ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین به همراه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم انتقال داده شدند و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس در اتاق رشد نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار در محیط مشابه زیرکشت شدند. شاخساره‌ها پس سه تا چهار هفته شروع به رشد کردند. شاخساره‌ها پس کشت در محیط گزینشی آغازین (دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین)، دو زیرکشت در محیط گزینشی آغازین (دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین)، یک زیرکشت در محیط گزینشی سرسخت (دارای ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین) و یک زیرکشت در محیط گزینشی سرسخت‌تر (دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین)، به محیط بدون BA و

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم و با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید[۱] (GA_3) منتقل شدند. شاخساره‌ها در پایان به محیط ریشه‌زایی دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید[۲] (NAA) انتقال پیدا کردند.

استخراج DNA ژنومی گیاه و PCR

استخراج ژنومی گیاه با استفاده از کیت Sinaclon Plant DNA Extraction Kit.50T-EX6131 انجام شد. برای تایید وجود ژن Chimeric *Chit42* از دو آغازگر ویژه استفاده شد. آغازگر پیش‌رو (1F24) '5'–TGCCTACGCCGATTATCAGAAGCA-3' و آغازگر پس‌رو (163R24) '5'–CTTCAAGTTGCGGTTGGCCTTCTT-3' بود، که نتیجه PCR با این جفت آغازگر ایجاد قطعه‌ای به طول حدود ۱۸۶ جفت باز می‌باشد. واکنش چرخه پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[۳] (ساخت شرکت Bio-Rad کشور آمریکا) با ترکیبات واکنش آغازگر پیش‌رو ۱/۲۵ میکرولیتر، آغازگر پس‌رو ۱/۲۵ میکرولیتر، آب ۶ میکرولیتر، DNA ۴ میکرولیتر و مسترمیکس ۱۲/۵ میکرولیتر بود که در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط بهینه برای واکنش چرخه پلیمراز بر اساس برنامه واسرشت آغازین به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه ۶۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه ۷۲ درجه سلسیوس و در پایان ۷ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای تکثیر پایانی تنظیم گردید. پس از پایان چرخه پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر، ۶ میکرومول از محصول چرخه پلیمراز در ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگزاری شد و الکتروفورز (دستگاه ساخت شرکت Major Science کشور آمریکا) گردید.

زیست‌سنجی[۴]

برای ارزیابی واکنش لاین‌های تراریخته به بیمارگر قارچی، از مقایسه لاین‌های تراریخته با گیاهچه‌های شاهد با آزمون زیست‌سنجی به روش غیر تهاجمی ولی مستقیم استفاده گردید. در این آزمون از جدایه بیمارگر *F. solani* که ده روز پیش روی محیط PDA کشت شده بود، به عنوان بیمارگر استفاده شد. پتری دارای محیط کشت MS را به دو نیم و روی خط میانی یک برش ۱/۵ سانتی‌متری به عرض یک میلی‌متر از جدایه بیمارگر *F. solani* قرار داده شد. در پایین پتری برگ جوان گیاهچه غیرتراریخته به‌عنوان شاهد (کنترل منفی) و در بالای پتری برگ جوان لاین‌های تراریخته که تقریبا هم اندازه برگ گیاهچه شاهد بودند، در شرایط کاملا گندزدایی شده و زیر هود لامینار قرار داده شد و در پتری‌ها با پارافیلم بسته شد تا شرایط کاملا گندزدایی شده با رطوبت بالا فراهم گردد. سپس در شرایط مناسب زنده‌مانی قطعه های برگ و رشد جدایه بیمارگر در اتاق رشد و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پتری‌ها و برگ‌های مایه‌زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفت تا این که پس از دو هفته جدایه بیمارگر *F. solani* بیشتر پتری‌ها و سطح برگ‌ها را فرا گرفت و ارزیابی مقاومت لاین‌های تراریخته بر اساس گسترش نشانه های ناشی از آلودگی قارچی و میزان نکروز ایجاد شده مشخص گردید.

واکاوی آماری

تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک به طور کامل تصادفی به‌صورت فاکتوریل در ۴ تیمار و با ۳ تکرار و ۵ زیرتکرار انجام شد. واکاوی داده‌ها با نرم افزار آماری SAS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و رسم نمودارها با نرم افزار GraphPad Prism 6 صورت گرفت.

۱- Gibberellic Acid ۲- Naphthaleneacetic Acid ۳- Thermocycler ۴- Bioassay

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

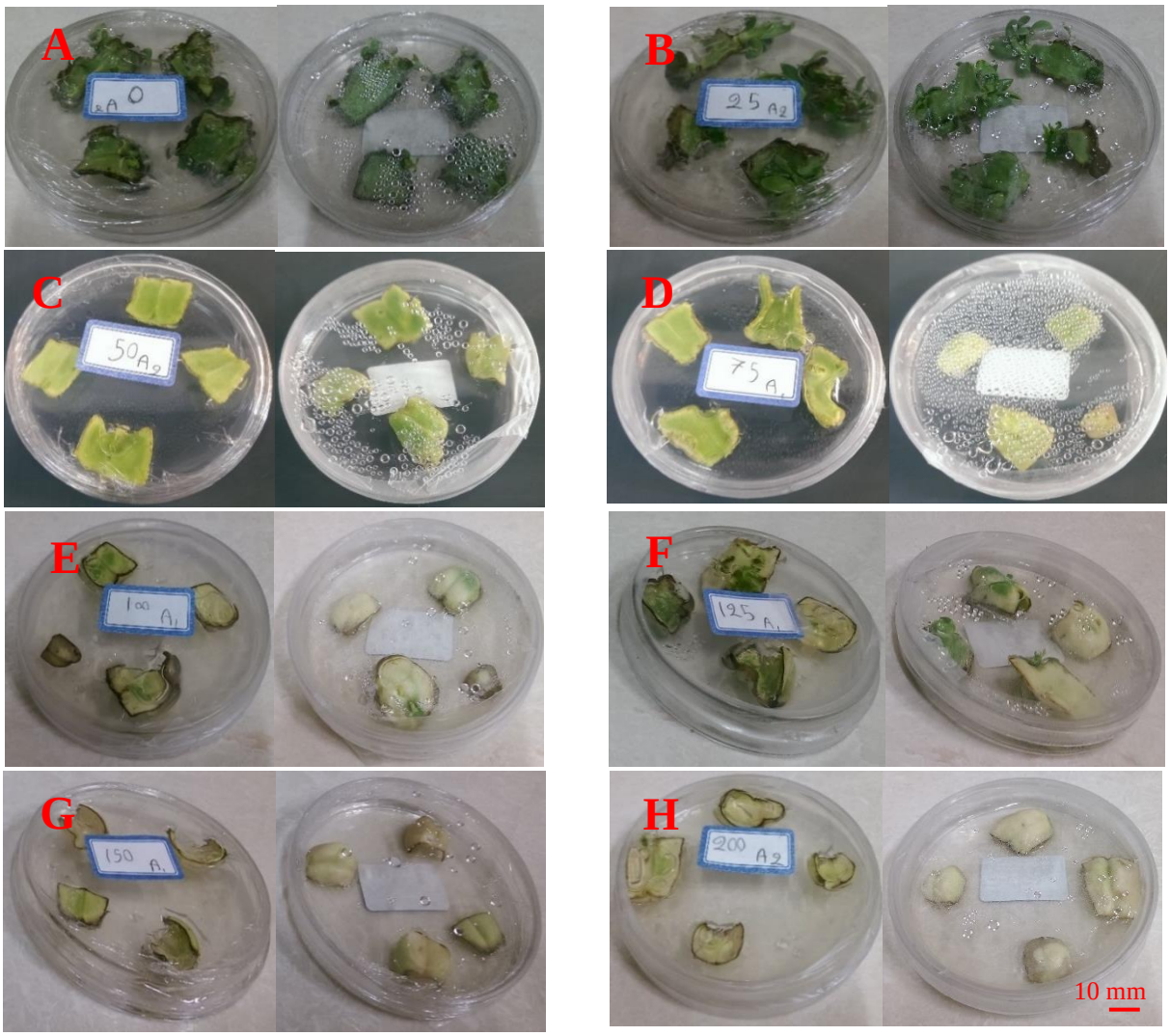
نتایج و بحث

اثر غلظت‌های متفاوت آنتی‌بیوتیک‌ها روی ریزنمونه

کارایی تولید گیاهان تراریخته رابطه مستقیمی با گزینش دقیق یاخته و بافت‌های تراریخته دارد و برای دستیابی به این گزینش دقیق، نیاز به تعیین آستانه تاثیر ژن گزینشگر گیاهی است. برای دستیابی به این هدف با توجه به این که pBI121 دارای ژن *nptII* می‌باشد و این ژن مقاومت به کانامایسین را نشان می‌دهد، اثر غلظت‌های متفاوت کانامایسین به عنوان عامل گزینشی تراریختی روی ریزنمونه قطعه های برگ مورد ارزیابی قرار گرفت. در پیش‌تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین پس از ۶ هفته تمامی قطعه های برگ مورد آزمایش سفید شدند (شکل ۲ G و H) و در اثر تیمارهای ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر شمار فراوانی از قطعه های برگ سفید و شماری هم زرد شدند و هیچ باززایی شاخساره در این سه تیمار ایجاد نگردید (شکل ۲ E و F). در اثر تیمارهای ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین قطعه های برگ زرد شدند و باززایی شاخساره در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۲ C و D). شمار شاخساره‌های باززایی شده در تیمار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین نسبت به تیمار شاهد کاهش چشم‌گیر و معنی‌داری داشت (شکل ۲ B). میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین برای محیط گزینشی آغازین استفاده شد و در زیرکشت‌های بعدی برای محیط‌های سرسخت و سرسخت‌تر به ترتیب مقادیر ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین در نظر گرفته شد.

در این آزمایش در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر قطعه های برگ هیچ باززایی نداشتند. پژوهشگران دیگر هم از غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای محیط گزینشی انتقال ژن به لیسیانتوس استفاده کرده بودند (Azuma *et al*., 2016; Bradley *et al*., 1999; Nakano, 2017; Laura Semeria *et al*., 1995;). برخی در انتقال ژن به لیسیانتوس به‌غیر از محیط گزینشی آغازین، از محیط گزینشی سخت و سرسخت‌تر استفاده کردند (Chen *et al*., 2010; Semeria *et al*., 1995). در این پژوهش در محیط گزینشی سخت، ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر و در محیط گزینشی سخت‌تر، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین به کار برده شد. سایرین به این نتیجه رسیدند که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین مانع از انگیزش و باززایی شاخساره در ریزنمونه قطعه های برگ می‌گردد؛ اما از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین در انتقال ژن به لیسیانتوس برای محیط گزینشی بهره بردند (Mercuri *et al*., 2001; Thiruvengadam and Yang, 2009). برخی در انتقال ژن‌های *NPTII* و *GUS-INT* به لیسیانتوس از محیط گزینشی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین استفاده کردند، که هم‌خوان با محیط گزینشی سرسخت‌تر در این آزمایش بود (Guan *et al*., 2014; Semeria *et al*., 1996; Thiruvengadam and Chung, 2015; Zhao Qing *et al*., 2012).

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین روی ریزنمونه قطعه های برگ لیسیانتوس.

تیمارها شامل غلظت‌های(به میلی گرم بر لیتر): A= ۰؛ B= ۲۵؛ C= ۵۰؛ D= ۷۵؛ E= ۱۰۰؛ F= ۱۲۵؛ G= ۱۵۰؛ H= ۲۰۰ از کانامایسین.

Figure 2- Effect of different concentrations of kanamycin on leaf fragment explants of lisianthus. Treatments include concentrations (in mg L^{-1}): A = 0; B = 25; C = 50; D = 75; E = 100; F = 125; G = 150; H = 200 of Kanamycin.

بررسی تاثیر نوع محیط کشت مایه زنی

در این پژوهش از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط مایه زنی استفاده نشد. ثابت شده است که استفاده از تنظیم کننده رشد BAP در انتقال ژن به *Arabidopsis thaliana* اثر منفی دارد و ۵ تا ۸ برابر از نرخ انتقال ژن می‌کاهد(Clough and Bent, 1998). همچنین آن‌ها گزارش کردند که سوکروز جزء مهمی از محیط مایه زنی است و حذف سوکروز در انتقال ژن به *Arabidopsis thaliana* کارایی انتقال ژن را به کمینه ممکن کاهش داد.

در پژوهشی، گزارش شد که سوکروز عضو حیاتی محیط مایه زنی در بهینه‌سازی بازده انتقال ژن با *Agrobacterium* می‌باشد (Curtis and Nam, 2001). پژوهشگران دیگری در انتقال ژن از راه *Agrobacterium* به لوبیا چشم بلبلی[۱]، دو نوع محیط مایه

۱- *Vigna unguiculata*

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

زنی MS و YEB[1] با هم مقایسه کردند؛ که محیط مایه زنی MS کارایی بیشتری نسبت به محیط مایه زنی YEB داشت (Adesoye *et al*., 2010).

همچنین، شمار شاخساره‌های باززایی شده در کنار محیط گزینشی سرسخت‌تر دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار A محیط مایه زنی دارای MS با pH ۵/۸ به همراه ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز بود و به‌طور متوسط ۹/۱۳ شاخساره از هر قطعه برگ به باززایی شدند (شکل ۳).

در بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته در انتقال ژن به لیسیانتوس از این محیط مایه زنی استفاده گردید (Azuma et al., 2016; Mercuri et al., 2001; Nakano, 2017; Semeria et al., 1996; Zhao Qing et al., 2012). در این پژوهش، این نوع محیط مایه زنی، باززایی شاخساره‌ها به شمار فراوانی را در انتقال ژن به لیسیانتوس در پی داشت و دومین تیمار اثر بخش از بین چهار تیمار مورد ارزیابی بود (شکل ۳). در تیمار B در محیط مایه زنی به جای ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، از ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز استفاده شده بود و همچنین میزان pH محیط مایه زنی از ۵/۸ به ۵/۲ کاهش یافت و به‌طور متوسط ۱۱/۱۳ شاخساره از هر قطعه برگ باززایی شد که برترین تیمار محیط مایه زنی از بین چهار تیمار مورد آزمایش بود (شکل ۳). افزودن قندهایی مانند سوکروز و مالتوز به محیط کشت مایه زنی برای انتقال T-DNA ضروری است (Pérez-Piñeiro *et al*., 2012). در پژوهش دیگری، مشابه این پژوهش از ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز در محیط مایه زنی انتقال ژن به گوجه‌فرنگی استفاده شد (Bhupendra *et al*., 2014).

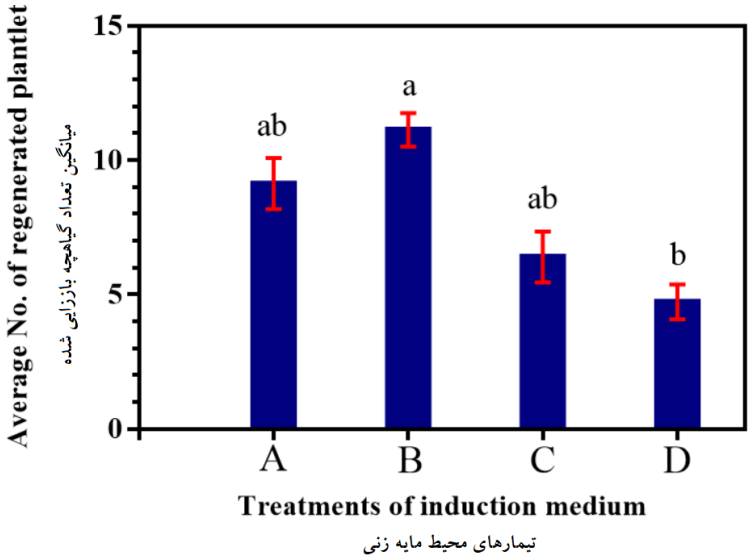
میزان pH محیط مایه زنی اثر حیاتی روی ویژگی تهاجمی و بیماری‌زایی *Agrobacterium* دارد (Vernade *et al*., 1988). کاهش pH محیط مایه زنی به ۵/۲، می‌تواند انتقال T-DNA از باکتری‌ها به ژنوم گیاه را بهبود بخشد (Mantis and Winans, 1992). بهترین میزان pH در انتقال ژن به گوجه فرنگی ۵/۲ توصیه شده است (Gao *et al*., 2009)؛ که نتایج ما با یافته‌های آن‌ها همسو می‌باشد. بین انگیزش ژن‌های *vir* و میزان pH وابستگی شدیدی وجود دارد و با کاهش pH محیط میزان انگیزش ژن‌های *vir* فراوان می‌شود (Rai *et al*., 2012).

در تیمار C محیط مایه زنی دارای ½MS با pH ۵/۸ به همراه ۱۵ گرم بر لیتر سوکروز استفاده گردید و میزان ترکیبات محیط MS و میزان سوکروز در محیط مایه زنی به نصف کاهش یافت و به‌طور متوسط از هر قطعه برگ ۶/۴ شاخساره باززایی شد و این تیمار سومین تیمار از نظر شمار شاخساره باززایی شده نسبت به چهار تیمار مورد ارزیابی بود و البته تفاوت معنی‌داری با تیمار A نداشت (شکل ۳). در انتقال ژن به *Arabidopsis thaliana* از راه *Agrobacterium* برای محیط مایه زنی از محیط کشت ½MS استفاده شده و میزان سوکروز کاهش یافت که نتایج ما با یافته‌های آن‌ها همسو می‌باشد (Clough and Bent, 1998).

در تیمار D از محیط مایه زنی LB دارای ۱۰ گرم بر لیتر باکتو پپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم بر لیتر نمک طعام با pH ۷ استفاده شد و به‌طور متوسط ۷/۷۳ شاخساره از هر قطعه برگ باززایی شد. این تیمار با تفاوت معنی‌داری نسبت به سه تیمار دیگر کمترین کارایی را در انتقال ژن به لیسیانتوس داشت (شکل ۳). در انتقال ژن به گندم از راه *Agrobacterium* نیز از محیط مایه زنی LB استفاده شده که کارایی کمتری نسبت به محیط مایه زنی MS داشته است، که نتایج این پژوهش نیز تا حدودی یافته‌های آن‌ها را تایید می‌نمود (Ahmadpour *et al*., 2016).

1- Yeast Extract Broth Bacteria

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]



شکل ۳- اثر چهار نوع محیط مایه زنی در انتقال ژن مقاومت به بیماری‌های قارچی Chimeric *Chit42* به لیسیانتوس رقم 'Mariachi Pure White' در میانگین شمار گیاهچه‌های باززایی شده در محیط گزینشی سرسخت‌تر (دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین). میانگین‌های دارای حرف (حروف) مشابه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح ۱٪) تفاوت معنی‌داری ندارند. خط‌های قرمز بیانگر خطای استاندارد است.

A- MS با pH ۵/۸ به‌همراه ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز؛ B- MS با pH ۵/۲ به‌همراه ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز؛ C- ½MS با pH ۵/۸ به‌همراه ۱۵ گرم بر لیتر سوکروز؛ D- LB دارای ۱۰ گرم بر لیتر باکتو پپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم بر لیتر نمک طعام با pH ۷

Figure 3 - Effect of four types of inoculation medium on the transfer of Chimeric *Chit42* resistance gene to lisianthus cultivar 'Mariachi Pure White' on the average number of regenerated plantlets on the more stringent selection medium (containing 100 mg L^{-1} kanamycin).
Means with the same letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range test at 1% level. Red lines represent SE.
A- MS with pH 5.8 along with 30 g L^{-1} sucrose; B- MS with pH 2.5 along with 30 g L^{-1} maltose; C- ½MS with pH 5.8 along with 15 g L^{-1} sucrose; D- LB containing 10 g L^{-1} bacto-peptone, 5 g L^{-1} yeast extract and 10 g L^{-1} salt with pH 7.

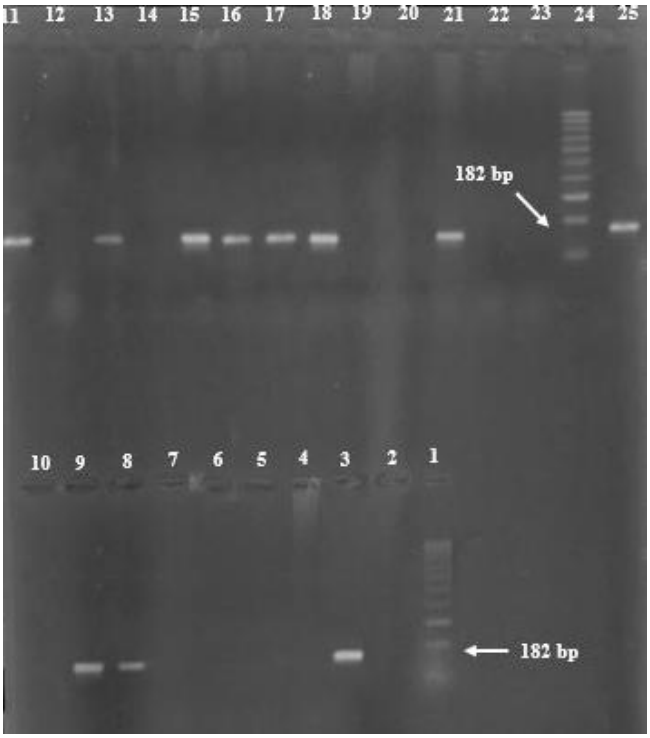
نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS نسبت به محیط کشت LB در محیط مایه زنی انتقال ژن به لیسیانتوس کارآمدتر است؛ اما به نصف رساندن ترکیب های محیط کشت و سوکروز اثر معنی داری در افزایش کارایی انتقال ژن به لیسیانتوس ندارد و همچنین تغییر سوکروز به مالتوز و کاهش میزان pH در محیط مایه زنی انتقال ژن در افزایش بازده تراریختی لیسیانتوس نقش مثبتی ایفا می‌نماید.

تایید تراریختی گیاهچه‌ها توسط آزمون PCR

پس از تایید تراریخته بودن شاخساره‌ها و گیاهچه‌ها در محیط گزینشی آغازین (دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین) و سپس در محیط گزینشی سرسخت (دارای ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین) و در پایان در محیط گزینشی سرسخت‌تر (دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین)، به طور کامل تصادفی از بین تمام تیمارها، گیاهچه‌هایی که در محیط گزینشی سرسخت‌تر باقی مانده بودند، ۲۱ لاین برای آزمون مولکولی PCR گزینش شدند. تراریخته بودن ۲۱ لاین با آزمون مولکولی PCR و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. در PCR نوار با طول ۱۸۲ bp در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی تکثیر شد

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

که در شکل ۴ نتیجه آن در ۲۱ لاین مورد ارزیابی قابل مشاهده است. DNA در شاهد (کنترل منفی) و گیاهان غیرتراریخته تکثیر نشد. از بین ۲۱ لاین، ۱۰ لاین با شماره‌های ۸، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۱ و ۲۵ به آزمون PCR پاسخ مثبت دادند (شکل ۴).



شکل ۴- تایید حضور قطعه bp ۱۸۲ حاصل از محصول PCR با استفاده از آغازگر پیش‌رو (1F24) و آغازگر پس‌رو (163R24) ژن Chimeric *Chit42* در گیاهچه‌های تراریخته.

۱ و ۲۴- Ladder؛ ۲- کنترل منفی (محصول PCR آب مقطر با آغازگرهای 1F24 و 163R24)؛ ۳- کنترل مثبت (محصول PCR تک همگروهه آگروباکتریوم تراریخته دارای پلاسمید pBI121 با آغازگرهای 1F24 و 163R24 و تکثیر قطعه bp ۱۸۲ مورد انتظار)؛ ۴ تا ۲۳ و ۲۵ – لاین‌های شماره ۱ تا ۲۰ و لاین شماره ۲۱.

Figure 4- Confirmation of the presence of 182 bp fragment from PCR product using forward primer (1F24) and reverse primer (163R24) of Chimeric *Chit42* gene in transgenic plantlets.
1 and 24- Ladder; 2- Negative control (PCR product of distilled water with primers 1F24 and 163R24); 3- Positive control (PCR product of transgenic *Agrobacterium* single colony containing plasmid pBI121 with 1F24 and 163R24 primers and expected 182 bp fragment amplification); 4 to 23 and 25- Line numbers of 1 to 20 and line number 21.

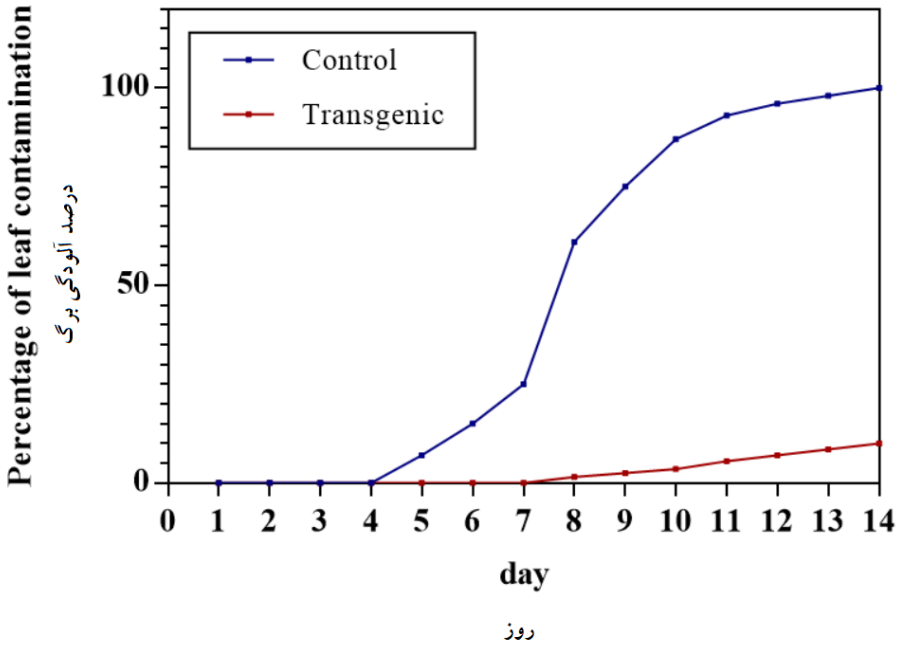
زیست‌سنجی

برای ارزیابی مقاومت گیاهچه‌ها و لاین‌های تراریخته به بیماری قارچی مورد نظر، آزمون زیست‌سنجی با استفاده از جدایه بیمارگر *F. solani* انجام گرفت. در پی آزمون زیست‌سنجی کاهش نشانه های آلودگی حاصل از *F. solani* در برگ گیاهچه‌های تراریخته دیده شد. پس از دو هفته نشانه های بیماری قارچی در اثر جدایه بیمارگر *F. solani* سراسر برگ‌ها را فرا گرفت و

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

منجر به نکروز شدن تمام برگ گیاهچه‌های غیر تراریخته گردید. برگ‌های گیاهچه‌های تراریخته عاری از نشانه های بیماری قارچی و نکروز شدن بودند یا میزان نکروز بسیار جزئی را نشان دادند.

شروع بروز نشانه های آلودگی از روز چهارم با وجود عدم گسترش قارچ در کل پتری‌دیش، روی برگ گیاهچه‌های شاهد آغاز و در پایان هفته اول شدت بیشتری گرفت، تا این که در پایان هفته دوم در تمام قسمت‌های برگ‌های شاهد قابل مشاهده بود. این در صورتی بود که برگ‌های گیاهچه‌های تراریخته تا انتهای هفته دوم کمینه نشانه های بیماری قارچی را داشتند یا میزان نکروز بسیار جزئی را نشان دادند. روند آلودگی برگ در گیاهان شاهد و گیاهان تراریخته به صورت درصد آلودگی برگ در طول ۱۴ روز آزمون زیست‌سنجی توسط جدایه بیمارگر *F. solani* در شکل ۵ دیده می‌شود.

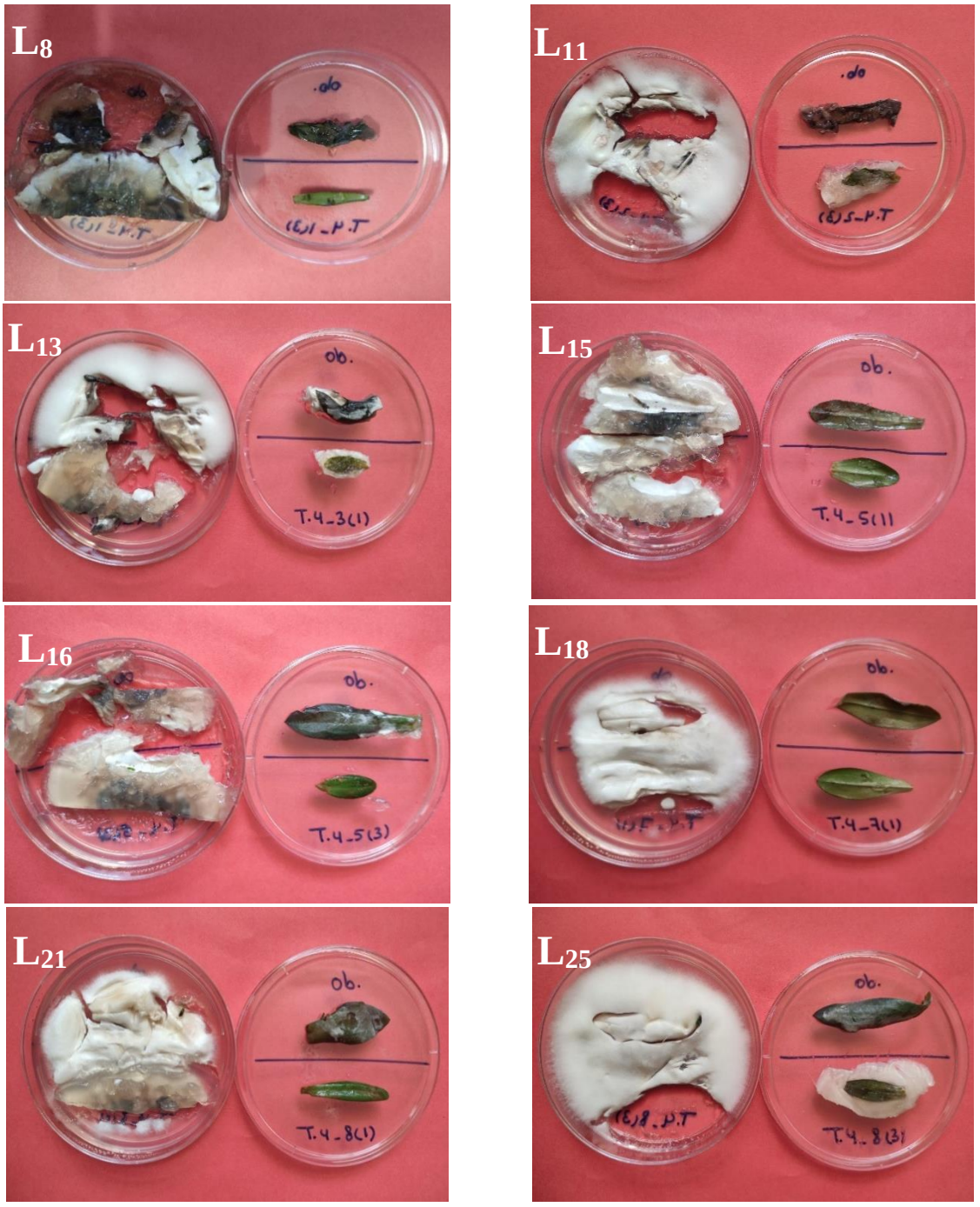


شکل ۵- درصد آلودگی برگ لیسیانتوس رقم 'Mariachi Pure White' در ۱۴ روز آزمون زیست‌سنجی با جدایه بیمارگر *F. solani* و مقایسه روند آلودگی برگ گیاه شاهد و لاین‌های تراریخته.

Figure 5- Percentage of 'Mariachi Pure White' lisianthus leaf infection during 14 days of bioassay with *F. solani* pathogen isolate and comparison of leaf infection of control and transgenic lines.

از ۱۰ لاینی که به آزمون PCR پاسخ مثبت دادند، شمار ۸ لاین با شماره‌های ۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۱ و ۲۵ به آزمون زیست‌سنجی نیز پاسخ مثبت نشان دادند و نسبت به بیماری قارچی جدایه بیمارگر *F. solani* بیشترین مقاومت را نشان دادند (شکل ۶).

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]



شکل ۶- لاین‌های تایید شده با آزمون زیست‌سنجی با جدایه بیمارگر ***F. solani***

پایین پتری‌دیش، برگ جوان گیاهچه غیرتراریخته به‌عنوان شاهد (نشانه های شدید و مخرب بیماری قارچی در اثر جدایه بیمارگر ***F. solani*** پس از دو هفته، در گیاهچه‌های شاهد) و بالای پتری‌دیش، برگ جوان لاین‌های تراریخته (بدون بروز نشانه های یا با نشانه های محدود بیماری قارچی در اثر جدایه بیمارگر ***F. solani*** پس از دو هفته، در لاین‌های تراریخته).

Figure 6- Lines confirmed by bioassay test by *F. solani* pathogen isolate.
Bottom of petri-dish, young leaf of non-transgenic plantlets as control (severe and destructive symptoms of fungal disease due to the isolate of *F. solani* pathogen after two weeks, in control plantlets) and top of petri-dish, young leaf of transgenic lines (without symptoms or with limited symptoms of fungal disease due to isolate of *F. solani* pathogen after two weeks, in transgenic lines).

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

این نخستین گزارش انتقال ژن کیتیناز کایمری در لیسیانتوس بود و آزمون زیست‌سنجی در این پژوهش نشان داد که انگیزش مقاومت به بیماری قارچی *F. solani* در لیسیانتوس تراریخته ایجاد شده است. گیاهان تراریخته لیسیانتوس می‌توانند به طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی مقاومت نشان دهند (Selitrennikoff, 2001). در این پژوهش در طی انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس در محیط سرسخت‌تر، ۴۷۱ شاخساره و گیاهچه از ۴۵ قطعه برگ، ایجاد شد و از شمار ۲۱ گیاهچه و لاین به‌طور تصادفی جدا شده، شمار ۱۰ لاین به آزمون PCR و ۸ لاین به آزمون زیست‌سنجی پاسخ مثبت نشان دادند.

جدول ۱- میزان تراریختی لیسیانتوس رقم 'Mariachi Pure White' با ژن مقاوم به بیماری‌های قارچی *Chit42* Chimeric.

Table 1. Transformation rate of lisianthus cultivar 'Mariachi Pure White' with fungal disease resistant gene Chimeric *Chit42*.

شمار لاین‌های تراریخته تایید شده توسط آزمون زیست‌سنجی **Number of transgenic lines confirmed by bioassay test**	شمار لاین‌های تایید شده توسط آزمون PCR از مجموع ۲۱ لاین جدا شده **The number of lines confirmed by PCR test was separated from a total of 21 lines**	شمار گیاهچه‌های باززایی شده از ۴۵ ریزنمونه قطعه برگ **Number of regenerated plantlets from 45 leaf pieces explants**
8	**10**	**24**

آنزیم کیتیناز *Chit42* بدون دومین[1] است و آنزیم کیتیناز کایمری دارای دومین باند شونده به کیتین می‌باشد که فعالیت و اثر بخشی این آنزیم را افزایش می‌دهد. پژوهشگران ثابت کردند که فعالیت کیتیناز کایمری در تخریب دیواره‌های قارچ‌ها تفاوت قابل توجهی نسبت به کیتیناز *Chit42* دارد (Kowsari *et al*., 2014; Kowsari M., 2016; Matroodi *et al*., 2013). افزایش ۳۶ درصدی (Limón *et al*., 2004) و ۵/۵ برابری (Fan *et al*., 2007) فعالیت کیتیناز کایمری نسبت به کیتیناز *Chit42* گزارش شده است. ژن کیتیناز کایمری توسط Ziaei و همکاران به کلزا انتقال داده شد که این ژن اثر بخشی بیشتری در انگیزش مقاومت به بیماری‌های قارچی در کلزا نسبت به ژن کیتیناز *Chit42* در پژوهش‌های مشابه انتقال ژن ایفا نمود (Ziaei, Motallebi, Zamani, and Panjeh, 2016; Ziaei, Motallebi, Zamani, Zarin Panjeh, *et al*., 2016). ژن کیتیناز کایمری با بیان آنزیم کیتیناز کایمری در گیاهان تراریخته باعث تجزیه ترکیب‌های کیتینی دیواره بیشتر قارچ‌ها و در پی آن موجب انگیزش مقاومت گیاهان تراریخته به اثر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و بیماری‌های قارچی می‌گردد (Kowsari *et al*., 2014; Kowsari M., 2016; Matroodi *et al*., 2013). با انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس در این پژوهش، گیاهان تراریخته مقاومت بسیار بیشتری نسبت به گیاهان شاهد به پیشروی قارچ *F. solani* نشان دادند.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نخستین گزارش از انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس می‌باشد. آزمون‌های مولکولی و زیست‌سنجی در این پژوهش نشانگر انگیزش مقاومت لیسیانتوس به بیماری قارچی *F. solani* بود. در این پژوهش دیده شد که گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد، مقاومت بسیار بیشتری نسبت به پیشروی قارچ *F. solani* نشان دادند. با در نظر گرفتن این نکته که

۱- Domain

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

بیماری‌های فوزاریومی یکی از مهم‌ترین مشکل‌های لیسیانتوس در سراسر دنیا می‌باشند و سال‌ها است که ایجاد مقاومت به بیماری‌های فوزاریومی از مهم‌ترین هدف‌های بهنژادی این گیاه زینتی با ارزش می‌باشد، انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانتوس دستاورد بزرگی در رسیدن به این مهم خواهد بود. بررسی‌های انجام شده در این پژوهش که نخستین پژوهش در زمینه بررسی اثر محیط مایه زنی بر کارایی انتقال ژن به لیسیانتوس بود، نشان داد که تیمار شامل محیط مایه زنی MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز با pH=۵/۲ بهترین پاسخ را در انتقال این ژن به لیسیانتوس داد و به‌طور معنی‌داری برتر از سه تیمار دیگر بود.

منابع

Adesoye, I., Togun, O., Machuka, J. (2010). Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) by *Agrobacterium* infiltration. *Journal of Applied Biosciences*, *30*, 1845–1860.

Ahmadpour, R., Zare, N., Asghari-zakaria, R., Sheikhzadeh, P. (2016). Enhancement of *Agrobacterium* -mediated transformation efficienc- y in immature embryo of *Triticum aestivum* , cv . Arya. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *4*(1), 45–53.

Azuma, M., Morimoto, R., Hirose, M., Morita, Y., Hoshino, A., Iida, S., Oshima, Y., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Shiratake, K. (2016). A petal-specific InMYB1 promoter from Japanese morning glory: A useful tool for molecular breeding of floricultural crops. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(1), 354–363. https://doi.org/10.1111/pbi.12389.

Bertoldo, C., Gilardi, G., Spadaro, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2015). Genetic diversity and virulence of Italian strains of *Fusarium oxysporum* isolated from *Eustoma grandiflorum*. *European Journal of Plant Pathology*, *141*(1), 83–97. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0526-2.

Bezirganoglu, I., Hwang, S. Y., Fang, T. J., Shaw, J. F. (2013). Transgenic lines of melon (*Cucumis melo* L. var. makuwa cv. 'Silver Light') expressing antifungal protein and chitinase genes exhibit enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *112*(2), 227–237. https://doi.org/10.1007/s11240-012-0227-5.

Bhupendra, K., Sugandha, S., Amla, D.V., Indraneel, S. (2014). Establishment and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*, *4*(10), 51–69. https://doi.org/10.12692/ijb/4.10.51-69.

Bradley, J.M., Deroles, S.C., Boase, M.R., Bloor, S., Swinny, E., Davies, K.M. (1999). Variation in the ability of the maize Lc regulatory gene to upregulate flavonoid biosynthesis in heterologous systems. *Plant Science*, *140*(1), 31–39. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00200-3.

Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Broglie, R. (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, *254*(5035), 1194–1197. https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1194.

Chen, Y.T., Fang, Q.S., Chiang, C.H., Yeh, S.D., Wu, H.W., Yu, T.A. (2010). Transgenic *Eustoma grandiflorum* expressing the bar gene are resistant to the herbicide Basta®. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *102*(3), 347–356. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9739-z.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *16*(6), 735–743. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.

Curtis, I.S., Nam, H.G. (2001). Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method - Plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research*, *10*(4), 363–371. https://doi.org/10.1023/A:1016600517293.

Fakhraei, M.M., Arab, M., Shariat Panahi, M.E. (2014a). Effect of cold, heat and chemical stresses on the induction of androgenesis in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Journal of Applied Crop Breeding*, *2*(1), 1-12 (In Persian).

Fakhraei, M.M., Arab, M., Shariat Panahi, M.E. (2014b). Effect of cultivar, growth regulators and light during incubation on induction of haploid in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) through microspore culture. *Journal of Crop Production and Processing*, *4*(12), 171-178 (In Persian).

Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M. J., Pei, Y. (2007). Increased

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 295–302.

Gao, N., Shen, W., Cao, Y., Su, Y., Shi, W. (2009). Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *98*(3), 321–330. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9566-2.

Gilardi, G., Gullino, M. (2006). Ornamentali - Prime osservazioni sulla suscettibilita a *Fusarium oxysporum* f. sp. eustomae di diverse cultivar di lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Informatore Fitopatologico*, *56*, 30–33.

Grison, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J.J., Toppan, A. (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnology*, *14*(5), 643–646. https://doi.org/10.1038/nbt0596-643.

Guan, C., Liu, X., Song, X., Wang, G., Ji, J., Jin, C. (2014). Overexpression of a peroxiredoxin Q gene, SsPrxQ, in *Eustoma grandiflorum* Shinn enhances its tolerance to salt and high light intensity. *Molecular Breeding*, *33*(3), 657–667. https://doi.org/10.1007/s11032-013-9982-1.

Hahm, Y.I. (1998). Occurrence of *Fusarium* wilt on lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. eustomae. *Korean Journal of Plant Pathology*, *14*(2), 188–190.

Halevy, K.A. (1984). Evaluation of lisianthus as a new flower crop. *HortScience*, *19*(6), 845–847.

Harbaugh, B.K. (2006). Lisianthus: *Eustoma grandiflorum*. In *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century* (pp. 644–663). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1-24.

Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, *8*(1), 97–109. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08010097.x.

Jones, J.D G., Dean, C., Gidoni, D., Gilbert, D., Bond-Nutter, D., Lee, R., Bedbrook, J., Dunsmuir, P. (1988). Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters. *Molecular & General Genetics*, *212*(3), 536–542. https://doi.org/10.1007/BF00330861.

Kowsari, M., Motallebi, M., Zamani, M. (2014). Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities. *Current Microbiology*, *68*(4), 495–502. https://doi.org/10.1007/s00284-013-0494-3.

Kowsari M., Zamani, M.R. and Motallebi, M. (2016). Overexpression of chimeric chitinase42 enhances the antifungal activity of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum*. *Mycologia Iranica*, *3*(1), 15 – 23.

Kuronuma, T., Ando, M., Watanabe, H. (2020). Tipburn incidence and ca acquisition and distribution in lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) cultivars under different ca concentrations in nutrient solution. *Agronomy*, https://doi.org/10.3390/agronomy10020216.

Kuronuma, T., Kinoshita, N., Ando, M., Watanabe, H. (2020). Difference of Ca distribution before and after the onset of tipburn in lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] cultivars. *Scientia Horticulturae*, https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108911.

Limón, M.C., Chacón, M.R., Mejías, R., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Codón, A.C., Benítez, T. (2004). Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, https://doi.org/10.1007/s00253-003-1538-6.

Liu, X., Yu, Y., Liu, Q., Deng, S., Jin, X., Yin, Y., Guo, J., Li, N., Liu, Y., Han, S., Wang, C., Hao, D. (2020). A Na2CO3-responsive chitinase gene from leymus chinensis improve pathogen resistance and saline-alkali stress tolerance in transgenic tobacco and maize. *Frontiers in Plant Science*, https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00504.

Mantis, N.J., Winans, S.C. (1992). The *Agrobacterium tumefaciens vir* gene transcriptional activator *virG* is transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *Journal of Bacteriology*, *174*(4), 1189–1196. https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1189-1196.1992.

Matroodi, S., Zamani, M., Haghbeen, K., Motallebi, M., Aminzadeh, S. (2013). Physicochemical study of a novel chimeric chitinase with enhanced binding ability. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *45*(10), 845–856.

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

https://doi.org/10.1093/abbs/gmt089.

McGovern, R.J. (2018). Diseases of Lisianthus. In R.J. McGovern, W.H. Elmer (Eds.), *Handbook of Florists' Crops Diseases* (pp. 583–632). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_20.

Mercuri, A., Sacchetti, A., De Benedetti, L.D., Schiva, T., Alberti, S. (2001). Green fluorescent flowers. *Plant Science*, *161*(5), 961–968. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00497-6.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. *Astrophysics and Space Science*, 203–209.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nakano, Y. (2017). Effect of acetosyringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* leaf disks. *Japan Agricultural Research Quarterly*, *51*(4), 351–355. https://doi.org/10.6090/jarq.51.351.

Onozaki, T., Satou, M., Azuma, M., Kawabe, M., Kawakatsu, K., Fukuta, N. (2020). Evaluation of 29 lisianthus cultivars (*Eustoma grandiflorum*) and one inbred line of e. exaltatum for resistance to two isolates of *Fusarium solani* by using hydroponic equipment. *Horticulture Journal*, *89*(4), 473–480. https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-151.

Pérez-Piñeiro, P., Gago, J., Landín, M., Gallego, P.P. (2012). *Agrobacterium*-mediated Transformation of Wheat: General Overview and New Approaches to Model and Identify the Key Factors Involved. In: Y. Ozden Çiftçi (ed.). Transgenic Plants-Advances and Limitations. Rijeka, Croatia: Intech Open Access Publisher, *326*. https://doi.org/10.5772/35232.

Rai, G.K., Rai, N.P., Kumar, S., Yadav, A., Rathaur, S., Singh, M. (2012). Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, *48*(5), 565–578. https://doi.org/10.1007/s11627-012-9442-3.

Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal Proteins. Applied and Environmental Microbiology, *67*(7), 2883–2894. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001.

Semeniuk, P., Griesbach, R.J. (1987). In vitro propagation of prairie gentian. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *8*(3), 249–253. https://doi.org/10.1007/BF00040952.

Semeria, L., Ruffoni, B., Rabaglio, M., Genga, A., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Allavena, A. (1996). Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *47*(1), 67–72. https://doi.org/10.1007/BF02318967.

Semeria, L., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Allavena, A. (1995). Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* Griseb. by microprojectile bombardment. *Euphytica*, *85*(1–3), 125–130. https://doi.org/10.1007/BF00023940.

Thiruvengadam, M., Chung, I.M. (2015). Efficient in vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *Propagation of Ornamental Plants*, *15*(1), 21–28.

Thiruvengadam, M., Yang, C.H. (2009). Ectopic expression of two MADS box genes from orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) and lily (*Lilium longiflorum*) alters flower transition and formation in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Cell Reports*, *28*(10), 1463–1473. https://doi.org/10.1007/s00299-009-0746-7.

Tomioka, K., Hirooka, Y., Takezaki, A., Aoki, T., Sato, T. (2011). *Fusarium* root rot of prairie gentian caused by a species belonging to the *Fusarium solani* species complex. *Journal of General Plant Pathology*, *77*(2), 132–135. https://doi.org/10.1007/s10327-011-0295-0.

Vernade, D., Herrera-Estrella, A., Wang, K., Van Montagu, M. (1988). Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. *Journal of Bacteriology*, *170*(12), 5822–5829. https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5822-5829.1988.

Wang, L., Xue, W., Li, X., Li, J., Wu, J., Xie, L., Kawabata, S., Li, Y., Zhang, Y. (2020). EgMIXTA1, a MYB-type transcription factor, promotes cuticular wax formation in *Eustoma grandiflorum* leaves. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.524947.

Zhao Qing, Ji, J., Wang, G., Wang, J., Ma, Y., Jin, C., Wu, W., Guan, C. (2012). Testing an inducible expression system in transgenic lisianthus (*Eustoma grandiflorum* cv. LisaBlue). *African Journal of Biotechnology*, *11*(21), 4767–4772. https://doi.org/10.5897/ajb11.3306.

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

Ziaei, M., Motallebi, M., Zamani, M.R., Panjeh, N.Z. (2016). Co-expression of chimeric chitinase and a polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic canola (*Brassica napus*) confers enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biotechnology Letters*, *38*(6), 1021–1032. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2058-7.

Ziaei, M., Motallebi, M., Zamani, M.R., Zarin Panjeh, N., Moghaddassi Jahromi, Z. (2016). A comparative study of transgenic canola (*Brassica napus* L.) harboring either chimeric or native Chit42 genes against phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *25*(4), 358–366. https://doi.org/10.1007/s13562-015-0347-1.

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]

Flower and Ornamental Plants (2021), 6(2): 147-164
Research article
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147

Effect of the type of inoculation medium on chimeric chitinase gene transfer to lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn) for resistance to the fungal disease *Fusarium solani*

Mohammad Mehdi Fakhraei[1], AliReza Motallebi Azar[1], Hassan Salehi[2], Nasser Mahna[1], Mostafa Motallebi[3]

1. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
2. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz
3. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran

✉ motallebiazar@gmail.com

Received: 2021/12/11, Revised: 2021/12/22, Accepted: 2021/12/22

Abstract

Lisianthus is in the top ten flowers in the world and in 2017, it was the fifth largest exporter and seller of ornamental plants in the world. Resistance to fungal diseases, especially *Fusarium*, is one of the most important breeding objectives for lisianthus. Little work has been done on the modification of resistance to fungal diseases in this ornamental plants. Therefore, gene transfer of chimeric chitinase to lisianthus will be an important contribution to achieve this important goal. The transfer and expression of chitinase gene in plants show a high level of resistance to fungal infections and a delay in the onset of symptoms when exposed to fungal pathogens. The researchers showed that the activity of chimeric chitinase in destroying fungal walls is significantly different from that of *Chit42* chitinase. The aim of this study was to achieve resistance to *Fusarium solani* in lisianthus by transfer of chimeric chitinase gene using *Agrobacterium tumefactions*. In this study, the effect of different culture media, MS, ½MS and LB, two pH values of 5.2 and 5.8 and 30 and 15 mg L^{-1} sucrose and 30 mg L^{-1} maltose in the inoculation medium were investigated. The results showed that the B treatment with MS inoculation medium containing 30 g L^{-1} maltose with a pH of 5.2 gave the best response in gene transfer to lisianthus and the presence of a more stringent selection medium containing 100 mg L^{-1} of kanamycin was superior to the other treatments with an average regeneration of 11.13 plantlets per leaflet. The results of this study show that MS medium is more efficient than LB medium for gene transfer to lisianthus. Lowering the pH and changing the carbohydrate source from sucrose to maltose in the inoculum medium increased the transformation efficiency. In this study, 471 plantlets were generated from 45 leaf explants during gene transfer of chimeric chitinase to lisianthus in a more stringent selection medium and out of 21 randomly selected plantlets and lines, 10 lines were selected by PCR and 8 lines responded positively to bioassay test. This is the first report of chimeric chitinase gene transfer in lisianthus.

Keywords: *Agrobacterium*, Bioassay, *Fusarium*, Fungal disease resistance, Transgenic line.

[Downloaded from flowerjournal.org on 2026-10-31]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.6.6]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.147]