

## بهینه‌سازی عوامل مؤثر در انتقال ژن FAD3 مؤثر در بیوسنتز امگا ۳ به دو رقم کنجد

### Optimization of effective factors in the transfer of FAD3 gene effective in omega-3 biosynthesis to two sesame cultivars

نوشین فلاحتی<sup>۱</sup>، علیرضا زبرجدی<sup>۲\*۳</sup>، زهرا طهماسبی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
- ۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- ۳- استاد، پژوهشکده گیاهان دانه روغنی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- ۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Fallahi N<sup>1</sup>, Zebarjadi A<sup>\*2,3</sup>, Tahmasebi Z<sup>4</sup>

- 1- PhD Student, Plant breeding- Molecular genetics and genetic engineering, Ilam University, Ilam, Iran
- 2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
- 3- Professor, Oilseed Plants Research Institute, Razi University, Kermanshah, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ilam University, Ilam, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zebarjadi@razi.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹)

چکیده

مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۶ و نسبت بسیار بالای امگا ۶ به امگا ۳ باعث بیماری‌های بسیاری از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و بیماری‌های التهابی و خودایمنی می‌شود. برای انتقال موفق یک ژن به گیاه، به بهینه‌سازی انتقال ژن نیاز است. کنجد یک گیاه دانه روغنی قدیمی است که بهدلیل داشتن لیگنان‌های مهم دارویی و همچنین روغن خوراکی با کیفیت شهرت دارد. افزایش امگا ۳ در این گیاه تا اندازه زیادی به بهبود کیفیت روغن آن کمک می‌کند. در این پژوهش جهت بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن FAD3 جدا شده از گیاه کتان به گیاه کنجد اثرات رقم (داراب و دشتستان)، مدت زمان پیش کشته (۵ و ۷ روزه)، غلظت اگروباکتریوم (۱ و ۰/۵ OD<sub>600</sub>)، مدت زمان تلچیح (۱۰ و ۳۰ دقیقه)، مدت زمان هم کشته (صفر، ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت) و شرایط نوری (تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) و غلظت استوسرینگون (۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) هر کدام به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های ۷ روزه در رقم دشتستان و ریزنمونه‌های ۵ روزه در رقم داراب، غلظت اگروباکتریوم OD<sub>600</sub>=1، مدت زمان تلچیح ۳۰ دقیقه، مدت زمان همکشته ۲۴ ساعت در تاریکی و غلظت استوسرینگون ۱۰۰ میکرومولار نقش مهمی در کارایی انتقال ژن داشوند. در این پژوهش رقم دشتستان درصد باززایی بهتری را نسبت به رقم داراب نشان داد. در نهایت گیاهچه‌های باززا شده به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. بررسی اولیه گیاهان باززا شده در محیط انتخابی انجام شد و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گشت و گیاهان تراویخته انتخاب شدند.

#### واژه‌های کلیدی

امگا ۳

انتقال ژن

کنجد

*Agrobacterium tumefaciens*

## مقدمه

طريق تکنیک انتقال ژن است (Kapoor et al. 2015). در روش‌های اصلاح مولکولی گیاهی از انتقال ژن و کشت بافت استفاده می‌شود و کشت درون شیشه‌ای یکی از روش‌های مهندسی ژنتیک در تولید گیاهان با صفات مطلوب است (Gholami 2017). کارایی انتقال ژن به چندین فاکتور بستگی دارد که از جمله آن می‌توان به نژاد و غلظت باکتری، اضافه کردن مواد فنلی در محیط کشت، گونه گیاهی و ژنتیک، تنظیم کننده‌های رشدی، ریزنمونه، نور و دما، دمای همکشتی، آنتی بیوتیک و روش مناسب انتخاب سلول تراریخت شده از بافت غیر تراریخته اشاره نمود. در تراریختگی به وسیله اگروباکتریوم علاوه بر نیاز به یک سیستم باززایی قدرتمند در گیاه مورد نظر، بهینه نمودن فاکتورهای دیگر مؤثر در انتقال ژن که باعث تولید گیاه باززا شده بیشتری می‌شود و در نهایت باعث افزایش کارایی روش شود ضرورت دارد. از طرفی طراحی و استفاده از سازه مناسبی که امکان ریدیابی آسان گیاهان تراریخته را در مراحل اولیه رشد فراهم نماید بسیار مفید خواهد بود (Towheed-Far and Mohsenpour 2010).

پژوهشگران اعلام کردند که می‌توان از ژن جدا شده FAD3 برای افزایش تبدیل اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸:۲ به ۱۸:۳ برای بهبود کیفیت دانه‌های روغنی برای غذای انسان استفاده کرد. آن‌ها اظهار داشتند که CsFAD3 پروتئینی است که می‌تواند اسیدهای چرب ۰۶ را به ۰۳ تبدیل کند (Soltani and et al. 2019). محققین اعلام کردند که میزان تراریختگی در گیاه کنجد مصری بسیار کم است و گیاه کنجد بهدلیل داشتن متabolیت‌های ثانویه نسبت به تراریختگی سرکش و بسیار مقاوم است (Shafeay and et al. 2011; Baskaran and Jayabalan 2006).

Nptll Al-Chowdhury and et al. (2014) موفق شدند که دو ژن GUS را به وسیله اگروباکتریوم به گیاه کنجد انتقال دهند. آن‌ها اعلام کردند که در این پژوهش باززایی گیاه کنجد در حدود ۵۷ درصد و تراریختگی آن ۴۳ درصد بوده است.

Debnath et al. (2018) در پژوهشی اظهار داشتند که تنظیم کننده‌های رشدی BAP، IAA و Agno3 در انتقال ژن گیاه کنجد مؤثر می‌باشد. به پژوهش آن‌ها از ریزنمونه کوتیلدون ۴ تا ۷ روزه جهت انتقال ژن مورد نظر استفاده شد.

کنجد با نام علمی *Sesamum indicum* مهم‌ترین گونه از جنس کنجد و عضوی از خانواده pedaliaceae است. دانه این گیاه دارای محتوای روغن بالا (۵۰٪)، سطح بالای اسیدهای چرب غیر اشباع و همچنین لیگنان‌های مهم دارویی شامل سرامین، سرامولین، توکوفرول‌ها می‌باشد (Zimik and Arumugam 2017).

درصد بالای اسید چرب امگا ۶ نسبت به اسید چرب امگا ۳ باعث بروز بیماری‌های کشنده‌ای از جمله دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و چاقی می‌شود در حالی که افزایش مقدار سطح اسید چرب امگا ۳ نسبت به امگا ۶ مانع بر سر راه این گونه بیماری‌هاست. مطالعات نشان می‌دهد اسید چرب امگا ۳ علاوه بر نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در تنظیم و ثبات پلاکت خون (هومستاز) و کاهش خطر لخته شدن خون (ترمبوز) مؤثر است که این موضوع نشان می‌دهد که می‌توان از آن در درمان COVID-19 بهره جست (Djuricic and et al. 2021).

گیاهان دانه روغنی با سطوح بالایی از امگا ۳ در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته‌اند. زیرا آن‌ها منابع ارزشمندی برای مطالعات و دستکاری‌های ژنتیکی همچون تغییر درمیزان امگا ۳ هستند (Soltani et al. 2020; Gunstone et al. 1994). اسیدهای چرب دیساتوراز (delta 15 desaturase (FAD) مهم‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در بیوسنتر اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه نقش دارند (Zauner et al. 2012).

در مطالعات اخیر، تجزیه و تحلیل ترکیبات اسیدهای چرب گیاه کنجد نشان داده که سطح اولئیک اسید (C18:1) و لینولئیک اسید (C18:2) در این گیاه بالاست، اما سطح آلفا لینولنیک اسید (C18:3) به طور قابل ملاحظه‌ای پایین است و نسبت ۲:۱ به C18:3 نیز بسیار زیاد است. بنابراین، ارقام کنجد با نسبت متعادل امگا ۶ به امگا ۳ به طور قطع می‌توانند ارزش غذایی بیشتری داشته باشند و به شایستگی غذایی این منبع روغنی ارزان قیمت و سالم بیفرایند (Bates et al. 2013; Bhunia et al. 2002; Browse et al. 1986).

تاكنوں در گیاه کنجد ورود ژن‌های مفید از گونه‌های وحشی به دلیل موانع پس از لقاد موفقیت‌آمیز نبوده است و تنها جایگزین برای بهبود کیفیت روغن این گیاه انتقال ژن از منابع دیگر، از

محیط‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط پیش‌کشتی، هم‌کشتی، باززایی و انتخاب و ریشه‌زایی بود (جدول ۱). به‌منظور بهینه‌سازی انتقال ژن در گیاه کنجد ۵ آزمایش چند عاملی در قالب طرح کامل تصادفی در ۴ تکرار به‌طور جداگانه و به شرح زیر اجرا شد.

آزمایش ۱- بررسی مدت زمان پیش‌کشتی=دو عامل رقم (داراب و دشتستان) و مدت زمان پیش‌کشتی (۵، ۶ و ۷ روز) ابتدا ریزنمونه‌ها در محیط شماره ۲ کشت داده شدند و در ادامه از ریزنمونه‌های ۵، ۶ و ۷ روزه جهت انتقال ژن استفاده شد.

آزمایش ۲- بررسی غلظت اگروباکتریم=دو عامل رقم (داراب و دشتستان) و غلظت اگروباکتریم ( $OD_{600} = 0.25, 0.5$ )

آزمایش ۳- بررسی مدت زمان تلقیح=دو عامل رقم (داراب و دشتستان) و مدت زمان تلقیح (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)

آزمایش ۴- بررسی مدت زمان همکشتی و اثر نور=سه عامل رقم (داراب و دشتستان)، مدت زمان همکشتی (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و اثر نور (تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس)

ریزنمونه‌ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر، ابتدا بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا مقداری از رطوبت آن کاهش یابد و سپس به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت دو شرایط نوری تاریکی و روشنایی قرار گرفتند.

آزمایش ۵- بررسی غلظت استوسرینگون=دو عامل رقم (داراب و دشتستان) و غلظت استوسرینگون (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) با توجه به اینکه اگروباکتریوم برای ورود به گیاه معمولاً به سمت زخم‌های گیاه ( محل تجمع مواد فتلی) حرکت کرده و در گیاه باعث بیماری‌زایی می‌شود، استفاده از استوسرینگون به عنوان ماده فنولی در بهبود و موفقیت انتقال ژن نقش دارد.

ریزنمونه‌ها بعد از سپری شدن مدت زمان همکشتی توسط سوفاتاکسیم ۵۰۰ میلی گرم به مدت ۹۰ دقیقه شستشو شدند.

برای انتقال ژن به کنجد از سوبه اگروباکتریوم تومه‌فاسینس (PGV3101) C58 که حاوی ناقل دوتایی pBI121 مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفارمپیسین بود استفاده شد.

مزایای فراوان استفاده از بیوتکنولوژی پیشرفته کشاورزی در بهبود ژنتیکی کنجد هنوز به طور جدی در ایران محقق نشده است. یکی از مشکلات روغن گیاه کنجد بالا بودن میزان امگا ۶ نسبت به امگا ۳ است. به‌همین دلیل مصرف دراز مدت این روغن ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی شود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش افزایش میزان امگا ۳ در این گیاه است که تا اندازه زیادی به بهبود کیفیت روغن در آن کمک کند. لازم به ذکر است تا به حال مسیر بیوستزر این اسید چرب ضروری در گیاه کنجد از طریق ژن FAD3 گیاه کتان به‌وسیله مهندسی ژنتیک دستورالعمل نشده است، لذا این تحقیق از این نظر اولین گزارش محسوب می‌شود.

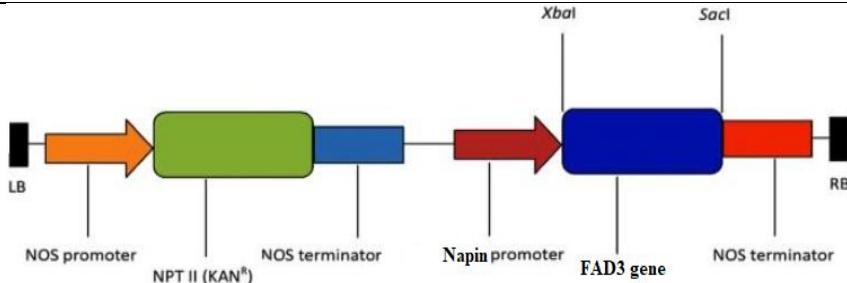
## مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی انجام شد. ارقام کنجد مورد استفاده در این پژوهش شامل دو رقم ایرانی داراب و دشتستان بود که از مؤسسه تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه شد. ابتدا بذور سالم انتخاب و به پس از شستشو به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطறخیس شدند. در ادامه توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدغونی گشتند و بعد از سه مرحله شستشوی ۵ دقیقه‌ای به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد قرار گرفتند. در نهایت سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه با آب مقطற استریل مورد شستشو قرار گرفتند. تمام لوازم موردنیاز از جمله اسکالپل، پنس، شیشه‌های کوچک جهت کشت بذور، پتری به‌منظور استریل شدن در اتوکلاو قرار گرفتند. فضای زیر هود لامینار جهت کشت و کار ابتدا با الکل ۷۰ درصد ضد غونی و سپس به مدت ۲۰ دقیقه نور ماوراء بنشش به آن تابیده شد. برای ضد غونی دست‌ها هم در زیر هود از الکل ۷۰ درصد استفاده شد. بعد از ضدغونی، پوشش و جنین بذرها توسط پنس و تیغ اسکالپل حذف و دو لپه بذور جدا گشتند (این کار به دقت بسیار زیادی نیاز دارد به طوری که باید لپه‌ها آسیب بینند).

محیط پایه در این پژوهش شامل محیط MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به عنوان عامل منعقد کننده بود.

جدول ۱- محیط‌های استفاده شده در بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه کنجد

| ترکیبات  | محیط                            |
|--|---------------------------------|
| AgNO <sub>3</sub> 5 mg/L+ IAA 1 mg/L+ BAP 6.5 mg/L + MS                    | محیط ۱ (پیش‌کشتی باقل از آلدگی) |
| acetosyringone + AgNO <sub>3</sub> 5 mg/L+ IAA 1 mg/L+ BAP 6.5 mg/L + MS   | محیط ۲ (همکشتی)                 |
| kanamycin 50 mg/L+ AgNO <sub>3</sub> 5 mg/L+ IAA 1 mg/L+ BAP 6.5 mg/L + MS | محیط ۳ (باززایی و انتخاب)       |
| kanamycin 30 mg/L+IAA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + MS                           | محیط ۴ (ریشه زایی)              |



شکل ۱- ساختار ژنی مورد استفاده

بتواند T-DNA خود را به گیاه منتقل کند. پس از این مرحله، ریزنمونه‌ها توسط آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم با غلظت ۱ mg L<sup>-1</sup> (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۵۰ میلی‌گرم (محیط ۳)) حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم در لیتر کانا مایسین منتقل شدند. ریزنمونه‌هایی که روی محیط انتخابی به گیاهچه‌های سبز باززا شدند، هر ۱۵ روز یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. بعد از مدت ۳۰ روز گیاهچه‌های تراریخت شده در محیط ریشه‌زایی (محیط ۴) قرار گرفتند.

جهت آنالیز گیاهان تراریخت ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های Doyle and Doyle شاهد و تراریخت گیاه کنجد طبق روش (Doyle and Doyle 1990) انجام گرفت و در نهایت، جهت تأیید انتقال ژن به گیاهان از روش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، استفاده شد.

به منظور تعیین میزان کمی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از فرمول زیر استفاده گشت:

$$\text{غلظت DNA} (\text{بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر}) = \frac{50}{\text{OD}_{260\text{nm}}} * \text{عكس رفت}$$

کیفیت DNA نیز از فرمول زیر بدست آمد:  

$$2 > \text{OD}_{280}/\text{OD}_{260} > 1/8$$

این ناقل دارای پرومودور ناپین جدا شده از گیاه کلزا (Sohrabi and et al. 2015) و ناحیه T-DNA حاوی ژن FAD3 گیاه کتان (Fallahi and et al. 2023) بود (شکل ۱).

جهت کشت اگروبکتریوم حاوی پلازمید نوترکیب حدود ۲۵ میکرولیتر از محیط باکتریایی ذخیره شده در گلیسروول (نگهداری شده در -۸۰ درجه سانتی‌گراد) پس از ذوب شدن بر روی یخ به ۵۰ میلی‌لیتر LB مایع (حاوی آنتی‌بیوتیک ریفارمپیسین و کانا مایسین) اضافه شد و به مدت یک شب در انکوباتور شیکر دار با سرعت ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸°C تا رسیدن به OD<sub>600</sub>=۱ رشد داده شدند. در روز تلقیح سوسپانسیون اگروبکتریوم به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتیفیوژ گشت و رسوب باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط تلقیح (محیط MS مایع) دوباره سوسپانسیون شد و در نهایت برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر رقیق شد.

جهت تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون ابتدا کوتیلدون‌های استریل در مدت زمان پیش‌کشتی (۵، ۶ و ۷ روزه) در محیط پیش‌کشتی (محیط ۱) کشت داده شدند. در ادامه به مدت زمان تعیین شده (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) در سوسپانسیونی از سه غلظت باکتری (۱۰/۵، ۲۰/۵ و ۳۰/۵ دقیقه) در دمای ۲۸ درجه با سرعت ۱۵۰ rpm شیک شدند. سپس به روی کاغذ صافی سترون شده منتقل شده و در نهایت به محیط هم‌کشتی (محیط ۲) به مدت زمان (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و شرایط نوری (تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) انتقال داده شده و در دمای ۲۵°C نگهداری شدند، تا اگروبکتریوم

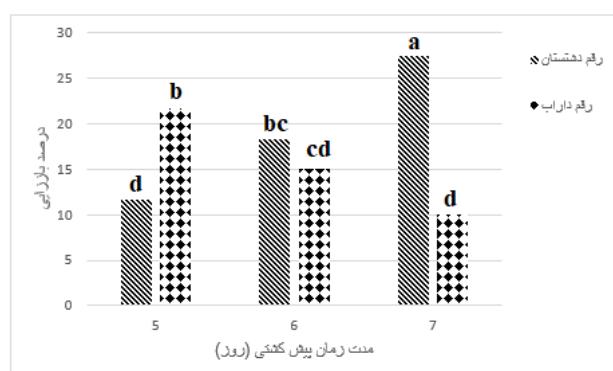
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده

| نام آغازگر | درصد | Tm    | تعداد باز | توالی آغازگر   |
|------------|------|-------|-----------|--|
| FFAD3B     | 41   | 69.45 | 39 mer    | <u>GAATTCTCTAGA ACTAGT ATGAGCCCTCCAAACTCAATG</u><br>EcoRI XbaI SpeI  |
| RFAD3B     | 51   | 72.79 | 37 mer    | <u>AAGCTT GAGCTC AGCGCT TCAGCTGGATTTGGACTTG</u><br>HindIII SacI AfeI |

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر رقم در مدت زمان پیش‌کشتی برای صفت درصد بازیابی

| متغیر                   | منبع تغییر        | درجه آزادی | میانگین مرباعات     |
|-------------------------|-------------------|------------|---------------------|
| رقم                     |                   | ۱          | ۷۸/۲۲ <sup>°</sup>  |
| مدت زمان پیش‌کشتی       | مدت زمان پیش‌کشتی | ۲          | ۱۱/۵۴ <sup>ns</sup> |
| رقم × مدت زمان پیش‌کشتی |                   | ۲          | ۳۷۸/۳ <sup>**</sup> |
| خطای آزمایشی            |                   | ۱۸         | ۱۰/۳۴               |
| ضریب تغییرات (درصد)     |                   |            | ۱۸/۵۳               |

\*\* و \* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر رقم در مدت زمان پیش‌کشتی برای صفت درصد بازیابی

داده‌های مقایسه میانگین نشان داد که رتبه a متعلق به رقم دشتستان ۲ با ۲۴/۹۹ درصد بازیابی بود (شکل ۳) و همچنین بالاترین درصد بازیابی (۳۰/۸۲) در غلظت اگروباکتریوم بالاترین درصد بازیابی (۰/۲۵) تعلق گرفت (شکل ۴). اگروباکتریوم OD<sub>600</sub>=۰ رخ داد و کمترین میزان بازیابی (۱۴/۹۹) به غلظت اگروباکتریوم (۰/۲۵) تعلق گرفت (شکل ۴). اگروباکتریها باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی هستند که می‌توانند DNA خود را در حین آلووده کردن به سلول‌های گیاهی انتقال دهند. اصلی‌ترین رویداد در انتقال ژن به گیاه در روش

بررسی نرمال بودن، تجزیه‌های آماری داده‌ها و رسم نمودار نبز با استفاده از نرم‌افزار Minitab 19 و SPSS 26 و Excel 2019 انجام گرفت و میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

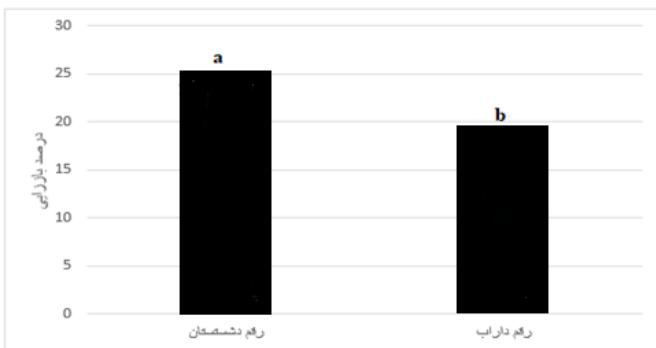
**مدت زمان پیش‌کشتی:** در این تحقیق از ریزنمونه‌های ۵، ۶ و ۷ روزه برای انتقال ژن در دو رقم دشتستان ۲ و داراب ۱ استفاده شد. نتایج جداول تجزیه واریانس نشان دادکه اثر متقابل مدت زمان پیش‌کشتی در رقم، در سطح یک درصد معنی دار است (جدول ۳). همچنین نتایج مقایسه میانگین حاکی از آن بود که ریزنمونه ۷ روزه در رقم دشتستان ۲ درصد بازیابی بالاتری (۲۷/۴۹) را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشت. در این پژوهش مشاهده شد که ریزنمونه ۵ روزه در رقم داراب ۱ درصد بازیابی بالاتری (۲۱/۶۶) را نسبت به ریزنمونه‌های ۶ و ۷ روزه این رقم به خود اختصاص داد (شکل ۲).

پژوهشگران اعلام کردند مدت زمان پیش‌کشتی در میزان بازیابی بعد از انتقال ژن مؤثر است. آن‌ها اعلام کردند که در فرآیند انتقال ژن به گیاه کنجد از بین ریزنمونه‌های ۴، ۶ و ۸ روزه ریزنمونه‌های ۶ روزه بالاترین درصد بازیابی را داشتند (Chowdhury and et al. 2018) (Bhattacharyya and et al. 2015) انتقال ژن در گیاه کنجد مناسب دانستند.

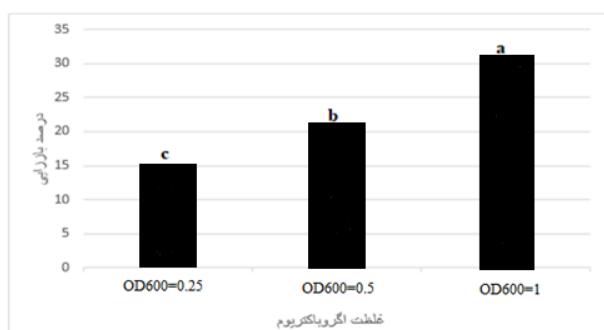
**غلظت اگروباکتریوم:** نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که دو اثر اصلی رقم و غلظت اگروباکتریوم به ترتیب در سطح پنج درصد و یک درصد دارای اختلاف معنی داری بودند (جدول ۴).

بакتریایی ۱ بهترین تراکم سلولی جهت انتقال ژن به این گیاه بوده است (Belide et al. 2011).

**مدت زمان تلقیح:** در این پژوهش سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه برای تلقیح (به روش شیک، با تعداد دور ۱۲۰-۱۳۰ rpm) شیکر و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که دو اثر اصلی رقم و مدت زمان تلقیح به ترتیب در سطح ۵ و یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر رقم برای صفت درصد باززایی



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر رقم در غلظت اگروبکتریوم برای صفت درصد باززایی

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که برای صفت مدت زمان تلقیح، از بین دو رقم دشتنستان ۲ و داراب ۱ بالاترین میزان باززایی (۲۴/۱۶) مربوط به رقم دشتنستان ۲ بود (شکل ۵). همچنین بیشترین نرخ باززایی در مدت زمان ۳۰ دقیقه با ۳۲/۴۹ درصد رخداد و کمترین نرخ باززایی با ۸/۳۲ درصد باززایی به تیمار مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه تعلق گرفت (شکل ۶).

یکی از موارد مهم در مراحل انتقال ژن که نقش اساسی در میزان باززایی دارد مدت زمان تلقیح است. به طوری که زمان بیشتر

اگروبکتریوم ورود T-DNA این بакتری به گیاه است (Rodrigues et al. 2021).

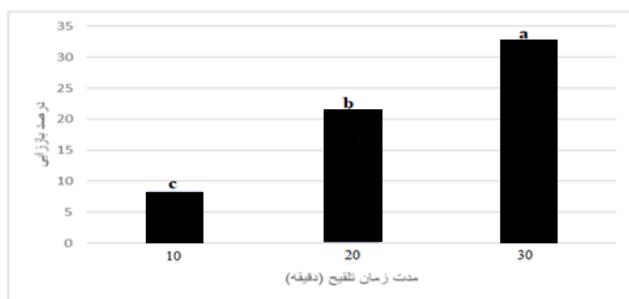
در این پژوهش از سویه PGV3101 (C58) اگروبکتریوم استفاده شد. Zimik et al. (2017) در پژوهشی جهت انتقال ژن در گیاه کنجد از بакتری *A. tumefaciens* سویه PGV3101 حامل ناقل دوتایی pCGMCP22 حاوی ژن - $\beta$ -گلوکورونیداز (GUS)، ژن uidA (uidA) و ژن نشانگر انتخابی کدکننده آنزیم تخریب کننده علف‌کش فسفوئینوتیریسین آمینوترانسفراز (PAT) استفاده کردند. نسبت متناسب بین سلول‌های میزان و سلول‌های اگروبکتریوم یکی از عوامل مؤثر در افزایش انتقال T-DNA است. به طوری که در غلظت کم اگروبکتریوم انتقال T-DNA کاهش می‌یابد و غلظت بیش از حد نیز باعث کاهش قابلیت زیست‌پذیری سلول‌های گیاه می‌شود (Wang et al. 2003). غلظت بالای اگروبکتریوم درصد زنده مانی و باززایی را در گیاه کنجد کاهش می‌دهد (Dutt and Al-Shafeey 2009). دات و گروس (Al-Shafeey 2011) اعلام کردند که تأثیر غلظت اگروبکتریوم بر کارایی انتقال ژن وابسته به نوع رقم و گونه گیاهی می‌باشد.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر رقم در غلظت اگروبکتریوم برای صفت درصد باززایی

| منبع تغییر             | درجه آزادی | میانگین مربعات     |
|------------------------|------------|--------------------|
| رقم                    | ۱          | ۲/۵۶ <sup>**</sup> |
| غلظت اگروبکتریوم       | ۲          | ۵/۸۵ <sup>**</sup> |
| رقم × غلظت اگروبکتریوم | ۲          | ۰/۴۰ ns            |
| خطای آزمایشی           | ۱۸         | ۰/۴۷               |
| ضریب تغییرات (درصد)    |            | ۱۴/۸۰              |

\*\*، \* و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

Yadav et al. (2010) در پژوهشی از انتقال موفق ژن به گیاه کنجد با استفاده از غلظت اگروبکتریوم  $OD_{600}=1$  خبر دادند. پژوهشگران اعلام کردند که از بین تراکم‌های سلولی انتخاب شده جهت بهینه نمودن شرایط انتقال ژن به گیاه گلنگ تراکم سلول



شکل ۶- مقایسه میانگین مدت زمان تلقیح برای صفت درصد باززایی

با توجه به اینکه در تیمار ۷۲ ساعت کل نمونه‌ها آلودگی شدید داشتند و از بین رفتند و در تیمار صفر نیز هیچ گونه باززایی مشاهده نشد فقط دادهای مربوط به تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت آنالیز شدند. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی هم‌کشتی، اثر نور و اثر رقم (در سطح ۱ درصد) معنی‌دار بوده است. همچنین اثر متقابل سه گانه رقم در زمان هم‌کشتی و اثر نور در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۶). مدت زمان دوره هم‌کشتی تأثیر مهمی در تراویختی دارد. بالاترین نرخ باززایی در شرایط تاریکی و در مدت زمان ۲۴ ساعت برای رقم دشتستان ۲ به میزان ۳۸/۳۳ درصد رخ داد. همچنین پایین‌ترین نرخ باززایی ۱۱/۶۶ در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و در مدت زمان ۴۸ ساعت و متعلق به رقم داراب ۱ بود (شکل ۷). مدت زمان هم‌کشتی و اثر نور برای انتقال ژن در گیاه حیاتی هستند. مطالعات گذشته نیز دوره هم‌کشتی به مدت ۲۴ ساعت در کنجد را تأیید نموده‌اند. پژوهشگران معتقدند که با افزایش زمان هم‌کشتی بیش از ۴۸ ساعت میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نیز کاهش می‌یابد (Chowdhury et al. 2014; Al-Shafeay et al. 2011).

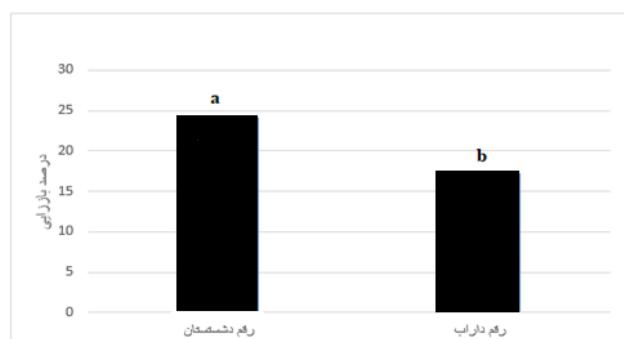
هم‌کشتی ۲۴ ساعت فرصت مناسبی به اگروباکتریوم داده می‌شود تا ریزنمونه را احاطه کند و در عین حال پلاسمید خود را وارد ریزنمونه کند. همچنین دوره هم‌کشتی خیلی طولانی منجر به رشد بیش از حد اگروباکتریوم و نکروزه شدن بافت‌ها می‌شود که این مورد در سایر گیاهان مانند ماش (Tazeen and Mirza 2004)، سویا (Verma et al. 2014) و توتون (Uranbey et al. 2005) نیز گزارش شده است.

باعث ترکیدگی سلول‌های گیاهی و زمان کمتر میزان انتقال ژن را کاهش می‌دهد و عامل مؤثری در انتقال ژن محسوب می‌شود. این عامل وابسته به ژنتیک و گونه گیاهی، نوع و مدت زمان پیش‌کشتی، نوع و ترکیب محیط کشت، دما و نحوه تلقیح و سایر عوامل می‌باشد (Sivanandhan and et al. 2016). Rajesh (2013) مدت زمان ۲۰ دقیقه را به عنوان زمان بهینه در انتقال ژن بهترین زمان برای تلقیح ریزنمونه کوتیلدون برای گیاه کنجد است (Al-Shafeay et al. 2011).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر رقم در مدت زمان تلقیح برای صفت درصد باززایی

| ضریب تغییرات (درصد) | خطای آزمایشی | رقم × مدت زمان تلقیح | مدت زمان تلقیح      | رقم               | منبع تغییر      |
|---------------------|--------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------|
| ۱۵/۹۹               | ۰/۴۹         | ۰/۲۸ <sup>ns</sup>   | ۱۵/۳۶ <sup>**</sup> | ۳/۶۶ <sup>*</sup> | میانگین مرباعات |
| درجه آزادی          |              |                      |                     |                   | درجه آزادی      |
| ۱۸                  | ۲            | ۲                    | ۲                   | ۱                 |                 |

\*\*, \* و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر رقم برای صفت درصد باززایی

مدت زمان هم‌کشتی و اثر نور: پس از تلقیح کوتیلدون‌ها، در محیط هم‌کشتی حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر AGNO<sub>3</sub> و ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، به مدت صفر (بعد از تلقیح بلا فاصله نمونه‌ها سشتشو و کشت شدند)، ۲۴ و ۴۸ ساعت تلقیح بلا فاصله نمونه‌ها سشتشو و کشت شدند. و ۷۲ ساعت قرار داده شدند.

دشتستان ۲ با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در لیتر استوسیرینگون تعلق گرفت (شکل ۸).

Chowdhury et al. (2014) اظهار داشتند که مدت زمان همکشتی، غلظت استوسیرینگون در افزایش ترازیختگی گیاه کنجد مؤثر است آن‌ها در پژوهش‌شان از غلظت ۱۰۰ میکرومولار استو سیرینگون استفاده کردند. در پژوهش‌هایی که بر روی بهبود روغن در گیاهان روغنی کرچک و کلزا از طریق مهندستی ژنتیک و انتقال ژن توسط اگروباکتریوم صورت پذیرفت اعلام شد که غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون در انتقال ژن موفق مؤثر است (Sánchez-Álvarez et al. 2019; rani et al. 2018). Fernando and et al. (2016) غلظت ۱۰۰ میکرومولار در لیتر استوسیرینگون را جهت انتقال ژن به گیاه اکالیپتوس در محیط همکشتی به کار برداشتند.

جدول ۷- تجزیه واریانس غلظت استوسیرینگون

| میانگین                | درجه آزادی | منع تغییر           |
|------------------------|------------|---------------------|
| میانگین مربعات         |            |                     |
| ۱۳۵۰/۱۵۰ <sup>**</sup> | ۱          | رقم                 |
| ۶۳۵/۱۲۰ <sup>**</sup>  | ۲          | استوسیرینگون        |
| ۱۰۵/۴۹ <sup>*</sup>    | ۲          | رقم × استوسیرینگون  |
| ۲۲/۸۴                  | ۱۸         | خطای آزمایشی        |
| ۱۹/۳۴                  |            | ضریب تغییرات (درصد) |

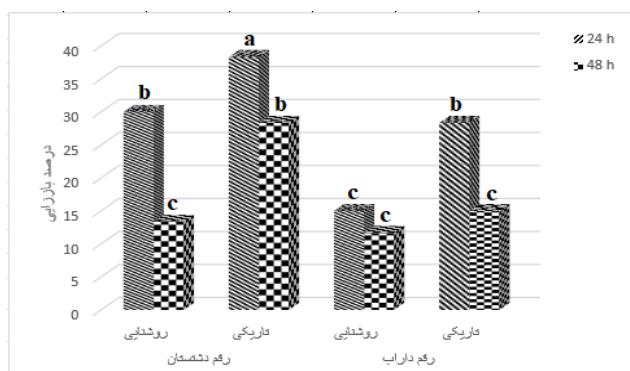
\*\*, \* و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی دار

جدول ۶- تجزیه واریانس مدت زمان همکشتی و اثر نور برای صفت درصد باززایی

| منع تغییر                   | درجه آزادی | میانگین مربعات      |
|-----------------------------|------------|---------------------|
| رقم                         | ۱          | ۷/۵۴ <sup>**</sup>  |
| اثر نور                     | ۱          | ۱۰/۳۳ <sup>**</sup> |
| مدت زمان همکشتی             | ۱          | ۱۱/۷۰ <sup>**</sup> |
| رقم × نور                   | ۱          | ۰/۰۶۴ <sup>ns</sup> |
| رقم × مدت زمان همکشتی       | ۱          | ۰/۳۹ <sup>ns</sup>  |
| نور × مدت زمان همکشتی       | ۱          | ۰/۰۱ <sup>ns</sup>  |
| رقم × نور × مدت زمان همکشتی | ۱          | ۲/۴۰ <sup>*</sup>   |
| خطای آزمایشی                | ۲۴         | ۰/۵۱                |

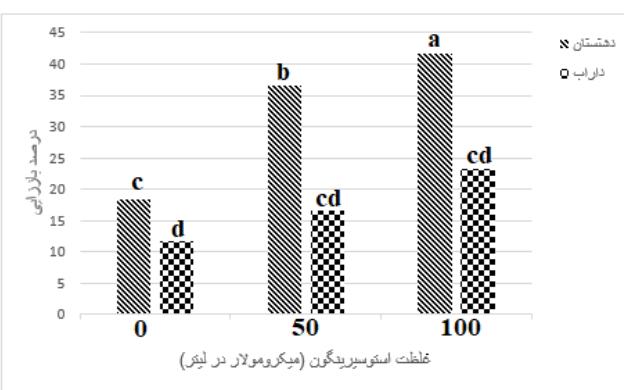
ضریب تغییرات (درصد)

\*\*, \* و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی دار



شکل ۷- مقایسه میانگین مدت زمان همکشتی و اثر نور برای صفت درصد باززایی

**غلظت استوسیرینگون:** اضافه کردن استوسیرینگون به محیط تلیچ، اثر مشتبی در افزایش نرخ باززایی در هر دو رقم مورد مطالعه داشت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی رقم و غلظت استوسیرینگون در سطح ۱٪ معنی دار می‌باشند و همچنین اثر متقابل رقم در غلظت استوسیرینگون در سطح ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۷). ترکیب فنولی استوسیرینگون به عنوان القاء کننده ژن Vir در اگروباکتریوم نقش مؤثری در جایگزینی T-DNA در سلول‌های گیاهی دارد. بهینه‌سازی غلظت آن موجب افزایش نرخ ترازیختی می‌شود زیرا غلظت بالای آن برای اگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی اثر سمیت دارد (Niazian et al. 2016). در این پژوهش رتبه a و بالاترین درصد باززایی (۴۱/۶۶) به رقم



شکل ۸- مقایسه میانگین رقم برای صفت درصد باززایی

روش بهینه انتقال ژن گیاه کنجد: در نهایت با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی انتقال ژن و بررسی بیشترین باززایی، روش

در لیتر از تنظیم‌کننده رشد  $0.5\text{ میلی‌گرم در لیتر نیز استفاده شد}.$

بررسی گیاهان تاریخت احتمالی: اگر چه رشد نوساقه‌ها روی محیط کشت حاوی کانامایسین می‌تواند دلیلی بر تاریخت بودن آن‌ها باشد ولی در گرینش گیاهان بر روی محیط گزینشگر امکان فرار گیاهچه‌های غیر تاریخت وجود دارد. با توجه به این موضوع و جهت اطمینان از تاریخت بودن گیاهان بازایی شده آنالیز PCR با آغازگرهای اختصاصی نیز بر روی گیاهان انتخابی انجام شد.

آزمون PCR: گیاهان تاریخت تولید شده با استفاده از آزمون PCR توسط پرایمرهای اختصاصی نیز تأیید شدند (شکل ۹ و ۱۰). استفاده از آزمون PCR یکی از روش‌های شناسایی گیاهان تاریخته می‌باشد. پژوهشگران در گیاه کنجد (Chowdhury et al. 2010; Niazian et al. 2014; yadave and Chaudhary 2010 Hamid et al. 2016) گوجه فرنگی (Jedi et al. 2018) پنبه (Soltani et al. 2019) برنج (Zandi et al. 2020) کاملینا (2018)

مناسب برای انتقال ژن در گیاه کنجد مشخص شد که به طور مختصر شامل مراحل زیر می‌باشد.

۱- تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون ۷ روزه در اگروباتریوم تومفاسینس سویه (PGV3101) C58 (حاوی پلازمید pBI121 که حاوی ژن انتخابگر مقاومت به کانامایسین است) با غلظت  $OD_{600}=1$

۲- همکشتی ریزنمونه‌ها در محیط بهینه شده کشت بافت حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و در شرایط تاریکی به مدت ۲۴ ساعت

۳- شستشو در سفاتاکسیم  $500\text{ mg/L}$  به مدت ۹۰ دقیقه

۴- کشت در محیط کشت بهینه شده شامل محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر AGNO<sub>3</sub> و  $6/5\text{ میلی‌گرم در لیتر BAP}$  و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به همراه آنتی بیوتیک‌های کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم و سفاتاکسیم  $500\text{ میلی‌گرم}$

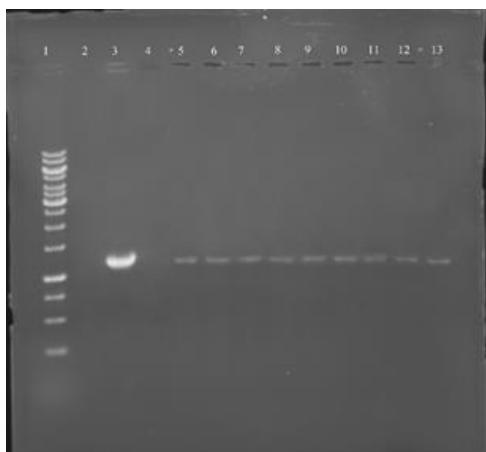
۵- واکشت در محیط مشابه هر دو هفته یک بار

۶- در این پژوهش ریشه‌زایی گیاهان تاریخت بسیار کندر و سخت‌تر از گیاهان غیرتاریخت صورت گرفت. به همین دلیل جهت القاریسه‌زایی علاوه بر تنظیم‌کننده رشد IAA یک میلی‌گرم





شکل ۹- مراحل رشدی گیاهان تراریخت



شکل ۱۰- نتایج حاصل از PCR تعدادی از گیاهان تراریخت چاهک ۱: سایز مارکر 1kb چاهک ۲: کنترل منفی چاهک ۳: شاهد مثبت چاهک ۴: شاهد منفی چاهک ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ گیاهان تراریخت

### منابع

Al-Shafeay AF, Ibrahim AS, Nesiem MR, Tawfik MS (2011) Establishment of regeneration and transformation system in Egyptian sesame (*Sesamum indicum* L.) cv Sohag 1. GM crops 2:182-192.

Baskaran P, Jayabalan N (2013) *In vitro* mass propagation and diverse callus orientation on *Sesamum indicum* L.-an important oil plant. Journal of Agricultural Technology 2:259-269.

Bates PD, Stymne S, Ohlrogge J (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. Current opinion in plant biology 16:358-364.

Belide S, Hac L, Singh SP, Green AG, Wood CC (2011) Agrobacterium-mediated transformation of safflower and the efficient recovery of transgenic plants via grafting. Plant methods 7:1-13.

Bhattacharyya J, Chakraborty A, Mitra J, Chakraborty S, Pradhan S, Manna A, Sikdar N, Sen SK (2015) Genetic transformation of cultivated sesame (*Sesamum indicum* L. cv Rama) through particle bombardment using 5-day-old apical, meristematic tissues of germinating seedlings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 123:455-466.

Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG (2002) PKD1 induces p21waf1

and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. Cell 109:157-168.

Browse J, Court P, Somerville C (1986) A mutant of *Arabidopsis* deficient in c(16:3) and c(18:3), leaf lipids. Plant Physiology 81:859-864.

Chowdhury S, Basu A, Kundu S (2014) A new high-frequency Agrobacterium-mediated transformation technique for *Sesamum indicum* L. using de-embryonated cotyledon as explant. Protoplasma 251:1175-1190.

Debnath AJ, Gangopadhyay G, Basu D, Sikdar SR (2018) An efficient protocol for *in vitro* direct shoot organogenesis of *Sesamum indicum* L. using cotyledon as explant. 3 Biotech 8:1-13.

Djuricic I, Calder PC (2021) Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for Nutrients 13:2421.

Doyle J (1990) DNA protocols for plants. Molecular Techniques in Taxonomy 283-293.

Dutt M, Grosser J (2009) Evaluation of parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98:331-340.

- Dutta D, Banerjee S, Pal M, Gangopadhyay G (2022) Validation of determinate (dt) gene-based DNA marker in inter-specific hybrid sesame and in-silico analysis of the predicted dt protein structures. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28:139-152.
- Fallahi N, Tahmasebi Z, Zebarjadi A (2023) Optimization of tissue culture conditions, Isolation, cloning, and synthesis of transferable construct from delta-15 desaturase (FAD3) gene effective in omega-3 biosynthesis pathway and its transfer to *Sesamum indicum* L. 84-85. (In Farsi).
- Fernando S C, Goodger JQD, Gutierrez SS, Johnson A, Woodrow IE (2016) Plant regeneration through indirect organogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus polybractea* RT Baker. *Industrial Crops and Products* 86:73-78.
- Gholami, AA (2017) Effective factors in tissue culture and methods of gene transfer to wheat plant. *Journal of Biosafety* 4:16-30. (In Farsi).
- Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB (1994) Dictionary. The Lipid Handbook. 2nd ed. FD Gunstone, JL Harwood, and FB Padley, ed. Chapman and Hall, London. UK 1273.
- Hamid R, Marashi H, Tohidfar M, Malekzadeh-hafaroudi S (2016) Optimization of regeneration and parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of commercial cultivar of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Modern Genetics Journal* 12:597-606. (In Farsi).
- Jadi L, Dorani-Oliaei, A. Farsi,M (2018) Optimizing factors effective in gene transfer by *Agrobacterium tumefaciens* to tomato. *Iranian Agricultural Research Journal* 8:384-368. (In Farsi).
- Kapoor S, Sanjay SP, Yadav M, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal R, Jaiwal PK (2015) Sesame (*Sesamum indicum* L.). Methods in Molecular Biology 2:37-46.
- Kazemi RA, Amani J, Sharfi A, Abbasi A, Salmanian A (2013) Optimization of transformation in canola (*B. napus* L.) with control of ethylene production and gradual increase in concentration of selection element. *Journal of Molecular and Cellular Research* 27:589-575. (In Farsi).
- Mousavi J, Hosseini R (2015) Transgenic sesame plant with gammatocopherol methyltransferase gene. MSc Thesis. Faculty of Agriculture and Natural Resources of Imam Khomeini University. Department of Agricultural Biotechnology 20-25. (In Farsi).
- Naing A H, Park K I, Lim S H, Kim C K (2014) Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum. *Plant Omics Journal* 7:237- 243.
- Naing AH, Ai TN, Jeon SM, Lim SH, Kim CK (2016) An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of recalcitrant chrysanthemum cultivar Shinma. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:9.
- Niazian M, Sadat-Nouri SA, Tawheed-Far M, Galushka P, Mortazavian SMM (2016) Optimization of Agrobacterium-mediated gene transformation in Ajowan medicinal plant (*Trachyspermum ammi* L.) using FLD gene. *Journal of Molecular and Cellular Research* 30:452-463. (In Farsi).
- Rajesh M, Jeyaraj M, Sivanandhan G, Subramanyam K, Mariashibu TS, Mayavan S, Kapil Dev G, Anbazhagan VR, Manickavasagam M, Ganapathi A (2013) *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Podophyllum hexandrum* Royle (syn. *P. emodi* Wall. ex Hook. f. & Thomas). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 114:71-82.
- Rani A, Panwar A, Sathe M, Chandrashekhar KA, Kush A (2018) Biofortification of safflower: an oil seed crop engineered for ALA-targeting better sustainability and plant based omega-3 fatty acids. *Transgenic Research* 27:253-263.
- Rodrigues SD, Karimi M, Impens L, Van Lerberghe E., Coussens, G, Aesaert S, Rombaut D, Holtappels D, Ibrahim HM, Van Montagu M, Wagemans J (2021) Efficient CRISPR-mediated base editing in *Agrobacterium* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 118:1-8.
- Sánchez-Álvarez A, Ruíz-López N, Moreno-Pérez AJ, Martínez-Force E, Garcés R, Salas JJ (2019) *Agrobacterium*-mediated transient gene expression in developing *Ricinus communis* seeds: A first step in making the castor oil plant a chemical biofactory. *Frontiers in Plant Science* 10:1410.
- Sivanandhan G, Arunachalam C, Vasudevan V, Kapildev G, Sulaiman AA, Selvaraj N, Ganapathi A, Lim YP (2016) Factors affecting Agrobacterium mediated transformation in *Hybanthus enneaspermus* (L.). *Plant Biotechnology Reports* 10:49-60.
- Sohrabi m, Zebarjadi A, Najaphy A, Kahrizi D (2015) Isolation and sequence analysis of napin seed specific promoter from Iranian Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Gene* 160-164.
- Soltani Gishini MF, Zebarjadi A, Abdoli-Nasab, M, Jalali Javarani M, Kahrizi D, Hildebrand D (2019) Endoplasmic reticulum retention signaling and transmembrane channel proteins predicted for oilseed ω3 fatty acid desaturase 3 (FAD3) genes. *Functional and integrative genomics* 20:433-458.
- Soltani MF, Zebarjadi A, Abdoli-Nasab M, Jalali Javarani M, Kahrizi D (2020) Isolation and characterization of delta 15 desaturase (FAD3) gene from *Camelina sativa* L. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 7:48-52.
- Tazeen S, Mirza B (2004) Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.). *Pakistan Journal of Botany* 36:887-896.
- Towheed-Far M, Mohsenpour M (2019) Effective factors in cotton (*Gossypium* spp ) Transformation using *Agrobacterium*. *Agricultural Biotechnology Journal* 2:1-24. (In Farsi).
- Uranbey S, Sevimay C, Kaya M, Ipek A, Sancak C, Basalma DC, Er Ozcan S (2005) Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer. *Biologia Plantarum* 49:53-57.
- Verma K, Saini R, Rani A (2014) Recent advances in the regeneration and genetic transformation of soybean. *Journal of Innovative Biology* 1:015-026.

Wang Y, Kausch AP, Chandlee JM, Luo H, Ruemmele BA, Browning M, Jackson N, Goldsmith MR (2003) Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Science* 165:497-506.

Yadav M, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal PK (2010) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 103:377-386.

Yadav SH, Sharma P, Srivastava A, Desai P, Shrivastava N (2014) Strain specific *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Bacopa monnieri*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12:89-94.

Zäuner S, Jochum W, Bigorowski T, Benning C (2021) A cytochrome b 5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 11:856-863.

Zimik M, Arumugam N (2017) Induction of shoot regeneration in cotyledon explants of the oilseed crop *Sesamum indicum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15:303-308.