

بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن GUS به موسیر با استفاده از آگروباکتریوم

Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*

ابوالفضل حاجی حیدر^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، سید مهدی میری^۱
Abolfazl Hajiheidar¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Seied Mehdi Miri¹

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران.
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

1.M.Sc, Assistant Professor, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۹)

چکیده

موسیر (*Allium stipitatum*) یک سبزی خوراکی بوده و از خصوصیات دارویی بسیار مهمی برخوردار است. بنابراین بهینه سازی یک سیستم باززایی و تراریزش کارآمد در این گیاه جهت بهبود و اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک ضروری است. در این مطالعه، ریزنمونه های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه ای موسیر در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلفی از تنظیم کننده های رشد NAA، 2,4-D و BA به منظور القاء کالوس و باززایی کشت شدند. ریزنمونه ها با سوبه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* دارای ناقل pBI121 حاوی ژن گزارشگر *gus* تراریزش شدند. نتایج نشان داد که ریزنمونه طبق پیاز نسبت به جنین و ریشه کالوس زایی و باززایی بالاتری داشت و بیشترین باززایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه طبق پیاز و در محیط کشت MS حاوی پنج میلی گرم در لیتر BA به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA، صورت گرفت. به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد و وجود این ژن را در هر دو ریزنمونه جنین و طبق پیاز، که به آزمون هیستوشیمیایی *gus* پاسخ مثبت داده بودند، اثبات کرد. همچنین عدم آلودگی ناشی از آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز تأیید شد. در این تحقیق کارایی تراریزش در ریزنمونه جنین ۱۰ درصد و در ریزنمونه طبق پیاز ۶/۶ درصد محاسبه شد.

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
ژن *gus*
کشت بافت
موسیر

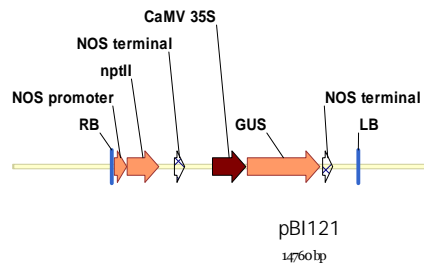
مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم فرآیندهای بیوتکنولوژی گیاهی، کشت بافت‌ها و اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای است که کاربردهای مختلف آن در زمینه گیاهان دارویی، از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی است. بهینه سازی کشت بافت موسیر که سریع‌ترین راه برای تکثیر این گیاه دارویی در حال انقراض است، می‌تواند راهگشایی برای تجاری سازی این گیاه با ارزش اقتصادی باشد. همچنین در موسیر از ریزنمونه طبق پیاز به‌منظور ریزازدیادی و تولید کالوس استفاده شده است (Ghahremani Majd et al., 2009). یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی گیاهی، مهندسی ژنتیک یا تکنولوژی DNA نوترکیب است که هدف از آن ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب گیاهان برتر از نظر ژن‌های کنترل کننده صفات مطلوب و همچنین حفظ تنوع واریته‌های گیاهی است (Farsi and Zolala, 2000). Zheng و همکاران در سال (۲۰۰۱) برای توسعه انتقال ژن به پیاز و موسیر دستورالعمل معتبری را تنظیم کردند و با ریزنمونه جنین‌های بالغ جنسی، ۱/۹۵ درصد فراوانی تراریزش به‌دست آوردند. همچنین کارایی تراریزش در سیر و تره فرنگی ۰/۰۶ درصد گزارش شده است (Eady et al., 2005).

با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*، می‌توان فرآیند انتقال ژن به موسیر را جهت فراهم آوردن زمینه‌های بعدی انتقال ژن به این گیاه بهینه کرد تا با افزایش میزان اسانس از آن در آینده راهگشایی جهت تولید داروهای گیاهی است. استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک و انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم نیازمند تهیه دستور کار روش موثر باززایی از بافت تراریخته است و تولید موفق موسیر تراریخته و هر گیاه دیگر به نوع ریزنمونه مورد استفاده، روش تراریزش، باززایی تعداد زیادی گیاه تراریخته مستقل از هم و نیز روش غربال‌گری و ارزیابی آن‌ها بستگی دارد (Tohidfar and Mohsenpour, 2010). در این پژوهش سعی شده است با استفاده از تیمارهای مناسب، بهترین فاکتورها به‌منظور حداکثر تراریزش برای گیاه موسیر بومی ایران (*A. stipitatum*) به‌دست آید. بدین منظور ابتدا باید یک روش باززایی مناسب برای انتقال ژن در موسیر بهینه شود و همچنین توسط ژن‌های گزارشگر مناسب نظیر ژن *gus* انتقال ژن به موسیر بهینه شود،

موسیر با نام انگلیسی shallot و نام علمی *Allium stipitatum* از تیره نرگس‌ها (Amaryllidaceae) است. برگ‌هایش باریک و دراز و به رنگ سبز تیره، گل‌ها کوچک و به رنگ صورتی یا مایل به سبز به‌صورت یک چتر در انتهای ساقه استوانه‌ای گل دهنده ظاهر می‌شود و دانه‌های آن سیاه است. از نظر ترکیبات شیمیایی دارای حدود ۰/۰۶-۱ درصد اسانس است که شامل آلپین-آلیساتین یک و دو، آلپیل پروپیل-دی سولفیدو دو ترکیب گوگردی است. از موسیر در صنایع غذایی (ماست موسیر، ترشی) و صنایع دارویی استفاده می‌شود و از این رو اهمیت اقتصادی قابل ملاحظه‌ای دارد (Kheikhah and Dadkhah, 2013). از اسانس موسیر در صنایع بهداشتی (شامپو) نیز استفاده می‌شود، به‌طوری که رضایی‌خوزانی و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند عصاره تام موسیر دارای اثرهای ضد باکتریایی بوده و می‌توان در آینده آن را جایگزین داروهای ضد باکتریایی شیمیایی کرد. موسیر ایرانی ضد دیابت بوده و اثرش را از طریق افزایش ترشح انسولین و کاهش خروج گلوکز کبدی با سرکوب فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز اعمال می‌کند (Arsalandeh et al., 2012). در ایران یکی از استان‌های مهم تولید کننده این محصول استان کرمانشاه با سطح زیر کشت حدود ۱۲ هکتار و عملکرد حدود ۱-۱/۵ تن در هکتار است (www3.as.irna.ir/faNews/80772912).

ارزش دارویی، تقاضای بازار و سطح فرآوری از مهمترین شاخص‌های سنجش اقتصادی یک گیاه است. طبق گزارش سازمان خواربار جهانی، ارزش تجارت گیاهان دارویی که در حال حاضر حدود صد میلیارد دلار در سال است، در سال ۲۰۵۰ میلادی به رقم پنج تریلیون دلار خواهد رسید. کشور ایران با داشتن شرایط اقلیمی و تنوع گیاهی به مراتب بهتر از اروپا، در حال حاضر تنها ۶۰ تا ۹۰ میلیون دلار از تجارت جهانی گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است. از مهمترین گیاهان دارویی صادراتی ایران در سال‌های گذشته موسیر، زیره سبز، آویشن و ... بوده که به‌طور کلی به کشورهای اروپای غربی و اروپای شرقی و آمریکا، هندوستان و کشورهای حوزه خلیج فارس صادر می‌شود (Kashfi Bonab, 2010).



شکل ۱- نقشه وکتور دوگانه pBI121

Figure 1- Binary vector pBI121

برای کشت باکتری اگروباکتریوم، از محیط کشت باکتریایی LB (Bertani, 1951)، در دو نوع مایع (LB Broth) و جامد (LB Agar) حاوی ۱۰ گرم در لیتر آگار استفاده شد که هر دو از شرکت Duchefa تهیه شده بودند. پس از اتوکلاو و رسیدن به دمای مناسب (۵۰ درجه سانتی گراد)، آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین (۲۵ میلی گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) که توسط فیلتر استریل شده بودند به آن‌ها اضافه شد و در پتری دیش (برای محیط کشت جامد) و یا فالكون و ارلن (برای محیط کشت مایع) توزیع و در یخچال نگهداری شدند.

آماده سازی اگروباکتریوم جهت انتقال ژن

سویه اگروباکتریوم LBA4404 جهت انتقال ژن، در محیط کشت LB مایع حاوی ۲۵ میلی گرم بر لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در دستگاه شیکر-انکوباتور با دور ۲۰۰rpm کشت شدند. پس از طی مدت زمان ۴۸ ساعت، به منظور افزایش کارایی تراریزش، ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت شده به پنج میلی لیتر محیط کشت LB مایع جدید حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین اضافه شده و به مدت شش ساعت، برای رشد باکتری‌های تازه، در دستگاه شیکر-انکوباتور قرار گرفت.

تلقیح ریزنمونه‌ها

در این پژوهش ریزنمونه‌های جنین به مدت ده و پانزده دقیقه و طبق پیاز و ریشه به مدت پنج و ده دقیقه در سوسپانسیون باکتری $OD_{600}=0.6$ غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن بر روی

سپس این روش‌ها برای تراریختی موسیر با ژن‌های مفید مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای موسیر (*A. stipitatum*) و گیاهچه درون شیشه‌ای موسیر عاری از ویروس جهت تهیه ریزنمونه طبق پیاز، از بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و ادامه مراحل آزمایش در گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج انجام شد.

سترون سازی بذرها و آماده سازی ریزنمونه

بذرهای ابتدا در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم یک درصد حجمی/حجمی حاوی دو قطره Tween 20 به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس با آب مقطر استریل ۳ مرتبه شستشو داده شدند. بذرها به مدت یک هفته در آب مقطر استریل خیسانده شدند تا پوسته‌ی بذر نرم شده و بتوان جنین را از داخل بذر جدا کرد. جدا سازی جنین در زیر هود لامینار و توسط میکروسکوپ لوپ و در شرایط به طور کامل استریل انجام شد. همچنین از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای طبق پیاز و قطعات یک سانتی متری ریشه تهیه شد.

تراریزش باکتریایی

در این پژوهش از سویه باکتری LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* دارای پلاسمید دوگانه pBI121 حاوی ژن *gus* تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم CaMV35S و پایانبر NOS به عنوان حامل پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). همچنین در پژوهش حاضر از روش ذوب-انجماد (Sambrook and Russel, 2001) جهت تراریزش اگروباکتریوم استفاده شد و تأیید صحت تراریزش اگروباکتریوم از طریق آزمون هیستوشیمیایی *gus* (Jefferson et al. 1987) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت.

در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت. پس از دو ماه، درصد باززایی و سایر صفات بررسی شدند. تمامی محیط کشت‌ها حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شدند.

استخراج DNA ژنومی گیاه موسیر و تأیید تراریزش ریزنمونه‌ها

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Dellaporta et al., 1983) انجام شد و برای اثبات تراریزش از آزمون هیستوشیمیایی *gus* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* استفاده شد. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه) انجام شد. گیاهان تراریخته‌ای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، قطعه مورد انتظار را تکثیر کردند، جهت اثبات عدم حضور آگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آگروباکتریوم *virG* بررسی شدند (جدول ۳).

کاغذ صافی استریل به صورت افقی به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی سی‌گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار و pH معادل ۵/۷-۵/۸ کشت شدند. سپس به محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم و سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند.

کالزایی و باززایی

ریزنمونه‌های تلقیح یافته جهت کالزایی به محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۱) انتقال یافته و در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. واکنش ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت. دو ماه پس از کشت صفات درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس بر روی تیمارهای هورمونی مختلف اندازه‌گیری شد.

برای باززایی نیز از محیط کشت‌های باززایی انتخابی MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۲) استفاده شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت باززایی در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و طول روز شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. واکنش ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به منظور القای کالوس ریزنمونه‌ها

Table 1- Hormonal treatments for inducing callus in explants

ردیف Row	ریزنمونه Explant	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم بر لیتر) Hormones (mg/l)		
		2,4-D	NAA	BA
1	جنین Embryo	-	1	2
2	طبقیاز موسیر Bulb	2	-	2
2	ریشه Root	-	1	2

جدول ۲- محیط‌های کشت باززایی پیازچه

Table 2- Regeneration culture media of bulblet

تنظیم کننده‌های رشد (میلی گرم بر لیتر)			ردیف Row
Hormones (mg/l)			
2,4-D	NAA	BA	
-	-	-	1
-	-	1	2
-	-	5	3
-	1	-	4
-	1	1	5
-	1	5	6
-	2	-	7
-	2	1	8
-	2	5	9
1	-	-	10
1	-	1	11
1	-	5	12
2	-	-	13
2	-	1	14
2	-	5	15

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 4- Primers and PCR products

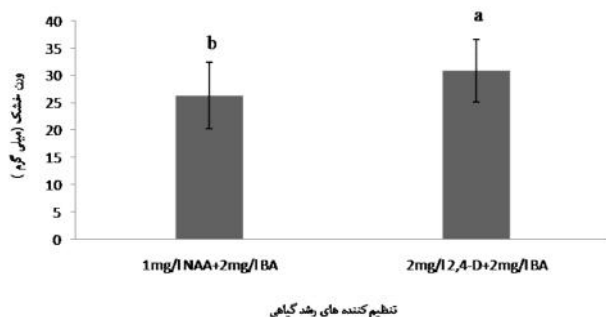
دمای بهینه اتصال (°C)	قطعه تکثیری (bp)	توالی	آغازگرها
Annealing (°C)	Amplified fragment (bp)	Sequence	Primers
		5' → 3'	
57	1092	Forward:CCCGCTTCGAAACCAATGCC Reverse:ACGTCCTGAAGAAACCCCA	<i>gus</i>
58	850	Forward:ATGATTGTACATCCTTCACG Reverse:TGCTGTTTTTATGAGTTGAG	<i>virG</i>

مدت یک دقیقه و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه) انجام شد.

واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

بررسی درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه جنین نشان داد که وزن تر کالوس در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی دار نداشت ولی در وزن خشک کالوس تفاوت معنی داری مشاهده شد. همچنین در ریزنمونه طبق پیاز نیز وزن تر و خشک کالوس ها در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی داری نداشتند. تشکیل کالوس در گیاه موسیر به نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه به طور کامل وابسته بود. در بین سه ریزنمونه به کار برده شده، جنین و طبق پیاز نسبت به ریشه تاثیر بیشتری را بر تشکیل کالوس ایجاد نمود. به طوریکه بیشترین درصد کال زایی (۱۰۰ درصد) با این دو ریزنمونه (در همه ترکیبات هورمونی) به دست آمد.

نتایج نشان داد در غلظت های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی داری بر وزن تر کالوس در ریزنمونه جنین مشاهده نشد. به طوریکه وزن تر کالوس در غلظت یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم لیتر BA و در غلظت دو میلی گرم در لیتر BA به همراه دو میلی گرم در لیتر 2,4-D با هم تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین نمودار نشان داد (شکل ۳) که در غلظت های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی داری بر وزن خشک کالوس داشت. به طوریکه در غلظت دو میلی گرم در لیتر 2,4-D و BA بیشترین وزن خشک کالوس و در غلظت یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم در لیتر BA کمترین وزن خشک کالوس مشاهده شد. این مسئله بیانگر این است که افزایش غلظت اکسین ها در وزن خشک کالوس اثر مستقیم دارد و باعث افزایش وزن خشک کالوس می شود.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر هورمون بر وزن خشک کالوس حاصل از جنین

Figure 3- Mean comparison effect of the hormone on embryo for callus dry weight

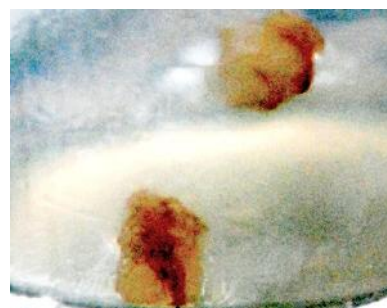
تجزیه و تحلیل آماری داده ها

آزمایشات کالوس زایی و باززایی در قالب طرح به طور کامل تصادفی با سه تکرار (هر تکرار سه ریزنمونه) انجام شد. تجزیه آماری داده های حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم افزار MSTATC و نتایج تجزیه واریانس توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان کالوس زایی در ریزنمونه ها

در این مطالعه، ریزنمونه های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه ای موسیر در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلفی از تنظیم کننده های رشد NAA، BA و 2,4-D به منظور القاء کالوس کشت شدند و درصد کال زایی، وزن تر و خشک کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. یک ماه پس از کشت، در تمام تیمارهای هورمونی تشکیل کالوس بر روی ریزنمونه های جنین و طبق پیاز مشاهده شد اما در ریزنمونه ریشه هیچگونه کالوسی مشاهده نشد. در ریزنمونه جنین کالوس تشکیل شده در تیمار یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم در لیتر BA تفاوت معنی داری با تیمار حاوی 2,4-D و BA نداشت. در ریزنمونه طبق پیاز نیز کالوس ها متراکم و فشرده، گرانوله، آبنباتی شکل، چسبنده یا پفکی بودند (شکل ۲).

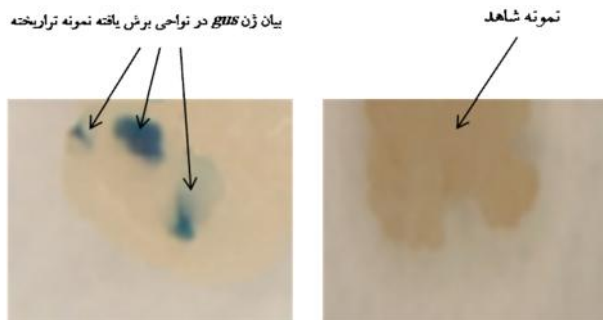


شکل ۲- کال زایی یک ماه پس از کشت

Figure 2- Callus induction one month after the culture

تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی *gus* در گیاهان تراریخته احتمالی

در این مطالعه از ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه به منظور انتقال ژن *gus* به گیاه موسیر بومی ایران استفاده شد. سنجش آزمون هیستوشیمیایی *gus* وجود نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نمونه را نشان داد که بیانگر بیان ژن *gus* است (شکل ۵).



شکل ۵- آزمون هیستوشیمیایی GUS در گیاهان تراریخته در محلول رنگ آمیزی GUS، نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نشان دهنده بیان ژن *gus* هستند

Figure 5- Histochemical GUS expression in transgenic plant

نتایج مقایسه میانگین فراوانی درصد تراریختی گیاهان احتمالی نشان داد (شکل ۶) در ریزنمونه جنین از ۳۰ نمونه بررسی شده توسط آزمون هیستوشیمیایی *gus*، سه نمونه که یکی به مدت ۱۵ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی‌گرم در لیتر BA قرار گرفته بود و دو نمونه دیگر به مدت ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه دو میلی‌گرم در لیتر BA قرار گرفته بودند، بیان ژن *gus* را نشان دادند. همچنین در ریزنمونه‌های طبق پیاز از ۳۰ نمونه بررسی شده یک نمونه به مدت پنج دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفته بود و نمونه دیگری که به مدت ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی دو میلی‌گرم در لیتر BA به همراه دو میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفته بود، بیان ژن *gus* را نشان دادند. صفت زمان تلقیح با آگروباکتریوم (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) تاثیر

نتایج نشان داد در غلظت‌های مختلف BA و NAA تاثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک کالوس در ریزنمونه طبق پیاز مشاهده نشد. به‌طوریکه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA و NAA و در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA و NAA وزن تر کالوس تفاوت معنی‌دار با هم نداشتند.

کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز که در ترکیبات متفاوت هورمونی در بخش کالزایی به‌دست آمده بودند به منظور بررسی میزان تشکیل نوساقه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BA، NAA و 2,4-D طبق (جدول ۲) کشت شدند و نتایج آن بعد از ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در تیمار پنج میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه طبق پیاز باززایی مشاهده شد (شکل ۴). در حالی که در ریزنمونه جنین هیچ گونه باززایی از کالوس صورت نگرفت. که این امر نشانگر این است که افزایش مقدار سایتوکینین‌ها در کنار اکسین‌ها برای باززایی بسیار موثر است. BA به عنوان یک سایتوکینین با غلظت بالا (پنج میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA به عنوان یک اکسین با غلظت متعادل (یک میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تاثیر را در باززایی (۱۰۰ درصد) و افزایش طول نوساقه‌ها داشتند.

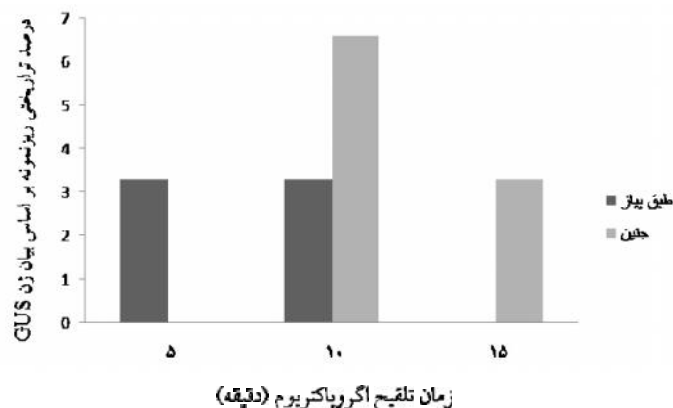


شکل ۴- باززایی از ریزنمونه طبق پیاز تراریخته

Figure 4- Regeneration of transgenic bulb

نتایج و بحث

در این پژوهش، دستورالعمل بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن به گیاه موسیر ایرانی تهیه شد. قهرمانی مجد و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند در نسبت‌های برابر بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید در ریزنمونه طبق پیاز اثر بهتری در تولید کالوس دارد که با نتایج ما نیز مشابه بود. همچنین تنها کالوس‌های به دست آمده از ریزنمونه طبق پیاز، باززا شدند. این امر نشان دهنده این است که ریزنمونه طبق پیاز بهترین ریزنمونه است. عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای بستگی به فاکتورهای متعددی دارد. مقادیر سطوح مختلف هورمون‌های داخلی، غلظت تنظیم کننده‌های رشد خارجی و برهمکنش اثر این تنظیم کننده‌ها همگی بر پاسخ ریزنمونه موثر است (Ghahremani Majd et al. 2009). به‌طور کلی چندین فاکتور می‌توانند اثر مهمی بر تراریزش با استفاده از آگروباکتریوم در گونه‌های گیاهی مختلف داشته باشند. با بهینه سازی فاکتورهای موثر می‌توان کارایی انتقال ژن به گیاهان را بالا برد. تراریختی به کمک آگروباکتریوم با وجود محدودیت‌هایی که دارد، در حال حاضر هنوز هم کاراترین روش برای تولید گیاهان تراریخته است. کوشش‌هایی در جریان است تا این روش را ساده‌تر و موثرتر کند تا تعداد ژنوتیپ‌های بیشتر، به‌خصوص واریته‌های برتر تراریخته شوند. برای ایجاد یک روش تراریختی مستقل از ژنوتیپ در گیاه پژوهش‌های بیشتری لازم است تا به افزایش تقاضا برای دستیابی سریع به ارقامی بهبود یافته برای تولید تجاری پاسخ داده شود (Tohidfar and Mohsenpour, 2010). در این پژوهش ریزنمونه‌های طبق پیاز و جنین نسبت به ریزنمونه‌های ریشه جهت کالزایی، باززایی و تراریزش در موسیر کاراتر بودند. بین سه محیط کشت باززایی، محیط کشت MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به همراه یک میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید بهترین محیط برای باززایی تشخیص داده شد. تنظیم کننده‌های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم سلولی دارند. همچنین سایتوکینین‌ها نیز در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی نقش دارند (Pirik, 2007).



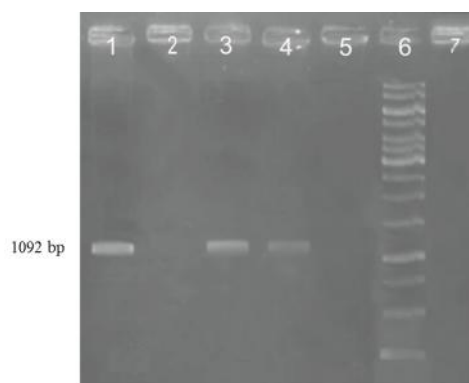
شکل ۶- فراوانی درصد تراریختی ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز بر اساس آزمون هیستوشیمیایی GUS

Figure 6- Transformation frequency percentage of embryo and bulb according to GUS assay

بسیار کمی بر درصد تراریختگی داشت و می‌توان نتیجه‌گیری نمود که زمان ۱۰ دقیقه مناسب‌ترین زمان برای تلقیح به روش غوطه‌وری است.

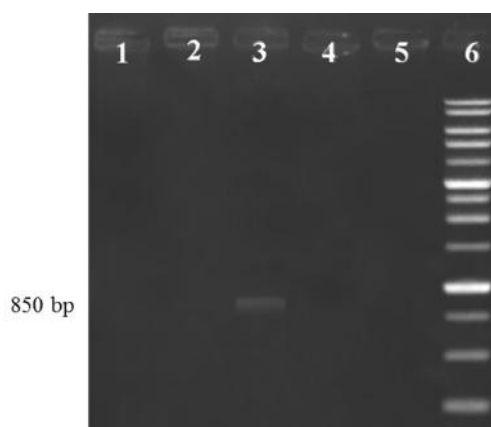
اثبات وجود ژن *gus* در گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب این ژن انجام شد. مشاهده باندها ۱۰۹۲ جفت بازی وجود این ژن را در گیاه، که به آزمون هیستوشیمیایی *gus* پاسخ مثبت داده بودند، اثبات کرد (شکل ۷). در گیاهان حاصل از ریزنمونه طبق پیاز و جنین باندها ۱۰۹۲ جفت بازی مشاهده شد. به طوری که وجود باندها ۱۰۹۲ جفت بازی مربوط به ژن *gus* نشان دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *gus* را دارا هستند. همچنین جهت اثبات عدم حضور آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته احتمالی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* انجام شد. باندها ۸۵۰ جفت بازی در نمونه آگروباکتریوم مشاهده شد و عدم ظهور این باندها در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود آگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آن‌ها است (شکل ۸).



شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *gus*، چاهک ۱- پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۲- نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۳- گیاه تراریخته (ریزنمونه طبق پیاز)، چاهک ۴- گیاه تراریخته (ریزنمونه جنین)، چاهک ۵- گیاه شاهد (ریزنمونه طبق پیاز) چاهک ۶- نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb plus)، چاهک ۷- گیاه شاهد (ریزنمونه جنین).

Figure 7- PCR analysis of transgenic plants with *gus* specific primers, 1. Positive PCR control, 2. Negative PCR control without DNA (H₂O), 3. Transgenic plant (bulb), 4. Transgenic plant (embryo), 5. Untransformed plant (bulb), 6. DNA marker, 7. Untransformed plant (embryo).



شکل ۸- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *virG*، چاهک ۱- گیاه تراریخته (ریزنمونه پیاز)، چاهک ۲- گیاه تراریخته (ریزنمونه جنین)، چاهک ۳- پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۴- گیاه شاهد، چاهک ۵- نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۶- نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb plus).

Figure 8- PCR analysis of transgenic plants with *virG* specific primers, 1. Transgenic plant (bulb), 2. Transgenic plant (embryo), 3. Positive PCR control, 4. Untransformed plant, 5. Negative PCR control without DNA (H₂O), 6. DNA marker.

کردند (Eady et al. 2005). در این پژوهش درصد تراریزش در ریزنمونه جنین ۱۰ درصد و در ریزنمونه طبق پیاز ۶/۶ درصد محاسبه شد. از نتایج این پژوهش می توان جهت مطالعات کشت بافت و همچنین مهندسی ژنتیک در گیاه موسیر استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری کارکنان بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران جهت تهیه ریزنمونه و همچنین جناب آقای دکتر اردشیر قادری مدیر گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و به-خصوص جناب آقای مهندس امیررضا زارع کاریزی کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و از همکاران محترمی که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می شود.

نفتالن استیک اسید به عنوان یکی از تنظیم کننده های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم سلولی دارد، بنابراین حضور آن برای باززایی لازم است. در نتیجه تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره ای پلیمرز نمونه های تراریخته احتمالی با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، نیز مثبت بودند که همگی در محیط حاوی آنتی بیوتیک رشد کرده بودند. گیاهان حاصل جهت ارزیابی حضور آگروباکتریوم توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* نیز مورد سنجش قرار گرفتند و عدم آلودگی در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود آگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آنها است. موسیر از گونه های سرسخت جهت تراریزش به وسیله آگروباکتریوم محسوب می شود (Purwito and Zheng, 2009). پژوهشگران در سال ۲۰۰۱ درصد تراریزش برای انتقال ژن به پیاز و موسیر را ۱/۹۵ درصد اعلام کردند (Zheng et al. 2001). در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۵، پژوهشگران کارایی تراریزش در سیر و تره فرنگی را ۰/۰۶ درصد گزارش

منابع

Arsalandeh F, Hoseini Zivejad M, Hoseini J, Mahmoodi M. 2012. The effects of extracts shallots (*Allium hirtifolium* Boiss.) on the gene expression of the enzyme glycogen phosphorylase and phosphoenol pyruvate carboxykinase in the rat liver diabetic for PCR-RT. 1st Student's National Conference of Biotechnology, Gorgan. (In Farsi with English abstract).

Bertani G, 1951. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62:293-300.

Dellaporta S, Hicks J W, Hicks JB, 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Eady C, Davis S, Catanach A, Kenel F, Hunger S, 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). Plant Cell Rep. 24: 209-215.

Farsi M, Zolala J, 2000. Introduction to plant biotechnology. Publishing Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi).

Ghahremani Majd H, Dashti F, Piri Kh, Yari MB, 2010. *In vitro* bulblet formation of Mooseer (*Allium hirtifolium*). Plant Production Technology 9(2): 65-73. (In Farsi with English abstract).

Irna. 2013. Islamic Republic News Agency Available at <http://www3.as.irna.ir/fa/News/80772912/>. IRNA, Tehran, Iran.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and

Kashfi Bonab A, 2011. The relative economic advantage the cultivation and trade of medicinal plants in Iran and its value in world markets. Commercial Surveys 44 (8): 78-67. (In Farsi with English abstract).

Kheirkhah M, Dadkhah A, 2013. Study of *Allium altissimum* Regel. phenology and consider how to domesticating it. Horticulture

- Researches in Pajouhesh and Sazandegi, 82: 19-24. (In Farsi with English abstract).
- Murashige T, Skoog F**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473- 497.
- Pirik RLM**, 2007. *In vitro* culture of Higher plants. Translate Bagheri, A., Saffari, M., Publishing Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi with English abstract).
- Purwito A, Zheng SJ**, 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation in Shallot (*Allium cepa* L.), IPBRepository 159-171.
- Rezaee Khozani N, Doodi M, Ghanbari F, Nasiri Z**, 2013. Reviews of anti-microbial extracts shallots against *Staphylococcus aureus* resistant to Meticillin, *Journal of Veterinary Laboratory Research* 4(1): 91-92. (In Farsi with English abstract).
- Sambrook J, Russel D**, 2001. *Molecular Cloning*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Tohidfar M, Mohsenpour M**, 2011. Effective factors in Cotton (*Gossipium spp*) Transformation Using *Agrobacterium*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2(1): 1-24. (In Farsi with English abstract).
- versatile gene marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Zheng SJ, Khrustaleva L, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, Kik C**, 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* 7(2): 101-115.

Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*

Abolfazl Hajiheidar¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Seied Mehdi Miri¹

1.M.Sc, Assistant Professor, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* Corresponding Author, Email M_Tohidfar@sbu.ac.ir

ABSTRACT

Shallot (*Allium stipitatum*) is an edible vegetable that has important pharmacological properties. Therefore, optimization of an efficient *in vitro* regeneration and transformation system for shallot breeding through genetic engineering would be useful. Embryo, root and bulb explants of shallot were cultured *in vitro* on MS basal medium supplemented with different concentrations of growth regulators (NAA, 2,4-D and BA) for callus induction and plantlet regeneration. Explants were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 and pBI121 plasmid carrying the *gus* reporter gene. The results indicated that bulb had a higher efficiency of callus induction and plantlet regeneration (100%) compared to embryo and root explants. The highest percentage of regeneration (100 %) was observed on MS medium supplemented with 5 mg.l⁻¹ BA and 1 mg.l⁻¹ NAA for bulb explants. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of *gus*-positive transformants confirmed genetic transformation of the cultures. Furthermore, the lack of *Agrobacterium*-related infection was confirmed using *virG*-specific markers. In this study, the efficiency of transformation was 10 and 6.6% in embryo and bulb, respectively.

Key Words

Agrobacterium, GUS gene, Gene transformation, Shallot, Tissue culture