

اثر نوع محیط مایه زنی در انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانئوس (*Eustoma grandiflorum* [Raf.]

Shinn) برای ایجاد مقاومت به بیماری قارچی *Fusarium solani*

محمد مهدی فخرائی^۱، علیرضا مطلبی آذر^{۲*}، 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

لیسیانئوس در رده ده گل برتر دنیا می باشد و در سال ۲۰۱۷ رتبه پنجم صادرات و فروش گیاهان زینتی دنیا را به خود اختصاص داده است. ایجاد مقاومت به بیماری های قارچی به ویژه فوزاریوم از مهم ترین هدف های بهنژادی لیسیانئوس می باشد. کارهای کمی در مورد بهنژادی برای مقاومت به بیماری های قارچی در این گیاه زینتی صورت گرفته است؛ از این رو انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانئوس 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 نشانه های بیماری را در زمان رویارویی با بیمارگرهای قارچی باعث می شود. پژوهشگران ثابت کرده اند که فعالیت کیتیناز کایمری در تخریب دیواره های قارچ ها تفاوت قابل توجهی نسبت به کیتیناز *Chit42* دارد. هدف از این پژوهش انگیزش مقاومت به بیماری قارچی *Fusarium solani* در لیسیانئوس از راه انتقال ژن کیتیناز کایمری با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* بود. در این پژوهش اثر انواع محیط کشت MS، $1/2MS$ و LB، دو میزان pH ۵/۲ و ۵/۸ و همچنین سوکروز با غلظت های ۳۰ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر و مالتوز ۳۰ میلی گرم 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 لیسیانئوس داد و در کنار محیط گزینشی سرسخت تر دارای ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین با میانگین باززایی ۱۱/۱۳ گیاهچه از هر قطعه برگ به طور معنی داری 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 لیسیانئوس کارآمدتر است و کاهش pH و تغییر منبع کربوهیدرات 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 لیسیانئوس در محیط گزینشی سرسخت تر، شمار ۴۷۱ گیاهچه از ۴۵ قطعه برگ، ایجاد شد و از شمار ۲۱ گیاهچه و لاین به طور تصادفی گزینش شده، شمار ۱۰ لاین به آزمون PCR و ۸ لاین به آزمون زیست سنجی پاسخ مثبت نشان دادند. این نخستین گزارش انتقال ژن کیتیناز کایمری در لیسیانئوس می باشد.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم، زیست سنجی، فوزاریوم، لاین تراریخته، مقاومت به بیماری قارچی.

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 می باشد و یکی از محبوب ترین گل های 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 بررسی های فراوانی در مورد انواع روش های کشت درون شیشه ای لیسیانتوس از جمله ریزافزایی، کشت بافت، رویان زایی بدنی، تولید بذر مصنوعی و کشت تک گان صورت گرفته است که این نشانه از اهمیت این موضوع می باشد (Semeniuk and Griesbach, 1987). در کارهای پیشین ما برای نخستین بار در دنیا انگیزش تک گانی و نرزاری 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 پیشرفت های فراوانی که در بهنژادی گیاه لیسیانتوس صورت گرفته است، پیشرفت اساسی در زمینه ایجاد مقاومت به بیماری های قارچی در این گیاه زینتی با ارزش اقتصادی انجام نشده است. لیسیانتوس مستعد سه نوع بیماری فوزاریومی پوسیدگی ریشه، طوقه و ساقه می باشد (Harbaugh, 2006) که گونه های *Fusarium avenaceum* و *F. oxysporum* خسارات فراوانی برای پرورش دهندگان لیسیانتوس به بار می آورند. نشاهای لیسیانتوس حساسیت بسیار فراوانی به *F. solani* دارند (McGovern, 2018). بهنژادی لیسیانتوس برای دستیابی به ارقام مقاوم به فوزاریوم، مشکل های تولید آن را به میزان زیادی کاهش می دهد. از مهم ترین چشم اندازهای بهنژادی لیسیانتوس انگیزش مقاومت به بیماری ها (به ویژه بیمارهای قارچی) است (Harbaugh, 2006). عامل بیماری زای *F. solani* می تواند به بذر، دانهال و گیاه بالغ لیسیانتوس حمله کند. نشانه های آغازین *F. solani*، قهوه ای شدن نواحی فرو رفته ساقه در خاک می باشد و در ادامه پوسیدگی به سیستم ریشه گسترش یافته و گیاه پژمرده می شود و در پایان می میرد. 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 می باشد (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 به شمار می آید. (Bertoldo *et al.*, 2015; Gilardi and Gullino, 2006; Hahm, 1998; Tomioka *et al.*, 2011). پوسیدگی ریشه ناشی از *F. solani* مهم ترین و مخرب ترین بیماری لیسیانتوس است که در ژاپن و سراسر دنیا باعث مرگ و میر جدی این گیاه می شود؛ با این حال بررسی های 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 نشانه های بیماری را در زمان رویارویی با بیمارگرهای قارچی نشان می دهند (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



باکتریایی به دست آمده از باکتری خاکری *Serratia marcescens* به طور پایدار تلفیق و در برگ‌های توتون بیان گردیده است (Jones et al., 1988). گیاهان توتون تراریخته^۱ بیان کننده گروه I کیتینازها، نسبت به قارچ بیماری‌زای *Rhizoctonia solani* مقاومت بیشتری نشان دادند و بروز نشانه‌های بیماری در گیاهان تراریخته به تاخیر افتاد (Broglie et al., 1991). Bezirganoglu و همکاران (2013) با انتقال ژن کیتیناز به طالبی^۲ لاین‌های تراریخته طالبی مقاوم به بیماری‌های قارچی تولید کردند که در برابر قارچ‌های *R. solani* و *F. oxysporum* مقاوم بودند (Bezirganoglu et al., 2013). به تازگی، 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 به دست آمد (Liu et al., 2020). کارهای کمی در مورد به‌نژادی برای مقاومت به بیماری‌های قارچی (به ویژه فوزاریوم) در لیسپانتوس 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 لیسپانتوس وجود ندارد. هدف از این پژوهش انگیزش مقاومت به فوزاریوم در لیسپانتوس با انتقال ژن کیتیناز کایمری با استفاده از *A. tumefaciens* بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در این پژوهش، از بذر F₁ لیسپانتوس 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 گندزدایی شده 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 ۱۵±۲۵ قرار گرفتند.

قارچ

در این پژوهش جدایه بیمارگر *F. solani* از کلکسیون قارچ بخش گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اهدایی دکتر بنی هاشمی تهیه شد. قارچ‌ها در محیط PDA^۳ که دارای ۲۰۰ گرم بر لیتر سیب‌زمینی خرد شده، ۲۰ گرم بر لیتر دکستروز و ۱۵ گرم بر لیتر آگار بود، در دمای ۲۵±۱ درجه سلسیوس رشد کردند.

سویه باکتری

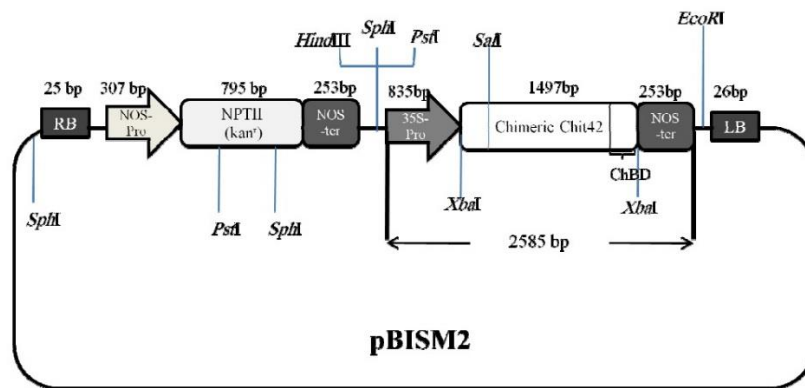
سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* از پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه گردید. برای تکثیر *A. tumefaciens* از محیط LB (Miller, 1972) دارای ۱۰ گرم بر لیتر باکتو پپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم بر لیتر نمک طعام با pH ۷ و از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و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



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' لیسیناتوس در قالب طرح به‌طور کامل 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 ۲۵±۱ قرار گرفتند. غلظت‌های ذکر شده کانامایسین در کشت آغازین به کار رفت و ریزنمونه‌های مورد آزمایش پس از مدت سه هفته با همان

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 کربوهیدرات در محیط مایه زنی بر انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسپانتوس با روش *Agrobacterium* در قالب طرح به‌طور کامل 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 به همراه ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز

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

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

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

هم‌کشتی

قطعه‌های برگ پس از مایه زنی روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار داده شدند تا به نسبت خشک شوند. سپس قطعه‌های 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 به‌طور کامل تاریک و در دمای ۲۵±۱ درجه سلسیوس منتقل شدند.

شستشو و کشت برگ در محیط گزینشی

پس از گذشت سه روز از هم‌کشتی، قطعه‌های 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 قطعه‌های برگ روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار داده شدند تا کمی رطوبت آن گرفته شود.

در ادامه قطعه‌های 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 ۲۵±۱ 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



آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم و با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر جیبرلیک اسید^۱ (GA₃) منتقل شدند. شاخساره‌ها در پایان به محیط ریشه‌زایی دارای ۰/۵ میلی گرم 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 پلیمرز 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 پلیمرز 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 پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر، ۶ میکرومول از محصول چرخه پلیمرز 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 غیر تراریخته به عنوان شاهد (کنترل منفی) و در بالای پتری برگ جوان لاین‌های تراریخته که تقریباً هم اندازه برگ گیاهچه شاهد بودند، در شرایط کاملاً گندزدایی شده و زیر هود لامینار قرار داده شد و در پتری‌ها با پارافیلیم بسته شد تا شرایط کاملاً گندزدایی شده با رطوبت بالا فراهم گردد. سپس در شرایط مناسب زنده‌مانی قطعه‌های 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 نشانه‌های ناشی از آلودگی قارچی و میزان نکروز ایجاد شده مشخص گردید.

واکاوی آماری

تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک به طور کامل تصادفی به صورت 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.



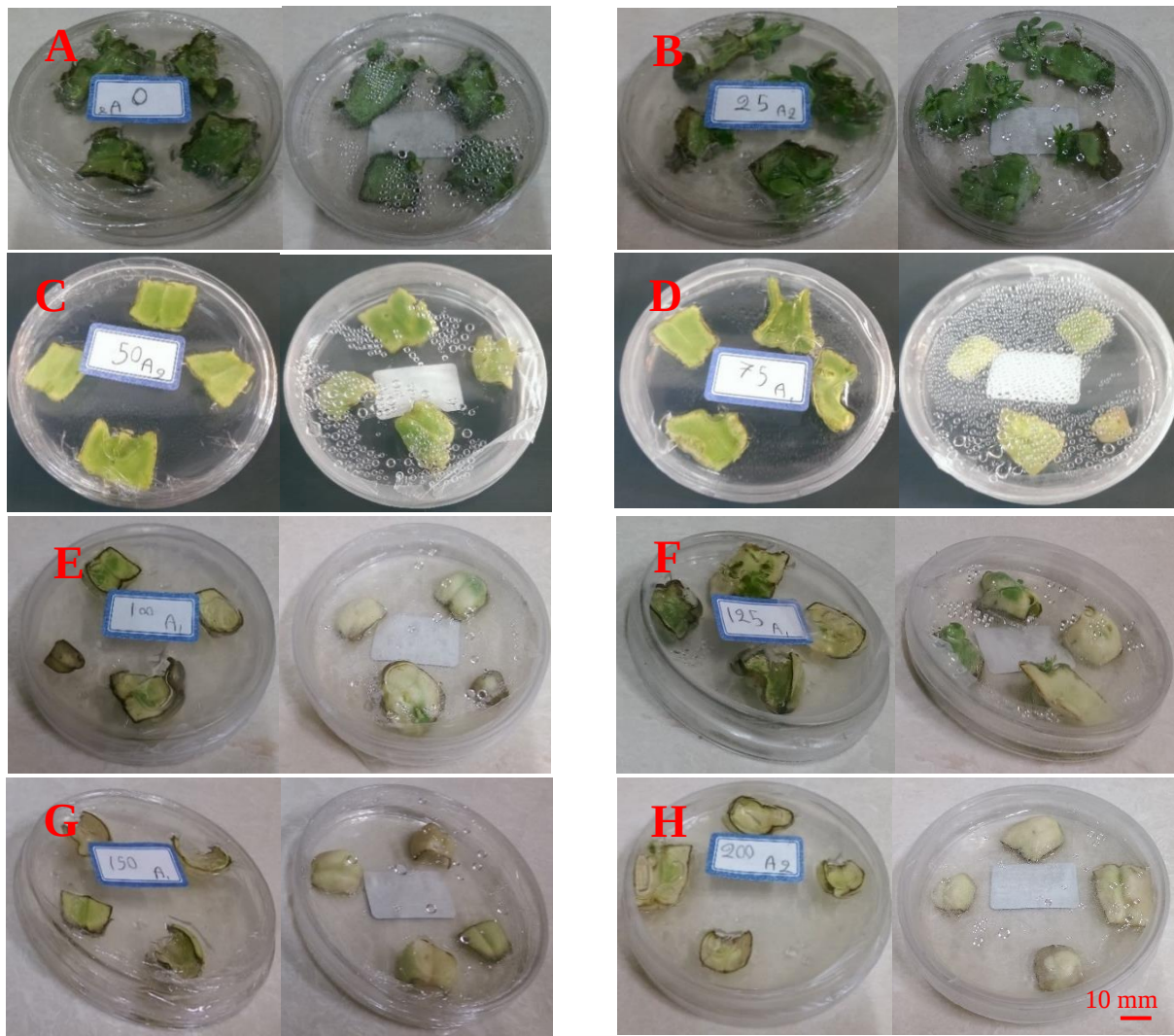
نتایج و بحث

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 قطعه‌های برگ مورد ارزیابی قرار گرفت. در پیش تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین پس از ۶ هفته تمامی قطعه‌های برگ مورد آزمایش سفید شدند (شکل ۲ G و H) و در اثر تیمارهای ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر شمار فراوانی از قطعه‌های 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 میلی گرم بر لیتر کانامایسین قطعه‌های برگ زرد شدند و باززایی شاخساره در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۲ C و D). شمار شاخساره‌های باززایی شده در تیمار ۲۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین نسبت به تیمار شاهد کاهش چشم‌گیر و معنی‌داری داشت (شکل ۲ B). میزان ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین برای محیط گزینشی آغازین استفاده شد و در زیرکشت‌های بعدی برای محیط‌های سرسخت و سرسخت‌تر به ترتیب مقادیر ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین در نظر گرفته شد.

در این آزمایش در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر قطعه‌های برگ هیچ باززایی نداشتند. پژوهشگران دیگر هم از غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر برای محیط گزینشی انتقال ژن به لیسپانتوس استفاده کرده بودند (Azuma et al., 2016; Bradley et al., 1999; Nakano, 2017; Laura Semeria et al., 1995). برخی در انتقال ژن به لیسپانتوس به غیر 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 میلی گرم بر لیتر و در محیط گزینشی سخت‌تر، ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین به کار برده شد. سایرین به این نتیجه رسیدند که غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین مانع از انگیزش و باززایی شاخساره در ریزنمونه قطعه‌های برگ می‌گردد؛ اما از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین در انتقال ژن به لیسپانتوس برای محیط گزینشی بهره بردند (Mercuri et al., 2001; Thiruvengadam and Yang, 2009). برخی در انتقال ژن‌های *NPTII* و *GUS-INT* به لیسپانتوس از محیط گزینشی ۱۰۰ میلی گرم 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).





شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین روی ریزنمونه قطعه‌های برگ لیسیانثوس.

تیمارها شامل غلظت‌های (به میلی گرم بر لیتر): A = 0؛ B = 25؛ C = 50؛ D = 75؛ E = 100؛ F = 125؛ G = 150؛ H = 200 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

زنی MS و YEB^۱ 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).

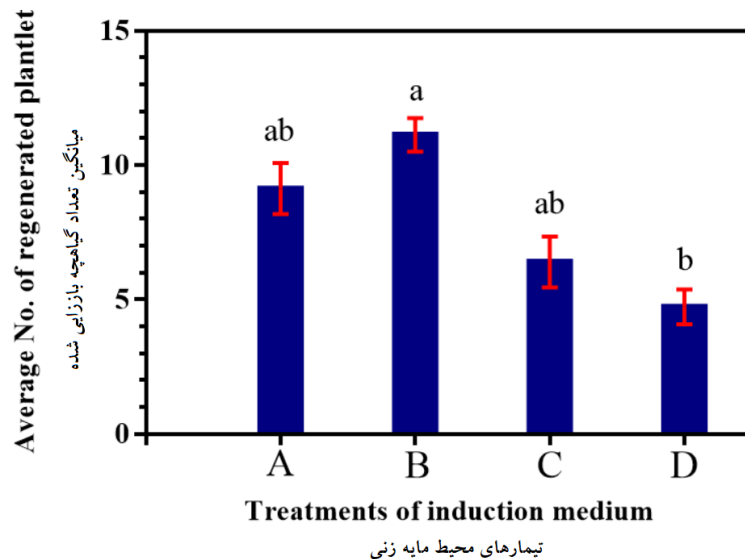
در بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته در انتقال ژن به لیسیانتوس از این محیط مایه زنی استفاده گردید (Azuma et al., 2016; Mercuri et al., 2001; Nakano, 2017; Semeria et al., 1996; Zhao Qing et al., 2012). در این پژوهش، این نوع محیط مایه زنی، باززایی شاخساره‌ها به شمار فراوانی را در انتقال ژن به لیسیانتوس در پی 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 گوجه‌فرنگی 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 ۱/۲MS 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 ۱/۲MS 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).





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

A- MS با pH ۵/۸ به همراه ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز؛ B- MS با pH ۲/۵ به همراه ۳۰ گرم بر لیتر مالتوز؛ C- ½MS با pH ۵/۸ به همراه 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.

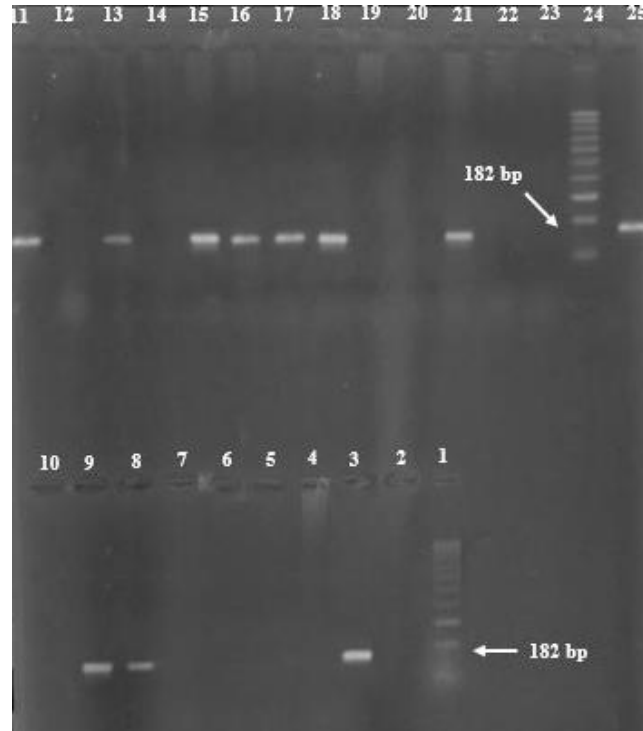
نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS نسبت به محیط کشت LB در محیط مایه زنی انتقال ژن به لیسیانتوس کارآمدتر است؛ اما به نصف رساندن ترکیب های محیط کشت و سوکروز اثر معنی داری در افزایش کارایی انتقال ژن به لیسیانتوس ندارد و همچنین تغییر سوکروز به مالتوز و کاهش میزان pH در محیط مایه زنی انتقال ژن در افزایش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

تایید تراریختی گیاهچه‌ها توسط آزمون PCR

پس از تایید تراریخته بودن شاخساره‌ها و گیاهچه‌ها در محیط گزینشی آغازین (دارای ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین) و سپس در محیط گزینشی سرسخت (دارای ۷۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین) و در پایان در محیط گزینشی سرسخت‌تر (دارای ۱۰۰ میلی گرم 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



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

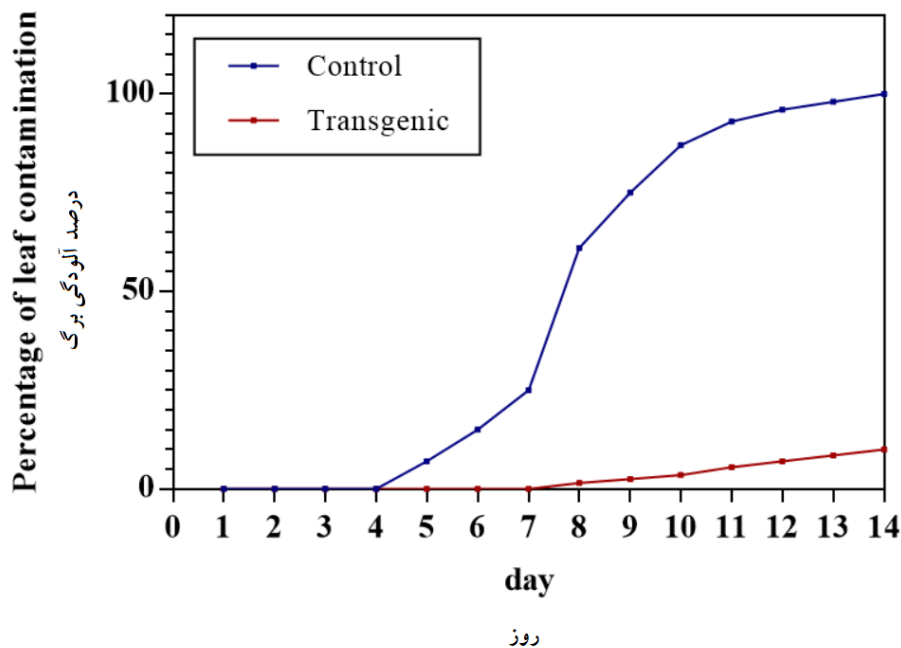
۱ و ۲۴- Ladder؛ ۲- کنترل منفی (محصول PCR آب مقطر با آغازگرهای 1F24 و 163R24)؛ ۳- کنترل مثبت (محصول PCR تک همگروهه آگروباکتریوم تراریخته دارای پلاسمید pBI121 با آغازگرهای 1F24 و 163R24 و تکثیر قطعه ۱۸۲ bp مورد انتظار)؛ ۴ تا ۲۳ و ۲۵- لاین‌های شماره ۱ تا ۲۰ و لاین شماره ۲۱.

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 نشانه‌های آلودگی حاصل از *F. solani* در برگ گیاهچه‌های تراریخته دیده شد. پس از دو هفته نشانه‌های بیماری قارچی در اثر جدایه بیمارگر *F. solani* سراسر برگ‌ها را فرا گرفت و

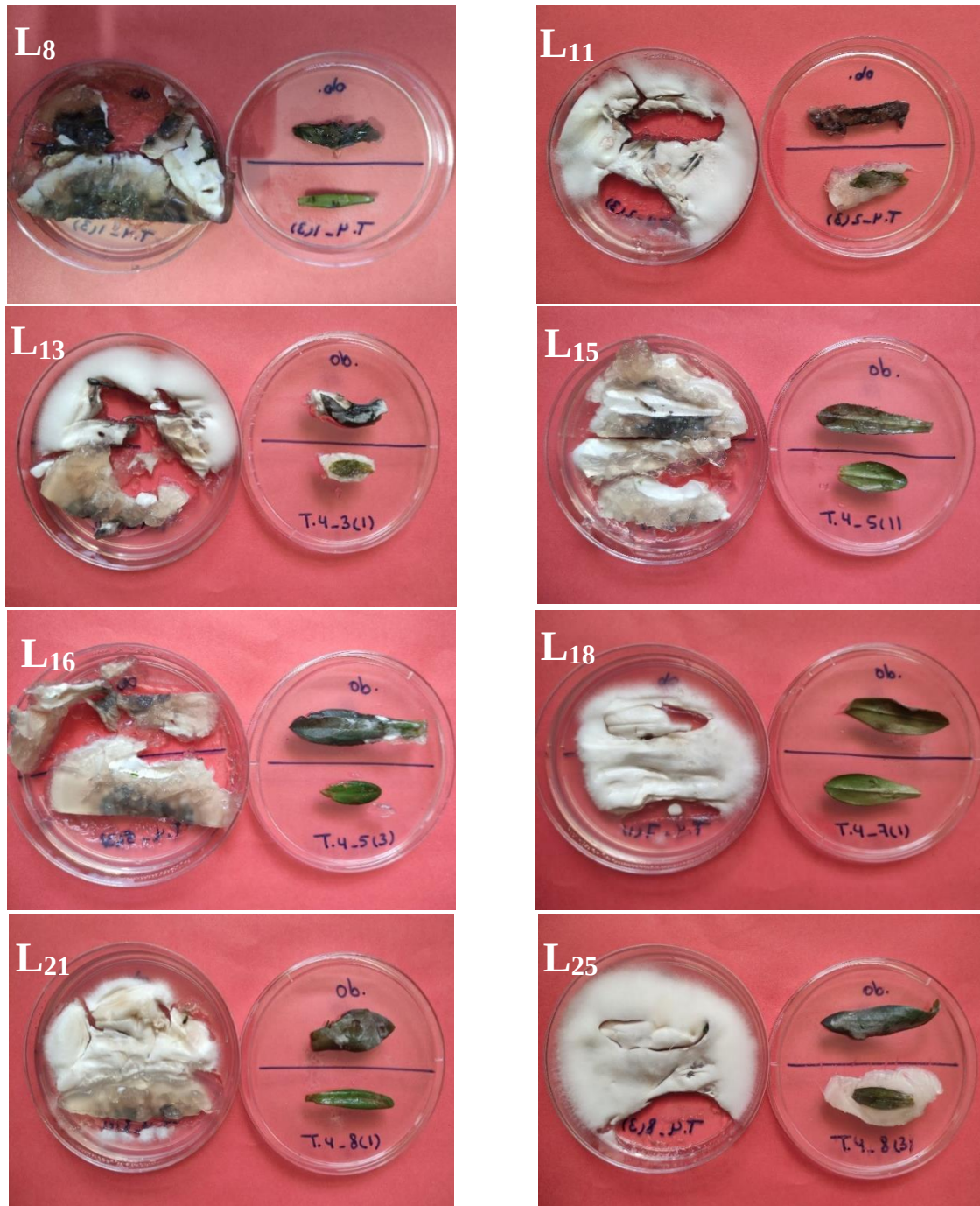
منجر به نکروز شدن تمام برگ گیاهچه‌های غیر تراریخته گردید. برگ‌های گیاهچه‌های تراریخته عاری از نشانه‌های بیماری قارچی و نکروز شدن بودند یا میزان نکروز بسیار جزئی را نشان دادند. شروع بروز نشانه‌های آلودگی از روز چهارم با وجود عدم گسترش قارچ در کل پتری‌دیش، روی برگ گیاهچه‌های شاهد آغاز و در پایان هفته اول 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 نشانه‌های 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 لیسانتوس 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).



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

پایین پتری‌دیش، برگ جوان گیاهچه غیرتراریخته به‌عنوان شاهد (نشانه‌های 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 نشانه‌های یا با نشانه‌های 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).

این نخستین گزارش انتقال ژن کیتیناز کایمری در لیسیانئوس بود و آزمون زیست‌سنجی در این پژوهش نشان داد که انگیزش مقاومت به بیماری قارچی *F. solani* در لیسیانئوس تراریخته ایجاد شده است. گیاهان تراریخته لیسیانئوس می‌توانند به طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی مقاومت نشان دهند (Selitrennikoff, 2001). در این پژوهش در طی انتقال ژن کیتیناز کایمری به لیسیانئوس 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 لیسیانئوس رقم 'Mariachi Pure White' با ژن مقاوم به بیماری‌های قارچی *Chimeric Chit42*.

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

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

آنزیم کیتیناز *Chit42* بدون دومین^۱ 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 لیسیانئوس 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 لیسیانئوس می‌باشد. آزمون‌های مولکولی و زیست‌سنجی در این پژوهش نشانگر انگیزش مقاومت لیسیانئوس 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



بیماری‌های فوزاریومی یکی از مهم‌ترین مشکل‌های لیسیانتوس در سراسر دنیا می‌باشند و سال‌ها است که ایجاد مقاومت به بیماری‌های فوزاریومی از مهم‌ترین هدف‌های بهژادی 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 efficiency 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>.
- Beziranoglu, 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., Derolles, 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](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.1365-3113.1998.00343.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



- 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 suscettibilità a *Fusarium oxysporum* f. sp. eustomae di diverse cultivar di lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Informatore Fitopatologico*, 56, 30–33.
- Grisson, 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.1365-3113X.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.



- <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](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>.
- Selitrrennikoff, 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>.



- 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>.





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 Fakhraei¹, AliReza Motallebi Azar¹, Hassan Salehi², Nasser Mahna¹,
Mostafa Motallebi³

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.