نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۸۱۴-۸۰۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 4, Winter 2018, P. 803-814
ISSN: 2008 - 4730

توسعه روش مؤثر باززایی و ترانسفورماسیون توتون از طریق بهینه‌سازی غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ساکارز

ماریا بیهقی[۱]- عبدالرضا باقری[۲*]- سید حسن مرعشی[۳]- مجتبی سنکیان[۴]- افسانه فرساد[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۱

چکیده

گیاه توتون یک بیوراکتور بسیار کارا به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد، لذا در این پروژه تحقیقاتی علاوه بر بهینه‌سازی سیستم کشت بافت این گیاه، فرآیند مناسب انتقال ژن به آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اثرات غلظت‌های مختلف ساکارز و ۴ ترکیب متفاوت هورمونی (BAP و NAA) روی القا کالوس، شاخه‌زایی مستقیم و ریشه‌زایی در قالب طرح کامل تصادفی به صورت فاکتوریل و با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. حساسیت ریزنمونه‌های توتون به آنتی‌بیوتیک کانامایسین با کشت ریزنمونه‌ها روی محیط انتخابی دارای غلظت‌های مختلف کانامایسین ارزیابی شد. برای انتقال ژن از اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefacien*) سویه GV3101 حاوی پلاسمید pBI121 استفاده شد و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت بررسی گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین میزان القا کالوس با استفاده از محیط کشت M1 (حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) با غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز حاصل شد. در صورتی که تعداد بالای شاخه‌زایی مستقیم در محیط کشت M1 با غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بدست آمد. بیشترین فراوانی ریشه‌زایی نیز توسط ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز حاصل شد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین بطور کامل از باززایی نمونه‌های غیرتراریخته ممانعت کرد و بنابراین از این غلظت در محیط کشت انتخابگر استفاده شد. در نهایت، قطعه ۷۹۸ bp مربوط به ژن *nptII* در ژنوم گیاهان تراریخته توتون تأیید شد و کارایی تراریختگی با استفاده از روش اگروباکتریوم بیش از ۹۵ درصد محاسبه گردید. تکنیک باززایی مستقیم و انتقال ژن مطرح شده در این تحقیق جهت وارد کردن ژن‌های خارجی مختلف به ژنوم گیاه توتون بسیار کارا و مؤثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تراریختگی، توتون، ژن انتخابگر *nptII*، شاخه‌زایی مستقیم، کشت بافت

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد استفاده در دنیا بوده و متعلق به خانواده سولاناسه (Solanacea) می‌باشد. این گیاه خودگشن بوده و دارای بذرهای بسیار ریزی می‌باشد که درون کپسول‌های دوخانه‌ای قرار می‌گیرند. هر گل ممکن است از ۲ تا ۸ هزار و هر گیاه تا یک میلیون بذر تولید کند. توتون بدلیل خواص دارویی و اهمیت اقتصادی بالا حائز اهمیت است. بیش از ۲۵۰۰ ترکیب دارویی شامل آلکالوئیدها و ترپنوئیدها در توتون وجود دارد که دارای ارزش بالای پزشکی می‌باشند (۱۷).

اکثر ارقام اصلاح شده توتون که در حال حاضر کشت می‌شوند به طریق اصلاح کلاسیک تولید شده‌اند ولی با توسعه زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک امکان اصلاح توتون با استفاده از روش‌های نوین فراهم شده است و مطمئناً این تکنیک‌ها در آینده نقش مهمتری را در اصلاح این گیاه ایفا خواهند کرد. اهداف اصلی اصلاح مدرن توتون در زمینه‌های مقاومت به آفات و بیماری‌ها، بهبود کیفیت، افزایش میزان عملکرد در جهت تولید مؤثر پروتئین‌های نوترکیب ترسیم شده است. برای استفاده از زیست‌فناوری در اصلاح توتون نیاز به بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال ژن به توتون می‌باشد بطوری‌که بتوان سلول‌های گیاهی را تراریخته کرده و با استفاده از محیط کشت مناسب از سلول های تراریخته، گیاه کامل در حداقل زمان ممکن بدست آورد. امروزه انجام مطالعات ژنتیکی در توتون به دلیل ساده‌بودن عمل دورگ‌گیری و تولید بذر فراوان پس از هر تلقیح، گسترش یافته است. تغییرات ژنتیکی زیادی در توتون صورت می‌گیرد و این گیاه به عنوان مدل

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: bagheriyazd@gmail.com
۴- دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵- استادیار گروه باغبانی، دانشگاه بیرجند
DOI: 10.22067/jhorts4.v31i4.62194

مناسبی برای انجام تحقیقات زیست فناوری و فیزیولوژی گیاهی شناخته می‌شود. همچنین در سال‌های اخیر از این گیاه جهت مطالعه عوامل مؤثر در انتقال ژن استفاده شده است. تحقیقات زیاد و تکنیک های متفاوتی جهت بررسی باززایی و تکثیر گیاه توتون انجام شده است که بطور اساسی به بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخه-زایی و باززایی مستقیم توتون تمرکز داشته‌اند (۱۰، ۲۸، ۱۲، ۹، ۸ و ۲). تحقیقات اندکی نیز تأثیر سایر عوامل مانند ترکیب آگار محیط کشت (۱۱ و ۱۸)، ژنوتیپ و اندازه ریزنمونه (۱۶ و ۲۶)، آنتی بیوتیک-ها (۲۷)، پلی آمین‌ها (۲۵) و منشأ فسفر و نیتروژن آلی و آمونیوم (۱۹) و pH (۲۰) را بر باززایی توتون مورد بررسی قرار دادند.

در توتون با استفاده از کشت بافت ریزنمونه‌های برگ، شاخه‌های جدید حاصل می‌شود. اولین شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه برگی با کشت آن‌ها بر روی محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش شد (۲۳). همچنین علی و همکاران (۱) اثر ژنوتیپ‌های مختلف توتون را بر شاخه‌زایی در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که یک ژنوتیپ خاص و غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین بر روی شاخه‌زایی تأثیر معنی‌داری داشتند. در مطالعه دیگری مشخص شد که درصد بالایی از جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم توتون با استفاده از دیسک‌های برگی به عنوان ریزنمونه و با کاربرد غلظت‌های متفاوت هورمونی NAA و BAP حاصل شد (۱۴). در تحقیقی که توسط طراوت و همکاران (۲۴) انجام گرفت نشان داده شد که بهترین تیمار هورمونی جهت باززایی توتون، NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) در مقایسه با تیمارهای NAA (با دو سطح ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (با دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. در تحقیق دیگری، یانجی و همکاران (۳۱) شاخه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ توتون را با استفاده از نسبت اندک هورمون اکسین به سیتوکنین گزارش کردند. جوشی (۷) در آزمایش دیگری تأثیر درصد آگار و منبع کربن محیط کشت را در شاخه‌زایی توتون مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که درصد پایین آگار در محیط کشت به افزایش شاخه‌زایی کمک می‌کند و گلوکز ۴ درصد به عنوان بهترین منبع کربن در شاخه‌زایی توتون عمل می‌کند.

موفقیت فرآیند انتقال ژن توتون بستگی به انتخاب بافت‌های تراریخته غیرشیمریک و باززایی مؤثر آن‌ها در مراحل بعدی می‌باشد (۵). مطالعاتی به منظور بررسی امکان انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم به توتون انجام شده است. تکسیرا- داسیلوا و همکاران (۲۶) انتقال ژن گزارشگر *gus* (β-glucuronidase) در توتون را با بکارگیری ۴ تکنیک متفاوت انجام دادند. آن‌ها نشان دادند که ظرفیت باززایی شاخه‌ها در گیاه تراریخته نه تنها تحت تأثیر نوع ریزنمونه و ترکیب محیط بازززایی قرار دارد بلکه با انتخاب روش مناسب تراریختگی نیز ارتباط مستقیم دارد. طراوت و همکاران (۲۴) نیز بهینه سازی انتقال ژن *gus* به گیاه توتون را انجام دادند. موهان و همکاران (۱۴) با استفاده از اگروباکتریوم تومفاشینس ژن *gus* را به توتون منتقل کردند و نتایج آزمون هیستوشیمیایی را گزارش نمودند.

نوع مصرف و بیومس گیاه توتون دارای پتانسیل مطلوب برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب می باشد (۳۳). بدیهی است دستیابی به روش‌های کارآمد و تکرارپذیر جهت باززایی و تولید گیاهچه‌های استریل با حداقل تنوع ژنتیکی در زمان کوتاه، می‌تواند به عنوان گامی مؤثر در مطالعاتی از جمله حفظ ذخائر ژنتیکی، بررسی انواع تنش‌ها یا کوتاه کردن طول دوره اصلاحی این گیاه مؤثر واقع شود. همچنین احتمالا بتوان از آن به عنوان ابزاری مهم در روش‌های نوین مهندسی ژنتیک استفاده نمود. هدف از انجام این تحقیق نیز بهینه‌سازی سیستم کشت بافت و روش انتقال ژن[1] *nptII* به گیاه توتون می‌باشد. بدین منظور این تحقیق طی دو مرحله انجام شد: اولین مرحله بهینه‌سازی کشت بافت برای گیاه توتون بود. برای این منظور اثر دو فاکتور غلظت ساکارز و مقادیر مختلف هورمون‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS بر میزان کالوس‌زایی، شاخه‌زایی مستقیم و ریشه‌زایی توتون بررسی شد. مرحله دوم آزمایش انتقال ژن *nptII* بواسطه اگروباکتریوم به توتون بود. بررسی ترانسفورماسیون در این گیاه به منظور کاربرد نتایج این تحقیق در مطالعات تولید پروتئین‌های داروئی در توتون مؤثر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده کردن ریزنمونه

در این آزمایش از بذور توتون *Nicotianana tabacum* cv. *Xanthi* به منظور تهیه ریزنمونه استفاده شد. بذور به صورت سطحی با هیپو کلریت سدیم ۵ درصد و یک قطره توین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. برای حذف باقیمانده هیپو کلریت سدیم، بذور ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه مجدد ضدعفونی گردیدند. در نهایت آبکشی با آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از خشک کردن بذور بر روی کاغذ صافی استریل، بذور به محیط جوانه‌زنی (محیط MS ۱/۲) منتقل شدند. بذور توتون به مدت سه روز در تاریکی در دمای ۲۵ درجه قرار گرفتند و سپس در اتاقک رشد با دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

1- Neomycin phosphotransferase

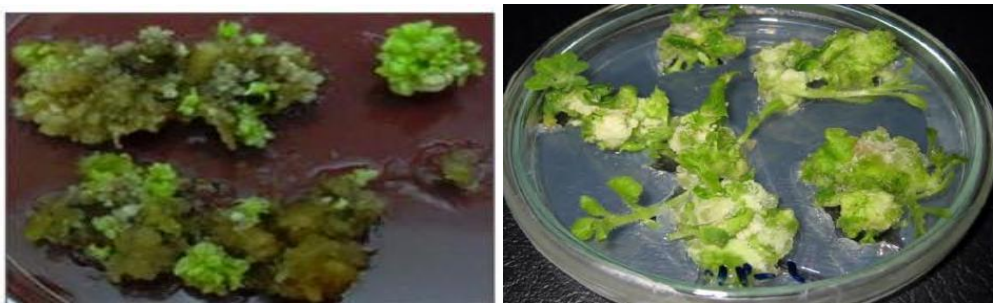
بهینه‌سازی سیستم کشت بافت توتون

بعد از تشکیل گیاهچه‌های چهار برگی، ریز نمونه برگ با دقت از گیاهچه‌ها جدا شدند. به منظور بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد، ریزنمونه‌های جدا شده به محیط کشت MS (۱۵) حاوی غلظت‌های مختلف (NAA و BAP) (جدول ۱) به همراه غلظت‌های مختلف ساکارز (۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر) و ۰/۸ درصد آگار منتقل شدند. تهیه محیط کشت MS با استفاده از محلول‌های ذخیره انجام می‌شود. معمولاً محیط کشت MS از چهار محلول ذخیره ماکرو، میکرو، آهن و ویتامین‌ها استفاده می‌شود. با توجه به این که در این روش، پس از مدت کوتاهی نمک‌ها دچار رسوب می‌شوند، در این تحقیق چهار محلول ذخیره 100x نیترات، سولفات، هالوژن‌ها و PBMo تهیه شد. ترکیب هر یک از این استوک‌ها در جدول ۲ بیان شده است. ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های هورمون‌دار به گونه‌ای قرار داده شدند که پشت ریزنمونه در تماس با محیط کشت باشد. همه پتری‌دیش های حاوی ریزنمونه‌های برگ به مدت ۴ هفته بدون انجام واکشت در اتاقک رشد در شرایط دمایی و نوری مشابه شرایط جوانه‌زنی بذر نگهداری شدند. تمام تیمارها پس از دو هفته در محیط مشابه واکشت شدند. سپس نوساقه‌های باززا شده (شکل شماره ۱) به محیط MS عاری از هورمون منتقل شدند. در نهایت گیاهچه‌های بدست آمده به گلدان منتقل شدند. بهترین ترکیب محیط کشت برای مرحله بعد یعنی ترانسفورماسیون توتون بکار برده شد.

جدول ۱- غلظت هورمونی در محیط‌های کشت مختلف برای القا کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم توتون

Table 1- Hormone concentration in different culture media for callus induction and direct shoot regeneration in *Nicotiana tabacum*

محیط کشت Medium	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی Plant growth regulators (mg/l)	
	NAA	BAP
M1	0.1	1
M2	0.15	1.5
M3	0.2	2
M4	0.25	2.5



B A

C

شکل ۱- کالوس‌زایی (A)، باززایی ساقه (B) و طویل شدن ساقه (C) در ریزنمونه‌های توتون

Figure 1- Callus induction (A), shoot regeneration (B) and shoot elongation (C) in of *Nicotiana tabacum* explants

ارزیابی میزان حساسیت ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک

حساسیت ریزنمونه‌های برگ توتون به آنتی‌بیوتیک کانامایسین با کشت این ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت‌های حاوی مقادیر مختلف کانامایسین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با ۳ تکرار بررسی شد.

تراریختگی ژنوم هسته توتون

در این تحقیق از اگروباکتریوم تومفاشینس سویه GV3101 حامل پلاسمید pBI121، جهت تراریختگی توتون استفاده شد. این پلاسمید حاوی ژن انتخابگر مقاومت به کانامایسین (*nptII*) خارج از بخش منتقل شونده به گیاه می‌باشد. باکتری نوترکیب GV3101 در محیط LB حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین، به مدت ۲۴ ساعت (بسته به سرعت رشد سویه آگروباکتریوم) در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۵۰ rpm کشت شد. پس از سانتریفوژ باکتری رشد یافته و حذف مایع رویی، اضافه کردن محیط MS بدون ساکارز انجام گرفت. سپس برش قطعات برگی و قرار دادن آن‌ها در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و بعد انتقال برگ‌ها به کاغذ صافی جهت خشک شدن و انتقال سریع برگ ها به محیط MS حاوی هورمون‌ها صورت گرفت. مرحله بعد بصورت قرار دادن پتری‌ها در تاریکی به مدت ۴۸ ساعت و سپس انتقال برگ-ها به محیط گزینشگر حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بود. جوانه‌ها تا زمان پدیدار شدن دو الی سه بار در محیط مشابه واکشت شدند. بعد از پدیدار شدن جوانه‌ها، آن‌ها به محیط MS حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و همان غلظت سفوتاکسیم منتقل شدند.

جدول ۲- استوک‌های مورد استفاده در تهیه محیط کشت MS

Table1 2- Stocks solution for MS media

محلول ذخیره Storage Solution	مقدار جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول(گرم) 100x(gr)
نیترات	
NH_4NO_3	16.5
KNO_3	19
سولفات	
$MgSO_4.7H_2O$	3.7
$MnSO_4.H_2O$	0.169
$ZnSO_4.H_2O$	0.086
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025
هالوژن‌ها	
$CaCl_2.2H_2O$	4.4
KI	0.0083
$CoCl_2.6H_2O$	0.00025
محلولPBMo	
KH_2PO_4	1.7
H_3BO_3	0.062
$NaMoO_4.2H_2O$	0.0025
محلول ذخیره آهن	
$FeSO_4.7H_2O$	0.278
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.373
ویتامین‌ها	
اسید نیکوتینیک	0.005
تیامین-HCl	0.001
پیریدوکسین-HCl	0.005
گلیسین	0.02

تجزیه‌های آماری

طرح آزمایشی برای تعیین غلظت‌های مناسب هورمونی در محیط کشت و همچنین تعیین مناسب‌ترین غلظت ساکارز به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در هر تکرار آزمایشی ۲۰ ریزنمونه برگی مورد استفاده قرار گرفتند. میزان شاخه‌زایی مستقیم بعد از ۳ هفته برای ریزنمونه‌های برگ در تیمارهای مختلف محاسبه شد. با استفاده از جدول تجزیه واریانس معنی‌داری اثرات اصلی ترکیبات هورمونی و غلظت ساکارز و همچنین اثر متقابل آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای والر- دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل داده های آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای SAS (۲۱) و SPSS16 انجام شد.

آغازگرهای استفاده شده و شرایط PCR

طراحی آغازگرها از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای توالی ژن *nptII* و توسط نرم‌افزار Oligoanalyser انجام شد. توالی آغازگرها در جدول ۳ ذکر شده است. برای تکثیر ژن *nptII* ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس واسرشته‌سازی، اتصال و طویل شدن به ترتیب در درجه حرارت‌های ۹۴، ۴۸ و ۷۲ هر کدام به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل انجام شد و در نهایت طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

جدول ۳- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII*

Table 3- Oligonucleotide sequence of *nptII* gene primers

آغازگر Primer	توالی الیگونوکلئوتیدی Oligonucleotide sequence
پیشرو Forward	5´ CACGGTTCAACAACATCCAG 3´
پسرو Reverse	5´ TGAAGACCCTGACTGGGAAG 3´

نتایج و بحث

این تحقیق به منظور بهینه‌سازی کشت بافت، بررسی میزان باززایی تحت تیمارهای هورمونی مختلف و غلظت ساکارز، انتخاب تیمار برتر و در نهایت انجام تراریختگی با تیمار برتر انجام شد.

بررسی تأثیر غلظت ساکارز و ترکیب هورمونی محیط کشت بر میزان کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی نشان داد که اثر غلظت ساکارز و نوع محیط کشت و اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار بودند. با توجه به اینکه اثر متقابل بین غلظت ساکارز و نوع محیط کشت معنی‌دار بود، بنابراین مقایسه میانگین ترکیبات تیماری با استفاده از روش مقایسه میانگین چند دامنه‌ای والر- دانکن انجام شد. نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری غلظت ساکارز و نوع محیط کشت، در جدول ۴ نشان داده شده‌است. با توجه به جدول شماره ۴، محیط کشت M1 حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز بیشترین میزان کالوس‌زایی را (۶۴ درصد) نشان داد. محیط کشت M2 حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز از لحاظ میزان کالوس‌زایی در رتبه بعدی قرار گرفت. حداقل میزان کالوس‌زایی (۱۷ درصد) در ترکیب تیماری محیط کشت M1 و غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. با توجه به نتایج جدول 4 می‌توان گفت که غلظت‌های پایین هورمون‌های BAP و NAA در غلظت‌های مختلف ساکارز به استثنا غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در محیط M1، باعث افزایش میزان کالوس‌زایی شدند. در مقابل غلظت های بالای هورمونی مانع کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها در هر دو غلظت مختلف ساکارز شدند. نتایج تحقیقات ژن و همکاران (۳۳) نشان داد که که میزان کالوس‌زایی در توتون به غلظت‌های هورمونی وابسته می‌باشد. بنابراین بدون در نظر گرفتن غلظت ساکارز می‌توان نتیجه-گیری نمود که میزان کالوس‌زایی در محیط کشت M4 کمتر از M1 می‌باشد.

بررسی تأثیر غلظت ساکارز و ترکیب هورمونی محیط کشت بر میزان شاخه‌زایی مستقیم

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفت میزان شاخه‌زایی مستقیم، مشخص شد که غلظت ساکارز و نوع محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی شاخه‌زایی مستقیم داشتند. اثر متقابل غلظت ساکارز و نوع محیط کشت برای این صفت معنی‌دار نبود، بنابراین اثرات اصلی با استفاده از روش والر- دانکن مقایسه میانگین شدند. نتایج مقایسه میانگین برای اثرات اصلی در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ٤- مقایسه میانگین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های توتون با دو غلظت مختلف ساکارز به روش والر- دانکن

Table4- Comparison of the the callus induction of *Nicotiana tabacum* in different concentration of sucrose based an Waller-Duncan T test

نوع محیط کشت Medium	غلظت ساکارز Sucrose concentration ($g\ l^{-1}$)	
	15	30
M1	64 a	17 c
M2	55a	53 a
M3	30 b	41 b
M4	20 c	34 b

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای والر- دانکن نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$) based on Waller-Duncan T test

بر اساس جدول شماره 5 برای اثر اصلی غلظت ساکارز، غلظت ۳۰ گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۱۵ گرم در لیتر بیشترین میزان شاخه‌زایی مستقیم را به خود اختصاص دادند. مقایسه میانگین اثر اصلی نوع محیط کشت برای میزان شاخه‌زایی مستقیم نشان داد که محیط کشت M1 و محیط کشت M2 بیشترین میزان شاخه‌زایی مستقیم را در مقایسه با سایر محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمایش به خود اختصاص دادند. با توجه به جدول مقایسه میانگین برای صفت میزان شاخه‌زایی مستقیم (جدول ۵) مشخص شد که این صفت نیز همانند صفت میزان کالوس‌زایی، به غلظت‌های پایین NAAو BAP پاسخ مناسب‌تری می‌دهد و در مقابل با افزایش غلظت این هورمون‌ها میزان شاخه‌زایی مستقیم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده از تحقیق استولارز و همکاران (۲۳) و حبیبی و همکاران (۶) بود که بیشترین میزان نوساقه را با استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آوردند. همچنین یافته‌های تحقیقی که توسط طراوت و همکاران (۲۴) انجام شد نیز مشابه نتایج این آزمایش بود. این محققین درصد بالایی از شاخه‌زایی را در ریزنمونه‌های برگی توتون با استفاده از غلظت‌های ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آوردند. با توجه به نتایج حاصل از بخش اول آزمایش و با توجه به این نکته که برای مرحله دوم آزمایش حداکثر شاخه‌زایی مستقیم با حداقل کالوس‌زایی مورد نظر بود، بنابراین از ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز برای ریزنمونه‌های توتون برای تلقیح بوسیله اگروباکتریوم سویه GV3101 استفاده شد.

بطور کلی، افزودن سیتوکینین‌ها مثل BAP به محیط کشت موجب ترغیب تقسیم سلولی، تشکیل شاخساره و پرآوری شاخساره جانبی شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کند. اما استفاده از دو هورمون NAA و BAP در اکثر گیاهان سبب تولید سریع‌تر و بیشتر ساقه‌زایی و تولید شاخساره در مقایسه با NAA و BAP به تنهایی می‌گردد (۲۲). در این تحقیق نیز استفاده توام از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA در محیط کشت اثر معنی‌داری (در سطح احتمال ۹۵ درصد) بر باززایی ساقه داشت.

بررسی تأثیر غلظت ساکارز و ترکیب هورمونی محیط کشت بر میزان ریشه‌زایی

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین ریشه‌زایی در ساکارز با غلظت ۶۰ گرم در لیتر مشاهده شد که نسبت به ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲). میانگین ریشه‌زایی در تیمارهای دارای تنظیم‌کننده رشد BAP، در مقایسه با تیمارهای فاقد آن، کاهش معنی‌داری را نشان داد. به نحوی که در محیط کشت‌های فاقد BAP ریشه‌زایی بطور متوسط ۶ برابر بیشتر بود. افزایش غلظت BAP از ۰/۱ به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر نتواست اختلاف معنی‌داری را در کاهش القای ریشه ایجاد نماید (شکل ۲).

میانگین تعداد ریشه‌ها در تیمارهای دارای ۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد به نحوی که بیشترین ریشه‌زایی در این دو تیمار مشاهده شد (شکل ۲). فراوانی ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA نسبت به تیمارهای فاقد آن، حدود ۱/۵ برابر افزایش یافت. بر اساس تحقیقات انجام شده، استفاده از هورمون NAA سبب تولید کالوس فراوان پیش از تشکیل ریشه می‌شود به همین علت این ریشه‌ها دارای منشایی غیرمستقیم می‌باشند (۲۹).

جدول ۵- مقایسه میانگین به روش والر- دانکن برای شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه های برگ توتون با غلظت‌های مختلف ساکارز

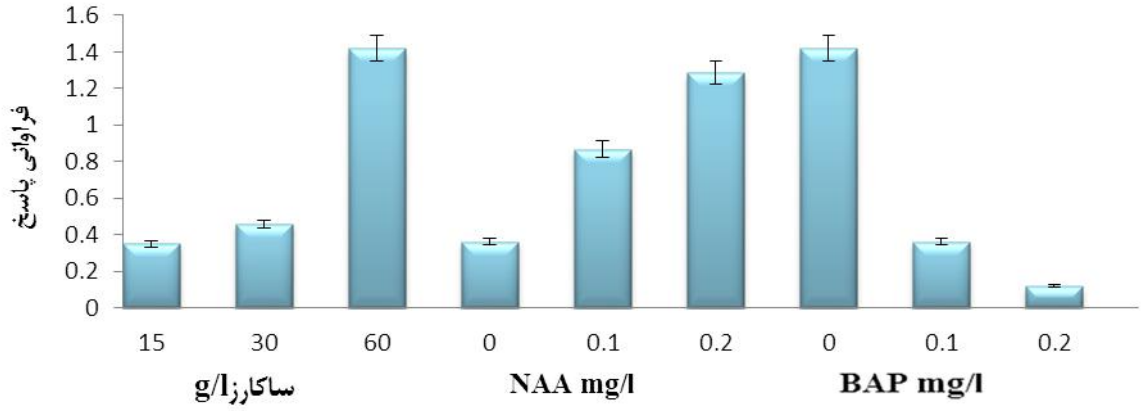
Table 5- Comparison of the the shoot regeneration frequency of *Nicotiana tabacum* leaves in different concentration of sucrose

میانگین Average	غلظت ساکارز Sucrose concentration (g l^{-1})		نوع محیط کشت Medium
	30	15	
68.5 a	72	65	M1
63 a	61	65	M2
32 b	33	31	M3
20 c	23	17	M4

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای والر- دانکن($P<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$) based on Waller-Duncan T test

این احتمال وجود دارد که با توجه به منشاء طبیعی تنظیم‌کننده رشد NAA، نیاز باشد از غلظت‌های بیشتری از آن در محیط کشت استفاده نمود. به طور متوسط از ریزنمونه‌هایی که در محیط با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند، بیش از ۲۰ ریشه مشاهده شد در حالی‌که در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، حداکثر ۱۰ ریشه القا شد که در مقایسه با سایر تیمارها افزایش چشمگیری داشته‌است. در این مطالعه بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، هر چند افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد NAA از ۰/۱ به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی در افزایش ریشه‌زایی اثر معنی‌داری نداشت (شکل ۲) اما اثر متقابل ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۶۰ گرم در لیتر ساکارز فراوانی ریشه‌زایی را در محیط کشت افزایش داد که در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار بود (نتایج آورده نشده است). لذا در راستای تحقیقات پیشین در زمینه ریشه‌زایی، هورمون NAA نقش مؤثری در افزایش ریشه‌زایی به همراه غلظت مناسب ساکارز داراست (۲۲). گزارش میائو و همکاران (۱۳) نیز بر روی گیاه *Allium chinense* بیانگر افزایش تشکیل ریشه با افزایش غلظت NAA بود. بنابراین در این آزمایش به منظور افزایش ریشه‌زایی و افزایش طول ریشه، شاخساره‌های طویل شده به محیط حاوی NAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز با غلظت ۶۰ گرم در لیتر منتقل شدند.



شکل ۲- مقایسه فراوانی ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف ساکارز، BAP و NAA در ریزنمونه‌های توتون

Figure 2- Comparison of the root regeneration frequency of *Nicotiana tabacum* in different concentrations of sucrose, NAA and BAP

تعیین سطح مؤثر کانامایسین بر روی ریزنمونه‌های توتون به عنوان انتخابگر

به منظور توسعه یک روش سریع و مؤثر تلقیح ریزنمونه‌های توتون با اگروباکتریوم، ابتدا اثر مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیک کانامایسین

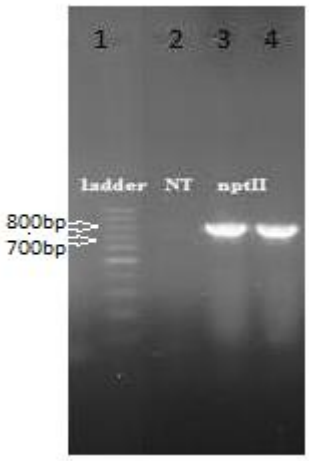
(۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) جهت تعیین حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک بر روی ریزنمونه‌های توتون بررسی شد، نتایج آزمایش نشان داد که یک هفته بعد از کالوس‌زایی در محیط کشت MS بدون کانامایسین تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها وارد مرحله کالوس زایی شدند و میزان کالوس زایی در محیط کشت MS حاوی کانامایسین ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بسیار پایین بوده و تمامی ریز نمونه‌ها (تراریخت و غیرتراتریخت) زرد شده و از بین رفتند در حالی‌که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین بطور کامل از کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم بر روی ریزنمونه‌های غیر تراریخت توتون جلوگیری کرد و تعدادی از ریزنمونه ها وارد مرحله کالوس زایی شدند. با توجه به اینکه مقادیر بالای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم اثر منفی بر روی شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگی دارد، در محیط کشت‌ها از غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم استفاده شد.

انتقال ژن انتخابگر *nptII* به سلول‌های توتون با استفاده از اگروباکتریوم

پس از آلوده‌سازی ریزنمونه‌های توتون با اگروباکتریوم حاوی ژن انتخابگر *nptII*، ابتدا نمونه‌ها به محیط هم‌کشتی (محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA فاقد آنتی‌بیوتیک) منتقل شدند (۴). بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مشخص گردید که نگهداری محیط‌های هم‌کشتی در شرایط تاریکی باعث افزایش نفوذ اگروباکتریوم به بافت گیاهی می‌شود. بعد از ۴۸ ساعت هم‌کشتی، نمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند. پس از ۱۰ روز، بخش‌هایی که ژن انتخابگر را دریافت نکرده بودند شروع به زردشدن کردند. ۵ هفته پس از تلقیح، نوساقه‌های تراریخته مقاوم به کانامایسین بر روی ریزنمونه‌های برگ ظاهر شدند. پس از ۸ هفته از تلقیح اولیه، گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بدست آمدند.

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته

برای تأیید حضور پلاسمید حاوی ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) در ریزنمونه‌های توتون، بررسی PCR بر روی گیاهان مقاوم انجام شد. با انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII*، قطعه‌ای به اندازه ۷۹۸ bp تکثیر شد و در گیاهان شاهد غیرتراریخته هیچگونه باندی مشاهده نشد (شکل ۳). با توجه به نتایج مشاهده شده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، حضور ژن مقاومت به کانامایسین در نمونه‌های تراریخته اثبات گردید.



شکل ۳- تأیید حضور سازه ژنی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در نمونه‌های تراریخته گیاه توتون، ۱: نشانگر مولکولی شرکت پارس توس؛ ۲:کنترل منفی (NT)؛ ۳ و ٤: تأیید حضور ژن با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) (تکثیر قطعه ۷۹۸ جفت بازی)

Figure 3- PCR analysis for detection of *nptII* gene in transformed leaves of tobacco. 1) 100bp size marker (parstous); 2)

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات گذشته، تلاش‌های محدودی برای بهینه‌سازی باززایی مستقیم توتون تراریخته نشان داده‌اند که اغلب شامل باززایی در حضور غلظت‌های مختلف هورمونی بوده است (۳۰). در این تحقیق، بررسی بهینه‌سازی کشت بافت توتون با اعمال تیمارهای مختلف هورمونی و غلظت‌های متفاوت ساکارز انجام شد. از آنجا که روش‌های باززایی غیرمستقیم از طریق کالوس، احتمال وقوع تنوع سوماکلونال و تغییر در ماده ژنتیکی را افزایش می‌دهد، تلاش برای توسعه روش‌های باززایی معتبر و مؤثر که تکرارپذیر باشند گامی مهم در توسعه سیستم تراریختی گیاه محسوب می‌شود و لذا ضروری است

بهینه‌سازی روش‌های باززایی بدون واسطه‌گری کالوس به عنوان پیش نیاز هرگونه اقدام مهندسی ژنتیک صورت گیرد. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که برای گیاه توتون کالوس‌زایی تحت تأثیر اثر متقابل غلظت ساکارز و نوع ترکیب هورمونی محیط‌کشت می‌باشد. اما صفت شاخه‌زایی مستقیم تحت تأثیر اثر متقابل این صفت و غلظت ساکارز نبود. با توجه به نتایج مقایسه میانگین BAP و NAA مشخص شد که محیط کشت‌هایی با غلظت‌های کم (کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم در ریزنمونه‌های توتون می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل از کشت بافت می‌توان پیشنهاد نمود که تیمارهای اعمال شده در این تحقیق بر روی سایر ژنوتیپ‌های توتون نیز اعمال شود و بهترین ژنوتیپ‌های پاسخ دهنده به کشت بافت تعیین شوند و در برنامه‌های اصلاح مولکولی این گیاه مورد استفاده قرار گیرند. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای انتخاب گیاهان تراریخته مناسب بود. در این تحقیق بعد از ۸ هفته از تلقیح اولیه، گیاهان مقاوم به کانامایسین بر روی محیط‌کشت‌های حاوی آنتی بیوتیک بدست آمدند. برای تأیید حضور قطعه ژن مقاومت به کانامایسین در ژنوم گیاه، PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان تراریخته احتمالی انجام شد. بررسی گیاهان تراریخته در سطح DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکنیک PCR نشان داد که ژن هدف *nptII* به ژنوم گیاه توتون پیوند خورده است. پیشنهاد می‌شود از سویه‌های دیگر اگروباکتریوم نیز برای انتقال ژن استفاده شود تا بهترین سویه برای انتقال ژن به این گیاه انتخاب شود. نتایج این مطالعه در مجموع نشان داد که استفاده از سیستم باززایی تک مرحله‌ای و نیز اجتناب از غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد بویژه سیتوکنین‌ها در بافت‌های جوان که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند احتمالا بتواند با کاهش تغییرات اپی‌ژنتیک برای باززایی مستقیم از گیاهان تراریخته در توتون مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1- Ali G., Hadi F., Ali Z., Tariq M., and Khan M.A. 2007. Callus Induction and in vitro Complete Plant Regeneration of Different Cultivars of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on Media of Different Hormonal Concentrations. Biotechnology, 6: 561–566.

2- Babbar S.B., Jain R., and Walia N. 2005. Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 41(3):258–261.

3- Ekrum G. 2001. Insertion of an antimicrobial gene into Agrobacterium and its further use in transforming tobacco. Turkish Journal of Botany, 25:169-175.

4- Gangopadhyay G., Das S., Mitra S.K., Poddar R., Modak B.K., and Mukherjee K. 2002. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68: 301–310.

5- Habibi-Pirkoohi M., Malekzadeh-Shafaroudi S., Marashi H., Moshtaghi N., Nassiri M.R., and Zibaee S. 2014. Transient Expression of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Coat Protein in Tobacco (*Nicotiana tabacom*) via Agroinfiltration. Iranian Journal of Biotechnology, 12: 28-35.

6- Joshi N. 2009. In Vitro Growth and Shoot Multiplication in *Nicotiana tabacum* L-influence of gelling agent and carbon source. International Journal of Plant Developmental Biology, Global Science Books.

7- Klems M., Balla J., Machackova I., Eder J., and Prochazka S. 2000. The uptake and metabolism of 3H-benzylaminopurine in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. Plant Growth Regulation, 31(3):135–142.

8- Leuba V., and LeTourneau D. 1990. Auxin activity of phenylacetic acid in tissue culture. Journal of Plant Growth Regulation, 9:71-76.

9- Linsmaier E.M., and Skoog F. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 18:100-127.

10- Lucyszyn N., Quoirin M., Homma M.M., and Sierakowski M.R. 2007. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. Biologia Plantarum, 51(1):173–176.

11- Mangat B.S., and JANJUA S. 1987. Cyclic Nucleotides and In Vitro Plant Cultures: Induction of organogenesis in tobacco (*Nicothiana tabacum*) callus cultures. Journal of Experimental Botany, 38 (12):2059-2067.

12- Miao-Miao Y., Chan X., Chun-Hwan K., Yeong-Cheol U., Amadou Apho B., and De-Ping G. 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus inductionand plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae, 123:124-128.

13- Mohan Pathi K., Tula S., and Tuteja N. 2013. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium- mediated genetic transformation of tobacco. Plant Signaling & Behavior, 8:6.

14- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology Journal. 15: 473–497.

15- Nhut D.T., Aswath C.R., Teixeira da Silva J.A., Le B.V., Thorpe T., and Tran Thanh Van K. 2003. Tobacco Thin Cell Layer Morphogenesis. Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications, 17-63.
16- Nugroho H., and Verpoorte R. 2002. Secondary metabolism in tobacco. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68:105-125.
17- Ozel C.A., Khawar K.M., and Arslan O. 2008. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Scientia Horticulturae, 117(2):174–181.
18- Parc G., Rembur J., Rech P., and Chriqui D. 2007. In vitro culture of tobacco callus on medium containing peptone and phytate leads to growth improvement and higher genetic stability. Plant Cell Reports, 26(2):145-52.
19- Ramage C.M., and Williams R.R. 2002. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. Journal of Experimental Botany, 53(373):1437-43.
20- SAS. 2001. SAS/STAT User's Guide (8.02) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
21- Smykalova I., Smirous P., Kubosiova M., Gasmanova N., and Griga M. 2009. Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 31:21-31.
22- Stolarz A., Macewicz J., and Lorz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. Journal of Plant Physiology, 137:347-357.
23- Taravat E., Sohrabi M., and Zebarjadi A. 2012. Optimization and gene transformation of Tobacco. Proceedings of 7th national biotechnology congress of I.R. Iran. (in Persian with English abstract).
24- Teixeira da Silva J.A. 2002. Polyamines in the regulation of chrysanthemum and tobacco in vitro morphogenic pathways. Propagation of Ornamental Plants, 2: 9-15.
25- Teixeira da Silva J.A. 2005. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. Plant Science, 169: 1046–1058.
26- Teixeira da Silva J.A., and Fukai S. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycinon chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesisand Agrobacterium growth. Journal of Applied Horticulture, 3(1):3-12.
27- Tran Thanh Van M., Dien N.T., and Chlyah A. 1974. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. Planta, 119(2):149-59.
28- Van den Ende G., Croes A.F., Kemp A., and Barendse G.W.M. 1984a. Development of flower buds in thin-layer cultures of stalk tissue from tobacco: Role of hormones in different stages. Physiologia Plantarum, 61: 114–118.
29- Van den Ende G., Croes A.F., Kemp A., Barendse G.W.M., and Kroh M. 1984b. Floral morphogenesis in thin-layer tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. Physiologia Plantarum, 62: 83–88.
30- Yanjie C. 2007. Callus induction and plant regeneration From leaf explants of tobacco. Available at http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/xbgc/sy/PDF/ChaoYanjie.pdf.
31- Zhan-sheng P., Ji-yao C., and Huai-xin C. 1989. The regulation effect of the light and hormones on morphogenesis in tobacco leaf tissue cultures. Acta biologiae experimentalis Sinica, 22 (3):279-285.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 4, Winter 2018, P. 803-814
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۸۱۴-۸۰۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Development of an Efficient Regeneration and Transformation Method for *Nicothiana tabacum* L. through the Optimization of Growth Regulators and Sucrose Concentration

M. Beihaghi[1]- A. Bagheri[2*]- H. Marashi[3]- M. Sankian[4]- A. Farsad[5]

Received: 26-02-2017
Accepted: 03-10-2017

Introduction: Plant tissue culture is a collection of techniques used to maintain or grow plant cells, tissues or organs under sterile conditions on a nutrient culture medium of known composition and widely used to produce clones of a plant in a method known as micropropagation. Plant research often involves growing new plants in a controlled environment. These may be plants that we have genetically altered in some way or may be plants of which we need many copies all exactly alike. These things can be accomplished through tissue culture of small tissue pieces from the plant of interest. These small pieces may come from a single mother plant or they may be the result of genetic transformation of single plant cells which are then encouraged to grow and to ultimately develop into a whole plant. Tissue culture techniques are often used for commercial production of plants as well as for plant research. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is one of the most important model plants used in the physiologic, genetic and tissue culture studies. The manipulation of tobacco genetic structure requires an efficient technique of gene transferring and regeneration. Whereas**,** the tobacco plant is a very effective bioreactor in the production of recombinant proteins, in this research we optimized the best tissue culture system and also, genetic transformation process of this plant.

Materials and Methods: Our plant tissue culture protocols, Include helpful information for Murashige and Skoog media, plant growth regulators, plant growth hormones, plant transformation systems, and other products for plant tissue culture. For this purpose, different concentrations of sucrose and 4 combinations of growth regulators (BAP and NAA) on callus induction, direct shoot regeneration and rooting were examined in a factorial experiment based on completely randomized design with 3 replications. The sensitivity of tobacco explants to kanamycin was examined through the cultivation of them on the selective medium with different concentrations of antibiotic. For genetic transformation, agrobacterium tumifacious (GV3101) harboring plasmid pBI121 was used and the transgenic plants were confirmed by PCR analysis.

Results and Discussion: The results of variance analysis and the means comparison showed that the best medium for callus induction was M1 (0.1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP) with 15 g/l sucrose in the leaf explants, while the most direct shoot regeneration rate was obtained on the M1 medium with 30 g/l sucrose concentration. High-frequency of rooting was also influenced by 0/1 mg/l NAA and 60 g/l sucrose. So, supplementing the medium with NAA and BAP at different concentrations facilitated induction of multiple shoots from explants. NAA was proved to be the best and the number of shoots increased with increase in the concentration up to (0.1 mg/l), and exceeding this concentration resulted in decline in percent response as well as number of shoots was recorded shoot regeneration. The concentration of BAP was further increased a linear increase in the number of shoots was observed up to an optimal level (1 mg/l). Beyond the optimal concentration (1 mg/l), a decrease in the response as well as number of shoots was recorded due to profuse basal callusing. The effect of cytokinins on multiple shoot regeneration, higher concentrations of NAA found to be inhibitory for shoot regeneration because of huge callusing which hampered the growth and development of new shoots. Also different concentrations of sucrose have a different effect on the shoots and callus. The concentration of sucrose had significant effect on direct shoot regeneration. The main effect of sucrose concentration, concentration of 30 grams per liter, compared with a concentration of 15 grams per liter had the highest direct shoot regeneration. Concentration of 50 mg/l kanamycin could completely prevent the regeneration of untransformed explants so was used in the selective culture medium. Subsequently, the presence of *nptII* gene (798 bp) in the transgenic plants was

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Professors of Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: bagheriyazd@gmail.com)
4- Associate Professor of Bu Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5- Asistant Professor of College of Agriculture, Birjand University, Iran

confirmed and the transformation efficiency obtained by using the agrobacterium-mediated transformation was more than 95%.

Conclusions In present research, an efficient *in vitro* regeneration protocol has been developed for tobacco, where different factors including the age of the explant and plant growth regulators were optimized for maximum propagation of tobacco. The results showed that regeneration and transformation method described here is highly efficient and fast for the introduction of any foreign gene directly in tobacco plant.

Keywords: Direct shoot regeneration, *Nicothiana tabacum*, *nptII* selective gene, Tissue culture, Transformation