مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۰۱-۹۱

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 حاجی‌حیدر[۱]، مسعود توحیدفر[۲*]، سید مهدی میری[۱]
Abolfazl Hajiheidar[1], Masoud Tohidfar[2*], Seied Mehdi Miri[1]

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 بهینه‌سازی یک سیستم باززایی و تراریزش کارآمد در این گیاه جهت بهبود و اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک ضروری است. دراین مطالعه، ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه‌ای موسیر درمحیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد NAA، 2,4-D و BA به‌منظور القاء کالوس و باززایی کشت شدند. ریزنمونه‌ها با سویه 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 کالوس‌زایی و باززایی بالاتری داشت و بیشترین باززایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه طبق پیاز و در محیط کشت MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیترBA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA، صورت گرفت. به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و وجود این ژن را در هر دو ریزنمونه جنین وطبق پیاز، که به آزمون هیستوشیمیایی *gus* پاسخ مثبت داده بودند، اثبات کرد. همچنین عدم آلودگی ناشی از آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته بااستفاده ازآغازگرهای اختصاصی ژن *virG* به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تأیید شد. در این تحقیق کارایی تراریزش در ریزنمونه جنین ۱۰ درصد و در ریزنمونه طبق پیاز۶/۶ درصد محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
ژن *gus*
کشت بافت
موسیر

مقدمه

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 آلیسین-آلیساتین یک و دو،آلیل 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 پیروات 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 امریکا، هندوستان و کشورهای حوزه خلیج فارس صادر می‌شود (Kashfi Bonab, 2010).

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 DNAی 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 اگروباکتریوم 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 داروهی 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،

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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

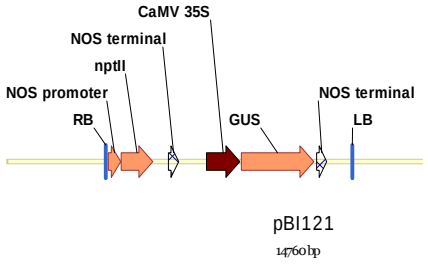
بذرهای موسیر (*A.stipitatum*) و گیاهچه درون شیشه‌ای موسیر عاری از ویروس جهت تهیه ریزنمونه طبق پیاز، از بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و ادامه مراحل آزمایش در گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج انجام شد.

سترون سازی بذرها و آماده سازی ریزنمونه

بذرها 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 سانتی‌متری ریشه تهیه شد.

تراریزش باکتریایی

در این پژوهش از سویه 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 پلیمراز انجام گرفت.



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 (LBAgar) 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 سانتی‌گراد)، آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) که توسط فیلتر استریل شده بودند به آن‌ها اضافه شد و در پتری‌دیش (برای محیط کشت جامد) و یا فالکون 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 میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع جدید حاوی آنتی‌بیوتیک‌های 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}=۰/۶ غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن بر روی

کاغذ صافی استریل به صورت افقی به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MS (Murashige and Skooge, 1962) حاوی سی گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار و pH معادل ۵/۸–۵/۷ 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 تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۱) انتقال یافته و در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. واکشت 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 اندازه گیری شد.

برای باززایی نیز از محیط کشت‌های باززایی انتخابی MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۲) استفاده شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت باززایی در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار 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 DNAی 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 پلیمراز 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 سانتی-گراد به مدت پنج دقیقه) انجام شد. گیاهان تراریخته‌ای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، قطعه مورد انتظار را تکثیر کردند، جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم *virG* بررسی شدند (جدول ۳).

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به منظور القای کالوس ریزنمونه‌ها

Table 1- Hormonal treatments for inducing callus in explants

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

جدول ۲- محیط‌های کشت باززایی پیازچه

Table 2- Regeneration culture media of bulblet

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

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 4- Primers and PCR products

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

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

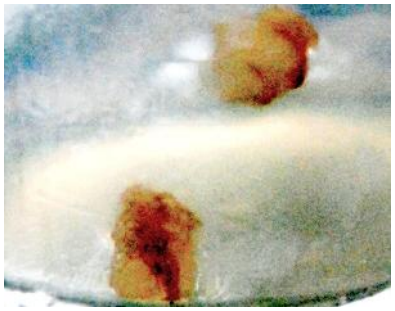
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

نتایج و بحث

بررسی میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها

در این مطالعه، ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه‌ای موسیر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد NAA، BA و 2,4-D به‌منظور القاء کالوس کشت شدند و درصد کال‌زایی، وزن تر و خشک کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. یک ماه پس از کشت، در تمام تیمارهای هورمونی تشکیل کالوس بر روی ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز مشاهده شد اما در ریزنمونه ریشه هیچگونه کالوسی مشاهده نشد. در ریزنمونه جنین کالوس تشکیل شده در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی‌گرم در لیتر BA تفاوت معنی‌داری با تیمار حاوی 2,4-D و BA نداشت. در ریزنمونه طبق پیاز نیز کالوس‌ها متراکم و فشرده، گرانوله، آبنباتی شکل، چسبنده یا پفکی بودند (شکل ۲).

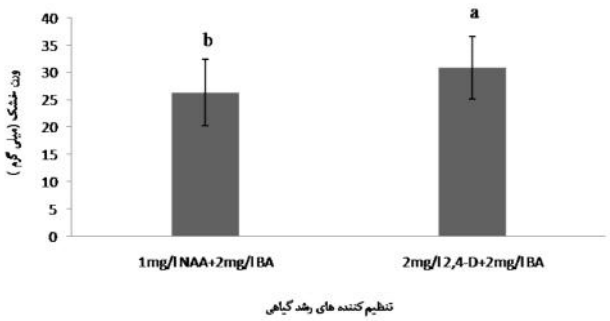


شکل ۲- کال‌زایی یک ماه پس از کشت

Figure 2- Callus induction one month after the culture

بررسی درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه جنین نشان داد که وزن تر کالوس در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی‌دار نداشت ولی در وزن خشک کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. همچنین در ریزنمونه طبق پیاز نیز وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی‌داری نداشتند. تشکیل کالوس در گیاه موسیر به نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه به طور کامل وابسته بود. در بین سه ریزنمونه به‌کار برده شده، جنین و طبق پیاز نسبت به ریشه تاثیر بیشتری را بر تشکیل کالوس ایجاد نمود. به‌طوریکه بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) با این دو ریزنمونه (در همه ترکیبات هورمونی) به‌دست آمد.

نتایج نشان داد در غلظت‌های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی‌داری بر وزن تر کالوس در ریزنمونه جنین مشاهده نشد. به‌طوریکه وزن تر کالوس در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی‌گرم لیتر BA و در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA به همراه دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین نمودار نشان داد (شکل ۳) که در غلظت‌های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک کالوس داشت. به‌طوریکه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و BA بیشترین وزن خشک کالوس و در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی‌گرم در لیتر BA کمترین وزن خشک کالوس مشاهده شد. این مسئله بیانگر این است که افزایش غلظت اکسین‌ها در وزن خشک کالوس اثر مستقیم دارد و باعث افزایش وزن خشک کالوس می‌شود.



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

نتایج نشان داد در غلظت‌های مختلف BA و NAA تاثیر معنی-داری 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.

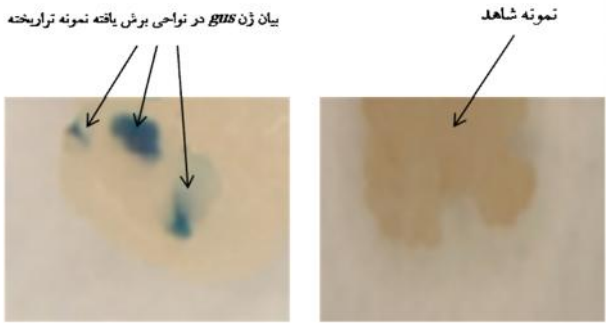
کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز که در ترکیبات متفاوت هورمونی در بخش کال‌زایی به‌دست آمده بودند به منظور بررسی میزان تشکیل نوساقه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BA، NAA و2,4-D طبق (جدول ۲) کشت شدند و نتایج آن بعد از ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان 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

تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی *gus* در گیاهان تراریخته احتمالی

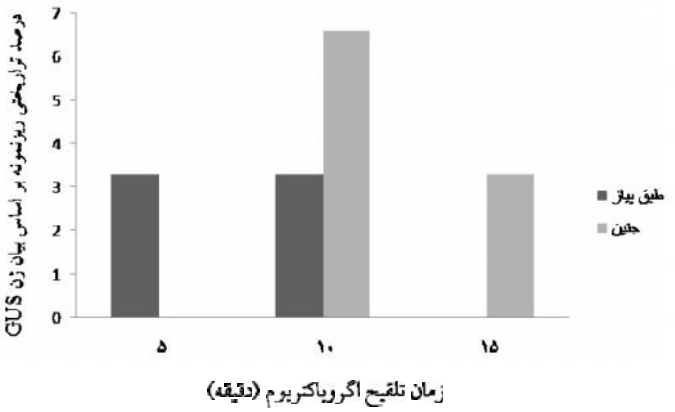
در این مطالعه از ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه به‌منظور انتقال ژن *gus* به گیاه موسیر بومی ایران استفاده شد. سنجش آزمون هیستوشیمیایی *gus* وجود نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نمونه را نشان داد که بیانگربیان ژن *gus* است (شکل ۵).



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 اگروباکتریوم 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 اگروباکتریوم 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 اگروباکتریوم 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 اگروباکتریوم 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



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

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

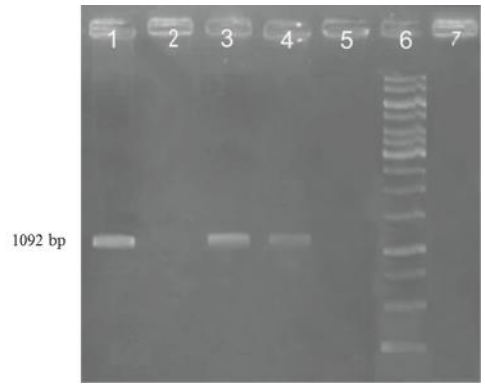
بسیار کمی بر درصد تراریختگی داشت و می‌توان نتیجه گیری نمود که زمان ۱۰ دقیقه مناسب‌ترین زمان برای تلقیح به روش غوطه‌وری است.

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

به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب این ژن انجام شد. مشاهده باند 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 باند ۱۰۹۲ جفت بازی مشاهده شد. به‌طوری که وجود باند 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 اگروباکتریوم در گیاهان تراریخته احتمالی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* انجام شد. باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه اگروباکتریوم مشاهده شد و عدم ظهور این باند در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود اگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آن‌ها است (شکل ۸).

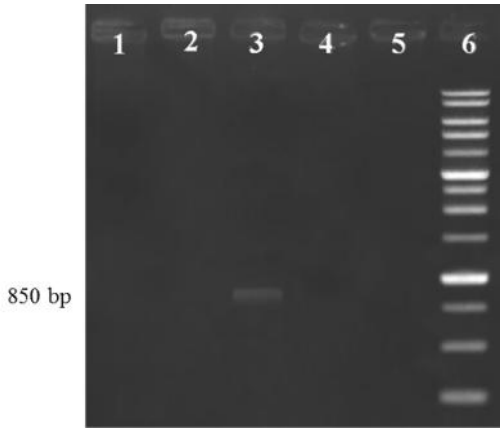
نتایج و بحث

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 به‌دست 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 اگروباکتریوم با وجود محدودیت-هایی 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 ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 (H_2O), 3. Transgenic plant (bulb), 4. Transgenic plant (embryo), 5. Untransformed plant (bulb), 6. DNA marker, 7. Untransformed plant (embryo).



شکل ۸- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 (H_2O),
6. DNA marker.

نفتالن استیک اسید به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم سلولی دارد، بنابراین حضور آن برای باززایی لازم است. در نتیجه تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نمونه‌های تراریخته احتمالی با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، نیز مثبت بودند که همگی در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کرده بودند. گیاهان حاصل جهت ارزیابی حضور اگروباکتریوم توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* نیز مورد سنجش قرار گرفتند و عدم آلودگی در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود اگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آن‌ها است. موسیر از گونه‌های سرسخت جهت تراریزش به وسیله اگروباکتریوم محسوب می‌شود (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 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 می‌توان 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 به‌خصوص جناب آقای مهندس امیررضا زارع‌کاریزی 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 می‌شود.

منابع

Arsalandeh F, Hoseini Zijevad 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 carboxykinasein 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 lysogeneis. 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 minipreparation: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 Frasi).

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: ß-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.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

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

Abolfazl Hajiheidar[1], Masoud Tohidfar[2]*, Seied Mehdi Miri[1]

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

A B S T R A C T

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 *vir*G-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