

بهینه کردن انتقال ژن نایسین به واسطه‌ی آگروباکتریوم در گیاه هویج

معصومه فلاح زیارانی^۱، مسعود توحیدفر^۱ و محمد حسین میرجلیلی^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده گیاهان دارویی، گروه گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

نایسین یک آنتی‌باکتریال طبیعی است که به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی و داروها استفاده می‌شود. تولید گیاهچه‌ی تراریخته هویج حاوی پروتئین نوترکیب نایسین به واسطه‌ی آگروباکتریوم، سویه‌ی LBA4404 و پلاسمید pBI121 بررسی شد. پلاسمید pBI121 حاوی ژن‌های گزارشگر NPTII به ترتیب با پیشبرهای CaMV35S و ترمیناتور NOS می‌باشد. به منظور تهیه‌ی پلاسمید نوترکیب، ابتدا ژن نایسین از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس شناسایی شد. پس از بهینه‌سازی کدونی، بین دوسایت برشی *SacI* و *BamHI* در وکتور pBI121 کلون سازی شد. ریزنمونه‌های ریشه، برگ، ساقه و گره-ی هویج با سوسپانسیون آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب با غلظت‌های مختلف مایه تلقیح (با OD ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱) آلوده شدند و در زمان‌های مختلف هم‌کشتی (۰، ۱، ۲ و ۳ روز) قرار داده شدند و بعد از سه روز در محیط کشت کالوس‌زایی حاوی کانامایسین و سفاتاکسیم کشت شدند. کالوس‌هایی که قادر به رشد روی محیط گزینش بودند، انتخاب و به محیط باززایی حاوی کانامایسین و سفاتاکسیم در سه غلظت ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. کالوس‌زایی در ۴۰ درصد ریزنمونه‌ها مشاهده شد. ۵۵ درصد کالوس‌های مقاوم، جنین‌زا شدند. جنین‌های تولید شده پس از جوانه زنی به محیط باززایی منتقل شدند. بیشترین درصد گیاهان مقاوم به کانامایسین (۴۵ درصد) مربوط به استفاده از ریزنمونه-ی ساقه و غلظت باکتری ۰/۶ تا ۰/۸ و زمان‌های مختلف هم‌کشتی ۱ و ۲ روز و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی گیاهان به آگروباکتریوم و تأیید صحت انتقال ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Vir Gene* انجام و صحت انتقال ژن تأیید شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نشان داد که ۶۰ درصد گیاهان تراریخته فرضی، حداقل یک نسخه از ژن‌های *nptII* و نایسین را در ژنوم خود دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: نایسین، گیاه تراریخته، هویج، لاکتوکوکوس لاکتیس، *nptII*

* نویسنده مسئول، تلفن: +۰۰۹۸۹۱۲۴۶۲۷۰۱۴، پست الکترونیکی: m_tohidfar@sbu.ac.ir

مقدمه

مواد نگهدارنده، موادی هستند که به منظور جلوگیری، کاهش یا محافظت رشد میکروب‌ها و یا فساد ناشی از تغییرات شیمیایی، به مواد غذایی یا دارویی در دوره‌ی نگهداری و در هنگام مصرف، در فرمولاسیون آن اضافه می‌شوند (۳۷). انواع مختلفی از نگهدارنده‌ها در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات یا منشأ طبیعی دارند و یا به صورت سنتتیک (شیمیایی) تولید می‌شوند

رشد میکروارگانیسم‌ها در غذا موجب واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی می‌شود که در نتیجه‌ی آن تغییراتی در رنگ، طعم، بافت، غلظت، ارزش غذایی و سلامت آن ایجاد می‌کند. آلودگی میکروبی علت اصلی فساد مواد غذایی است. رشد میکروبی ناخواسته در غذاها به سلامت افراد و به اقتصاد ملی ضرر می‌زند. بنابراین، جلوگیری یا تأخیر در ایجاد تغییرات مختلف در یک محصول غذایی ضروری است.

عصاره‌ی گیاهان دارویی به منظور کنترل باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده شده است. Elisha و همکاران در سال ۲۰۱۷ از عصاره‌ی برگ‌های ۹ گیاه شامل *Hypericum roeperianum* G.W. Schimp.exA. Rich. var. (Hypericaceae, PRU 120126), *Roeperianum*, *Cremastra triflora* (Thonn.) K., Schum (Rubiaceae, PRU 120129), *Heteromorpha arborescens* (Spreng.) Chan. &Schltdl (Apiaceae, PRU 120026), *Pittosporum viridiflorum* Sims (Pittosporaceae, PRU 120025), *Bolusanthus speciosus* (H. Bolus) Harms (Fabaceae, PRU 120027), *Calpurnia aurea* (Aiton) Benth ssp aurea (Fabaceae, PRU 120125), *Maesa lanceolata* Forssk (Maesaceae PRU120125), *Elaeodendron croceum* (Thunb.) DC (Celastraceae, PRU 120127) و *Morus mesozygia* Stapf ex A.Chev (Moraceae, PRU 120128) و همکاران از عصاره‌ی گیاهان *Punica granatum*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiberofficinales aromaticum* و *Thymus vulgaris* استفاده کردند (۲). نتایج، اثرات بازدارندگی عصاره‌ی این گیاهان بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی شامل اشرشیاکولای و گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس را ثابت کرد. Manandhar و همکاران از عصاره‌ی متانولی گیاهان دارویی (*Oxalis corniculata*, *Artemisia vulgaris*, *Cinnamomum tamala*, and *Ageratina adenophora*) (۳۳، ۳۸) و *Atefl* و همکاران از عصاره‌ی برگ گیاهان دارویی *Moringa oleifera* L. و *Matricaria recutita* استفاده کردند (۲۹) و نتیجه مانند تحقیقات قبلی بود.

باوجود اهمیت نایسین، تاکنون پروتئین نایسین به گیاه منتقل نشده است (۲۳). هدف از این تحقیق بررسی تولید پروتئین نایسین در گیاه هویج با استفاده از چهار ریزنمونه‌ی مختلف توسط آگروباکتریوم به روش باززایی غیرمستقیم می‌باشد.

مواد و روشها

دریافت توالی ژن نایسین و بهینه‌سازی کدونی ژن نایسین: توالی ژن نایسین از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس از سایت NCBI با کد MG913135.1 دریافت شد. بهینه-

(۲۷). بنزوات‌ها، نیتريت‌ها، سولفیت‌ها، سوربات‌ها نمونه‌هایی از نگهدارنده‌های شیمیایی هستند که در مواد غذایی استفاده می‌شوند (۳۰). برخی از نگهدارنده‌های مواد غذایی مانند دی اکسید گوگرد و نیتريت‌ها مضر هستند. دی اکسید گوگرد باعث تحریک لوله‌های تنفسی و نیتريت سرطان‌زا است (۲۷). نگرانی‌هایی در مورد اثرات مضر افزودنی‌های شیمیایی وجود دارد. از جمله مشکلات استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی آسیب به کبد به دلیل فشار وارده به کبد برای دفع این نگهدارنده‌ها و افزایش ابتلا به سرطان می‌باشد (۲۷). به منظور رفع این مشکلات، امروزه نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. نگهدارنده‌های طبیعی، منشأ گیاهی یا جانوری دارند و یا از منابع میکروبی حاصل می‌شوند که این نگهدارنده‌ها به نگهدارنده‌های سبز معروف هستند (۸ و ۳۶). از بین نگهدارنده‌های طبیعی، نگهدارنده‌های تولید شده توسط میکروب‌ها مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. نمونه‌ای از نگهدارنده‌های میکروبی شامل اسیدها، باکتریوسین‌ها، الکل و دی استیل می‌باشند (۵ و ۳۶).

تعداد زیادی از باکتری‌های لاکتیک اسید و دیگر باکتری‌های گرم مثبت پپتیدهایی تولید می‌کنند که فعالیت ضد میکروبی دارند (۲۲). این پپتیدها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌ها هستند. یک کلاس از این پپتیدهای ضد میکروبی که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند لانتی‌بیوتیک‌ها هستند (۷). برجسته‌ترین لانتی‌بیوتیک که در حال حاضر استفاده می‌شود نایسین است که توسط چندین استرین از لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود (۱۰، ۱۳، ۱۸، ۱۹ و ۳۴). نایسین به عنوان ماده‌ی نگهدارنده‌ی غذایی به مدت طولانی در کشورهای مختلف به طور گسترده استفاده شده و امروزه به علت گرایش مصرف‌کنندگان به نگهدارنده‌های زیستی، مصرف این مواد در صنایع غذایی افزایش یافته است (۱۳ و ۲۶).

تاکنون ژن ضد میکروبی به گیاه منتقل نشده است. اما از

تولیدشده پس از بهینه‌سازی کدون، فعالیت پروتئین جدید بوسیله‌ی سایت (<http://blocks.fhrc.org>) Blocks نیز بررسی شد.

طراحی سازه: سازه‌ی طراحی شده حاوی ژن نایسین با عناصر تنظیمی مناسب جهت تولید هویج حاوی پروتئین ضدباکتری در شکل ۱ آورده شده است (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه‌ی فیزیکی پلازمید نو ترکیب pBI121 حاوی ژن ضد باکتری نایسین. Kan R: نشانگر مقاومت به کانامایسین. KDEL: پپتید نشانه برای جمع‌آوری پروتئین در پلاستید. توالی Kozak: برای افزایش بیان ژن در گیاه. پروموتور CamV35s خاتمه دهنده‌ی NOS. ژن نایسین از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس که به منظور بیان بیشتر در گیاه بهینه‌سازی شده است.

ابتدا ژن نایسین حاوی توالی کزاک و توالی نشانه‌ی KDEL بین دو سایت برشی *BbmHI* و *SacI* در پلازمید pBI121 کلون شد. به منظور جمع‌آوری پروتئین نایسین در شبکه آندوپلاسمی، توالی نشانه‌ی KDEL به انتهای ژن اضافه شد. ژن نایسین تحت پیشر *CaMV35S* و ترمیناتور NOS قرار گرفت. سازه‌ی نو ترکیب، ابتدا در باکتری *E. coli* استرین *Dh5α* تراریخت شد. کلونی‌های رشد کرده در محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین غربال شدند. در مرحله‌ی بعد پلازمید pBI121 نو ترکیب به آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 تراریخت شد (۱). به منظور غربالگری از محیط (LB) Luria-Bertani حاوی کانامایسین و ریفامپسین استفاده شد و کلون‌های رشد کرده در این محیط انتخاب شدند.

سپس با آب دو بار تقطیر شده سه تا پنج بار شست و شو داده شده و به مدت یک شب بذره‌های ضد عفونی شده در آب دو بار تقطیر شده قرار داده شدند. بذرها روی محیط (Murashige and Skoog) 1/2MS محتوی ساکارز ۳ و ۰/۸ درصد آگار کشت شدند.

انتقال ژن: از آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 یک کلونی درفالكون ۵۰CC حاوی ۵CC محیط LB مایع و آنتی-بیوتیک (بسته به نوع سازه‌ی مورد استفاده متفاوت است) ریفامپسین (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شد. سپس فالكون برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور rpm ۲۲۰ قرار گرفت. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری رشد کرده به ۵CC محیط LB مایع حاوی ریفامپسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین اضافه شده و برای حدود ۷ ساعت بر روی شیکر در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا غلظت باکتری به optical density (OD) ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ برسد. ریزنمونه‌های برگ، ساقه،

سازگی کدونی به منظور بیان این ژن در گیاه با استفاده از سایت (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) انجام شد (۳ و ۲۰).

پس از بهینه‌سازی به منظور اطمینان یافتن از عدم تغییر فعالیت پروتئین جدید، توالی جدید در سایت NCBI به منظور یافتن توالی‌های مشابه مورد جست و جو قرار گرفت. به منظور تأیید عدم تغییر فعالیت پروتئین

ضد عفونی بذرها: بذرها هویج رقم Nantes از موسسه‌ی اصلاح نهال و بذرها کرج تهیه شد. به منظور ضد عفونی، بذرها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۹۰ درصد و سپس ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت ۵ درصد قرار داده شدند.

رشد کرده در این محیط انتخاب شدند.

ریشه و گره گیاه هویج ۱۴ روزه در محلول باکتری به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از خشک کردن با کاغذ صافی، هم‌کشتی نمونه‌ها به مدت صفر، یک، دو و سه روز در محیط کشت (نمک‌های MS محتوی ساکارز ۳ و ۰/۸ درصد آگار) در تاریکی انجام شد. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی حاوی نمک‌های MS، ۱ میلی‌گرم در لیتر (NAA) Naphthaleneacetic acid و همراه با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۸۰۰ لوکس انتقال داده شدند. برای حذف احتمالی آلودگی آگروباکتریوم از آنتی‌بیوتیک سفاتاکسیم در غلظت ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ۵ تا ۶ هفته، پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی، کالوس‌های تشکیل شده در محیط حاوی کانامایسین به منظور جنین‌زایی به محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین و سفاتاکسیم به مدت ۲-۳ هفته منتقل شدند. جنین‌ها به منظور تولید گیاهچه به محیط مشابه محیط قبلی منتقل شدند. شرایط نوری در تمام مراحل رشد یکسان (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی بود). برای انتقال

گیاهچه‌ها به گلدان به نسبت ۱:۱:۱ ماسه: ورمیکولیت: پیت استفاده شده و هر روز گیاهچه‌ها با آب اسپری شدند تا ریشه‌ی هویج تشکیل و گیاه کامل تشکیل شود. درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در تمام مراحل بررسی شد.

تجزیه‌ی PCR گیاهان تراریخت احتمالی: به منظور استخراج DNA از برگ از روش تغییر یافته‌ی Dellaporta استفاده شد (۹ و ۶). برای غربال اولیه‌ی گیاهان تراریخت احتمالی و تأیید اولیه حضور ژن در آنها از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن و همچنین آغازگرهای اختصاصی نشانگر کانامایسین استفاده شد. PCR (Polymerase chain reaction) در حجم ۲۵ میکرولیتر (۱۲/۵ میکرولیتر از اجزای تشکیل دهنده واکنش) (Master) (۱ میکرولیتر DNA ng/μl - ۵۰- ۱۰۰)، ۱ میکرولیتر آغازگر رو به جلو (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس (۱۰ پیکومول)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل) انجام شد.

آغازگرهای استفاده شده به منظور انجام PCR برای نشانگر *NPTII*، ژن نایسین و ژن *VirG* در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رو به جلو و معکوس نشانگر *NPTII*، ژن نایسین و ژن *VirG*

نام آغازگر	توالی آغازگر رو به جلو	توالی آغازگر معکوس
NPTII	3'- GAACAAGATGGATTGCACGC -5'	5'- GAAGAACTCGTCAAGAAGGC -3'
NISIN	3'- CTGCTACTTGCCATTGCTC -5'	5'- AGCCTCTCTAACCATCTGTG -3'
VirG	3'- ATGCCCGATCGAGCTCAAGT -5'	5'- TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA -3'

چرخه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ سانتی‌گراد درجه به مدت ۱ دقیقه و مرحله‌ی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. به منظور اطمینان از عدم آلودگی گیاهان تراریخت به آگروباکتریوم، DNA استخراج شده بوسیله‌ی آغازگرهای اختصاصی ژن *vir*، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شدند. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *vir* به صورت زیر می‌باشد. مرحله‌ی اول شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴

شرایط انجام PCR برای ژن *nptII* به صورت زیر می‌باشد. مرحله‌ی اول شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله‌ی دوم شامل ۳۵ چرخه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله‌ی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه انجام شد. برای آغازگرهای ژن نایسین برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله‌ی دوم شامل ۳۵

باند ۷۸۵ bp در محصول PCR آشکار شد. اما در آگروباکتريوم غيرتراريخت و كنترل منفي باندهای مورد نظر مشاهده نشدند كه نشان دهنده نوتركيب باكتري است.

انتقال ژن و تجزيه‌ی PCR گیاهان تراريخت احتمالی:
بذرهای ضدعفونی شده بعد از هفت روز جوانه زدند و گیاهان ۱۵ روزه جهت تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد. کارایی ضدعفونی ۱۰۰ درصد بود و هیچ‌گونه آلودگی قارچی و باکتریایی مشاهده نشد.

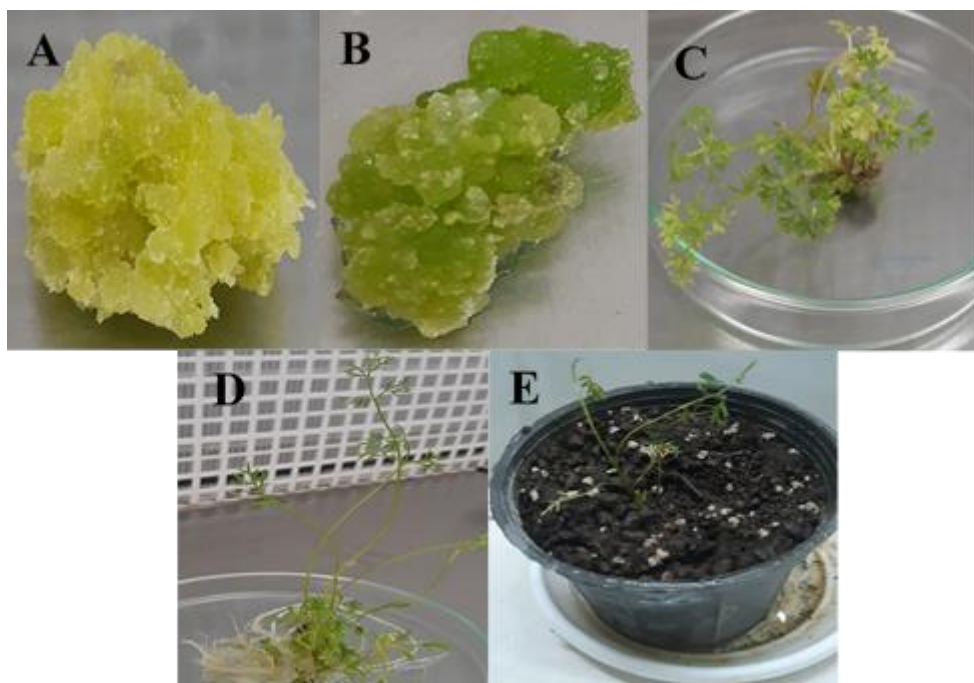
پس از غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در مایع تلقیح و قراردادن ریزنمونه‌ها در محیط انتخابی ریزنمونه‌هایی كه ژن مورد نظر را دریافت نكرده‌اند سفید شده و از بین رفتند. ریزنمونه‌هایی كه در محیط انتخابی سالم مانده‌اند به منظور كالوس‌زایی، جنین‌زایی و تولید گیاهیچه در محیط مشابه محیط قبلی هر دو هفته یکبار واكشت شدند (شکل ۲، A, B, C).

درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دوم شامل ۳۵ چرخه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه انجام شد.

محصولات تکثیری بوسیله‌ی الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شد و در دستگاه (Syngene) Gel Doc عکس‌برداری و برای حضور یک نوار اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

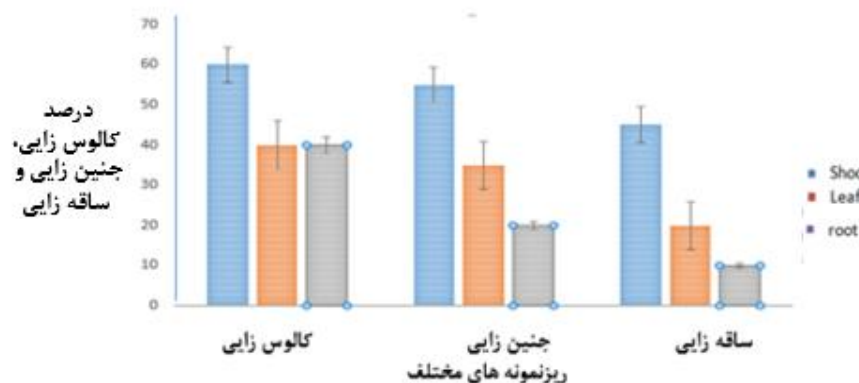
نتایج

تأیید انتقال ژن به آگروباكتريوم: به منظور تأیید انتقال ژن به آگروباكتريوم، از روش واكنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و آغازگرهای ژن نایسین استفاده شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن نایسین باند ۹۷۸ bp و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nptII*



شکل ۲- مراحل القای كالوس و باززایی هویج‌های تراريخته با وركتور pBI121 حاوی ژن نایسین. A. القای كالوس تراريخته‌ی احتمالی در محیط انتخابی، B. جنین‌زایی تراريخته‌ی احتمالی در محیط انتخابی C. باززایی هویج‌های تراريخت احتمالی در محیط انتخابی D. گیاهیچه‌ی ریشه‌دار شده از ریزنمونه‌ی ساقه در محیط انتخابی E. گیاه تراريخته احتمالی در گلدان در شرایط گلخانه.

ریزنمونه‌ی گی‌گره به دست آمد. بعد از ریزنمونه‌ی ساقه، ریزنمونه‌ی ریشه و سپس ریزنمونه‌ی برگ به ترتیب بیشترین میزان کالوس‌زایی، جنین‌زایی و ساقه‌زایی را دارد (شکل ۳).



شکل ۳- درصد کالوس‌زایی، جنین‌زایی و ساقه‌زایی از چهار ریزنمونه‌ی استفاده شده (ساقه، ریشه، برگ و گره) در محیط کشت انتخابی همراه با خطای استاندارد

جدول ۳- درصد تراریختگی در استفاده از غلظت‌های مختلف

غلظت سفاتاکسیم (میلی‌گرم در لیتر)	درصد تراریختگی (%)
۱۰۰	۲۰
۲۵۰	۶۰
۵۰۰	۳۰

در این آزمایش سه زمان تلقیح شامل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه استفاده شد. در زمان تلقیح ۱۵ دقیقه به دلیل آلودگی ریزنمونه‌ها به آگروباکتریوم و از بین رفتن بافت درصد تراریختگی (۳۰ درصد) کاهش یافت، اما در زمان تلقیح ۵ و ۱۰ دقیقه درصد تراریختگی (۶۰ درصد) بیشتر بود و هیچ گونه آلودگی آگروباکتریوم مشاهده نشد. این دو زمان تلقیح از نظر تراریختگی تفاوتی با هم نداشتند.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد از ۵ گیاه رشد کرده در محیط انتخابی، ۳ گیاه هر دو باند مورد نظر تکثیر شده به وسیله‌ی پرایمرهای اختصاصی ژن ناپسین و پرایمرهای نشانگر کانامایسین را نشان دادند (شکل‌های ۵ و ۶).

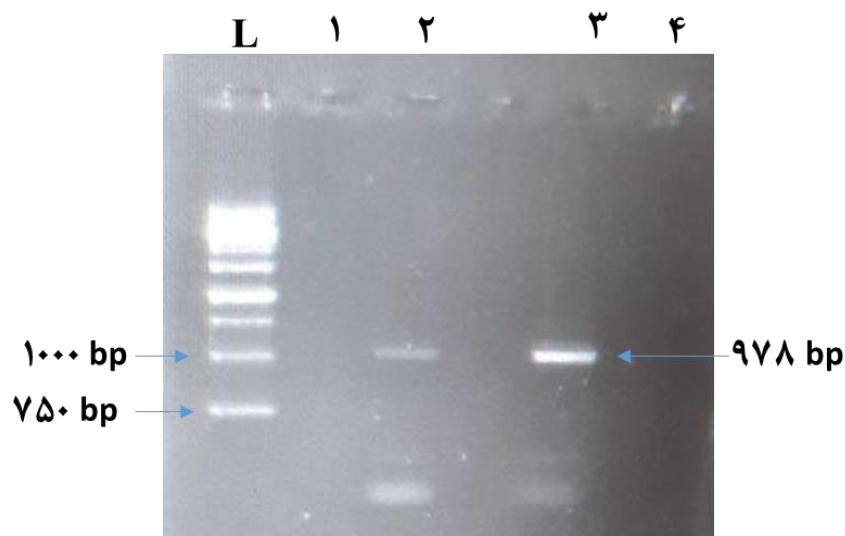
در این مراحل صفات مختلفی اندازه‌گیری شد به طوری که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۶۰ درصد)، جنین‌زایی (۵۵ درصد) و تولید گیاهچه در محیط انتخابی از ریزنمونه‌ی ساقه (۴۵ درصد) به دست آمد. کمترین میزان کالوس‌زایی، جنین‌زایی و ساقه‌زایی (صفر درصد) از

بهترین نتیجه از مایه تلقیح با غلظت ۰/۶ تا ۰/۸ به دست آمد. در غلظت ۰/۴ درصد تراریختگی به شدت کاهش یافت و در غلظت ۱ نیز به دلیل آلودگی ریزنمونه‌ها درصد تراریختگی کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۲- درصد تراریختگی در غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم

OD	درصد تراریختگی (%)
۰/۴	۱۵
۰/۸ تا ۰/۶	۶۰
۱	۳۵

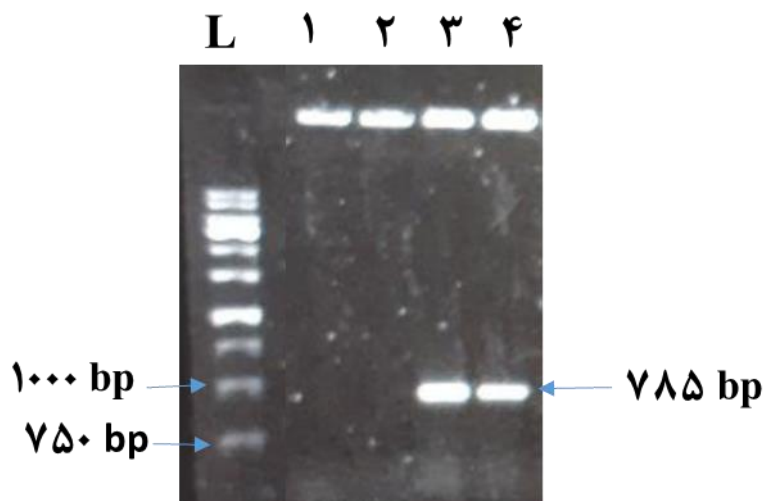
درصد تراریختگی از تعداد گیاهانی که تراریختگی در آنها ثابت شده است نسبت به کل گیاهان باززایی شده در محیط انتخابی به دست آمد. بهترین درصد تراریختگی و کنترل آگروباکتریوم از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم به دست آمد. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم به دلیل آلودگی آگروباکتریوم درصد تراریختگی کاهش یافت و در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به دلیل اثر بازدارندگی بر رشد ریزنمونه‌ها نیز درصد تراریختگی کاهش یافت (جدول ۳).



شکل ۴- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نایسین در گیاه هویج. L نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1 Kb). ۱. گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی)، ۲، ۳. گیاه تراریخته‌ی احتمالی، ۴. نمونه آب (واکنش PCR بدون DNA الگو).

و در گیاه شاهد هیچکدام از این دو باند ظاهر نشدند. وجود این دو باند در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی در مقایسه با گیاه شاهد نشان‌دهنده‌ی وجود حداقل یک نسخه از ژن نایسین در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی می‌باشد (شکل ۵ و ۶).

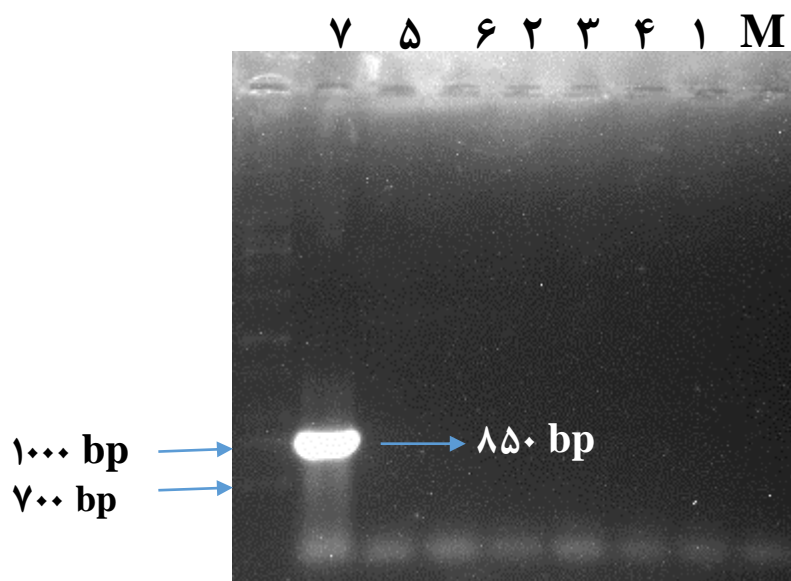
وجود باند ۹۷۸ bp در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نایسین اثبات شد. همچنین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* باند ۷۸۵ bp آشکار شد. این دو باند در سه گیاه از ۵ گیاه رشد کرده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و سفاتاکسیم آشکار شده



شکل ۵- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *nptII* در گیاه هویج. L نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1 Kb). ۱. گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی)، ۲. نمونه آب (واکنش PCR بدون DNA الگو)، ۳ و ۴. گیاه تراریخته‌ی احتمالی.

وجود باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه‌ی آگروباکتریوم و عدم وجود آن در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی نشان‌دهنده عدم آلودگی به باکتری است (شکل ۶).

به منظور اثبات عدم حضور آلودگی آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* انجام شد.



شکل ۶- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *vir* در گیاه هویج. M. نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1 Kb). ۱. آگروباکتریوم حاوی پلازمید. ۲. گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی)، ۳. نمونه آب (واکنش PCR بدون DNA الگو)، ۴-۸. گیاه تراریخته‌ی احتمالی

بهینه ممکن است گیاهان غیرتراریخت نیز رشد کنند و در غلظت‌های بیش از حد بهینه‌سازی ممکن است از باززایی گیاهان تراریخت جلوگیری شود. در نتیجه بهینه‌سازی غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده برای افزایش کارایی انتقال ژن نیاز می‌باشد (۲۴، ۲۵). در تحقیق حاضر از رقت آگروباکتریوم ۰/۶ تا ۰/۸، غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم استفاده شد. نتیجه‌ی این تحقیق مشابه نتایج تحقیقات Yadav و همکاران در سال ۲۰۱۲ است (۴۴). در حالی که Baranski و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده کردند. در تحقیق Pandey و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز بهترین تراکم سلولی به منظور انتقال ژن به گیاه دارویی زیره ۰/۶ به دست آمد (۳۰). به نظر می‌رسد فعال‌ترین مرحله رشد و تکثیر لگاریتمی سویه‌های آگروباکتریوم در این مقدار رقت حاصل می‌شود (۴۵).

در تحقیق حاضر از آگروباکتریوم تومفاسینس سویه‌ی LBA4404 استفاده شد و بهترین نتیجه از ریزنمونه‌ی ساقه به دست آمد (شکل ۲، جدول ۳). قبولی و همکاران (۱۴)،

در نهایت همانطور که در این تحقیق مشخص شد درصد تراریختگی ۶۰ درصد به دست آمد. سپس گیاهان تراریخت سازگار شدند. درصد سازگاری گیاهان نیز ۵۵ درصد به دست آمد.

بحث

کالوس‌زایی چهار ریزنمونه‌ی مختلف (ساقه، ریشه، برگ و گره) در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بررسی شد. spant همکاران در سال ۲۰۰۷ از ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳۱)، Hardegger و همکاران در سال ۱۹۹۸ از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۷)، Rafal در سال ۲۰۰۸ از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳۲)، Roderick و همکاران در سال ۱۹۸۷ از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۳۵) و Yoshihiko و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۴ و ۴۴) به منظور باززایی استفاده کردند. به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه هویج، تعیین غلظت بهینه مایه تلقیح حاوی آگروباکتریوم و غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفاتاکسیم و کانامایسین ضروری می‌باشد. در غلظت‌های کمتر از حد

سال ۱۳۹۴ می‌باشد (۱۶). اما Tokuji و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مدت دو ساعت ریزنمونه‌ها را در مایه تلقیح قرار دادند (۴۵). در این تحقیق از ۴ زمان هم‌کشتی استفاده شد. نتایج نشان داد زمان هم‌کشتی بالاتر از دو روز موجب بافت‌مردگی و در نتیجه کاهش تراریختگی می‌شود. ولی در زمان هم‌کشتی ۱ و ۲ روز بافت‌مردگی دیده نشده و در نتیجه کاهش تراریختگی مشاهده نشد. بین زمان هم‌کشتی یک و دو روز از نظر تراریختگی تفاوتی مشاهده نشد. در زمان هم‌کشتی صفر تقریباً درصد تراریختگی بسیار جزئی و نزدیک به صفر درصد بود، زیرا عدم هم‌کشتی به خاطر عدم زمان کافی به منظور انتقال DNA باعث کاهش فرایند تراریختی می‌شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق مشابه نتایج به دست آمده از تحقیق محجل کاظمی و همکاران در سال ۱۳۹۹ و Hardegger و همکاران در سال ۱۹۹۸ می‌باشد (۲۷). Tokuji و همکاران در سال ۲۰۱۴ از زمان ۵ روز هم‌کشتی استفاده کردند (۴۵). همچنین زارع و همکاران بهترین نتیجه را از زمان سه روز هم‌کشتی به دست آوردند (۴۶). در تحقیق Baranski کارایی انتقال ژن ۹۰ درصد نرخ تراریزش در مطالعه‌ی قبولی و همکاران ۳/۸ (۱۴)، در آزمایش Roderick و همکاران ۶۲ درصد (۳۵) و در تحقیق Tokuji و همکاران ۱۰ درصد بود (۴۱). اما در تحقیق حاضر درصد تراریختگی ۶۰ درصد به دست آمد.

از دلایل متفاوت بودن نتایج می‌توان به متفاوت بودن سویه‌ی آگروباکتریوم مورد استفاده، نوع واریته‌ی استفاده شده و استفاده از ریزنمونه‌های مختلف اشاره کرد (۲۴).

Baranski (۳۲) و Hardegger و همکاران (۱۷) نیز از همین سویه‌ی آگروباکتریوم در تحقیق خود استفاده کردند. اما Roderick و همکاران (۳۵) از سویه‌ی C58C1، Hiroo و همکاران (۴۵) از سویه‌ی EHA101، زارع و همکاران (۴۶) و همچنین پارسا و همکاران (۴۷) از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه‌ی A4 و سهرابی و همکاران (۳۹) از سویه‌ی MSU و ۲۶۵۶ برای انتقال ژن مورد نظر استفاده کردند. در بسیاری از آزمایش‌ها سویه‌ی LBA4404 به عنوان کارآمدترین سویه معرفی شده است (۴۲، ۴۳). سویه‌های مختلف آگروباکتریوم توانایی متفاوتی در انتقال ژن به گونه‌های مختلف گیاهی و ژنوتیپ‌های درون یک گونه دارند (۱۵).

از دیگر عوامل مهم در موثرتر بودن انتقال ژن مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها در محلول آگروباکتریوم است و به نوع و سن ریزنمونه، گونه‌ی گیاهی و حتی ژنوتیپ گیاهی مورد استفاده، سویه‌ی آگروباکتریوم، نوع و غلظت ترکیبات محیط کشت، نحوه‌ی تلقیح و دمای تلقیح بستگی دارد و باتوجه به همه‌ی این عوامل معمولاً از دامنه‌ای از ۲ تا ۶۰ دقیقه متغیر است (۱۱، ۲۸ و ۴۰).

در این تحقیق از سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه برای تلقیح استفاده شد. در زمان ۱۵ دقیقه در تعدادی از ریز نمونه‌ها آلودگی آگروباکتریوم مشاهده شد، اما در زمان‌های ۱۰ و ۵ دقیقه در هیچکدام از ریزنمونه‌ها آلودگی آگروباکتریوم ظاهر نشد. زارع و همکاران نیز از زمان ۱۰ دقیقه تلقیح بهترین نتیجه را به دست آوردند (۴۶). از نظر تراریختگی هیچ تفاوتی بین زمان‌های تلقیح ۵ و ۱۰ دقیقه دیده نشد. نتایج این تحقیق مشابه نتایج حاجی حیدر و همکاران در

منابع

- An, G., Wastson, B.D., and Chiang, C.C., 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system, *Plant Physiol*, 81, PP: 301-305.
- Ashraf, A.M., Abdulaziz, A.A.A., Khalid, S.A., Turki, M.D., Essam, N.S., and Marwah, M.B., 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, PP: 361-366.
- Buchman, W.B., Banerjee, S., and Hansen, J.R., 1988. Structure, expression and evolution of a

- gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic, *Journal of Biological Chemistry* 263, PP: 16260–16266.
- 4- Cabral, G.B., Carneiro, V.T.C., Lacerda, A.L., Valle, C.B.D., Martinelli, A.P., and Dusi, D.M.D.A., 2011. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107(2), PP: 271–282.
 - 5- Chen, L., Yuhang, H., Sanhong, F., Lizhen, M., Yi, Z., and Benjamin, K.S., 2020. Effect of three kinds of natural preservative cocktails on vacuum-packed chilled pork. *Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1002/fsn3.1535 p.
 - 6- Christian, G.C., and Claudia, S., 2020. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Stable Transformation of *Daucus carota*, *National Library of Medicine*, 10, DOI: 10.1007/978-1-4939-9952-1_24.
 - 7- De Vos, W.M., Kuipers, O.P., van der Meer, J.R., and Siezen, R.J., 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria, *Mol, Microbiol*, 17, PP: 427–437.
 - 8- Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its applications as a food preservative, *Journal of the Society of Dairy Technology*, 43, PP: 73–76.
 - 9- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II, *Plant Molecular Biology Reports*, 4, PP: 19-21.
 - 10- Dereddy, G., 2020. Antibacterial Activity of Natural Preservatives. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, Doi: 10.35248/1948-5948.20.12.441.
 - 11- Ekam, V.S., Udosen, E.O., and Chigbu, A.E., 2006. Comparative effect of carotenoid complex from Golden Neo-Life Dynamite (GNLD) and carrot extracted carotenoids on immune parameters in albino Wistar rats., *Niger, The Journal of Physiological Sciences*, 21, PP: 1-4.
 - 12- Elizabeth, M.E., Dania, O.G.A., Marisela, H., Jacquelyne, C., Jorge, A., Salazar-Gonza, L., Andrea, R.M., Gabriela, R., Teresa, G., Gladis, F., Edda, S., and Sergio, R.M., 2016. Towards the development of an oral vaccine against porcine cysticercosis, expression of the protective HP6/TSOL18 antigen in transgenic carrots cells, *Planta*, 243 (3), PP: 675-85.
 - 13- François, M., Annie, V., Saïd, B., Daniel, M., Joëlle, L., Gabriel, P., and Didier, L., 1999. Modification of Bovine β -Lactoglobulin by Glycation in a Powdered State or in an Aqueous Solution: Immunochemical Characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (11), PP: 4543–4548.
 - 14- Ghabouli, M., Bahrami, A.R., Shahriari, F.A., Zolala, J., and Mohammadi, A., 2013. Studying the Efficiency of Floral Dip Method for Genetic Transformation of Apiaceae Plants., *Journal of Horticultural Sciences*, 27, PP: 139-147.
 - 15- Guo, M., Zhang, Y.L., Meng, Z.J., and Jiang, J., 2012. Optimization of factors affecting *Agrobacterium* mediated transient expression of Micro-Tom tomatoes, *Genetics and Molecular Research*, 11, PP: 661-671.
 - 16- Hajiheidar, A., Tohidfar, M., and Mehdi Miri, S., 2015. Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*, *Journal Genetic Engineering and Biosafety*, 4, PP: 91-101.
 - 17- Hardegger, M., and Sturm, A., 1998. Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.), *Molecular Breeding*, 4, PP: 119-127.
 - 18- Horn, N., Dodd, H.M., and Gasson, M.J., 1990. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon, *Molecular Genetics and Genomics*, 228, PP: 129–135.
 - 19- Imaël Henri, N.B.H., Rodolfo, J., 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties, *Molecules*, 17, PP: 3989-4006.
 - 20- Immonen, T., Ye, S., Ra, R., Qiao, M., Paulin, L., and Saris, P.E.J., 1995. The codon usage of the *nisZ* operon in *Lactococcus lactis* N8 suggests a nonlactococcal origin of the nisin-sucrose transposon, *DNA Sequence*, 5, PP: 203–218.
 - 21- Ishaku Leo, E., Francien, S.B., Lyndy Joy, M., and Jacobus Nicolaas, E., 2017. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, PP: 133- 142.
 - 22- Jack, R.W., Tagg, J.R., and Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Microbiol Rev*, 59, PP: 171–200.
 - 23- Kaletta, C., and Entian, K.D., 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its

- peptide product, *Journal Bacteriol*, 171, PP: 1597–1601.
- 24- Kim, M.J., An, D.J., Moon, K.B., Cho, H.S., Min, S.R., Sohn, J.H., Jeon, J.H., and Kim, H.S., 2016. Highly efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Helianthus tuberosus* L., *Ind, Crops Prod*, 83, PP: 670–679.
 - 25- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, PP: 680-685.
 - 26- Liang, Z., Auke, J., van, H., Manuel, M.L., Oscar, P.K., 2016. Potentiating, the Activity of Nisin against *Escherichia coli*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 7 p.
 - 27- Michael, P.D., and Mark, A.H., 2002. This IFT Scientific Status Summary discusses the potential for microorganisms to become resistant to antimicrobials and sanitizers used in food processing, *Food Technol*, 56, PP: 10-21.
 - 28- Mohajel Kazemi, E., Pazhouhandeh, M., Jonoubi, P., and Kazemian, M., 2020. The optimization of gene transfer to tomato and the study of expression possibility of salt-tolerance gene (SOS3), *Nova Biologica Reperta*, 7(1), PP: 76-84.
 - 29- Nagwa, M.A., Sanaa, M.S., Sahar, I.N., and Yasmeen, A., 2019. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, PP: 144-151.
 - 30- Pandey, S., Mishra, A., Kumar Patel, M., and 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.
 - 31- Pant, B., and Manandhar, S., 2007. In Vitro Propagation Of C (*DAUCUS CAROTA*) L., *World Scientific Research*, Vol. 5, No, 5 p.
 - 32- Rafal, B., 2008. Genetic Transformation of Carrot (*Daucus carota*) and Other Apiaceae Species, *Transgenic Plant Journal* 2 (1): 18-38.
 - 33- Rasoul N., Mohammad M. 2016. Investigation of antibacterial properties of ethanolic extracts of four native medicinal plants of Ardebil province by two methods of disk and well diffusion. *The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*. 2016; Vol.40; No.3.
 - 34- Rauch PJG, de Vos WM (1992) Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol*. 174: 1280–1287.
 - 35- Roderick, J.S, and John, D., 1987. Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells, A useful model system for gene expression studies in plants, *Plant Molecular Biology*, 8, PP: 265-274.
 - 36- Russell, A.D., and Hugo, B., 1999. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 3rd edn. Ayliffe, Eds. Blackwell Scientific Ltd., ISBN 063 2041 43.
 - 37- Sahl, H.G., and Bierbaum, G., 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria, *Annu Rev Microbiol*, 52, PP: 41-79.
 - 38- Sarita, M., Shisir, L., and Raj, K.D., 2019. In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria, *Journal of Tropical Medicine*, 15, PP: 121-134.
 - 39- Sohrabinejad, Z., Marashi, H., Moshtaghi, N., 2017. Optimization of hairy root production in *Calendula officinalis* for production of oleanolic acid, *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31 (3), PP: 640-654.
 - 40- Sivanandhan, G., Arunachalam, C., Vasudevan, V., Kapildev, G., Sulaiman, A. A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., and Lim, P.Y., 2016. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Hybanthus enneaspermus* (L.), *F, Muell. Plant Biotechnol, Rep*, 10, PP: 49–60.
 - 41- Takaaki, K., Shigeru, S.H., Tohru, K., Takuro, N., and Shigeru, D., 2016. Distribution of eukaryotic serine racemases in the bacterial domain and characterization of a representative protein in *Roseobacter litoralis* Och 149, *Microbiology*, 162, PP: 53–61.
 - 42- Tohidfar, M., Mohammadi, M., and Ghareyazie, B., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton using a heterologous bean chitinase gene, *PCTOC*, 83, PP: 83-96.
 - 43- Yadav, S.H., Sharma, P., Srivastava, A., Desai, P., and Shrivastava, N., 2014. Strain specific *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *bacopa monnieri*, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12, PP: 89-94.
 - 44- Yadav, S.K., Katikala, S., Yellisetty, V., Kannepalle, A., Narayana, J.L., Maddi, V., Mandapaka, M., Shanker, A.K., Bandi, V., and

- Bharadwaja, K.P., 2012. Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of cotyledonary node explants of *Vignaradiate*, SpringerPlus, 1, PP: 59-67.
- 45- Yoshihiko, T., and Hiroo, F., 2014. A Rapid Method for Transformation of Carrot (*Daucus carota* L.) by Using Direct Somatic Embryogenesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (3), PP: 519-523.
- 46- Zare, N., Madani, V., Jamali, A., and Asghari, R., 2021. Factors affecting hairy roots induction efficiency via *Agrobacterium rhizogenes* and evaluation of Valerenic acid production in the hairy root culture of medicinal plant *Valeriana officinalis* L, *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*.
- 47- Parsa, M., and Zeinali, A., 2018. Effects of methyl jasmonate and jasmonic acid on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L., *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 30 (4).

Optimization of Nisin Gene Transfer by *Agrobacterium* in Carrot Plant

Fallah ziarani M.¹, Tohidfar M.¹ and Mirjalili M.H.²

¹ Dept. of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C. Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Medicinal Plants, Faculty of Medicinal Plants, Shahid Beheshti University, G.C. Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nisin is a natural antibacterial that is used as a preservative in foods and drugs. The production of transgenic carrots containing recombinant nisin protein was investigated by *Agrobacterium*, LBA4404 strain and pBI121 plasmid. PBI121 plasmid contains NPTII reporter genes with promoter CaMV35S and terminator NOS, respectively. In order to prepare recombinant plasmid, nisin gene first was identified from *Lactococcus lactis*. After codon optimization, were cloned between *bam*HI and *Sac*I in pBI121 vector. Root, leaf, stem and nods explants of carrot were inoculation with *agrobacterium* suspension containing inoculum with different concentrations (0.4, 0.6, 0.8 and 1) and were placed for different times of co-cultivation (0, 1, 2 and 3 days) and they were also cultured in callus induction medium containing kanamycin and cefotaxime. The calli that were able to grow on the selective medium were selected and were transferred to the regeneration medium containing kanamycin and cefotaxime at three concentrations of 100, 250 and 500 mg/L. Callus induction was observed in 40% of the explants. The produced embryos, after germination were transferred to the regeneration medium. The highest percentage of kanamycin resistant plants (45%) were related to the use of stem explants and bacterium concentrations of 0.6 to 0.8 and different co-cultivation times of 1 and 2 days and concentration of 250 mg/L cefotaxime. In order to ensure no contamination of plants to *Agrobacteria* and confirm the accuracy of gene transfer, polymerase chain reaction was performed using specific primers of *vir* gene and the accuracy of gene transfer was confirmed. Polymerase chain reaction was showed that 60% of hypothetical transgenic plants had at least one copy of *nptII* and *nisin* genes in their genomes.

Key words: carrot, transgenic plant, nisin, *nptII* *Lactococcus lactis*