بهینه کردن انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم در گیاه دارویی زنیان با استفاده از ژن *fld*

محسن نیازیان[۱]، سید احمد سادات نوری[۱*]، مسعود توحید فر[۲]، پتر گالوشکا[۳] و سید محمد مهدی مرتضویان[۱]

[۱] پاکدشت، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات

[۲] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده فنآوری نوین، گروه بیوتکنولوژی

[۳] جمهوری چک، دانشگاه پالاچکی، مرکز بیوتکنولوژی هانا، گروه زیست شناسی مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۲

چکیده

به منظور بهینه کردن شرایط انتقال ژن به گیاه دارویی زنیان عوامل مختلف شامل رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم، نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم، غلظت استوسرینگون و مدت زمان تلقیح بر روی تعداد گیاهان باززا شده با استفاده ازسازه ژنی p6U-Ubi-FVT دارای ژن انتخابیHPT و ژن *fld* بررسی شد. غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین برای غربالگری سلول های تراریخت و جلوگیری از تولید کالوس در سلول های غیر تراریخت بهترین غلظت تشخیص داده شد. اثر متقابل سه عامل تراکم سلولی آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم و نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر تعداد گیاهان باززا شده در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود و رقت ۰/۶-۰/۸آگروباکتریوم × سویه GV3101 آگروباکتریوم × غلظت ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کشنده تیمنتین اثر بازدارنده کمتری بر تعداد گیاهان باززا شده داشتند. بیشترین تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به آنتی بیوتیک هیگرومایسین مربوط به غلظت ۲۵۴/۸ میکرومولار در لیتر استوسرینگون بود. گیاهان باززا شده بیشتری در مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه نسبت به زمان های تلقیح ۲۰ دقیقه و ۱ دقیقه حاصل شد همچنین تفاوت آماری معنی داری بین میانگین تعداد گیاهان باززا شده حاصل از ۲۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه زمان تلقیح مشاهده نشد. بررسی حضور ژن مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز روی گیاهان باززا شده انجام شد. نتایج وجود حداقل یک نسخه از ژن هدف را در ژنوم گیاهان تائید کرد. برتری گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت در تحمل به تنش اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال توسط آزمون زیست سنجی تحمل به تنش اسمزی تایید گردید.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم، زنیان، فاکتور های تراریختی، فلاودوکسین، هیگرومایسین.

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۹۱۲۳۸۴۷۵۵۱ ، پست الکترونیکی: noori@ut.ac.ir

مقدمه

زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) گیاهی است علفی و یکساله از تیره چتریان که در صنایع دارویی و غذایی کاربرد گسترده ای دارد (۲۵). منشاء این گیاه منطقه مدیترانه شرقی و احتمالاً مصر است که توسط یونانی ها به هند وارد شده است. زنیان عمدتاً در مناطقی از مصر، ایران و افغانستان کشت می شود. محصولات مختلفی از زنیان از قبیل روغن زنیان، تیمول و روغن بدون تیمول تولید میشوند که دو محصول اول در پزشکی و صنایع پزشکی کاربرد دارند و محصول سوم برای کاربردهای صنعتی و تولید اسیدهای روغن های چرب استفاده می شود (۳۳). ایده استفاده از گیاهان دارویی برای درمان انسان و احشام جدید نیست، و در بسیاری از کشورهای پیشرفته استفاده از گیاهان دارویی هنوز رواج دارد (۷). در پزشکی مدرن داروهای زیادی استفاده می شوند که عمدتاً از گیاهان مشتق می شوند مانند دیژیتال، مورفین، آتروپین، cinchona و vinblastine. به دلیل این حقیقت که بیشتر

داروهای گیاهی بدون اثرات جانبی هستند علاقه به محصولات گیاهی در سرتاسر جهان بطور وسیعی افزایش یافته است (۱۸،۱۱و ۲۰). اسانس زنیان حاوی تقریباً ۵۰٪ تیمول است که یک آنتی بیوتیک قوی، ضد اسپاسم و ضد قارچ است (۱۸). هرچند زنیان در کشورهای زیادی کشت می شود اما بطور وسیعی در مناطق خشک و نیمه خشک کشت می شود.

تنش های محیطی باعث کاهش انتقال الکترون در مسیر فتوسیستم می شود، فردوکسینها در گیاهان که در انتقال الکترون دخالت دارد، در پاسخ به محرک های مختلف محیطی کاهش می یابد (۳۲). میکروارگانیسم های فتوسنتزی در هنگام کاهش نامطلوب فردوکسین، بیان ناقل های الکترونی همانند فلاودوکسین*fld* (flavodoxin) که عملکردی مشابه فردوکسین را دارند القا می کنند. فلاودوکسین ها تنها در بعضی از باکتری ها و جلبک های اقیانوسی یافت می شوند. فلاودوکسین در این موجودات می تواند القاء کننده عملکرد فردوکسین تحت شرایط فقر آهن و تنش های محیطی که منجر به کاهش فردوکسین می شود باشند. فلاودوکسین نقشی مشابه فردوکسین ایفا می کند و قادر است با جلوگیری از وقوع اغتشاشات در چرخه انتقال الکترون و ممانعت از تشکیل گونه های فعال اکسیژن، آسایش گیاه را فراهم کند (۴). اثر منفی تنش های غیر زیستی خشکی و شوری بر عملکرد و اجزای عملکرد و نیز سایر خصوصیات مورد بررسی در زنیان و سایر گیاهان دارویی خانواده چتریان گزارش شده است (۶، ۷، ۸، ۲۱ و ۲۴) ازطرفی تنش خشکی به عنوان افزایش دهنده تولید متابولیتهای ثانویه در انواع گیاهان دارویی بیان شده است (۱۰، ۱۴و ۳۸) بنابراین به نظر می رسد با ایجاد اکوتیپ های مقاوم به خشکی زنیان علاوه بر بهره مندی از امکان کشت این گیاه در مناطق خشک و افزایش سطح زیر کشت آن بدون تاثر منفی بر صفات عملکردی می توان با کشت این گیاه دارویی در شرایط کمبود آب میزان متابولیت های ثانویه آن را نیز افزایش داد. توسعه یک روش تراریختی برای ارتقاء ژنوم گیاهان دارویی ارزشمند که منبع غنی از متابولیت های ثانویه پویا دارویی هستند ضروری است (۳۵).

برتری گیاهان توتون تراریخت با ژن *fld* که فرودوکسین گیاهی آنها با فلاودوکسین جایگزین شده بود در تحمل به انواع تنش های محیطی گزارش شده است (۳۶). Sheikh Beig Goharrizi و همکاران (۲۰۱۶) از سازه ژنی p6U جهت انتقال ژن *fld* (فلاودوکسین سیانوباکتریایی) به جنین های سوماتیکی گردو استفاده کردند و پس از اعمال تنش اسمزی با غلظت های ۰-۲۰۰ میلی مولار NaCl و همچنین ۰-۱۰٪ PEG برتری جنین های سوماتیکی تراریخته را در تنش های ۵۰-۱۰۰ میلی مولار NaCl و ۵-۱۰٪ PEG نسبت به جنین های سوماتیکی غیر تراریخته گزارش نمودند (۳۱). کارایی انتقال ژن بستگی به چندین فاکتور دارد. از جمله، می توان به نژاد و غلظت باکتری، اضافه کردن مواد فنولی در محیط کشت، گونه گیاهی و ژنوتیپ، تنظیم کننده های رشدی، ریزنمونه، نور و دما، دمای هم کشتی، آنتی بیوتیک، تیمار ایجاد زخم در بافت هدف و روش مناسب انتخاب سلول های تراریخت شده از بافت غیر تراریخته اشاره نمود (۲). در تراریختی به واسطه آگروباکتریوم علاوه بر نیاز به یک سیستم باززایی قدرتمند در گیاه مورد نظر، بهینه نمودن فاکتورهای دیگر موثر در انتقال ژن که باعث تولید گیاهان باززا شده بیشتری شود و در نهایت باعث افزایش کارایی روش شود نیز ضرورت دارد. از طرفی طراحی و استفاده از سازه مناسبی که امکان ردیابی آسان گیاهان تراریخته را در مراحل اولیه رشد فراهم نماید بسیار مفید خواهد بود (۲). هدف از تحقیق حاضر بررسی و انتخاب بهترین شرایط انتقال ژن جهت تراریختی گیاه دارویی زنیان باسازه ژنیp6U حمل کننده ژن فلاودوکسین و عامل انتخابی مقاومت به هیگرومایسین با بیشترین تعداد گیاه باززا شده بود.

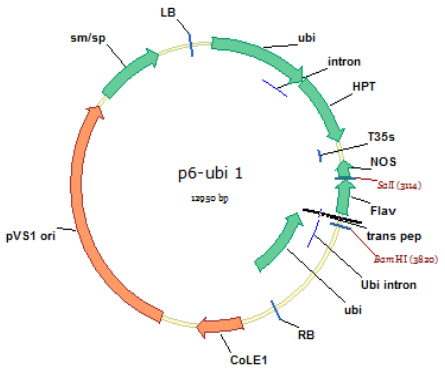
مواد و روشها

مواد گیاهی: جهت تولید ریزنمونه های استریل، از بذر اکوتیپ شیراز (12313) تهیه شده از مرکز تحقیقات جنگل ها و مراتع ایران استفاده شد. پس از کشت بذور استریل در محیط ½Ms از هیپوکوتیل ۱۰ روزه گیاهچه های تولیدی به عنوان ریزنمونه جهت انتقال ژن استفاده شد (۲۷).

محیط کشت پایه جهت القاء کالوس و باززایی: از محیط پایه MS همراه با فیتوهورمون های 2,4-D (۱/۹۸ میلی گرم بر لیتر) + Kin (۰/۴۹ میلی گرم در لیتر) + ۳٪ ساکارز (وزنی /حجمی) جهت القای جنین زایی سوماتیکی استفاده شد. pH محیط در محدوده ۰/۲ ± ۵/۸ تنظیم (۱۵) شد. در نهایت از ۰٫۳۸٪ (وزنی/حجمی) فیتاژل جهت جامد نمودن محیط کشت، و اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد (۱۵ و ۲۵). بعد از قرار گیری ریزنمونه ها در محیط های کشت، تمامی کشت ها در اتاقک کشت در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۶۰-۶۵٪ و چگالی شار فوتون فوتوسنتزی (Photosynthetic Pphoton Flux Density) ۲۵ میکرومول بر متر مربع بر سانتیمتر ($\mu molm^{-2}s^{-1}$) (۲۷) قرارگرفتند.

تعیین سطح کشنده آنتی بیوتیک هیگرومایسین: از آنجا که جهت انتقال ژن از وکتور p6U حاوی نشانگر انتخابی هیگرومایسین استفاده شد (شکل ۱) لذا در اولین گام جهت تعیین سطح کشنده آنتی بیوتیک هیگرومایسین در زنیان و حصول غربالگری موثر گیاهان تراریخت، آزمایشی با غلظت های ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین (۱۷ و ۳۰) همراه با تیمار شاهد در غالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی ریزنمونه های هیپوکوتیل انجام شد.

بررسی پارامترهای انتقال ژن: پارامترهای مختلف انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم تومفاشینس از قبیل سه رقت آگروباکتریوم شامل ۰/۲، ۰/۶-۰/۸ و ۱-۱/۲، سه سویه AGL1، LB4404 و GV3101 آگروباکتریوم، دو نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم (آنتی بیوتیک تیمنتین با غلظت ۱۶۰ میلی گرم در لیتر و آنتی بیوتیک سفاتاکسیم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر)، چهار غلظت مختلف استوسرینگون شامل ۲۰۰، ۲۵۴/۸، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار در لیتر و سه مدت زمان ۱، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تلقیح مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اثر عوامل رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم و نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر روی تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به هیگرومایسین مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- وکتورp6U حاوی ژن فلاودکوسین و نشانگر انتخابی هیگرومایسین (Sheikh Beig Goharrizi و همکاران، ۲۰۱۶)

در آزمایش دیگری با ثابت در نظر گرفتن این سه عامل و مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه، اثر چهار غلظت مختلف استوسرینگون بر روی تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به آنتی بیوتیک هیگرومایسین مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت در آزمایش دیگری اثر سه مدت زمان تلقیح مختلف همراه با عوامل بهینه شده قبلی مورد بررسی قرار گرفت. در هر سه آزمایش صفت درصد باززایی اندازه گیری شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مراز: استخراج DNA از بافت برگی گیاهان تراریخته طبق روش ChabiSika و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد (۷). به منظور اثبات تلفیق ژن، واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵

میکرولیتر با پرایمرهای اختصاصی ژن *fld* (fld-F: 5´GCG ATC GTC TGT TAA GTC 3´, fld-R: 5´CTA CGG TAC TCA AAC TGG 3´) انجام شد. شرایط واکنش به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه و در نهایت تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۷ دقیقه بود.

محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز روی ژل آگارز ۱ درصد همراه با ۱۰ میکرولیتر بر لیتر اتیدیوم برماید به مدت ۲۵ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز سپس در دستگاه ژل داک عکس برداری گردید.

سنجش تحمل به تنش اسمزی: جهت ارزیابی تحمل به تنش اسمزی گیاهچه های غیر تراریخت و تراریخت با ژن *fld* با ارتفاعی در حدود ۴-۵ سانتی متردر محیط کشت ½Ms با چهار سطح تنش اسمزی شامل کنترل (۰٪ PEG 6000)، ۵٪ PEG 6000 (۰/۰۵- مگاپاسکال)، ۱۰٪ PEG 6000 (۰/۱۵- مگاپاسکال)، ۱۵٪ PEG 6000 (۰/۳- مگاپاسکال) و ۲۰٪ PEG 6000 (۰/۴۹- مگاپاسکال) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۹). ظروف کشت حاوی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در اتاقک کشت با شرایط محیطی توصیف شده قبلی قرار گرفتند. رشد گیاهچه ها در شرایط تنشی مختلف به مدت ۵۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه های آماری: تجزیه و تحلیل داده های آزمایش های انجام شده توسط نرم افزارهای Excell و SAS انجام شد.

نتایج

اثر عامل انتخابی (آنتی بیوتیک هیگرومایسین) بر باززایی گیاهان: جهت بررسی اثر غلظت های مختلف آنتی بیوتیک هیگرومایسین بر ریزنمونه های هیپوکوتیل واکشت ها در دوره های زمانی ۱۰ روزه انجام و طی هر واکشت تعداد گیاهان رشد یافته در هر پتری دیش محاسبه شد و در نهایت یادداشت برداری نهایی داده ها در ماه دوم آزمایش پس از مرگ ریزنمونه ها در کمترین غلظت آنتی بیوتیکی پایان یافت. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف آنتی بیوتیک هیگرومایسین بر درصد القاء کالوس به روش LSD حاکی از آن بود که بین تمام غلظت های آنتی بیوتیک هیگرومایسین با تیمار شاهد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵٪ وجود داشت، همچنین بالاترین درصد القای کالوس مربوط به تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین با میانگین ۵۳٪ بود و بین غلظت های ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم بر لیتر هیگرومایسین با صفر درصد القاء کالوس تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۲) لذا غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین برای غربالگری سلول های تراریخت زنیان کافی بود و پس از گذشت سه هفته، تمام ریزنمونه های قرار گرفته در این غلظت سفید شده و از بین رفتند. بر اساس منحنی کشتن هیگرومایسین کاملاً مشهود است که بیشترین میزان عدم القای کالوس در ریزنمونه ها از غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر حاصل شد و کاربرد غلظت های بالاتر (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم بر لیتر هیگرومایسین) تفاوتی در تعداد گیاهان با عدم القای کالوس نداشت (شکل ۳).

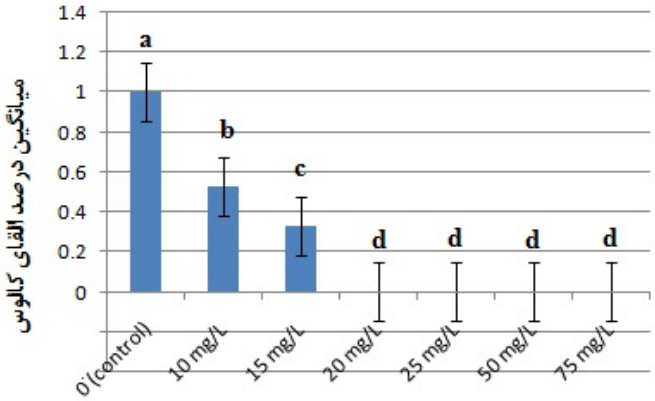
اثر متقابل تیمارهای رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم و نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر تعداد گیاهان باززا شده: جدول ۱ نتایج حاصل از تجزیه واریانس آزمایش فاکتوریل بررسی اثر عوامل رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم ونوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر روی محیط کشت حاوی ۲۰ میلی گرم هیگرومایسین را نشان می دهد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثرهای ساده و متقابل هر سه عامل مرود بررسی بر روی تعداد گیاهان باززایی شده مقاوم به هیگرومایسین در سطح احتمال ۱ درصد ($p<0.001$) معنی دار بود. پس از معنی دار شدن اثر عوامل مورد بررسی در

تجزیه واریانس، در مرحله بعد مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها (شکل ۴) نشان داد که بالاترین میانگین گیاهان بازرا شده مقاوم به آنتی بیوتیک هیگرومایسین مربوط به رقت آگروباکتریوم ۰/۶–۰/۸ (OD600=0.6-0.8) × سویه GV3101 آگروباکتریوم × غلظت ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کشنده تیمنتین بود (شکل۵). همچنین کمترین میانگین تعداد گیاهان بازرا شده مربوط به اثر متقابل رقت آگروباکتریوم ۰/۲ (OD_{600}=0.2) × سویه AGL1 آگروباکتریوم × غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کشنده سفاتاکسیم بود.

جدول ۱– تجزیه واریانس اثر متقابل عوامل رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم و نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر تعداد گیاهان بازرا شده زنیان

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقت آگروباکتریوم (OD_{600})	۲	۱/۲۳**
سویه آگروباکتریوم	۲	۰/۱۸**
آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم	۱	۰/۰۵**
رقت آگروباکتریوم× سویه آگروباکتریوم	۴	۰/۰۵**
رقت آگروباکتریوم× آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم	۲	۰/۰۰۶**
سویه آگروباکتریوم× آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم	۲	۰/۰۰۷**
رقت آگروباکتریوم× سویه آگروباکتریوم× آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم	۴	۰/۰۵**
خطا	۳۶	۰/۰۰۰۹
ضریب تغییرات (٪)	۷/۳۶	

**: معنی داری در سطح احتمال ۱٪

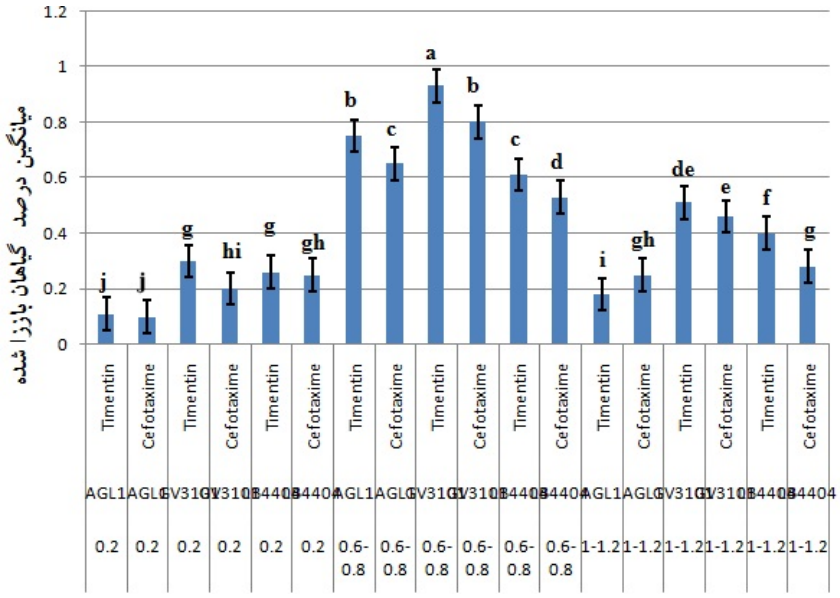


شکل ۲– مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف آنتی بیوتیک هیگرومایسین بر درصد القاء کالوس در گیاه دارویی زنیان به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ (خطوط بالای هر ستون بیانگر خطای معیار می باشد؛ میانگین های دارای حروف لاتین مشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

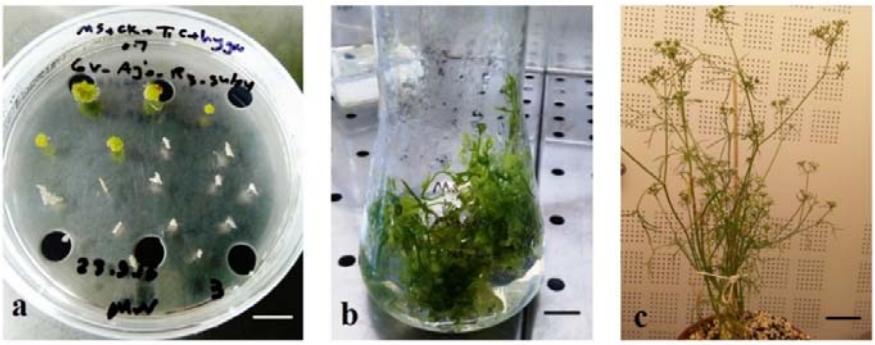
تعیین غلظت بهینه استوسرینگون در محیط تلقیح: در مرحله بعد سه پارامتر رقت ۰/۶–۰/۸آگروباکتریوم، سویه GV3101 آگروباکتریوم و ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کشنده تیمنتین را انتخاب و چهار غلظت مختلف

استوسرینگون شامل ۲۰۰، ۲۵۴/۸، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار در لیتر در محیط Ms ½ مایع جهت حل مجدد رسوب آگروباکتریوم در محیط تلقیح بکار برده شد. در نهایت اثر تیمارهای مورد بررسی بر تعداد گیاهان باززا شده در غالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۳- منحنی کشتن هیگرومایسین در گیاه دارویی زنیان

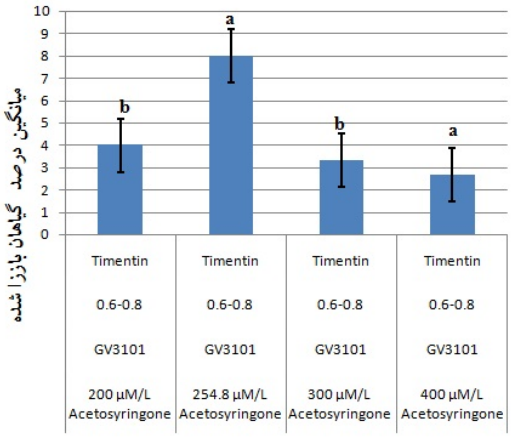


شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل عوامل رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم و نوع آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر درصد گیاهان باززا شده به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ (خطوط بالای هر ستون بیانگر خطای معیار می باشد؛ میانگین های دارای حروف لاتین مشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)



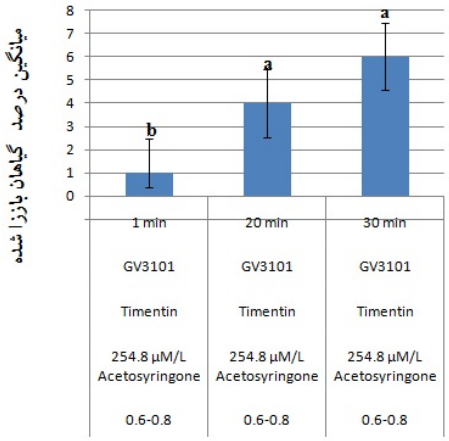
شکل ۵- مراحل القای کالوس و باززایی زنیان های تراریخته با ژن *fld*. (a) القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل تراریخت احتمالی در محیط حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین (خط نشانه ۲ سانتی متر). (b) باززایی زنیان های تراریخت احتمالی در محیط دارای آنتی بیوتیک هیگرومایسین (خط نشانه ۳ سانتی متر). (c) گیاه تراریخته احتمالی در گلدان در شرایط گلخانه (خط نشانه ۶ سانتی متر).

پس از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها، بیشترین تعداد گیاهان باززایی شده مقاوم به آنتی بیوتیک هیگرومایسین مربوط به غلظت ۲۵۴/۸ میکرومولار در لیتر استوسرینگون بود (شکل ۶). همچنین مقایسه میانگین ها نشان داد که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین غلظت های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار در لیتر استوسرینگون وجود ندارد با این حال با افزایش غلظت استوسرینگون در محلول تلقیح، تعداد گیاهان باززا شده بطور چشمگیری کاهش یافت (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه میانگین درصد گیاهان باززا شده حاصل از اثر غلظت های مختلف استوسرینگون در محیط تلقیح آگروباکتریوم به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ (خطوط بالای هر ستون بیانگر خطای معیار می باشد؛ میانگین های دارای حروف لاتین مشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)

تعیین مدت زمان مناسب تلقیح: جهت بررسی بهترین مدت زمان تلقیح ریزنمونه ها با آگروباکتریوم در این مرحله آزمایشی با سه مدت زمان ۱، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تلقیح در غالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج حاصله از مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین تعداد گیاهان باززا شده مربوط به مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه با میانگین ۶ گیاه باززا شده بود و کمترین میانگین تعداد گیاهان باززا شده مربوط به مدت زمان تلقیح ۱ دقیقه بود، همچنین هر چند تعداد گیاهان باززا شده در مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه بیش از یک دقیقه بودند (میانگین ۴ گیاه) اما از لحاظ آماری تفاوتی بین تعداد گیاهان باززا شده در مدت زمان های ۲۰ و ۳۰ دقیقه تلقیح وجود نداشت ($p<0.05$) (شکل ۷).

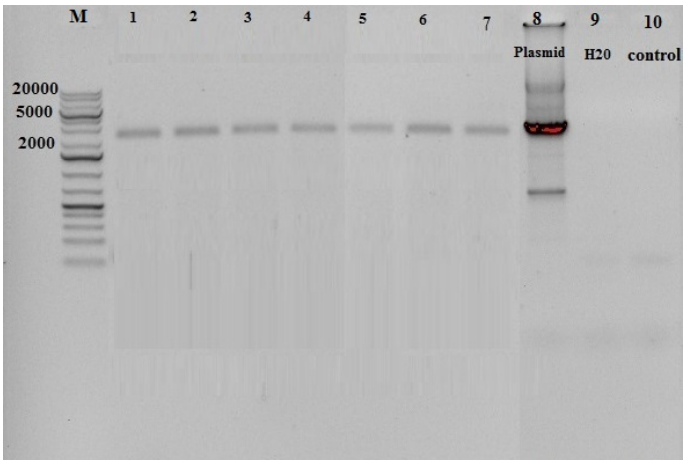


شکل ۷- مقایسه میانگین درصد گیاهان باززا شده حاصل از اثر مدت زمان های مختلف تلقیح ریزنمونه با آگروباکتریوم به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ (خطوط بالای هر ستون بیانگر خطای معیار می باشد؛ میانگین های دارای حروف لاتین مشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)

تایید تراریختی گیاهان ترانسفورم شده با واکنش زنجیره ای پلی مراز: واکنش زنجیره ای پلی مراز با پرایمرهای اختصاصی ژن *fld* برای گیاهان باززا شده حاصل ازتیمارهای رقت آگروباکتریوم ۰/۶-۰/۸، سویه GV3101 آگروباکتریوم، غلظت ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک تیمنتین، ۲۵۴/۸ میکرومولاردر لیتر استوسرینگون و ۳۰ دقیقه زمان تلقیح، نشان دهنده حضور باند ژن در دامنه مورد انتظار (۲۶۵۰ جفت باز) بود (شکل ۸). بر اساس شکل ۴ عدم وجود باند در آب (چاهک شماره ۹)، نشان دهنده این است که واکنش PCR عاری از آلودگی بوده است، همچنین وجود باند قوی در نمونه پلاسمید (چاهک شماره ۸) موید صحت مواد و آزمایش PCR می باشد. نتیجه PCR برای گیاه غیر تراریخته (چاهک شماره ۱۰) نشان دهنده عدم حضور ژن *fld* در گیاه دارویی زنیان بود.

در مجموع وجود حداقل یک نسخه از ژن هدف در هفت گیاه از مجموع ۶۳ گیاه بررسی شده (تراریختی ۱۱/۱۱٪) تائید شد (شکل ۸).

ارزیابی گیاهان تراریخت برای تحمل به تنش اسمزی: به منظور بررسی پاسخ گیاهان تراریخت به شرایط تنش، اثر سطوح مختلف تنش اسمزی ناشی از غلظت های مختلف PEG 6000 بر روی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت زنیان مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط کنترل و تنش اسمزی خفیف تفاوتی در خصوصیات ظاهری گیاهان تراریخت و غیرتراریخت مشهود نبود. در محیط کشت حاوی ۵-۱۰٪ PEG تفاوت رشدی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت مشهودتر بود، اما حداکثر اثر منفی بر خصوصیات رشدی و همچنین تفاوت معنی دار گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در محیط کشت حاوی غلظت ۱۵٪ PEG 6000 (۰/۳- مگاپاسکال) مشاهده شد (شکل ۹). پس از ده روز قرار گرفتن در فشار اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال، گیاهان غیرتراریخت زنیان کاهش رشد چشمگیری نسبت به گیاهچه های تراریخت داشتند (شکل a۹)، پس از گذشت ۵۰ روز از کشت، اثرات نامطوب تنش اسمزی در گیاهان تراریخت نیز مشهود بود در حالی که گیاهان غیرتراریخت بطور کامل نکروزه شده و قابلیت رشد مجدد را نداشتند (شکل b۹).



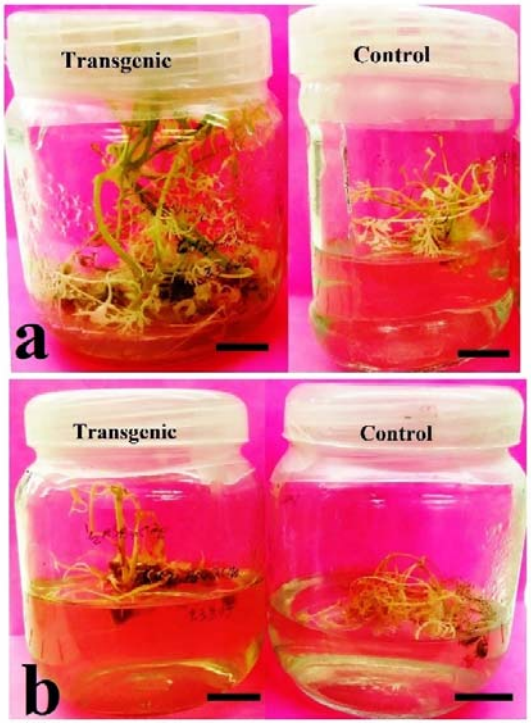
شکل ۸- محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *fld* در گیاه دارویی زنیان. M: نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1 Kb)، چاهک ۱-۷ گیاهان تراریخته احتمالی، چاهک ۸ پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۹ : نمونه آب (واکنش PCR بدون DNA الگو)، چاهک ۱۰: گیاه غیر تراریخته (کنترل منفی).

بحث

گیاهان دارویی اهمیت زیادی در درمان بیماریها دارند اما به دلیل محدود بودن رویشگاه های طبیعی، کمی زادآوری و استفاده بی رویه، نیاز به برنامه ریزی برای کشت و اهلی کردن (۱) و همچنین توسعه روش های اصلاحی سنتی و مولکولی دارند.

تا کنون گزارشی از بهینه نمودن شرایط انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم و انتخاب سطوح مناسب آنتی بیوتیکی در گیاه دارویی زنیان مشاهده نشده است. تعیین غلظت بهینه عامل انتخابی در گیاه مورد نظر عامل کلیدی در غربالگری سلول های تراریخت و جلوگیری از رشد گیاهان غیر تراریخت است، همچنین غلظت انتخابی باید در حداقل مقدار کشنده باشد تا از باززایی سلول های تراریخت جلوگیری نکند و موفقیت انتقال ژن افزایش یابد. تفاوت در مقاومت به غلظت های مختلف هیگرومایسین در بررسی های انتقال ژن انجام شده در گیاهان مختلف مشهود است. Kim و همکاران (۲۰۱۶) جهت انتقال ژن به

گیاه *Helianthus tuberosus* با استفاده از پلاسمید pCAMBIA1301 حاوی ژن انتخابی hpt II، غلظت های ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین را بر روی ریزنمونه های غیر تراریخت آزمون کردند و غلظت ۳ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین با ۲۰ درصد القای کالوس را به عنوان غلظت بهینه این عامل انتخابی گزارش نمودند (۱۷).



شکل ۹- رشد گیاهچه های تراریخت و غیرتراریخت گیاه دارویی زنیان در تنش اسمزی ۱۵٪ PEG 6000 (فشار اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال)؛ (a) ۱۰ روز پس از کشت (خط نشانه ۴ سانتی متر)، (b) ۵۰ روز پس از کشت (خط نشانه ۴ سانتی متر).

Samara Shekar Reddy و همکاران (۲۰۱۶) جهت انتقال ژن به برنج غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین را به عنوان عامل انتخابی بر روی کالوس های غیر تراریخت آزمون کردند و غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین را به عنوان غلظت بهینه معرفی نمودند (۳۰).

در تحقیق حاضر اثر پارامترهای عامل آگروباکتریوم بر تعداد گیاهان باززا شده مشهود بود و مشخص شد رقت آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم بکار رفته و آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم همگی بر تعداد گیاهان باززا شده تاثیر دارند به گونه ای که افزایش تعداد گیاهان باززا شده مقاوم به آنتی بیوتیک نتیجه اثر متقابل این سه عامل آگروباکتریومی است. در بررسی اثر متقابل این سه عامل، رقت آگروباکتریوم ۰/۶-۰/۸ بهترین پاسخ را برای تعداد گیاهان باززا شده داشت و بنظر می رسد فعال ترین مرحله رشد و تکثیر لگاریتمی (log phase) سویه های آگروباکتریوم دراین مقدار رقت حاصل می گردد (۳۷) و بنابراین برای انتقال ژن در گیاه دارویی زنیان موثر است. اثر سمیت آگروباکتریوم در تراکم های سلولی بالا در انتقال ژن به گیاه *W. Somnifera* گزارش شده است. Sivanandhan و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که جذب نوری باکتریایی بالاتر از ۰/۵ در این گیاه علاوه بر اثر سمیت بر سلول های پذیرنده، بیان ژن GUS را نیز کاهش می دهد (۳۴). Pandey و همکاران (۲۰۱۳)، تراکم های سلولی ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ را جهت بهینه نمودن شرایط انتقال ژن GUS به گیاه دارویی زیره بررسی نمودند و تراکم سلول باکتریایی ۰/۶ را به عنوان بهترین تراکم سلولی جهت انتقال ژن به این گیاه دارویی گزارش نمودند (۲۶).

از عوامل کلیدی دیگر در موفقیت انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، سویه آگروباکتریوم مورد استفاده می باشد. در تحقیق حاضر سویه GV3101 آگروباکتریوم در تولید تعداد کالوس های مقاوم به آنتی بیوتیک بیشتر موفق تر از سویه LB4404 و همچنین سویه AGL1 آگروباکتریوم بود. کاظمی و همکاران (۱۳۹۳) اثر سویه های LB4404، GV3101 و GV3850 را جهت انتقال ژن EPSPS به گیاه کلزا بررسی نمودند و بیشترین تعداد گیاهان با PCR مثبت را برای سویه GV3850 با تعداد ۲۰ گیاه گزارش نمودند (۵). Naing و همکاران (۲۰۱۶) سویه های GV3101 و C58C1 را جهت انتقال ژن RsMYB1 به گیاه

chrysanthemum بکار بردند و گزارش نمودند تعداد گیاهان باززا شده از ریزنمونه های تلقیح شده با سویه C58C1 آگروباکتریوم بیشتر از ریزنمونه های تلقیح شده با سویه GV3101 اگروباکتریوم بود (۲۳). در تحقیق حاضر برتری سویه GV3101 نسبت به سویه LB4404 آگروباکتریوم در باززایی تعداد گیاهان بیشتر مشاهده شد و از این لحاظ نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابق با نتایج کاظمی و همکاران (۱۳۹۳) بود. انتقال ژن در گیاهان نیازمند انتخاب مناسب آنتی بیوتیک ها برای باززایی بافت های تراریخته و همچنین حذف آگروباکتریوم است، پس علاوه بر آنتی بیوتیک انتخابی جهت حذف گیاهان غیر تراریخت، انتخاب آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم نیز عامل کلیدی در افزایش تعداد گیاهان باززا شده و موفقیت انتقال ژن است. در این تحقیق از دو نوع آنتی بیوتیک متفاوت کشنده آگروباکتریوم استفاده شد و مشخص گردید که آنتی بیوتیک تیمنتین به میزان ۱۶۰ میلی گرم در لیتر نتیجه بهتری را همراه با سایر پارامترهای انتقال ژن نسبت به آنتی بیوتیک سفاتاکسیم به میزان ۲۵۰ میلی گرم در لیتر دارد. Sivanandhan و همکاران (۲۰۱۶) اثر غلظت های ۱۰۰–۴۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک های سفاتاکسیم و تیمتین را بر باززایی نمونه های برگی گیاه *H. enneaspermus* مورد برسی قرار دادند و در نهایت تعداد گیاهان باززا شده حاصل از کاربرد غلظت های مختلف آنتی بیوتیک تیمنتین را بیشتر گزارش نمودند، همچنین در پایان گزارش نمودند که گیاهان باززا شده در حضور آنتی بیوتیک تیمنتین سبزتر و سالم تر از گیاهان باززا شده در محیط حاوی آنتی بیوتیک سفاتاکسیم بودند (۳۵)، لذا تحقیق حاضر از نظر برتری کاربرد آنتی بیوتیک تیمنتین نسبت به آنتی بیوتیک سفااتاکسیم برای حذف آگروباکتریوم و متعاقباً برای باززایی گیاهان بیشتر (میانگین باززایی ۹۳٪)، تطابق داشت. Naing و همکاران (۲۰۱۴) اثر سه آنتی بیوتیک کربیسیلین، سفاتاکسیم و کلاوموکس (Clavamox) را بر تعداد گیاهان باززا شده در انتقال ژن GUS به Chrysanthemum بررسی نمودند و گزارش دادند که اثر بازدارندگی آنتی بیوتیک های کربیسیلین و کلاوموکس بر تعداد گیاهان باززا شده از هر ریزنمونه نسبت به آنتی بیوتیک سفاتاکسیم کمتر بود، و در نهایت بیشترین تعداد گیاه باززا شده را به استفاده از ۱۲۵ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کلاوموکس جهت حذف آگروباکتریوم گزارش نمودند (۲۲). گزارشات قبلی اثر بازدارندگی آنتی بیوتیک کشنده آگروباکتریوم بر باززایی گیاهان را فقط در شرایط کنترل (آزمایشات کشت بافتی) گزارش داده اند و بنظر می رسد در شرایط انتقال ژن و وجود آگروباکتریوم میزان باززایی گیاهان تغییر کند و این میزان تحت تاثیر اثر متقابل سایر عوامل انتقال ژن قرار گیرد، لذا در تحقیق حاضر اثر غلظت های بهینه آنتی بیوتیک های کشنده آگروباکتریوم در شرایط واقعی انتقال ژن و در حضور سایر فاکتورهای موثر در انتقال ژن بررسی شد.

ترکیب فنولی استوسرینگون به عنوان القاء کننده ژن Vir در آگروباکتریوم در جایگزینی T-DNA در سلول های گیاهی نقش دارد (۳۵) و انتخاب مقدار بهینه این ترکیب نیز می تواند در افزایش موفقیت تراریختی موثر باشد زیرا غلظت پایین آن (کمتر از ۱۰۰ میکرومولار) حالت ویرولنس آگروباکتریوم را تشدید نمی کند و غلظت بالای آن (بیشتر از ۵۰۰ میکرومولار) نیز برای آگروباکتریوم و سلول های گیاهی اثر سمیت دارد (۱۲). در تحقیق حاضر میزان ۲۵۴/۸ میکرومولار در لیتر (۵۰ میلی گرم در لیتر) استوسرینگون در محلول تلقیح آگروباکتریوم باعث باززایی گیاهان مقاوم بیشتری (میانگین ۸ گیاه باززا شده) نسبت به غلظت های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار در لیتر شد. کاظمی و همکاران (۱۳۹۳) تاثیر مقادیر ۰/۱، ۰/۲، /۰، ۰/۶ و ۰/۸ میلی مولار در لیتر استوسرینگون جهت انتقال ژن EPSPS در کلزا را بررسی نمودند و غلظت ۰/۲ میلی مولار بر لیتر با میانگین ۱۰ درصد گیاهان با PCR مثبت را به عنوان غلظت بهینه استوسرینگون در انتقال ژن به کلزا گزارش

نمودند (۵). Fernando و همکاران (۲۰۱۶) غلظت ۱۰۰ میکرومولار در لیتر استوسرینگون را جهت انتقال ژن به گیاه اکالیپتوس در محیط های پیش کشتی و همکشتی بکار بردند (۱۳). Sivanandhan و همکاران (۲۰۱۶) غلظت ۱۵۰ میکرومولار در لیتر استوسرینگون در محیط همکشتی را به عنوان غلظت بهینه در انتقال ژن به *H. enneaspermus* گزارش نمودند (۳۵). همچنان که در نتایج تحقیقات دیگر نیز مشهود است غلظت بهینه استوسرینگون جهت انتقال ژن در گیاهان مختلف متفاوت است، همچنین این غلظت بهینه در گیاه مورد نظر می تواند تحت تاثیر اثر متقابل آن با سایر فاکتورهای موثر در انتقال ژن (سویه آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح، تیمار پیش کشتی و ...) و همچنین زمان کاربرد آن (محیط پیش کشتی، محیط تلقیح یا محیط همکشتی) قرار گیرد.

یکی از دیگر از عوامل کلیدی در موفقیت انتقال ژن مدت زمان تلقیح ریزنمونه ها در محلول آگروباکتریوم است و بنظر می رسد بسته به نوع ریز نمونه و سن آن، گونه گیاهی و حتی ژنوتیپ گیاهی مورد استفاده، سویه آگروباکتریوم، نوع و ترکیبات محیط کشت، نحوه تلقیح و دمای تلقیح و سایر عوامل انتقال ژن، این مدت زمان از ۲-۶۰ دقیقه متغیر باشد (۳۵)، در نتیجه پیدا نمودن مدت زمان تلقیح مناسب عاملی موثر در انتقال ژن می باشد. Jha و همکاران (۲۰۱۱) ۳۰ دقیقه را به عنوان مدت زمان بهینه تلقیح جهت انتقال ژن به گیاه *Pennisetum glaucum* گزارش نمودند (۱۶)، همچنین Rajesh و همکاران (۲۰۱۳) مدت زمان تلقیح ۲۰ دقیقه را به عنوان زمان بهینه برای انتقال ژن به گیاه دارویی *P. hexandrum* گزارش دادند (۲۸). Yadav و همکاران (۲۰۱۲) مدت زمان های تلقیح ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه را جهت انتقال ژن annexin 1bj به گیاه Vignaradiate بکار بردند و مدت زمان تلقیح ۱۵ دقیقه را به عنوان بهترین تیمار در این گیاه گزارش نمودند (۳۷). در تحقیق حاضر نیز بیشترین گیاهان باززا شده از مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه حاصل شد هر چند تفاوت معنی داری بین تعداد گیاهان باززا شده از مدت زمان های تلقیح ۲۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه وجود نداشت، لذا از این لحاظ نتایج تحقیق حاضر مطابق با تحقیقات قبلی انجام شده در گیاهان دارویی دیگر بود.

یکی از روش های موثر القای تنش اسمزی در گیاهان استفاده از پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی بالا (PEG 6000-8000) می باشد. سودائی زاده و همکاران (۱۳۹۴) از غلظت های مختلف PEG6000 جهت ایجاد تنش خشکی در سطوح ۰/۵-، ۰/۹-، ۱/۴۵- و ۲/۱- مگاپاسکال در گیاه شاهی (*Lepidium sativum* L.) استفاده کرده و گزارش نمودند که بذور دارای موسیلاژ شاهی نسبت به بذور بدون موسیلاژ به میزان کمتری تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفتند (۳). Rohamare و همکاران (۲۰۱۴) اثر تنش های اسمزی ۰/۰۵-، ۰/۱-، ۰/۱۵- و ۰/۲- مگاپاسکال حاصل از غلظت های مختلف PEG را در مراحل جوانه زنی و گیاهچه گیاه دارویی زنیان مورد برسی قرار دادند و بالاترین اثر منفی بر خصوصیات جوانه زنی و صفات موروفولوژیکی را در فشار اسمزی ۰/۲- مگاپاسکال گزارش نمودند (۲۹). در تحقیق حاضر نیز اثر منفی و جبران ناپذیر تنش اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال بر گیاه غیرتراریخت زنیان مشهود بود، با این حال، حضور ژن *fld* در گیاه دارویی زنیان به خوبی اثر منفی تنش اسمزی ناشی از PEG را به تاخیر انداخت و باعث تحمل طولانی تر گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت در برابر تنش اسمزی شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Sheikh Beig Goharrizi (۲۰۱۶) نیز اثر مثبت ژن *fld* در مقاومت جنین های سوماتیکی گردو به تنش اسمزی ناشی ۵-۱۰٪ PEG را گزارش نمودند (۳۱).

نتیجه گیری نهایی

غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین کمترین غلظت برای جلوگیری از رشد و تولید کالوس در هیپوکوتیل های غیر تراریخت زنیان بود. رقت

آگروباکتریوم ۰/۶–۰/۸، سویه GV3101 آگروباکتریوم، غلظت ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک تیمنتین، ۲۵۴/۸ میکرومولار در لیتر استوسرینگون و ۳۰ دقیقه زمان تلقیح به عنوان بهترین پارامترهای انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم حامل سازه ژنی p6U با ژن انتخابی HPT با بیشترین تعداد گیاهان باززا شده شناسایی شدند. تراریختی گیاه دارویی زنیان با ژن *fld* باعث افزایش تحمل به تنش اسمزی نسبت به گیاه غیرتراریخت شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کمک مالی شماره ۹۵۰۶۲۰ ستاد توسعه زیست فناوری انجام شده است. از سازمان تحقیقات جنگلها و مراتع جمهوری اسلامی ایران جهت فراهم نمودن بذور زنیان و از جناب آقای دکتر محمد حسن عصاره دبیر ستاد توسعه علوم و فن آوری گیاهان دارویی و طب سنتی برای معرفی گیاه دارویی زنیان و همچنین از گروه زیست شناسی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی هانا دانشگاه پالاچکی جمهوری چک جهت فراهم نمودن شرایط آزمایشگاهی انجام بخشی از تحقیق حاضر تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. اسعدی ع.م، حشمتی غ.ع. ۱۳۹۴. اثر تیمارهای مختلف بر شکستن خواب و تحریک جوانه زنی بذر آویشن خراسانی (*Thymus transcaucasicus* Ronn.) و آویشن شیرازی (*Zataria moltiflora* Boiss.). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۸، شماره ۱. ص: ۱۲–۲۲.

۲. توحید فر م، محسن پور م. ۱۳۸۹. فاکتورهای موثر در تراریزش پنبه با استفاده از آگروباکتریوم. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. جلد ۲، شماره ۱. ص: ۲–۲۴.

۳. سودائی زاده ح، مصلح آرائی ا، تجملیان م. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر موسیلاژ بر میزان مقاومت به خشکی گیاه شاهی (*Lepidium sativum* L.) در مرحله جوانه زنی و رشد اولیه. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۸، شماره ۵. ص: ۱۰۱۷–۱۰۲۷.

۴. عبدالملکی س، توحید فر م، فتوت ر، صالحی جوزانی غ.م. ۱۳۹۲. تراریزش گیاه گندم با استفاده از ژن *fld* به روش تفنگ ژنی. مجله پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. جلد ۵، شماره ۱۱. ص: ۱–۱۰.

۵. کاظمی ر.ا، امانی ج، شرفی ع، عباسی ع، سلمانیان ع.ه.۱۳۹۳. بهینه سازی تراریختی در گیاه کلزا (*B. napus* L.) با کنترل تولید گاز اتیلن و افزایش تدریجی عامل انتخاب کننده. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. جلد ۲۷، شماره ۴. ص: ۵۷۵–۵۸۹.

6- Akbari G. A, Amirinejad M, Baghizadeh A, Allahdadi I, Shabazi M. 2013.Effect of Zn and Fe foliar application on yield, yield components and some physiological traits of Cumin (*Cuminum cyminum*) in dry farming. International Journal of Agronomy and Plant Production 4 (12): 3231-3237.

7- Ashraf M, Orooj A. 2006. Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). Journal of Arid Environments 64:209–220.

8- Azhar N, Hussain B, Ashraf M. Y, Abbasi K.Y. 2011. Water stress mediated changes in growth, physiology and Secondary metabolites of desi ajwain (*Trachysperum ammi* L.). Pak. J. Bot 43: 15-19.

9- ChabiSika K, Kefela T, Adoukonou-Sagbadja H, Ahoton L, Saidou A, Baba-Moussa L, Baptiste L.J, Kotconi S, Gachomo E. 2015. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. Plant Gene 1: 43-45.

10- Charles D.J, Simon J.E, Shock C.C, Feibert E.B.G, Smith R.M.1993. In: Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of Artemisia annuaL. (Eds.): J. Janick and J.E. Simon. Proceedings of the second national symposium: New crops, exploration, research and commercialization. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 640-643.

11- Chatterjee T.K. 2000. Herbal Options. Books and Allied Pvt. Ltd., Calcutta, India, pp. 153.

12- De Clercq J, Zambre M, VanMontagu M, Dillen W, Angenon G. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Rep 21:333–340.

13- Fernand, S C, Goodger J Q D, Gutierrez S.S, Johnson A, Woodrow I E. 2016. Plant regeneration through indirect organogenesis and genetic transformation of Eucalyptus polybractea R.T. Baker. Industrial Crops and Products 86:73–78.

14- Jaleel C.A, Sankar B, Murali P.V, Gomathinayagam M, Lakshmanan G.M.A, Panneerselvam R. 2008.Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in Catharanthusroseus; impacts on ajmalicine accumulation. Colloids Surf. B: Biointerfaces 62: 105-111.

15- Jasrai Y.T, Barot S.M, Mehta A.R.1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in hypocotyls explants of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. Plant Cell Tissue Organ Cult 29: 57–60

16- Jha P, Shashi S, Rustagi A, Agnihotri P, Kulkarni V, Bhat V. 2011. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. using shoot apices as explant source. Plant Cell Tiss Organ Cult 107:501–51.

17- Kim M J, An D J, Moon K B, Cho H S, Min S R, Sohn J H, Jeon J H, Kim H S. 2016. Highly efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Helianthus tuberosus* L. Industrial Crops and Products 83: 670–679.

18- Krishnamoorthy V, Madalageri M.B. 1999. Bishop weed (*Trachyspermum ammi*): an essential crop for north Karnatka. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 21 (4):996–998.

19- Kulkarni S, Shobha N, Hongal S, Ahmed T, Hiremath V, Siddappa R. 2015. Fixing of optimal concentration of PEG 6000 for induction of moisture stress in coriander (*Coriandrum sativum* L.). International Journal of Tropical Agriculture 33(2): 1351-1353.

20- Lipp F.J. 1996. The efficacy, history, and politics of medicinal plants. Alternative Therapies in Health and Medicine 2: 36–41.

21- Moussavi-Nik S.M, Salari M, Mobasser H.R, Keshavarzi M.H.B. 2011.The effect of different irrigation intervals and mineral nutrition on seed yield of Ajowan (*Trachyspermum ammi*).Scholars Research Library 2 (6):692-698.

22- Naing A H, Park K I, Lim S H, Kim C K. 2014. Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum. Plant Omics Journal 7(4):237-243.

23- Naing A H, Ai T N, Jeon S M, Lim S H, Kim C.K. 2016. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of recalcitrant chrysanthemum cultivar Shinma. Acta Physiol Plant 38:38, 9p. DOI 10.1007/s11738-015-2059-5,

24- Neffati M, Sriti J, Hamdaoui G, Kchouk M, Marzouk B. 2010. Salinity impact on fruit yield, essential oil composition and antioxidant activities of (*Coriandrum sativum*) fruit extracts. Food Chem 124: 221- 225.

25- Niazian M, Sadat Noori, S.A, Galuszka P, Tohidfar M, Mortazavian S.M.M. 2017. Genetic stability of regenerated plants via indirect somatic embryogenesis and indirect shoot regeneration of *Carum copticum* L. Industrial Crops and Products 97:330-337.

26- Pandey S, Mishra A, Kumar Patel M, Jha B. 2013.An Efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration in cumin (*Cuminum cyminum* L.). Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-013-0349-1, 9pp.

27- Purohit S, Kothari S.L. 2007. Direct somatic embryogenesis from cotyledon and cotyledonary node explants in bishop's weed *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. In Vitro Cell DevBiol - Plant 43:154–158.

28- Rajesh M, Jeyaraj M, Sivanandhan G, Subramanyam K, Mariashibu TS, Mayavan S, Dev K, Anbazhagan VR, Manickavasagam M, Ganapathi A. 2013. *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Podophyllum hexandrum* Royle (syn. P.emodi Wall. ex Hook.f. and Thomas). Plant Cell Tiss Organ Cult 114:71–82.

29- Rohamare Y, Dhumal K.N, Nikam T.D. 2014. Response of Ajowan to water stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000 during seed germination and seedling growth. Journal of Environmental Biology 35:789-793.

30- Samara Shekar Reddy S, Singh B, Peter A J, Venkateswar Rao T. 2016. Production of transgenic local rice cultivars (*Oryza sativa* L.) for improved drought tolerance using

Agrobacterium mediated transformation. Saudi Journal of Biological Sciences Article in press.

31- Sheikh Beig Goharrizi M.A, Dejahang A, Tohidfar M, Izadi Darbandi A, Carillo N, Hajirezaei M.R, Vahdati K. 2016. *Agrobacterium* mediated transformation of somatic embryos of persian walnut using *fld* gene for osmotic stress tolerance. Journal of Agricultural Science and Technology 18:423-435.

32- Singh A.K, Li H, Sherman L.A. 2004. Microarray analysis and redox control of gene expression in the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. Physiologia. Plantarum 120: 3-27.

33- Singh D, Choudhary S.P. 2008. Evaluation of ajowain (*Trachyspermum ammi* L.) genotypes suitable for semi arid regions. Journal of Spices and Aromatic Crops 17(2):167-171.

34- Sivanandhan G, KapilDev G, Theboral J, Selvaraj N, Ganapathi A, Manickavasagam M. 2015. Sonication, vacuum infiltration and thiol compounds enhance the *Agrobacterium*-mediated transformation frequency of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plos One DOI:10.1371/journal.pone.0124693,23pp.

35- Sivanandhan G, Arunachalam C, Vasudevan V, Kapildev G, Sulaiman AA, Selvaraj N, Ganapathi A, Lim P Y. 2016. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell. PlantBiotechnol Rep 10:49–60.

36- Tognetti, V. B., Palatnik, J. F., Fillat, M. F., Melzer, M., Hajirezaei, M. R., Valle, E. M., Carrillo, N. 2006. Functional Replacement of Ferredoxin by a Cyanobacterial Flavodoxin in Tobacco Confers Broad-range Stress Tolerance. Plant Cell Online, 18:2035-2050.

37- Yadav S K, Katikala S, Yellisetty V, Kannepalle A, Narayana J L, Maddi V, Mandapaka M, Shanker A.K, Bandi V, Bharadwaja K P. 2012. Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of cotyledonary node explants of Vignaradiate. SpringerPlus 1:59, 8 pp.

38- Zobayed S.M.A, Afreen F, Kozai T. 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. Environ. Exp. Bot 59: 109-116.

Optimization of *Agrobacterium*-mediated gene transformation in Ajowan medicinal plant (*Trachyspermum ammi* L.) using *fld* gene

Niazian M.[1], Sadat Noori S.A.[1], Tohidfar M.[2], Galuszka P.[3], Mortazavian S.M.M.[1]

[1] **Agronomy and Plant Breeding Science Dept., College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, I.R. of Iran**

[2] **Biotechnology Dept., Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran**

[3] **Molecular Biology Dept., Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agriculture Research, Palacky University, Olomouc, Czechia**

Abstract

To optimize gene transformation condition in ajowan medicinal plant effect of individual parameters such as optical density of *Agrobacterium* cell culture, *Agrobacterum* strain, type of antibiotic to elimination of *Agrobacterium*, acetosyringone concentration and inoculation duration was investigated using p6U-Ubi-FVT1 plasmid contain HPT gene as selectable marker and *fld* gene. 20 mg/L of hygromaycin was identified as minimum concentration of this selectable agent to prevent of callus induction in non-transgenic cells of ajowan. Interaction effect of optical density of A*grobacterium*, *Agrobacterium* strain and type of *Agrobacterium* killing antibiotic on number of regenerated plant was significant at 1% probability level and less inhibitory effect on regenerated plant was related to OD_{600}=0.6-0.8×GV3101 *Agrobacterium* starin×160 mg/L of timentin antibiotic. More regenerated plant resistance to hygromaycin was achieved by 254.8 µm/L of acetosyringone. More regenerated plant was achieved from 30 minutes inoculation duration than 1 and 20 minutes inoculation duration, nonetheless there was no statistically significant difference between means of regenerated plant from 20 and 30 minutes inoculation duration. The presence of the target gene was evaluated using PCR analysis on regenerated plants. Results of PCR analysis confirm entity of at least one copy of the target gene on plants genome. The superiority of transgenic plants against non-transformed plants for tolerance to -0.3 Mpa osmotic stress was proved through osmotic stress tolerance bioassay.

Key words: *Agrobactrium*, Ajowan, Flavodoxin, Hygromaycin, Transformation Factors.