

## Optimization of *gus* gene transferring to *Begonia soli-mutata*

### Fateme Hosseini

MSc. of Agricultural Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: [fatemehosseini12@yahoo.com](mailto:fatemehosseini12@yahoo.com)

### Nasrin Moshtaghi

Associate Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: [moshtaghi@um.ac.ir](mailto:moshtaghi@um.ac.ir)

### Ahmad Sharifi

\*Assistant Professor, Ornamental Plant Biotechnology Department, Academic Center for Education, Culture and Research: ACECR, Khorasan Razavi Province, Mashhad, Iran. Tel: +985131997456, Email: [ahmadsharifi66@yahoo.com](mailto:ahmadsharifi66@yahoo.com)

### Abdolreza Bagheri

Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: [abagheri@um.ac.ir](mailto:abagheri@um.ac.ir)

### Hasan Marashi

Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: [marashi@um.ac.ir](mailto:marashi@um.ac.ir)

## Abstract

### Objective

Begonias are popular ornamental plants in the world so introducing of various forms of this plant is very important. Nowadays plant modification through biotechnology and genetic engineering for production of new genotypes with varied forms is highlighted in this genus. So optimization of regeneration in *in vitro* culture condition and gene transferring is in priority to provide a suitable condition for gene transferring in this plant specially those responsible in flower color.

### Materials and methods

In the first step, thin cell layer (TCL) explants from petioles of *B. soli-mutata* were assayed in MS medium containing Kin or TDZ (0.2, 1 and 2 mg/l) in combination with NAA (0 and 0.2 mg/l). For co-culturing of petiole TCL explants with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 containing *GUS* and *NPTII* genes MS medium supplemented with 1 mg/l Kin and 0.2 mg/l NAA was used. Transformed plantlets were confirmed by PCR and Gus assay test.

### Results

Based on the regeneration results, Kin was better than TDZ, also adding NAA to the medium has positive effect on both of cytokinins. In transformation process, out of 2000 explants which infected with *Agrobacterium*, after 4 months of culture only 17 plantlets were adopted. Of these 17 plantlets, only 7 plantlets were confirmed by Gus assay test and PCR as transgenic plants.

### Conclusions

The result showed in this species transformation percentage is low and optimization of transformation condition is important.

**Keywords:** *Agrobacterium*, Regeneration, *Begonia*, Transformation.

**Citation:** Hosseini F, Moshtaghi N, Sharifi A, Bagheri A, Marashi H (2019) Optimization of *gus* gene transferring to *Begonia soli-mutata* . Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 87-104.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 87-104

DOI: 10.22103/jab.2019.12975.1086

Received: July 5, 2019; Accepted: October 8, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

## انتقال ژن *GUS* به گیاه زینتی *Begonia soli-mutata*

### فاطمه حسینی

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل:  
fatemehosseini12@yahoo.com

### نسرین مشتاقی

دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل:  
[moshtaghi@um.ac.ir](mailto:moshtaghi@um.ac.ir)

### احمد شریفی

\* نویسنده مسئول، استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی. تلفن: 05131997456  
ایمیل: [ahmadsharifi66@yahoo.com](mailto:ahmadsharifi66@yahoo.com)

### عبدالرضا باقری

استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل:  
[abagheri@um.ac.ir](mailto:abagheri@um.ac.ir)

### حسن مرعشی

استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ایمیل:  
[marashi@um.ac.ir](mailto:marashi@um.ac.ir)

تاریخ دریافت: 1398/04/14، تاریخ پذیرش: 1398/07/16

### چکیده

**هدف:** بگونه‌ای یکی از رایج‌ترین گیاهان زینتی در جهان است و امروزه توجه ویژه‌ای به استفاده از بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در تولید اقام جدید با فرم‌های متنوع در این جنس شده است. این آزمایش با هدف بهینه‌سازی باززایی و انتقال ژن در این گیاه انجام شد تا زمینه‌ی لازم برای انتقال ژنهای ارزشمند را فراهم کند.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا شاخه‌زایی ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک دم‌برگ گونه *B. soli-mutata* در محیط کشت MS حاوی سیتوکینین‌های Kin یا TDZ (0/2، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (0 و 0/2 میلی‌گرم در لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هم‌کشتی و تولید گیاهان تراریخته، ریزنمونه دم‌برگ بگونیا با باکتری *A. tumefaciens* نژاد LBA4404 حاوی ژن *GUS* و ژن گزینشگر *NPTII* در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شد. برای تایید تراریختی گیاهچه‌های بدست آمده، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای ژنهای *GUS* و *VIR* و آزمون ارزیابی *Gus* استفاده شد.

**نتایج:** نتایج حاصل از این بررسی نشان داد به لحاظ باززایی شاخه سیتوکینین Kin نسبت به TDZ برتری دارد و اضافه کردن NAA به محیط کشت در هر دو تیمار سیتوکینین باعث بهبود تمام صفات شد. لذا برای هم‌کشتی از محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. طی فرایند تولید گیاهان تراریخته، بعد از 4 ماه هم‌کشتی 2000 ریزنمونه با باکتری در محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کاناماسین، در مرحله سازگاری 17 گیاهچه بدست آمد که تراریختی 7 گیاهچه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آزمون ارزیابی *Gus* تایید شد.

**نتیجه گیری:** نتایج این بررسی نشان داد درصد تراریزش در این گیاه پایین است و بهینه کردن شرایط برای افزایش کارایی انتقال ژن در آن از اهمیت زیادی برخوردار است.

**کلمات کلیدی:** آگروباکتریوم، باززایی، بگونیا، تراریختی.

## مقدمه

بگونیا یکی از بزرگترین جنس‌ها در بین بازدانگان و از خانواده Begoniaceae می‌باشد (Frodin 2004). تا به امروز تعداد گونه‌های ثبت شده در این جنس به 1835 مورد می‌رسد، علاوه بر این حدود 15000 هیبرید هم در این جنس گزارش شده است (Sandgrind 2017). هیبریداسیون درون این جنس به راحتی انجام می‌شود و بیشتر بگونیاهایی که امروزه به صورت تجاری تولید می‌شوند هیبرید هستند. بگونیا یکی از رایج‌ترین گیاهان زینتی در سراسر جهان است که به عنوان گیاه باغی، گلدانی، آویز و گلخانه‌ای پرورش داده می‌شود (Hvoslef-Eide & Munster 2006). از لحاظ اهمیت کشور بلژیک در سال 2015 بیش از 2/75 میلیون، هلند در سال 2013 بیش از 13 میلیون، آمریکا در سال 2013 بیش از 27/9 میلیون و سوئد در سال 2011 بیش از 2/7 میلیون گلدان بگونیا تولید کردند (International Statistics Flower and Plants 2014). ارزش تجاری گیاهان زینتی اغلب به طور مستقیم مربوط به رنگ گل، فرم بوته، ساختار گل، زمان گلدهی، کیفیت پس از برداشت و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (Sharifi et al. 2017). ایجاد تنوع در این گونه زینتی نیز مانند سایر گیاهان با روش‌های اصلاح کلاسیک و مهندسی ژنتیک امکان پذیر است. به هر حال مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی امکاناتی را برای

تولید ارقامی با خصوصیات جدید از طریق بیان ژنهای خارجی یا تغییر هدفمند ژنهای موجود فراهم می‌کند. در گیاهانی مانند داوودی، کوب، میخک و رز از طریق مهندسی ژنتیک گیاهان تراریخته با خصوصیات جدید و با ارزش تجاری تولید شده است (Sharifi et al. 2017).

اگرچه تاحدودی روش‌های کشت بافت برای انواع گونه‌های بگونیا مشابه است و بیشتر از ریزنمونه های برگ و دمبرگ برای القای باززایی استفاده می‌شود (Burritt & Leung 1996; Burritt 2008; Nhut et al. 2010) اما نیاز این گونه‌ها به تنظیم کننده‌های رشد متفاوت می‌باشد. به طور کلی، سطوح تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده اغلب عامل پیچیده‌ای برای کالوس‌زایی، باززایی یا رشد و تمایز ریزنمونه کشت شده هستند و تقسیم سلولی را تحریک و تمایز سلولی و اندام زایی را کنترل می‌کنند. نوع و غلظت مناسب تنظیم کننده‌های رشد از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (Kumari et al. 2015). در کشت بافت بگونیا جهت القای باززایی بیشتر از سیتوکین‌هایی نظیر BA، Kin، TDZ در ترکیب با NAA و IAA استفاده شده است (Nada et al. 2011; Kabirnatay et al. 2012; Shobi and Viswanathan 2017).

اولین مقالات درباره تراریزش ژنتیکی بگونیا توسط Einset & Kopperud (1995) منتشر گردید. آنها گونه‌ای را که تراریخته نموده بودند به اشتباه *B. heimalis* می‌نامیدند که در حقیقت *B. cheimantha* بود (Hvoslef-Eide & Munster 2006). در این گیاه آنها ژن ACC اکسیداز از مسیر بیوستنز اتیلن را خاموش کردند با این حال دوام گل در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد تفاوتی نداشت (Einset & Kopperud 1995; Hvoslef-Eide & Munster 1995). Kiyokawa et al. (1996) تراریزش ژنتیکی *B. tuberhybrida* را با ژنهای *GUS* و *ROL* گزارش نمودند. این تراریزش ژنتیکی با استفاده از اگروباکتریوم تومی فاشینس سویه LBA4404 صورت گرفت. Kishimoto et al. (2002) تراریزش ژنتیکی *B. hiemalis* با ژن *GUS* را با استفاده از همین باکتری با سویه AGL0 گزارش نمودند. در این سه مورد فراوانی تراریزش خیلی متفاوت بود، به طوری که Einset & Kopperud (1995) فقط یک گیاه تراریخته بدست آوردند، Kishimoto et al. (2002) درصد تراریزش را حداکثر 3/2 درصد گزارش کردند و Kiyokawa et al. (1996) 24 درصد گیاهان تراریخته تولید نمودند. Hoshi et al. (2003) به منظور تراریزش *B. semperflorens* با استفاده از *A. tumefaciens* از قطعات برگ این گیاه استفاده کردند. Ping-qu & Lei (2010) ژن *(Isopentenyl pyrophosphate) IPT* را به همین گیاه منتقل کردند. گیاهان تراریخته تولید شده نسبت به گیاهان شاهد از مقاومت بهتری نسبت به شرایط خشکی برخوردار بودند. Xu et al. (2011) ژن *KNOX* که نقش مهمی در حفظ خصوصیت مریستمی و الگوگیری مناسب اندام‌ها دارد را با کمک *A. tumefaciens* به *B. maculate* منتقل کردند و توانستند در این گیاه یک فنوتیپ جدید گل تولید کنند. در این بررسی حداکثر درصد تراریزش 5/8 درصد گزارش شد. همچنین Sandgrind (2017)، به منظور تولید رنگ آبی در *B. tuberhybrida* ژن *F3'5'H* را با استفاده از *A. tumefaciens* به این گیاه منتقل کرد. وی 1692 ریزنمونه را تیمار کرد و در کل 18 گیاه تراریخته تولید نمود که هیچ یک از آنها رنگ آبی قابل توجهی تولید نکردند.

با توجه به ارزش تجاری بالای بگونیا لازم است شرایط مناسب برای دستیابی به روش‌های سریع و قابل اطمینان تولید فرم‌های جدید در این گیاه فراهم شود. لذا پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن به گونه *B. soli-mutata* مبتنی بر ژن گزارشگر *GUS* انجام شده است. این پژوهش به عنوان پیش‌نیاز ضروری برای انتقال ژن‌های مطلوب بویژه ژن‌های دخیل در رنگ گل در این گیاه می‌باشد.

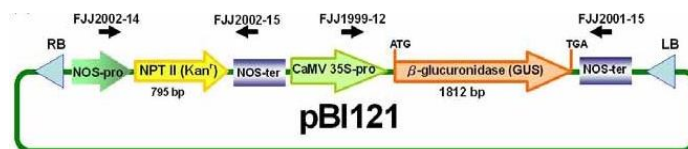
## مواد و روش‌ها

**اثر ترکیب هورمونی محیط کشت بر باززایی *B. soli-mutata*:** با توجه به اهمیت انتخاب نوع ریزنمونه در موفقیت کشت بافت گیاهان، در آزمایش مقدماتی اثر نوع ریزنمونه (دمبرگ، برگ و ساقه) در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر TDZ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ریزنمونه دمبرگ نسبت به سایر ریزنمونه‌ها از لحاظ استقرار ریزنمونه در شرایط کشت بافت و باززایی وضعیت بهتری داشت با این حال درصد باززایی بسیار پایین بود (داده‌ها نشان داده نشده). لذا به منظور بهبود شرایط باززایی در آزمایش اصلی ریزنمونه دمبرگ انتخاب شد و اثر ترکیب تنظیم کننده‌های رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای اجرای این تحقیق ابتدا ریزنمونه‌های دمبرگ گیاه شاداب و در حال رشد *B. soli-mutata* جدا و به مدت 30 دقیقه زیر آب جاری شستشو شد. برای ضدعفونی آنها از محلول هیپوکلریت سدیم 1/5 درصد به مدت 15 دقیقه استفاده و سپس زیر هود لامینار با آب استریل شستشو شدند. پس از جدا نمودن دو انتهای دمبرگ از قسمت باقیمانده برای تهیه TCL‌هایی (Thin Cell Layer) به ضخامت دو میلی‌متر استفاده شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی سیتوکینین TDZ یا Kin با غلظت‌های 0/2، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با اکسین NAA (0 و 0/2 میلی‌گرم در لیتر)، 3 درصد ساکارز و 0/8 درصد آگار با 5/8 pH= در ویال‌های 50 میلی‌لیتری حاوی 12 میلی‌لیتر محیط کشت، کشت شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور سیتوکینین و اکسین (دو نوع سیتوکینین با سه غلظت و اکسین با دو سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. ریزنمونه‌ها در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از آن هر 4 هفته، واکنش ریزنمونه‌ها به محیط کشت جدید انجام شد. پارامترهای باززایی شامل درصد زنده‌مانی ریزنمونه، درصد شاخه زایی، درصد کالوس‌زایی و درصد ریشه‌زایی در پایان واکنش دوم و تعداد برگ، تعداد ریشه (بزرگتر از 3 میلی‌متر طول) و طول آن (با میانگین گیری طول تمام ریشه‌های بزرگتر از 3 میلی‌متر) در پایان واکنش چهارم یادداشت برداری شدند.

## مشخصات باکتری و پلاسمید مورد استفاده: در این آزمایش از آگروباکتریوم تومی-فاشینس نژاد LBA4404

حامل پلاسمید pBI121 دارای ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین *NPTII* و ژن گزارشگر *GUS* جهت تراریختی استفاده شد (شکل 1). برای تایید باکتری آگروباکتریوم تومی-فاشینس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. سه واکنش جداگانه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GUS*، *VIR* و *NPTII* (جدول 1) جهت تکثیر و تایید استفاده شد. دمای

اتصال برای ژن *VIR* حدود 64 درجه سانتی گراد و برای ژن‌های *GUS* و *NPTII* حدود 55 درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد و PCR استاندارد در 35 چرخه انجام شد.



شکل 1. تصویر پلاسمید pBI121 حاوی ژن *GUS*.

Figure 1. *pBI121* plasmid containing *GUS* gene.

جدول 1. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GUS*، *VIR* و *NPTII*

Table 1. The sequences of specific primer for *GUS*, *VIR* and *NPTII* genes

| طول محصول (جفت باز)     | توالی الیگونوکلئوتیدی               | نام آغازگر                   |
|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Length of fragment (bp) | Nucleotide sequence                 | Name of primer               |
| 1056                    | Forward 5'- CTCATCAGGCACGCTTG-3'    | Primer for <i>VIR</i> gene   |
|                         | Reverse 5'- GCGGATGCTTCAAATGG-3'    |                              |
| 1100                    | Forward 5'- ACGTCCTGTAGAAACCCCAA-3' | Primer for <i>GUS</i> gene   |
|                         | Reverse 5'- CCCGCTTCGAAACCAATGCC-3' |                              |
| 900                     | Forward 5'- CAGGTTCTCCGGCCGCT-3'    | Primer for <i>NPTII</i> gene |
|                         | Reverse 5'- GAACTCGTCAAGAAGGC-3'    |                              |

شرایط همکشتی و محیط کشت انتخابی: برای تعیین غلظت مناسب کانامایسین جهت گزینش ریزنمونه‌های تراریخته، ریزنمونه‌های TCL گیاه *B. soli-mutata* در محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA و یک میلی گرم در لیتر Kin و غلظت‌های مختلف کانامایسین شامل 0، 25، 50، 75 و 100 میلی گرم در لیتر کشت و پارامترهای باززایی بعد از شش هفته یادداشت برداری شدند.

برای همکشتی ریزنمونه‌های TCL از گیاهچه‌های استریل *B. soli-mutata* رشد یافته در شرایط این‌ویترو، ابتدا ریزنمونه‌ها به صورت پیش تیمار در محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA و یک میلی گرم در لیتر Kin کشت شدند. بعد از یک هفته جهت هم کشتی با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند. زمانی که OD باکتری در طول موج 600 نانومتر به 0/8 تا یک رسید برای همکشتی استفاده شد. ریزنمونه‌های TCL یک هفته‌ای، به مدت 30 دقیقه در درون سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند سپس در محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA، یک میلی گرم در لیتر Kin، 100 میکرومولار

استوسرینگون (Kishimoto et al. 2002)، سه درصد ساکارز و 0/8 درصد آگار کشت شدند. 2000 ریزنمونه TCL در همکشتی با اگروباکتریوم تومی فاشینس مورد استفاده قرار گرفت. بعد از طی مدت 48 و 72 ساعت از همکشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA، یک میلی‌گرم در لیتر Kin، 500 میلی‌گرم در لیتر سفوناکسیم و 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتقال یافتند و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از 6 هفته گیاهچه‌های تولید شده جهت طویل شدن به همین محیط کشت فاقد کانامایسین منتقل شدند. با توجه به اینکه گیاهچه‌ها در همین محیط کشت بازرایی تولید ریشه نمودند، برای سازگاری به بستر حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت 1:1 انتقال یافتند.

#### تایید تراریختی با استفاده از PCR و ارزیابی Gus: پس از سازگاری گیاهچه‌ها برای سنجش بیان ژن بتا -

گلوکونونیداز در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی آزمون ارزیابی Gus انجام شد. برای تهیه محلول gus و مشاهده فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزونیداز از دستورالعمل Jefferson et al. (1987) استفاده شد. چند شاخه تراریخته احتمالی تهیه و دیسک‌های کوچکی از برگ آنها در محلول gus غوطه‌ور شدند. این نمونه‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز نگهداری شدند. پس از طی این مدت به منظور حذف رنگیزه‌های گیاهی، پنج بار با الکل 70 درصد شستشو شدند. در صورت تراریخته بودن، رنگ آبی در زمینه سفید قابل مشاهده است.

پس از گزینش شاخه‌های تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون ارزیابی Gus، لازم بود آزمون تایید مولکولی ژن انتقال یافته بر روی این شاخه‌ها صورت گیرد. بنابراین از این شاخه‌ها استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از آغازگرهای ژن‌های *GUS* و *VIR* بطور جداگانه PCR انجام و سپس الکتروفورز محصول PCR انجام شد. به منظور استخراج DNA از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخته و غیرتراریخته از روش CTAB استفاده شد (Doyle & Doyle 1987).

#### نتایج و بحث

**اثر ترکیب هورمونی محیط کشت بر باززایی *B. soli-mutata*.** بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 2)، اثر سیتوکینین بر تمام صفات مورد ارزیابی بجز درصد کالوس زایی و اثر میزان اکسین NAA در تمام صفات مورد بررسی در سطح 5 درصد معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حضور 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA در هر دو تیمار سیتوکینین باعث بهبود تمام صفات شد (جدول 3). همچنین Kin در تمام صفات مورد بررسی بویژه درصد زنده مانی ریزنمونه و درصد شاخه زایی اثر بهتری نسبت به TDZ داشت. اثر متقابل سیتوکینین و غلظت اکسین در تمام صفات بجز درصد باززایی و تعداد برگ تولید شده در سطح پنج درصد معنی دار نبود (جدول 2). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین درصد زنده مانی ریزنمونه (100)، درصد کالوس زایی (42/5)، درصد شاخه زایی (100) و تعداد برگ تولید شده به ازای هر ریزنمونه (26/25 عدد) در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. همچنین بیشترین تعداد ریشه



46 عدد) و طول ریشه به ازای هر ریزنمونه (35/75 میلی متر) در محیط کشت حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد (جدول 3). شکل 2 القای باززایی شاخه در ریزنمونه دمبرگ و تولید گیاهچه کامل در شرایط این ویترو را نشان می دهد.

جدول 2. تجزیه واریانس صفات مربوط به باززایی گونه *B. soli-mutata* در شرایط این ویترو

Table 2. Analysis variance for regeneration characteristics of *B. soli-mutata* in *in vitro* condition

| طول ریشه<br>(میلی متر)<br>Root<br>length<br>(mm) | تعداد ریشه<br>Root<br>number | تعداد برگ<br>Leaf<br>number | درصد شاخه زایی<br>Shoot<br>regeneration<br>percentage | درصد<br>کالوس زایی<br>Callogenesis<br>percentage | درصد<br>زنده مانی<br>Survival<br>percentage | درجه آزادی<br>Degree of<br>freedom | منابع تغییر<br>Source of<br>variation                     |
|--|------------------------------|-----------------------------|---|--|---|------------------------------------|---|
| 172.93*  | 77.34*                       | 18.25*                      | 860.82*   | 209.35 <sup>ns</sup>                             | 0.13*                                       | 5                                  | سیتوکینین<br>Cytokinin                                    |
| 7482.25*   | 12191.84*                    | 5220.06*                    | 69086.61*   | 70201.59*  | 4.30*                                       | 1                                  | اکسین<br>Auxin  |
| 372.96*  | 228.84*                      | 27.52*                      | 248.44*   | 229.41*  | 0.12*                                       | 5                                  | سیتوکینین* اکسین<br>Cytokinin*<br>Auxin                   |
| 3.37   | 2.39                         | 8.78                        | 48.8  | 84.39  | 0.02  | 36                                 | خطا<br>Error  |
| 15   | 10                           | 4.7                         | 19  | 8.3  | 0.3   |                                    | ضریب تغییرات<br>(درصد)<br>Coefficient of<br>variation (%) |

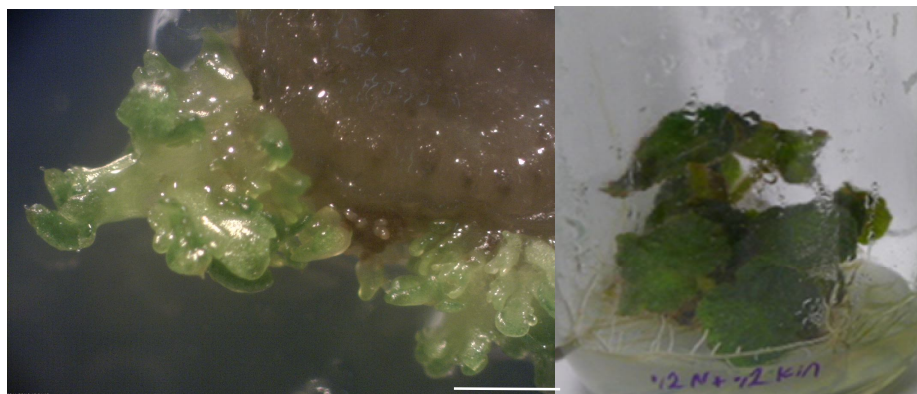
جدول 3. اثر سیتوکینین و میزان اکسین NAA بر میانگین شاخه زایی و ریشه زایی *B. soli-mutata* در شرایط این ویترو

**Table 3. Effect of cytokinin and concentration of NAA on mean of shoot regeneration and rooting of *B. soli-mutata* in *in vitro* culture condition**

| طول ریشه<br>(میلی متر) | تعداد برگ<br>تعداد ریشه | تعداد شاخه<br>زایی | درصد<br>کالوس زایی                  | درصد<br>زنده مانی          | غلظت اکسین<br>Concentration<br>of auxin | غلظت سیتوکینین<br>Concentration<br>of cytokinin | سیتوکینین<br>Cytokinin |
|------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|---|------------------------|
| Root<br>length<br>(mm) | Root<br>number          | Leaf<br>number     | Shoot<br>regeneration<br>percentage | Callogenesis<br>percentage | Survival<br>percentage                  |   |                        |
| 0.00 d                 | 0.00 i                  | 0.00 h             | 0.00 g                              | 0.00 b                     | 0.00 i                                  | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   | 0.2   |                        |
| 13.25 c                | 12.00 fg                | 0.00 h             | 0.00 g                              | 8.25 b                     | 37.00 g                                 | 0.2   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   |                        |
| 0.75 d                 | 0.75 i                  | 1.50 fg            | 16.50 fg                            | 5.50 b                     | 27.50 h                                 | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | 1                      |
| 19.75 b                | 20.75 d                 | 0.00 h             | 0.00 g                              | 23.25 ab                   | 57.00 cd                                | 0.2   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   |                        |
| 0.00 d                 | 0.00 i                  | 0.00 h             | 0.00 g                              | 0.00 b                     | 37.00 g                                 | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | 2                      |
| 13.00 c                | 16.50 e                 | 0.25 fg            | 1.50 g                              | 16.50 ab                   | 57.00 cd                                | 0.2   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   |                        |
| 2.50 d                 | 0.75 i                  | 0.75 fg            | 11.00 fg                            | 0.00 b                     | 49.50 def                               | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | 0.2                    |
| 35.75 a                | 46.00 a                 | 15.75 c            | 83.00 bc                            | 0.00 b                     | 61.25 c                                 | 0.2   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   |                        |
| 12.75 c                | 9.50 gh                 | 5.25 de            | 49.50 de                            | 22.00 ab                   | 53.50 cdef                              | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | 1                      |
| 19.75 b                | 40.50 b                 | 26.25 a            | 100 a                               | 42.50 a                    | 100.00 a                                | 0.2   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | Kin                    |
| 12.00 c                | 11.25 fg                | 3.50 ef            | 70.75 bc                            | 16.50 ab                   | 54.50 cde                               | 0   |                        |
|                        |                         |                    |                                     |                            |   |   | 2                      |
| 13.75 c                | 23.75 c                 | 21.50 b            | 100 a                               | 0.00 b                     | 77.50 b                                 | 0.2   |                        |

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% probability level.



شکل 2. مراحل باززایی شاخه در گیاه *B. soli-mutata* (راست) القای باززایی در ریزنمونه دمبرگ (چپ) گیاهچه باززا شده

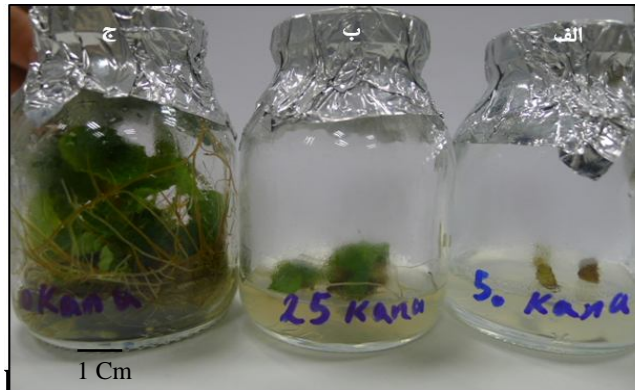
Figure 2. Shoot regeneration in *B. soli-mutata*, right) regeneration induction in petiole explant, left) regenerated plantlet

برای تولید جنین‌های سوماتیکی در بگونیا Castillo and Smith (1997) از محیط کشت MS غنی شده با 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و دو درصد شیره نارگیل استفاده کردند. بیشترین تعداد جنین (60 تا 70 عدد به ازای هر ریزنمونه) از کالوس‌های بدست آمده از ریز نمونه‌های برگ بدست آمد. Nhut et al. (2005) جهت ریزازدیادی *B. tuberosus* از ریز نمونه‌های TCL دمبرگ در محیط کشت غنی شده با 0/2 میلی‌گرم بر لیتر TDZ استفاده کردند و جهت ریشه‌دار نمودن شاخه‌های تشکیل شده از محیط کشت MS تکمیل شده با 0/5 میلی‌گرم بر لیتر BA، 0/1 میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک گرم بر لیتر زغال فعال استفاده کردند. Shobi and Viswanathan (2017) سیتوکنین‌های Kin، BAP و TDZ در ترکیب با اکسین‌های IAA، IBA و NAA در محیط کشت پایه MS را بر باززایی *B. fallax* مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین ترکیب است. شواهد از باززایی در گونه‌های مختلف بگونیا حاکی از این است که ساختارهای ژنتیکی متفاوت گونه‌ها می‌تواند باعث پاسخ‌های متفاوت به ترکیبات هورمونی محیط کشت شده باشد.

#### بررسی اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی گونه *B. soli-mutata* در شرایط

**این‌ویترو:** نتایج جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی گونه *B. soli-mutata* در شرایط این‌ویترو نشان داد که بین غلظت‌های مختلف از نظر درصد زنده‌مانی و درصد باززایی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی (100 درصد) و باززایی (100 درصد) در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کانامایسین مشاهده شد (جدول 4). با توجه به درصد شاخه‌زایی (11 درصد) و زنده‌مانی (25 درصد) ریزنمونه‌ها در غلظت 50 میلی‌گرم در لیتر

کانامایسین، از این غلظت در محیط کشت‌های انتخابی برای گزینش ریزنمونه‌های تراریخته استفاده شد. Einset & Kopperud (1995)، Kiyokawa et al. (1996)، Kishimoto et al. (2002) و Ping-qu & Lei (2010) از غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین جهت گزینش گیاهچه‌های تراریخته گونه‌های دیگر بگونیا استفاده کردند در حالی که این غلظت در گونه *B. soli-mutata* نامناسب بوده و موجب سوختگی تمام ریز نمونه‌ها گردید (شکل 3).



شکل 3. گیاهچه‌های *B. soli-mutata* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین. راست) 50 میلی‌گرم در لیتر. وسط) 25 میلی‌گرم در لیتر. چپ) صفر میلی‌گرم در لیتر.

Figure 3. *B. soli-mutata* plantlets in media containing different concentration of Kanamycin. Right) 50 mg/l; Middle) 25 mg/l; Left) 0 mg/l.

جدول 4. اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر صفات مورد ارزیابی *B. soli-mutata* در شرایط این‌ویترو

Table 4. Effect of Kanamycin concentrations on regeneration of *B. soli-mutata* in *in vitro* culture condition

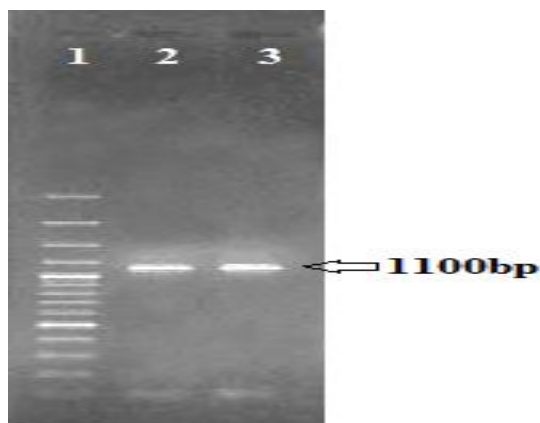
| درصد شاخه زایی                | درصد زنده مانی      | غلظت کانامایسین (میلی گرم در لیتر) |
|-------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| Shoot regeneration percentage | Survival percentage | Concentration of Kanamycin (mg/l)  |
| 100 a                         | 100 a               | 0                                  |
| 66.25 b                       | 81.25 a             | 25                                 |
| 11.00 c                       | 25.00 b             | 50                                 |
| 0.00 c                        | 15.00 b             | 75                                 |
| 0.00 c                        | 7.50 b              | 100                                |

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% probability level.

تایید حضور پلاسمید و ژنهای *VIR*، *GUS* و *NPTII* در باکتری اگروباکتریوم تومی فاشینس

پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای ژن *GUS*، *VIR* و *NPTII* حضور این ژنها در باکتری مورد نظر تایید شد. در شکل 4 نمونه ای از نتیجه واکنش PCR برای ژن *GUS* در دمای اتصال 53 و 55 درجه سانتی گراد نشان داده شده است.



شکل 4. باند 1100 جفت بازی مربوط به حضور ژن *GUS* در *Agrobacterium* (چاهک 1) سایز مارکر، (2) دمای اتصال 53 درجه سانتی گراد و (3) دمای اتصال 55 درجه سانتی گراد

Figure 4. The 1100 bp fragment for the presence of *GUS* gene in the *Agrobacterium*. well 1) Ladder, well 2) annealing temperature in 53°C, well 3) annealing temperature in 55°C.

تایید گیاهان تراریخته: استخراج DNA از بافت برگ گیاهچه‌های شاهد *B. soli-mutata* به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle 1987). ولی به دلیل وجود میزان بالای اگزالیک اسید در برگ‌های بگونیا مقدار DNA استخراج شده بسیار اندک بود. مقدار DNA استخراج شده با نانودراپ اندازه گیری شد و در بهترین وضعیت مقدار 38 نانوگرم DNA در ماکرولیتر بدست آمد. لذا این دستورالعمل بنا به پیشنهاد ارائه شده در روش Einset & Kopperud (1995) مبنی بر شستشو با بافر نمکی T10E10 (Tris 10 mM, EDTA 10 mM) اصلاح شد که باعث بهبود کیفیت DNA استخراج شده گردید. Doyle & Doyle (2005) در استخراج DNA از برگ‌های تازه و خشک شده بگونیا در ژل سیلیکا، از روش Doyle & Doyle (1987) استفاده کردند. Chen & Mii (2012) به مشکل استخراج DNA از برگ‌های بگونیا اشاره کردند و در استخراج DNA از برگ‌های بگونیا طبق روش Einset & Kopperud (1995) از بافر 10 mM Tris Hcl + 10 mM T10 E10 (EDTA) برای شستشو استفاده کرده و سپس از روش CTAB براساس دستورالعمل Murray & Thompson (1980) در استخراج DNA استفاده کردند.

پس از همکشتی 2000 ریزنمونه ی TCL گونه *B. soli-mutata* با باکتری اگروباکتریوم تومی فاشینس، تعداد 58 عدد از ریزنمونه‌ها در محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی گرم در لیتر کانامایسین باززا شدند که 32 عدد زمان 48 ساعت و 26

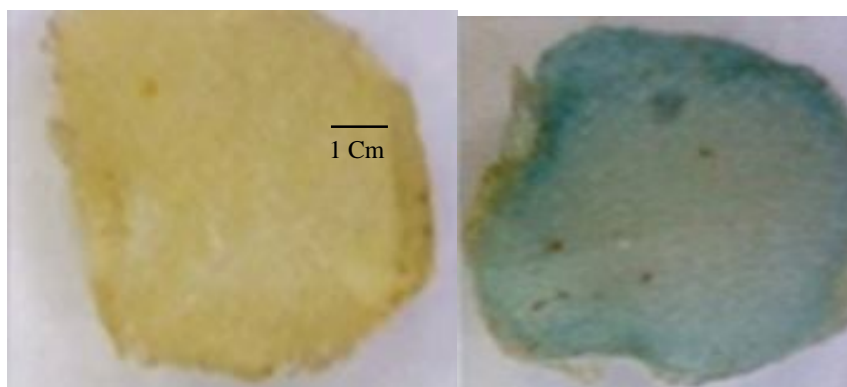
عدد زمان 72 ساعت همکشتی با باکتری را طی نموده بودند. در کلیه گیاهچه‌های باز شده از این ریزنمونه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد کندی رشد مشاهده گردید. بنابراین پس از 12 هفته گزینش در محیط کشت انتخابی، گیاهچه‌ها جهت افزایش رشد به محیط کشت MS فاقد آنتی بیوتیک کاناماسین انتقال یافتند. پس از گذشت 14 هفته از تاریخ همکشتی تنها 17 گیاهچه به مرحله سازگاری رسیدند. برای سازگاری گیاهچه‌ها از بستر کوکویت همراه با پرلیت به نسبت 1:1 استفاده شد. پس از گذشت 60 روز از سازگاری و رشد مناسب گیاهان (با حداقل 8 برگ جدید) از برگ‌های جوان که در وضعیت فعال رشد بودند DNA استخراج شد و در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل 5). از 17 گیاهچه سازگار شده، در ارزیابی بیان ژن *GUS* تنها در 7 گیاه رنگ آبی مشاهده شده و بیان آن تایید شد (شکل 6). واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با آغازگرهای ژن *GUS* و *VIR* بر روی تمام این 17 گیاهچه انجام شد و تنها همان 7 گیاهچه باند 1100 جفت بازی مربوط به حضور ژن *GUS* را نشان دادند (شکل 7) و هیچ کدام باند 1056 جفت بازی مربوط به حضور ژن *VIR* را نشان ندادند.

Kiyokawa et al. (1996) برای انتقال ژن *GUS* به *B. tuberhybrida* از نژاد باکتری LBA4404 استفاده کردند و درصد تراریختی را 22/5 درصد گزارش کردند. Einset & Kopperud (1995) برای خاموشی ژن ACC اکسیداز از همین نژاد استفاده کردند اما اشاره‌ای به درصد تراریختی نکردند. Kishimoto et al. (2002) نیز با استفاده از این نژاد ژن *GUS* را به *B. hiemalis* منتقل کردند. آنها توانستند از 628 ریزنمونه مورد استفاده در همکشتی تنها 2 گیاه تراریخته بدست آورند که درصد تراریزش در آن نزدیک به 1/6 درصد بود. Xu et al. (2011) درصد تراریزش نسبت به ریزنمونه اولیه در گیاه *B. maculata* را بسته به تراکم باکتری بین 1/7 تا 5/8 گزارش کردند. Sandgrind (2017) برای تولید رنگ آبی در گیاه *B. tuberhybrida* ژن F3'5'H را با استفاده از نژاد GV3101 اگروباکتریوم تومی فاشینس به این گیاه منتقل کردند و درصد تراریزش 1 درصدی را گزارش کردند. در مجموع نتایج کار سایر محققان مبین این است که درصد تراریزش در گیاه بگونیا پایین است و برای تولید گیاه تراریخته لازم است تعداد زیادی ریزنمونه اولیه همکشتی داده شوند که با نتایج بدست آمده در این آزمایش مطابقت دارد. در بررسی حاضر نیز از دو هزار ریزنمونه ی هم کشتی حدود هفت گیاهچه با بیان مثبت ژن حاصل شد و درصد تراریزشی پایین تر از یک درصد را حاصل نمود. البته طبیعت سرسخت این گیاه در انتقال ژن وابسته به خصوصیات بیوشیمیایی و ترکیباتی در گیاه است که بعضاً نقش بازدارندگی در آلودگی باکتریایی ایفا می کنند. با این حال به منظور افزایش کارایی انتقال ژن در این گیاه بهتر است عوامل دیگری چون نژاد های مختلف باکتری، ریزنمونه های دیگر، زمان همکشتی و عوامل القا کننده تلقیح مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.



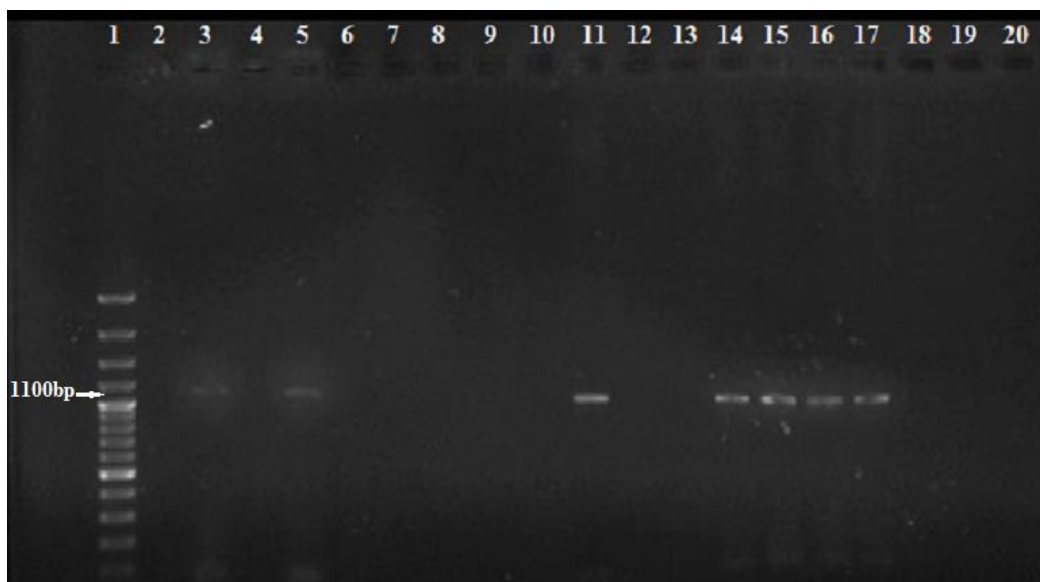
شکل 5. گیاه تراریخته *B. soli-mutata* در بستر کوکوپیت + پرلیت

Figure 5. Transgenic *B. soli-mutata* in CocoPeat and perlite medium



شکل 6. مشاهده رنگ آبی در ارزیابی بیان ژن *gus* در دیسک برگ گیاه تراریخته (سمت راست) و فقدان رنگ آبی در گیاه شاهد غیر تراریخته (سمت چپ)

Figure 6. Blue color in *gus* assay of leaf disk in transgenic plant (right) and non-transgenic plant (left)



شکل 7. باند 1100 جفت بازی ژن *gus* در گیاهان تراریخته. چاهک 1) سایز مارکر، چاهک 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 و 12 و 13 و 14 و 15 و 16 و 17 و 18) گیاهان گزینش شده در محیط کشت حاوی کانامیسین، 19) شاهد غیر تراریخته، 20) کنترل منفی

**Figure 7. The 1100 bp fragment for the presence of *GUS* gene in the transgenic plants. Well 1) Ladder, wells 2-18) Selected plantlets in media containing Kanamycin, Well 19) Control, Well 20) Negative control**

**نتیجه گیری:** با توجه به ارزش تجاری بالای بگونیا و لزوم دستیابی به روش‌های سریع و قابل اطمینان تولید فرم‌های جدید در این گیاه، در پژوهش حاضر در دو مرحله شرایط باززایی و انتقال ژن به گونه *B. soli-mutata* مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله اول شرایط باززایی گیاه از ریزنمونه دمبرگ در شرایط این ویترو بهینه شد و بهترین محیط کشت، محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر Kin و 0/2 میلی گرم در لیتر NAA معرفی گردید. در مرحله دوم شرایط انتقال ژن به این گونه مبتنی بر ژن گزارشگر *GUS* بهینه شد. برای گزینش گیاهان تراریخته از محیط کشت انتخابی حاوی 50 میلی گرم در لیتر کانامیسین استفاده شد. در مجموع نتایج آزمایش تراریختی نشان داد که درصد تراریزش در این گونه بگونیا پایین است و برای تولید گیاه تراریخته لازم است تعداد زیادی ریزنمونه اولیه همکشتی داده شوند. همچنین به منظور افزایش کارایی انتقال ژن در این گیاه بهتر است عوامل دیگری چون نژاد های مختلف باکتری، ریزنمونه های دیگر، زمان همکشتی و عوامل القا کننده تلقیح مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.



## References

- Burrirt DJ (2008) Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95, 209-215.
- Burrirt DJ, Leung DWM (1996) Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia x erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. *J Exp Botany* 47, 557-567.
- Castillo B, Smith MAL (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep* 16, 385-388.
- Chen YM, Mii M (2012) Interspecific hybridization of *Begonia semperflorens* (section *Begonia*) with *B. pearcei* (section *Eupetalum*) for introducing yellow flower color. *Plant Biotech* 29, 77-85.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19,11-15.
- Einset JW, Kopperud C (1995) Antisense ethylene genes for *Begonia* flowers. *ISHS Acta Hort* 405, 24.
- Forrest LL, Hughes M, Hollingsworth PM, Zomlefer WB (2005) A Phylogeny of *Begonia* Using Nuclear Ribosomal Sequence Data and Morphological Characters. *Systematic Bot* 30, 671-682.
- Frodin DG (2004) History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53, 753-776.
- Hoshi Y, Kondo M, Kobayashi H (2003) Transformation of *Begonia semperflorens* by using *Agrobacterium*. *J Jpn Soc Hort Sci* 72, 373.
- Hvoslef-Eide AK, Fjeld T, Einset JW (1995) Breeding Christmas begonia (*Begonia cheimantha* Everett) for increased keeping quality by traditional and biotechnological methods. *Acta Hort* 405,197-204.
- Hvoslef-Eide AK, Munster C (2006) *Begonia*. History and Breeding. In: *Flower Breeding and Genetics* (1<sup>st</sup> edn). Anderson NO (ed). Springer, Netherlands, pp. 241-275
- International Statistics Flowers and Plants (2014) Center for Business Management in Horticulture and Applied Research (1<sup>st</sup> edn). Leibniz University Hanover, Germany, Volume 62.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS Fusions: Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *EMBO J* 6, 3901-3907.

- Kabirnataj S, Ghasemi Y, Nematzadeh G et al. (2012) Effect of explant type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Begonia rex*. Int Res J Appl Basic Sci 3, 896-901.
- Kishimoto S, Aida R, Shibata M (2002) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Elatior Begonia* (*Begonia. Hiemalis* Fotsch). Plant Sci 162, 697-703.
- Kiyokawa S, Kikuchi Y, Kamada H, Harada H (1996) Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by *Rirol* genes. Plant Cell Rep 15, 606-609.
- Kumari A, Baskaran P, Van Staden J (2017) *In vitro* regeneration of *Begonia homonyma* - A threatened plant. South Afri J Bot 109, 174-177.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8, 4321-4326.
- Nada S, Chennareddy S, Goldman S et al. (2011) Direct shoot bud differentiation and plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *Begonia tuberhybrida*. HortSci 46, 759-76.
- Nhut D, Hai N, Huyen P et al. (2005) Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from *begonia* petiole transverse thin cell layer culture. Propag Orn Plants 5, 151-157.
- Nhut DT, Hai NT, Phan MX (2010) A Highly Efficient Protocol for Micropropagation of *Begonia tuberous* (1<sup>st</sup> edn). In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Jain SM, Ochatt SJ (eds). Methods in Molecular Biology book series 589, Humana Press.
- Ping-qu B, Lei Z (2010) Study on genetic transformation of *ipt* gene to *Begonia semperflorens* and its drought resistant ability. Hubei Agri Sci 2, 265-270.
- Sandgrind S (2017) Breeding of *Begonia tuberhybrida* using modern biotechnology. MS Thesis. Norwegian University of Life Science, Norway.
- Sharifi A, Khykha Akhar F, Kharazi M, Khadem A (2017) Biotechnology of Ornamental Plant Jahad Daneshgahi Mashhad press, pp 95. (in Persian)
- Shobi TM, Viswanathan MBG (2017) Micropropagation of an Important Medicinal Plant, *Begonia fallax* (Begoniaceae). Int J Curr Res Biosci Plant Biol 4,94-99.
- Xu QL, Dong JL, Gao N et al. (2011) Transgenic lines of *Begonia maculata* generated by ectopic expression of *PttKNI*. Biol 66: 251-257.