مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢٧٩-٢٦٩

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر انتقال ژن بتا–گلوکورونیداز (GUS) به‌واسطه اگروباکتریوم در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi*)

Optimization of effective factors on *β-glucuronidase* (*GUS*) gene transformation by *Agrobacterium* to *Trachyspermum ammi*

معصومه نعمانی [۱]، سید احمد سادات نوری*[۱]، مسعود توحیدفر[۲] و حسین رامشینی[۱]

Masoumeh Nomani [1], Seyed Ahmad Sadat Noori [1*], Masoud Tohidfar [2] and Hossein Ramshini [1]

۱- دانشجوی دکترا، استاد و دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

1- Ph.D student, Professor and Associate Professor of Department of Agronomy and Plant breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Associate Professor of Department of Biotechnology – College of Life Science and Biotechnology - Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: noori@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۵)

چکیده

زنیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی ایران است. این گیاه حاوی خاصیت‌های دارویی بسیار مهمی از جمله ضد اختلالات گوارشی، ضد اسپاسم و تسکین دردهای روماتیسمی است. به‌منظور فرابیان بعضی از مواد مؤثره در این گیاه لازم است فرآیند انتقال ژن در آن بهینه شود. بدین‌منظور ریزنمونه هیپوکوتیل، دو سویه *Agrobacterium tomefaciens* به همراه فاکتورهای اندازه‌گیری شامل مدت زمان تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ دقیقه) و طول دوره هم‌کشتی (۱، ۲ و ۳ روز) بررسی شدند. در این تحقیق از وکتور pBI121 حاوی ژن *GUS* به‌عنوان گزارشگر و ژن *nptII* به‌عنوان نشانگر گیاهی استفاده شد. به منظور تأیید انتقال ژن از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، آزمون هیستوشیمیایی *GUS* و RT-PCR استفاده شد. بر طبق نتایج حاصل، زمان تلقیح ۵ دقیقه و طول هم‌کشتی یک روز منجر به افزایش کارآیی انتقال ژن شد. ضمن اینکه سویه LBA4404 کارآیی بالاتری نسبت به GV3101 برای انتقال ژن از خود نشان داد. برای نخستین بار، مطالعه حاضر روش مؤثر و کارآیی را برای انتقال ژن به گیاه دارویی زنیان ارائه می‌دهد که می‌تواند به‌عنوان یک روش کارآ در انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
هیپوکوتیل،
ژن گزارشگر،
زنیان،
هم کشتی،

مقدمه

زنیان (*Trachyspermum ammi*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی ایران بوده که دارای خاصیت‌های دارویی فراوانی است. زنیان گیاهی یک‌ساله متعلق به خانواده چتریان بوده که در قسمت‌های مختلفی از ایران، هند، پاکستان و مصر رشد می‌کند (Hedge and Lamond, 1987). مهم‌ترین مناطق رشد این گیاه در ایران خوزستان، اصفهان، فارس، کرمان، خراسان و سیستان و بلوچستان است. قسمت عمده مورد استفاده گیاه بذر آن بوده که حاوی ماده مهم و ارزشمندی به نام تیمول است (Ballba *et al*.1973). تیمول یک ترکیب فنولی مهمی بوده که در درمان بسیاری از بیماری‌ها همچون اختلالات گوارشی، فقدان اشتها، مشکلات تنفسی، آسم و به‌عنوان ضدعفونی کننده برای تمیز کردن زخم به‌کار می‌رود (Dwivedi *et al*.2012). این ماده دارای خاصیت ضد باکتری (Singh and Singh, 2000) و ضد میکروبی (Sivropoulou *et al*.1996) بالایی است. زنیان به طور سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها در انسان و حیوان به‌کار می‌رود. این گیاه دارای خواص ضداسپاسم و ضدنفخ بوده و در درمان سوءهاضمه بسیار مفید است (Bentely and Trimen,1999).

اصلاح سنتی دارای محدودیت‌های فراوانی از جمله کمبود ژرم‌پلاسم، عدم تلاقی بین‌گونه‌ای، زمانبر و هزینه‌بر بودن است که موجب شده روش‌های جدیدی همچون بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک ابداع شود (Chauhan and Kanwar,2012). مهندسی ژنتیک دارای نقش ارزشمندی در شناسایی و دستکاری‌های ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز تولید فرآورده‌های مهم در گیاهان دارویی است. روش‌هایی همچون افزایش بیان ژنهای این مسیر، خاموشی ژنها منجر به تولید مطلوب متابولیت‌های ثانویه در واحد سطح در این گیاهان می‌شود. روش‌های ملکولی در بهبود صفات مهم گیاهان دارای اهمیت بالایی هستند. ژن‌های مطلوب می‌توانند با به‌کارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک وارد گیاهان شوند (Welden and Schell, 1990). در مورد گیاهان دولپه‌ای انتقال ژن با اگروباکتریوم به ژنوم هسته‌ای سلول‌های گیاهی نسبت به سایر روش‌ها، بسیار کارا و موثر است (Binns,1999; Gallie,1998).

انتخاب سویه مناسب اگروباکتریوم به طور فزاینده‌ای کارآیی انتقال ژن و بیان پروتئین خارجی را افزایش داده، بنابراین فاکتور بسیار مهمی در طی فرآیند انتقال ژن است (Yadav *et al*. 2014). ژن‌های گزارشگردر بهینه‌سازی انتقال ژن تعدادی از گیاهان، برای تعیین عوامل موثر بر حداکثر تراریزش در گیاهان، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به طور عادی ژن *GUS* در بافت‌های گیاهی گیاهان عالی حضور ندارد. حساسیت این مارکر، آن را برای تایید انتقال ژن فاکتور بسیار مفیدی می‌سازد (Jefferson *et al*.1987). انتقال ژن *GUS* با واسطه اگروباکتریوم در تعدادی از گیاهان دارویی انجام شده است (Nisha *et al*.2003; Lievre *et al*.2005; Puc *et al*.2012). ولی تاکنون در مورد گیاه دارویی زنیان، تحقیقی انجام نشده است. یکی از مهمترین اهداف اصلاح گیاه دارویی زنیان، افزایش میزان تیمول با استفاده از روش‌های نوین ملکولی است. لذا بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر انتقال ژن در این گیاه حائز اهمیت فراوانی است. دستورالعمل حاضر برای نخستین بار بهینه‌سازی انتقال ژن *GUS* را در گیاه دارویی زنیان با کارآیی بالا ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی،ضدعفونی بذر

بذر گیاه زنیان اکوتیپ قم از موسسه تحقیقاتی جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شد. به‌منظور ضدعفونی بذر، ابتدا بذرها در زیر هود لامینار در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس بلافاصله در هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵درصد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس با آب مقطر استریل سه بار و هر

دفعه به مدت ۳ دقیقه شسته شدند. در ادامه بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شده تا خشک شوند و پس از انتقال به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog,1962) در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۴ درجه در اتاق رشد نگهداری شدند.

سویه اگروباکتریوم و پلاسمید

در این مطالعه از دو سویه LBA4404 و GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حاوی پلاسمید دوگانه pBI121 که دارای ژن *GUS* با پیشبر CaMV35S و خاتمه دهنده NOS و همچنین از ژن نئومایسین فسفوترانسفراز (*nptII*) به‌عنوان نشانگر انتخابی گیاهی و مقاومت به کانامایسین با پیشبر و خاتمه دهنده NOS استفاده شد (شکل ۱).

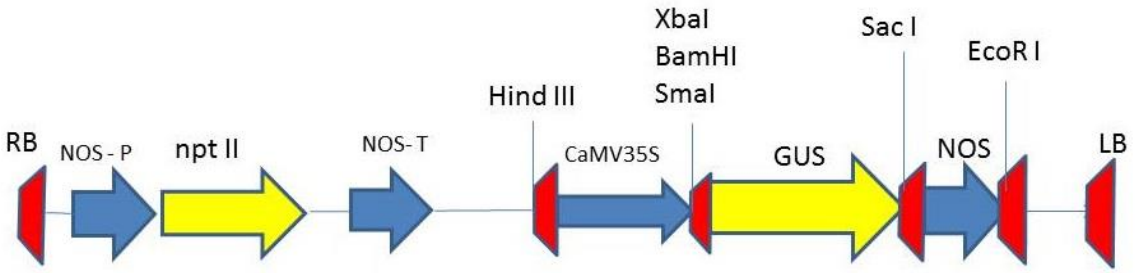
بهینه‌سازی غلظت کانامایسین

به‌منظور تعیین غلظت مناسب کانامایسین برای گیاه، از غلظت‌های مختلف کانامایسین (۱۰۰mg/l، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۵، ۱۰، ۰) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در محیط انتخابی استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌ها قبل مصرف فیلتر استریل (فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون) شده و در غلظت‌های ذکر شده به محیط انتخابی اضافه شدند.

تهیه ریزنمونه‌ها، تراریختی و باززایی گیاه

در ابتدا سویه‌های اگروباکتریوم در محیط کشت LB (Quelab) مایع همراه با کانامایسین (50 mg/l) و ریفامپیسین (75 mg/l) در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه و با دور rpm ۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از طی این زمان ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت شده را به ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع جدید همراه با کانامایسین و ریفامپیسین در فالکون اضافه کرده و به مدت ۷ ساعت در انکوباتور تا رسیدن به OD=0.6 قرار داده شد و سپس برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد.

از گیاهان بیست روزه در شرایط استریل و زیر هود لامینار، هیپوکوتیل‌ها جدا شده وسپس در زمان‌های مختلف در محیط تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) برای تعیین زمان مناسب قرار داده شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشتی به مدت یک، دو و سه روز منتقل شدند.



شکل ۱- ساختار ناحیه T-DNA پلاسمید pBI121 . NOS-P : پیشبر ژن نوپالین‌سینتاز، *nptII* : ناحیه کد کننده ژن نئومایسین فسفوترانسفراز ، NOS-T : خاتمه‌دهنده رونویسی ژن نوپالین‌سینتاز، CAMV35S: پیشبر 35s ویروس موزاییک گل کلم ، *GUS* : ناحیه کد کننده ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز

Figure 1- Structure of T-DNA region of plasmid pBI121. NOS-P: Nopaline synthase gene promoter, *nptII*: coding region of Neomycin phosphotransferase gene, NOS-T: Nopaline synthase terminator, CAMV35S: 35s promoter of Cauliflower mosaic virus, *GUS*: coding region of the β-glucoronidase reporter gene.

محیط هم‌کشتی شامل محیط MS (Duchefa) همراه با 2,4-D (2 mg/l) (SIGMA) و کاینتین(0.5 mg/l) (SIGMA) و همچنین آگار (7gr/l) و ساکارز (30gr/l) بود. بعد طی این زمان ریزنمونه‌ها به محیط القای کالوس‌دهی (محیط انتخابی) البته همراه با250 mg/l سفوتاکسیم (Duchefa) و 25 mg/l کانامایسین منتقل و در اتاق کشت قرار داده شدند. بعد از یک ماه و ظهور کالوس‌ها، مقادیر هورمون‌ها به منظور تولید کالوس‌های جنین‌زا کاهش یافت و در نهایت به منظور باززایی گیاه فقط از هورمون کاینتین به میزان 0.2 mg/l به همراه مقادیر ثابت سفوتاکسیم و کانامایسین استفاده شد.

آزمون PCR

استخراج DNA ژنومی گیاهان با استفاده از کیت کیاژن (DNAse plant Mini Kit) انجام شد. به‌منظور تایید حضور ژن *GUS* از آغازگرهای اختصاصی این ژن استفاده شد. توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده عبارت بودند از:

آغازگر پیشرو '3 -ACCTCGCATTACCCTTACGCTGAA- 5'

و آغازگر معکوس '3 -AATCGCCGCTTTGGACATACC- 5' –

برای تضمین تراریخته بودن گیاه از آغازگرهای اختصایی ژن *nptII* هم استفاده شد. توالی آغازگرهای اختصاصی این ژن هم عبارت بودند از:

آغازگر پیشرو '3 -GTCATCTCACCTTGCTCCTGC- 5'–

و آغازگر معکوس '3 -AAGAAGGCGATAGAAGGCG- 5'–

همچنین برای اطمینان از آلوده نبودن گیاهان تراریخته احتمالی به اگروباکتریوم، PCR با استفاده از آغازگرهای *VirG* صورت گرفت. توالی این آغازگرها هم عبارت بودند از :

آغازگر پیشرو '3 -ATGATTGTACATCCTTCACG- 5'

و آغازگر معکوس '3 -TGCTGTTTTTATCAGTTGAG- 5'

واکنش چرخه‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه چرخه حرارتی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط بهینه شده با استفاده از آغازگر *GUS* طبق برنامه حرارتی زیر بود. مرحله اول شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه و دمای ۹٤ درجه به مدت ۱ دقیقه، ٦۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ٤۵ ثانیه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. برای آغازگرهای *nptII* برنامه چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه و دمای ۹٤ درجه به مدت ۱ دقیقه، ٦۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ٤۵ ثانیه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. برای آغازگرهای *vir G* شرایط برنامه PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه و دمای ۹٤ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. محصول پی‌سی‌آر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد.

آزمون رنگ‌آمیزی *GUS*

فعالیت هیستوشیمیایی *GUS* با استفاده از روش جفرسون و همکاران (۱۹۸۷) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کوچک برگی از گیاهان تراریخته احتمالی و گیاه نرمال جدا شده و در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. سپس به آنها محلول X- gluc (5-bromo -4-chloro-3-indolyl- β-glucuronidase) اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷درجه قرار گرفتند. سپس محلول از تیوپ حذف شده و گیاهان در اتانول ۷۰ درصد به مدت ٤ ساعت گذاشته شدند. در نهایت نمونه‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

RT-PCR

برای تایید نهایی تولید گیاهان تراریخته و بیان پایدار ژن، RNA گیاهان احتمالی تراریخته از برگ‌های جوان توسط ترایزول (Invitrogen) استخراج شدند و بعد از تیمار با DNase با استفاده از کیت سنتز CDNA (Eurex)، تک رشته CDNA با استفاده از پرایمر(Oligo (dt و طبق دستورالعمل شرکت Eurex ساخته شد. برای ساخت رشته دوم و تکثیر CDNA از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (شرایط ذکر شده) استفاده شد. سپس CDNA سنتز شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد در ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت قرار داده شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌برماید، در دستگاه ژل داک در زیر نور UV مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مطالعه از ۱۵ ریزنمونه و از یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با دو عامل شامل زمان تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) و زمان هم کشتی یک، دو و سه روز و با چهار تکرار استفاده شد. نتایج مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.3) تعیین شد و برای رسم نمودارها هم از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

فاکتورهای مؤثر بر انتقال ژن

نتایج بررسی ریزنمونه‌های گیاه زنیان در محیط کشت همراه با کانامایسین نشان داد که کانامایسین به‌شدت از باززایی گیاه زنیان جلوگیری کرده و در غلظت‌های بالاتر از 25mg/l باززایی مشاهده نشد. بیشترین تعداد گیاهان باززایی شده در نمونه‌های شاهد (بدون کانامایسین) وجود داشت. همچنین در غلظت‌های بالاتر از 25mg/l تفاوت معنی‌داری در نمونه‌ها مشاهده نشد. بنابراین این غلظت به‌عنوان غلظت بهینه در باززایی گیاه مورد استفاده واقع شد (شکل 2A). در بررسی زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم، نتایج حاصل در هر دو سویه اگروباکتریوم نشان داد که سویه LBA4404 با مدت زمان تلقیح ۵ دقیقه، بیشترین میزان باززایی و سویه GV3101 با مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه کمترین میزان باززایی را نشان دادند. به‌طور کلی با افزایش زمان تلقیح امکان از بین رفتن ریزنمونه‌ها بیشتر شد (شکل 2B).

نتیجه‌های مربوط به هم‌کشتی و سویه باکتری نشان داد که در هر دو سویه اگروباکتریوم بیشترین درصد باززایی در طی ٢٤ ساعت هم‌کشتی دیده شد و با گذشت زمان میزان باززایی کاهش یافت، به‌طوریکه پس از طی سه روز هم‌کشتی، باززایی به حداقل رسید. همچنین بیشترین میزان باززایی در سویه LBA4404 با هم‌کشتی ۱ روز و کمترین میزان باززایی در سویه LBA4404 با هم‌کشتی ۳ روز مشاهده شد (شکل 2C).

برطبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین، میزان باززایی سویه LBA4404 به طور معنی داری نسبت به سویه GV3101 بیشتر بود که نشان دهنده توانایی بالای این سویه در انتقال ژن به گیاه زنیان می باشد (شکل 2D).

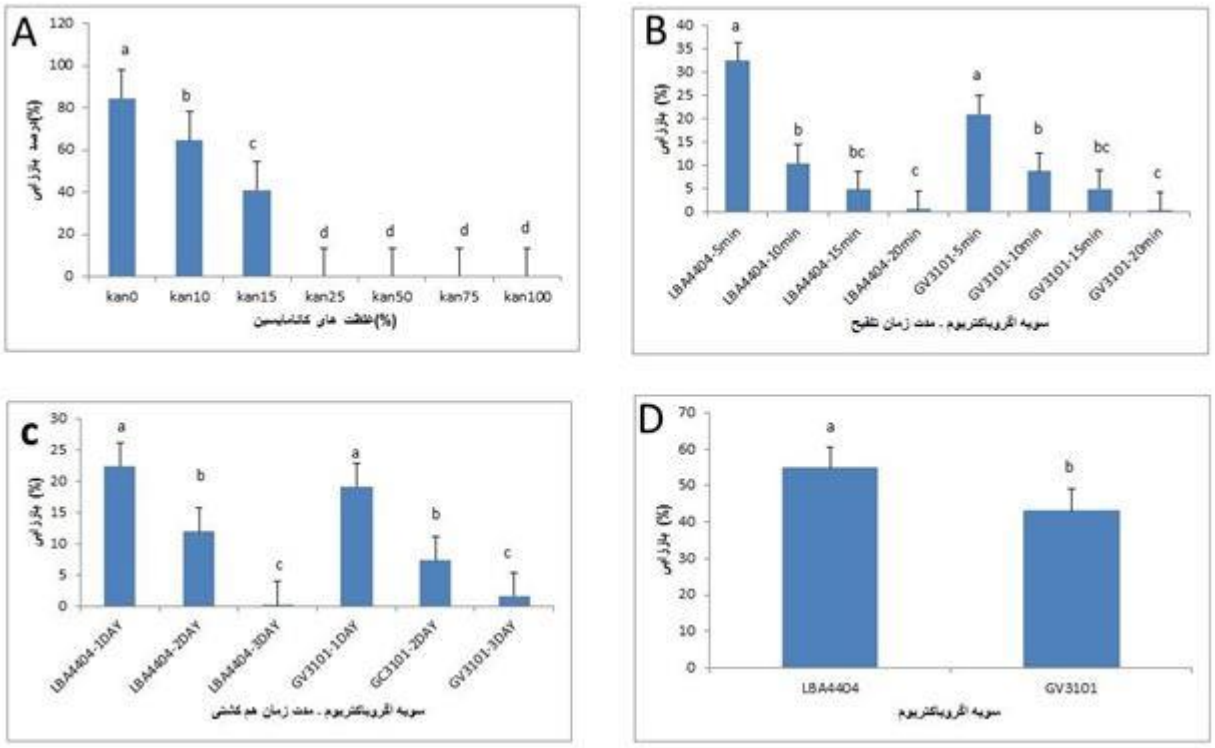
آزمون هیستوشیمیایی *GUS*

آزمون *GUS* جهت تأیید گیاه احتمالی تراریخته از غیر تراریخته انجام شد. گیاه غیر تراریخته به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (شکل ۳). رنگ آبی در برگ گیاه تراریخته نشان‌دهنده فعالیت ژن *GUS* بود که شناسایی شد و هیچ رنگی در گیاه غیرتراریخت دیده نشد.

آزمایش‌های ملکولی گیاهان تراریخته

پس از استخراج DNA از برگ‌های جوان گیاهان تراریخته احتمالی، به منظور تأیید حضور ژن، از آغازگرهای اختصاصی ژن بتا-گلوکورونیداز و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. حضور ژن *GUS* در گیاهان با حضور قطعه ٤٥٠ جفت بازی روی ژل آگارز ۲ درصد تایید شد. این باند در گیاه غیر تراریخته و نمونه شاهد (آب) تکثیر نشد (شکل3A). از تعداد ۸۵ گیاه باززاشده، ۵۲ گیاه باند مربوط به ژن *GUS* را نشان دادند که از این میان ٦٦درصد و ۵۵ درصد به ترتیب مربوط به سویه‌های LBA4404 و GV3101 بود (جدول ۱).

برای تأیید دوباره گیاهان تراریخته احتمالی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* انجام شد و حضور قطعه ٤٧٠ بازی مربوط به ژن *npt II* بر روی ژل آگارز ۲ درصد تایید شد. این باند در نمونه گیاه غیر تراریخته و نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل 3B). از تعداد۸۵ گیاه باززا شده، ٤٣ گیاه باند مربوط به ژن *npt II* را نشان دادند که از این میان ۵۷درصد و ٤٢ درصد به ترتیب مربوط به سویه‌های LBA4404 و GV3101 بود (جدول ۱). در ادامه، از کل گیاهان باززا شده، ۳۹ گیاه باندهای هر دو ژن *gus* و *nptII* را نشان دادند و از این میان ۵۵درصد و ۳۵ درصد به ترتیب مربوط به سویه‌های LBA4404 و GV3101 بودند (جدول ۱).



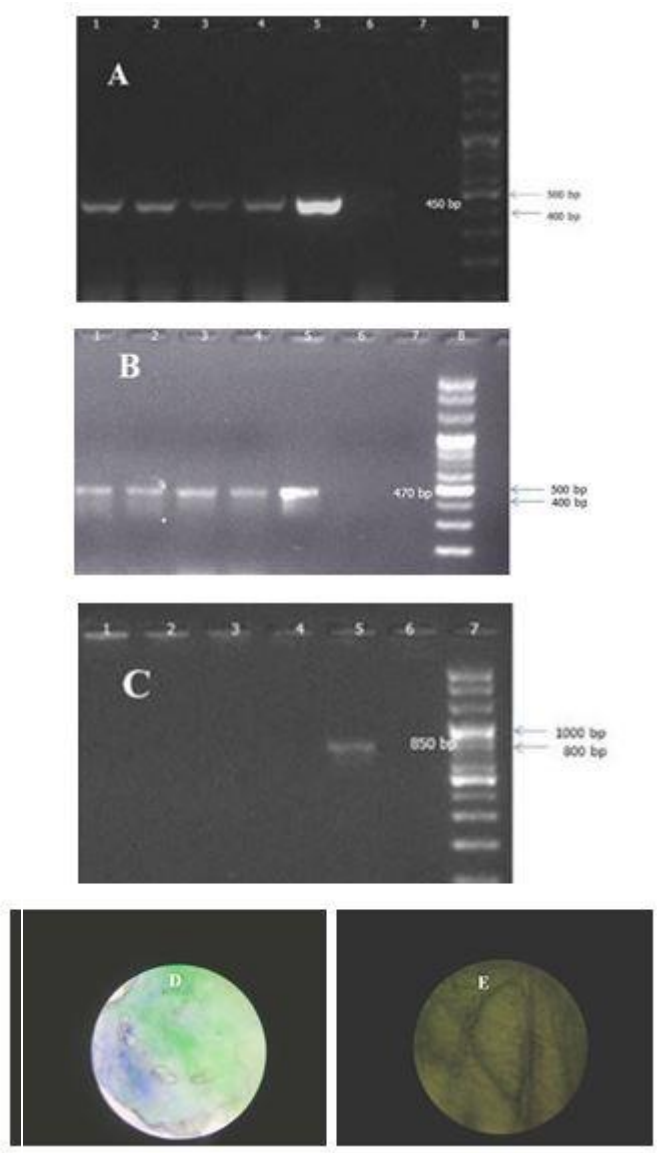
شکل۲– A: باززایی گیاه زنیان در غلظت‌های مختلف کانامایسین. B: باززایی گیاه تراریخته احتمالی بر اساس سویه‌های اگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ دقیقه). C: باززایی گیاه تراریخته احتمالی بر اساس سویه‌های اگروباکتریوم و مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲ و ۳ روز) D: مقایسه میانگین مربوط به سویه‌های اگروباکتریوم در باززایی گیاه تراریخته احتمالی در شرایط مدت زمان تلقیح ۵ دقیقه و هم‌کشتی یک روز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن هستند ($P \leq 0.05$).

Figure 2- A: Plant regeneration of *Trachyspermum ammi* in various concentration of kanamycin. B: Regeneration of putative transgenic plants based on agrobacterium strains and inoculation times (5, 10, 15, 20 min). C: Regeneration of putative transgenic plants based on agrobacterium strains and co-cultivation times (1, 2, 3 days). D: Comparison of means of agrobacterium strains in regeneration of putative transgenic plants with inoculation 5 min and co-cultivation 1 day. The different letters indicate significant differences among treatment according to Duncan's test ($P \leq 0.05$).

جهت اثبات عدم وجود آلودگی باکتریایی از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. اگروباکتریوم به عنوان کنترل مثبت باند ۸۵۰ جفت بازی را بر روی ژل نشان داد. گیاهان تراریخته باندی نشان ندادند که نشان‌دهنده عدم آلودگی گیاهان و اثبات تراریخته بودن است (شکل 3C). از کل گیاهان باززا شده که برای هر دو ژن، پی‌سی‌آر مثبت بودند در حدود ۳۲ گیاه هیچ‌گونه آلودگی نشان نداده و در نتیجه میزان باززایی گیاه تراریخت در حدود ٤٦درصد و ۲۷درصد به ترتیب برای سویه‌های اگروباکتریوم LB4404 و GV3101 بودند (جدول ۱).

مراحل مختلف باززایی گیاه تراریخته زنیان از تشکیل کالوس تا باززایی در شکل شماره ٤ نشان داده شده است

برای تأیید نهایی بیان پایدار ژن *GUS* در گیاه تراریخته زنیان، RT-PCR با استفاده از آغازگر ژن اختصاصی انجام شد (شکل ۵). بیان ژن *GUS* در چهار نمونه گیاه تراریخته که به طور تصادفی انتخاب شدند، تایید شد. البته در گیاه شاهد باندی دیده نشده و بیان ژن در گیاه غیرتراریخته وجود نداشت.



شکل ۳ – نتایج مربوط به PCR و آزمون هیستوشیمیایی *GUS*. A: نتایج تکثیر ژن *GUS* لاین‌های ۱-٤ : گیاهان تراریخته احتمالی؛ لاین ۵: کنترل مثبت (پلاسمید)؛ لاین ٦ : گیاه غیر تراریخته؛ لاین ۷: کنترل منفی (آب)؛ لاین ۸: نشانگر مولکولی DNA (100 bp). B نتایج تکثیر ژن *nptII* : لاین‌های ۱-٤ : گیاهان تراریخته احتمالی؛ لاین ۵: کنترل مثبت (پلاسمید)؛ لاین ٦ : گیاه غیر تراریخته؛ لاین ۷: کنترل منفی (آب)؛ لاین ۸: نشانگر مولکولی DNA (100 bp). C: نتایج تکثیر ژن *virG* لاین‌های ۱-٤ : گیاهان تراریخته احتمالی؛ لاین ۵: کنترل مثبت (پلاسمید)؛ لاین ٦: کنترل منفی (آب)؛ لاین ۷: نشانگر مولکولی DNA (100 bp). D: آزمون هیستوشیمیایی *GUS*، گیاه تراریخته احتمالی؛ E : گیاه غیر تراریخته (شاهد).

Figure 3- Resukts related to PCR and histochemical *gus* analysis. A: PCR product of *gus* gene , Lines 1-4: Putative transgenic plants, Line 5: Positive control (Plasmid), Line 6: non- transgenic plant, Line 7: Negative control (distilled water) , Line 8: Molecular marker (100 bp). B: PCR product of *nptII* gene, Lines 1-4: Putative transgenic plants, Line 5: Positive control (Plasmid), Line 6: non- transgenic plant, Line 7: Negative control (distilled water) , Line 8: Molecular marker (100 bp). C: PCR product of *Vir G* gene, Lines 1-4: Putative transgenic plants, Line 5: Positive control (Plasmid), Line 6: Negative control (distilled water) , Line 7: Molecular marker (100 bp). **D:** Histochemical *GUS* assay, Putative transgenic plant, E: non- transgenic plant (control).

جدول ۱– نتایج پی‌سی‌آر گیاهان تراریخته احتمالی زنیان

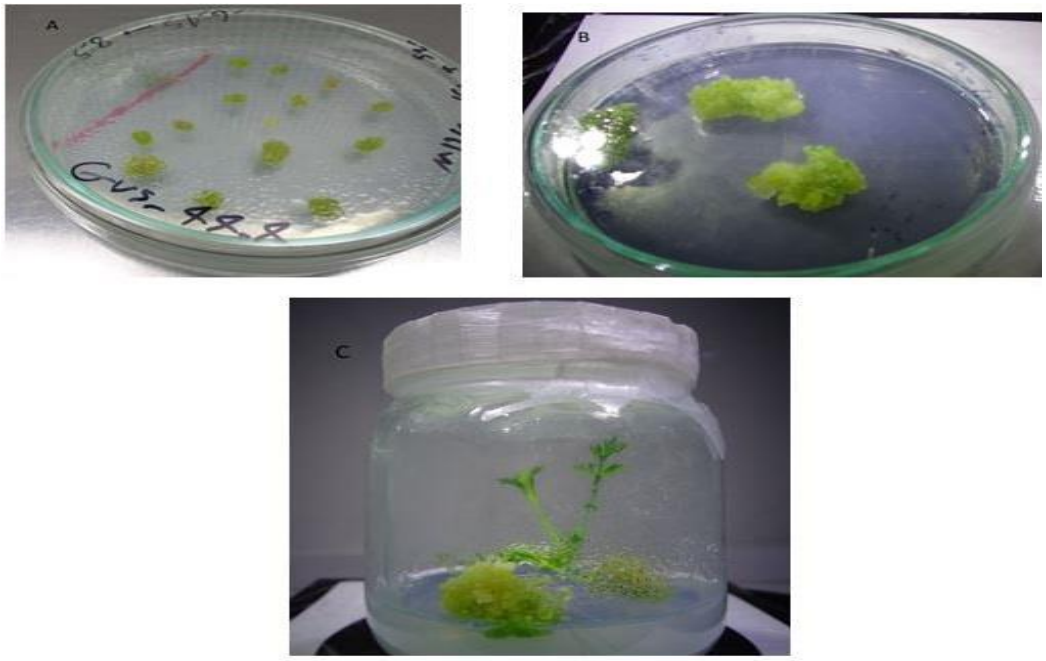
Table 1- Results of the putative transgenic *Trachyspermum ammi* by PCR

سویه اگروباکتریوم	تعداد گیاهان باززایی شده مقاوم به کانامایسن	تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت [a] *GUS*(%)	تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت [b] *nptII* (%)	تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت هر دو ژن GUS & *nptII* (%)	تعداد گیاهان پی سی آر مثبت [c] *Vir G* (%)	تعداد گیاهان تراریخته احتمالی (%)
LBA4404	٤٥	۳۰ (66%)	۲٦ (57%)	۲۵ (55%)	4(8.8%)	۲۱ (46%)
GV3101	٤۰	۲۲ (۵۵%)	۱۷ (42%)	۱٤ (35%)	3(7.5%)	۱۱ (27%)

a: (تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت با ژن *gus*/ تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به کانامایسین) × ۱۰۰

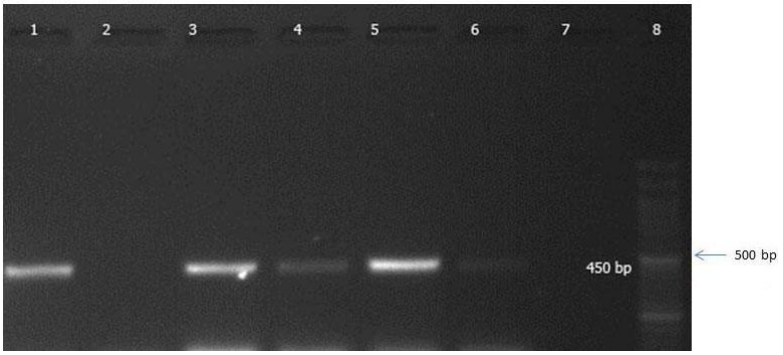
b : (تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت با ژن *nptII*/ تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به کانامایسین) × ۱۰۰

c : (تعداد گیاهان پی‌سی‌آر مثبت با ژن *Vir G*/ تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به کانامایسین) × ۱۰۰



شکل ٤- انتقال ژن و باززایی گیاه دارویی زنیان A : رشد کالوس‌ها در محیط انتخابی همراه با کانامایسین و سفوتاکسیم B : تشکیل کالوس‌های جنین‌زا C : تولید گیاه تراریخته احتمالی

Figure 4- Gene transformation and Regeneration of *Trachyspermum ammi*. A: Growth of calli in selective media containing kanamycin and cefotaxime B: Embryogenic calluses E: putative transgenic plants.



شکل ٥- RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *gus*. لاین های۳ و ٤و ٥ و ٦ گیاه تراریخته ؛ لاین ۱ کنترل مثبت (پلاسمید)، لاین ۲: گیاه غیر تراریخته، لاین ۷: کنترل منفی؛ لاین ۸: نشانگر ملکولی DNA (100bp).

Figure 5- RT-PCR analysis with *gus* specific primer. Lines 3,4,5,6: Putative transgenic plants, Line 1: Positive control (Plasmid), Line 2: non-transgenic plant, Line 7: Negative control (distilled water), Line 8: Molecular marker (100 bp)

بحث

برای انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخته، باززایی مناسب و تنظیم هورمونی در کشت بافت و به تبع آن بهینه‌سازی شرایط مهم در انتقال از الزامات هر برنامه انتقال ژن است. در این مطالعه از اکوتیپ قم استفاده شد که دارای صفت‌های مهم و مناسبی همچون میزان تیمول بالا (Mirza hosseini *et al*.2015) و دارای مقاومت بالایی به خشکی و شوری است. در ابتدا بر طبق آزمایشات اولیه، دستورالعمل مناسبی برای کالوس‌زایی و باززایی گیاه بهینه شد. محیط MS همراه با ترکیب هورمونی 2,4-D و Kin ترکیب مناسبی

برای کالوس‌دهی و تولید کالوس‌های جنین‌زا در گیاه دارویی زنیان بود و به‌منظور باززایی در محیط MS فقط از هورمون کاینتین استفاده گردید. نقش مهم هورمون 2,4-D در کالوس‌زایی و جنین‌زایی در بسیاری از آزمایش‌ها نشان داده شده است (Jasrai *et al.*1992; Dudits *et al.*1991). در تحقیقی نشان داده شد که محیط MS همراه با 2,4-D منجر به تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در گیاه *Foeniculum Vulgare* شد (Anzidei *et al.*2000). همچنین در تحقیقی نشان داده شد که باززایی در حضور کاینتین رخ می‌دهد (Jha *et al.*1981). مقاومت به محیط کشت حاوی کانامایسین و باززایی، اولین مرحله در شناسایی گیاهان تراریخته است. در تحقیق حاضر غلظت مناسب کانامایسین 25 mg/l در نظر گرفته شد. *Agrobacterium tumefaciens* دارای دامنه میزبانی وسیعی در گیاهان دولپه‌ای بوده و سویه اگروباکتریوم فاکتور بسیار مهمی در کارآیی انتقال ژن است. دراین تحقیق از دو سویه اگروباکتریوم (LBA4404 ، GV3101) استفاده و کارآیی انتقال ژن در هر دو سویه بررسی شد. آزمایشات پی‌سی‌آر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حضور قطعی ژن‌ها را در گیاهان تراریخت اثبات کرد. بر طبق نتایج حاصل سویه‌های LBA4404 و GV3101 کارآیی بالایی در انتقال ژن به گیاه زنیان دارند. البته سویه LBA4404 به دلیل بیماری‌زایی بالا و دامنه میزبانی با گیاه زنیان نسبت به سویه GV3101 از کارآیی بالاتری برخوردار است. در بسیاری از آزمایش‌ها سویه LBA4404 به عنوان کارآمدترین سویه معرفی شده است (Tohidfar *et al.*2005; Yadav *et al.*2014). سویه های مختلف اگروباکتریوم توانایی متفاوتی در انتقال ژن به گونه‌های مختلف گیاهی و ژنوتیپ‌های متنوع درون یک گونه دارند (Gue *et al.*2012). کارآیی انتقال ژن در این مطالعه ٤٦٪ بود که در مقایسه با بسیاری از گیاهان دارویی، مطلوب است. همچنین برای تعیین نهایی بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت احتمالی از RT-PCR استفاده شد. بر طبق نتایج حاصل، بیان ژن در سطح RNA در چهار گیاه تراریخت که PCR مثبت بوده و به طور تصادفی انتخاب شدند، نیز تایید شده که بیانگر تلفیق ژن در گیاهان تراریخت است. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از PCR حضور هر دو ژن *GUS* و *nptII* در گیاه و باززایی گیاه در محیط کشت حاوی کانامایسین و همچنین نتایج RT-PCR می‌توان نتیجه گرفت گیاهان باززایی شده در این بررسی، تراریخته هستند.

مطالعات زیادی در انتقال ژن در گیاهان دارویی با استفاده از سویه‌های اگروباکتریوم همراه با ژن نشانگر *npt II* انجام شده است از جمله در آزمایشی در گیاه *celery* از ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ لپه و سه سویه اگروباکتریوم EHA105 ، LBA4404 و GV3101 استفاده شد. بر طبق نتایج حاصل سویه های EHA105 و LBA4404 ١٦ تا ١٨ درصد کارآیی انتقال ژن را نشان دادند اما GV3101 کارآیی کمتر از ٥ درصد را نشان داد (Song *et al.*2007) که با نتایج حاصل از پژوهش ما برای تعیین سویه مناسب اگروباکتریوم مشابه بود. در تحقیقی بر روی گیاه دارویی *Digitalis purpurea* به منظور انتقال ژن از دو سویه اگروباکتریوم GV2260 و GV3101 با به‌کارگیری ریزنمونه برگ به منظور انتقال ژن *GUS* استفاده شد. که در این تحقیق سویه GV3101 دارای کارآیی بالاتری (٦٠درصد) نسبت به سویه دیگر (٥٢,١درصد) بود (Li *et al.*2014). در آزمایشی بر روی گیاه *Coriandrum sativum* انجام شد دو روز هم کشتی ریزنمونه هیپوکوتیل با سویه اگروباکتریوم GV3850، ٢٣درصد گیاهان مقاوم به کانامایسین و در نهایت ٦,٦ درصد کارآیی انتقال ژن را نشان داد (Wang and Kumar, 2004). در آزمایشی بر روی گیاه دارویی *Ocimum gratissimum* سویه باکتری LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 با ژن *GUS* حدود ٢٠ درصد فراوانی تراریختی را نشان دادند و به عنوان سویه مناسب معرفی شد (Khan *et al.*2015). در مطالعه دیگری بر روی گیاه دارویی *Withania somnifera Dunal* انتقال ژن گزارشگر *GUS* با سویه اگروباکتریوم GV3101 به مدت ٢٠ دقیقه تلقیح و دو روز هم‌کشتی انجام شد. که در حدود ١٠/٦درصد تراریختی نشان دادند (Mishra *et al.*2016). این مطالعه نخستین تحقیق برای انتقال ژن *GUS* به گیاه دارویی زنیان محسوب می‌شود که در آن به بررسی و بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن به گیاه زنیان پرداخته شد. در این تحقیق ما روشی با کارآیی بالا برای باززایی و انتقال ژن به گیاه دارویی زنیان ارائه دادیم که می‌تواند برای تحقیقات بیوتکنولوژی و انتقال ژن‌های مناسب به این گیاه ارزشمند و تنظیم مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه به منظور افزایش ترکیبات مفید، بسیار موثر واقع شود.

منابع

Anzidei M, Bennici A, Schiff S, Tani C, Mori B. 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. Plant Cell, Tissue and Organ culture 61: 69-79.

Ballba SI, Hilal SH, Haggag MY. 1973. The volatile oil from the herb and fruits of *Carum Capticum* at different stages of growth. Plant Med 23: 312-320.

Bentely R, Trimen H. 1999. Medicinal Plants. Asiatic Publishing House, New Delhi, 107-115.

Binns AN. 1990. *Agrobacterium- mediated* gene delivery and the biology of hostrange limitations. Physiologia Plantrum 79(1): 135-139.

Chauhan RD. Kanwar K. 2012. Biotechnological advances in pomegranate (*punica granatum L*.). In vitro cellular and development biology- plant 579-594.

Dudits D, Bogre L, Gyorgyey J. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. Journal of Cell Science 99: 475–484.

Dwivedi SN, Mishra RP, Alava S. 2012. Phytochemistry, pharmacological studies and traditional benefits of *Trachyspermum Ammi* Sprague. International Journal of Pharmacy and Life Science 3(5): 1705- 1709.

Gallie DR. 1998. Controlling gene expression in transgenic. Current Opintion of Plant Biology 1:166-172.

Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J. 2012. Optimization of factors affecting Agrobacterium mediated transient expression of Micro-Tom tomatoes. Genetics and molecular research 11: 661-671.

Hedge IC. Lamond JM. Rechinger KH. Alava R. Chamberlin DF. Engstrand L. Hernstadd I. Heyn CC. Leute GH. Mandenova I. Peev D. Pimenov MG. Snogerup S. Tamamschian SG.1987. Umbeliferra, In:Flora Iranica. (Rechinger. K.H. ed) Akademische Drusk-U. Verlagsanstalyt Graz, Austria,Vol:162.

Jasrai YT, Barot SM, Mehta, AR. 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in hypocotyl explants of *Trachyspermum Ammi (L.) Sprague*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 57-60.

Jefferson R A, Kavanagh TA, Bevan MV. 1987. GUS fusion: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The European Molecular Biology Organization Journal 6: 3901-3907.

Jha TB, Roy SC, Mitra CC. 1981. A brief review of in vitro studies on umbeliferous spice plants. In: Rao AN (Ed). Proc Costed Symp on Tissue Culture of Economically Important Plant, Singapore 94-97.

Khan S, Fahim N, Singh P, Rahman L. 2015. *Agrobacterium tumefaciens mediated* genetic transformation of *Ocimum gratissimum* : A medicinally important crop. Industrial crop and products 71: 138-146.

Li Y, Gao Z, Piao CH, Lu K, Wang ZH, Cui M-L. 2014. A stable and efficient *agrobacterium tumefacience*-mediated genetic transformation of the medicinal plant *Digitalis purpurea L*. Applied Biochemistry and Biotechnology 172: 1807-1817.

Lievre K, Hehn A, Minh Tran TL, Gravot A, Thomasset B, Bourgaud F, Gontier E. 2005. Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta Graveolens L*. by Agrobacterium tumefaciens- mediated method. Plant Science 168: 883-888.

Mirza Hoseiny SM, Sadat Noori SA, Amanzadeh Y. 2015. Evaluation of chemical components of 23 ecotypes of *Trachyspermum Ammi*. In: First International and 9th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. Shahid Beheshty University, Tehran, Iran.

Mishra S, Bansal SH, Singh Sangwan R, Sangwan NS. 2016. Genotype independent and efficient agrobacterium –mediated genetic transformation of the medicinal plant *Whisania somnifera Dunal*. Journal of plant biochemistry and biotechnology 25(2): 191-198.

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

Nisha KK, Seetha K, Rajmohan k, Puroshothama MG. 2003. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Brahmi *(Bacopa monniera (L.,) Wettst*.) a popular medicinal herb of India. CURRENT SCIENCE 85(1): 85-89.

Puc AY, Berzunza EA, Chan-Bacab MJ, Pena Rodriguez LM, Hernandez GG. 2012. Agrobacterium- mediated transient transformation of *Pentalinon andrieuxii Mull. Arg*. Advance in bioscience and biotechnology 3: 256-258.

Singh I, Singh VP. 2000. Antifungal properties of aqueous and organic extracts of seed plants against Aspergillus flavus and A.niger. Phytomorphology 20:151-157.

Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nilolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44:1202-1205.

Song GQ, Loskutov AV, Sink KC. 2007. Highly efiicient Agrobacterium tumefaciencs-mediated transformation of celery (Apium graveolens L.) through somatic embryogenesis . Plant cell Tissue and Organ culture 88: 193-200.

Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B. 2005. Agrobacterium-mediated transformation of cotton using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue and Organ Culture 83:83-96.

Walden R, Schell J. 1990. Techniques in plant molecular biology, progress and problems. European Journal of Biochemistry 192: 563-567.

Wang Y, Kumar PP. 2004. Heterologous expression of Arabidopsis ERSI causes delayed senescense in coriander. Plant cell reports 22: 678-683.

Yadav SH, Sharma P, Srivastava A, Desai P, Shrivastava N. 2014. Strain specific Agrobacterium-mediated genetic transformation of *bacopa monnieri*. Journal of genetic engineering and biotechnology 12: 89-94.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Optimization of effective factors on *β-glucuronidase* (*GUS*) gene transformation by *Agrobacterium* to *Trachyspermum ammi*

Masoumeh Nomani [1], Seyed Ahmad Sadat Noori [1*], Masoud Tohidfar [2] and Hossein Ramshini [1]

1- Ph.D student, Professor and Associate Professor of Department of Agronomy and Plant breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Associate Professor of Department of Biotechnology ‐ College of Life Science and Biotechnology - Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

*Email corresponding author: noori@ut.ac.ir

Abstract

Trachyspermum ammi is one of the most important medicinal herbs in Iran. This plant contains important medicinal properties, including anti-digestive, antispasmodic and relieving rheumatic pains and has been used as a spice and food preservative. To overexpress some effective ingredients in this plant, it is necessary to optimize the gene transfer process. For this purpose, the explants of hypocotyl, two strains of *Agrobacterium tumefaciens* were studied along with factors such an inoculation times (5, 10, 15, 20 min) co-cultivation times (1, 2 and 3 days). In this study, pBI121 vector harboring *GUS* as the reporter gene, and *nptII* gene as the plant selected marker were used. To confirm the gene transfer, PCR, histochemical *GUS* staining and RT-PCR tests were used. According to the results, the time of inoculation of 5 minute and the time of one day for co- cultivation increased the efficiency of gene transfer. Both bacterial strains showed a relatively good performance in gene transfer, but the LBA4404 strain showed higher efficacy than GV3101. In this study, 25 mg/L of kanamycin was selected as the appropriate concentration for determining the probable transgenic plant by Agrobacterium. For the first time, the present study presents an effective and efficient method for gene transfer to *Trachyspermu ammi* that can be effectively used for gene transfer.

Keywords: Agrobacterium, Hypocotyl, Reporter gene, *Trachyspermum*, Co-cultivation