Archive of SID

انتقال T-DNA وایجاد گیاه تراریخت داتوره (*Datura metel* L.)

طیبه همایی بروجنی[۱]، علی اکبر احسانپور[۱*] و غلامرضا اصغری[۲]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] اصفهان دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۸

چکیده

در این تحقیق، شرایط ایجاد گیاه تراریخت از *Datura metel* L با استفاده از *A. tumefaciens* حامل پلاسمید pZM1047 شامل ژنهای NPTII، و بتا گلوکورونیداز (GUS) بهینه گردید. از سوسپانسیون باکتری جهت انجام co-culture با قطعات برگ استفاده شد و سپس قطعات گیاه به محیط باززایی MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BAP، ۷۰۰ میلی گرم در لیتر سفازولین ، ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل گردیدند. بعد از ۲۰-۱۵ روز کالوسهای در حال باززایی ظاهر شدند و بعد از انتقال ساقه باززایی شده به محیط MS بدون هورمون ریشه دار شدند. انتقال ژن در گیاهان تراریخت با استفاده از PCR مورد تأیید قرار گرفت. نرخ ترانسفورماسیون حدود ۱۳ درصد به‌دست آمد. که نسبت به درصد گزارش شده توسط محققان قبلی ۲ درصد افزایش داشت.

واژه های کلیدی: داتورا متل، آلکالوئید، تراریخت، آتروپین، آگروباکتریوم، بتاگلوکورونیداز.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۱۳۵۵۲۰، پست الکترونیکی: ehsanpou@yahoo.com

مقدمه

گیاه. *Datura metel* گیاهی از خانواده سیب زمینی و جنس داتورا است. این جنس در نواحی گرم کره زمین و یا نواحی معتدل پراکنده می باشد. از نظر ترکیبات شیمیایی، آلکالوئیدهای آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاه داتوره وجود دارند (۱۸). ازآنجایی که این ترکیبات دارای اثرات آنتی موسکارینی هستند، در درمان اختلالات عصبی و ناراحتیهای قلبی کاربرد زیادی دارند (۷). اما میزان تولید آنها به صورت طبیعی کم می باشد و سنتز شیمیایی این ترکیبات نیز پیچیده است و استخراج آنها هزینه های زیادی در بر دارد. تا کنون تحقیقات فراوانی به منظور تولید آلکالوییدهای تروپان از طریق کشت سلولها، کالوس وریشه های معمولی این گیاهان انجام گرفته، اما محتوای این آلکالوییدها در کالوسهای تمایز نیافته و سوسپانسیونهای سلولی کمتر از گیاهان اصلی گزارش شده است (۱) مهندسی ژنتیک و انتقال ژن می‌تواند وسیله‌ای مناسب برای افزایش آلکالوئیدها به وسیله روش‌هایی همچون متوقف کردن مسیرهای رقابتی، کاهش کاتابولیسم محصولات و غلبه بر مراحل محدود کننده سرعت باشد (۲ و ۱۶). در سالهای اخیر بسیاری از پژوهشگران علاقمند به تحقیق برای افزایش آلکالوئیدهای دارویی در گیاهان شده اند. به عنوان مثال Zhang و همکاران مروری بر مهندسی متابولومیکس در گیاهان ارائه نموده اند (۱۸). برای تولید سریع و انبوه متابولیتهای ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی و انتقال ژن می توان استفاده کرد. از مزیتهای تولید متابولیتهای ثانویه از طریق کشت بافت می‌توان به کنترل بهینه شرایط کشت و افزودن پیش سازهای مورد نیاز برای افزایش راندمان تولید متابولیتهای ثانویه خاص اشاره کرد. اما در این میان روشهای کشت

www.SID.ir

Archive of SID

بافت که بر پایه سیستمهای غیرمتمایز مثل کالوس استوارند، توانایی بیوسنتز ترکیبات ثانویه را از دست می‌دهند. زیرا برخی از ترکیبات تا زمانی که سلول تمایز نیابد، سنتز نمی‌شوند (۱) . یکی از دلایل این امر احتمالاً حضور هورمونهای اکسین و سیتوکینین در سیستمهای کشت کالوس است که اثر مهاری روی فعالیت آنزیمهای کلیدی درگیر در بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان از جمله PMT دارد (۱۶).

Agrobacterium tumefaciens باکتری میله‌ای، گرم منفی، هوازی و متحرک خاک می‌باشد که در خانواده Rizobiaceae قرار گرفته و از آن جهت انتقال T-DNA درون ژنوم گیاه استفاده می‌شود (۱۱). انتقال ژن به گیاهان با استفاده از اگروباکتریوم (۵) نسبت به انتقال مستقیم ژن از طریق تفنگ بیولوژیک (biolistic gun) و یا سایر روشهای مرسوم مزیتهایی از جمله کارآیی بالا، ساده بودن روش و هزینه بسیار کم برتری دارد(۶).

انتقال T-DNA توسط آگروباکتریوم سویه LBA4404 به گیاه *Datura metel* تنها در یک مورد در سال ۲۰۰۸ گزارش شده است (۱۷). بدیهی است برای حصول به یک نتیجه قابل تکرار و انتقال ژنهای اختصاصی به منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای با ارزش در این گیاه اولین مرحله انجام موفق انتقال ژن و کسب اطلاعات دقیق در زمینه شرایط انتقال ژن است. با توجه به اینکه شرایط انتقال ژن به گیاه به میزان نسبتاً زیادی به شرایط آزمایش، نوع گیاه و نوع ژنوتیپ گیاه بستگی دارد. بنابراین هدف از این تحقیق انتقال T-DNA و ایجاد گیاه تراریخت *Datura metel* به منظور بهینه سازی شرایط ترانسفورماسیون در این گیاه با ارزش است.

مواد و روشها

ابتدا بذرهای گیاه .*Datura metel* L داتوره از هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. برای ضد عفونی کردن بذرها ابتدا آنها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد قرار گرفتند. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شده و در محیط کشت پایه MS (Murashinge and Skoog,) (۱۵) کشت و در اطاقک رشد، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت ۱۵۰۰ لوکس نور سرد (لامپ مهتابی) و دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. و بعد از جوانه زنی، گیاهان حاصل هر ۴۵ روز یکبار واکشت گردیدند. باکتری مورد استفاده *A. tumefasciens* حاوی پلاسمید pZM1047 روی محیط LB (Lysogeny broth) (۴) جامد حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیترآنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد، و بعد از رشد در شرایط استریل جهت تولید سوسپانسیون باکتریایی به محیط LB مایع منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور 100 rpm قرار گرفت، غلظت سوسپانسیون باکتریایی با OD آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد و برابر ۰/۴۰ تنظیم شد. جهت انجام کشت توأم قطعات چهار هفته ای برگ داتورا از گیاهان تکثیر شده در شرایط کشت در شیشه که قبلاً ذکر شد به ابعاد تقریبی ۱ سانتیمتر مربع بریده شده و داخل سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه غوطه‌ور گردید. سپس این قطعات به مدت ۵-۳ ساعت روی محیط MS ساده تهیه شده درون پلیت قرار گرفت و در مرحله بعدی جهت از بین بردن باکتریهای اضافی موجود بر روی سطح آنها، به محیط باززایی بهینه MS حاویی یک میلی گرم در لیترBAP (بنزیل آمینو پورین) ، ۷۰۰ mg/L آنتی بیوتیک سفاتوکسیم و ۲۵ mg/L آنتی بیوتیک کانامایسین (۸) منتقل گردید. حدود ۷ قطعه برگ در هر پلیت قرار گرفت و در اتاق کشت در تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت ۱۵ روز به منظور باززایی کالوسهای حاصله، پلیتها از تاریکی مطلق در شرایط دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در حدود

www.SID.ir

Archive of SID

۱۵ روز بعد، باززایی کامل و تشکیل نوساقه صورت گرفت. نوساقه‌های حاصل با انتقال به محیط کشت MS ساده پس از ۸ روز ریشه تشکیل دادند. به منظور اطمینان از عدم آلودگی گیاهان تراریخت باززایی شده حد اقل ۲ بار به طور متناوب در محیط کشت حاوی سفاتوکسیم و بدون سفاتوکسیم واکشت شدند و از گیاهان بدون آلودگی در محیط کشت بدون آنتی بیوتیک جهت استخراج DNA استفاده شد. از برگ گیاهان عاری از باکتری تراریخت ابتدا طبق روش به کارگیری CTAB توضیح داده شده توسط Ehsanpour, and Twell,(۸) DNA استخراج و سپس جهت تأیید ترانسفورماسیون گیاهان تراریخت، ابتدا از باکتری پلاسمید pZM1047 استخراج و با طراحی پرایمر GUS با توالی ذیل، نسبت به اثبات حضور پلاسمید اقدام گردید.

FW: GTG GGT CAA TAA TCA GGA AGT GA
RV: GGC TGT GAC GCA CAG TTC ATA G

همچنین واکنش PCR با استفاده از پرایمر ژن مقاومت به کانامایسین یعنی نئومایسین فسفوترانسفرازII (NPTII) با توالی زیر انجام شد.

FW: 5-GAG GCT ATT CGG CTA TGA GTG-3
RV: 5-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل : ۵۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR. ۲۰۰ میکرو مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۱ U Taq Enzyme، ۲۵ پیکومول پرایمر Rev و ۲۵ پیکومول پرایمر Fw انجام پذیرفت.

شرایط PCR شامل: ۹۴درجه به مدت ۲ دقیقه ، ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۳۰ ثانیه،۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه با تعداد ۳۵ سیکل DNA تکثیر شد. محصول واکنش بر روی ژل آگارز۱ درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید در حضور اشعه UV عکس تهیه شد.

رنگ آمیزی GUS برای بررسی محل بیان ژن: در این آزمایش لاینهای ۱، ۲ و ۳ تراریخت و یک گیاه غیر تراریخت به عنوان شاهد پس از تائید تراریختی توسط PCR انتخاب و سپس قطعاتی از ریشه و برگ جدا و طبق روش ذیل جهت بیان ژن بتا گلوکورونیداز (GUS) مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور اندام گیاهی در محلول سوبسترای آنزیم بتا گلوکورونیداز طبق شرایط ذیل قرار گرفت.

(1mM) 5-bromo-4-chloro –3- indolyl glucuronide (X-Gluc)
Potassium ferricyanide (0.5 mM)
0.5 M sodium phosphate , pH =7

پس از افزودن سوبسترا (X-Gluc) به نمونه ها؛ ابتدا در دسیکاتور به مدت ۱۰ دقیقه تحت فشار خلاء قرار گرفت تا سوبسترا در بافتها نفوذ کند سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۰–۱۲ ساعت قرار گرفت و نتایج توسط استریو میکروسکوپ بر رسی و عکس برداری گردیدند.

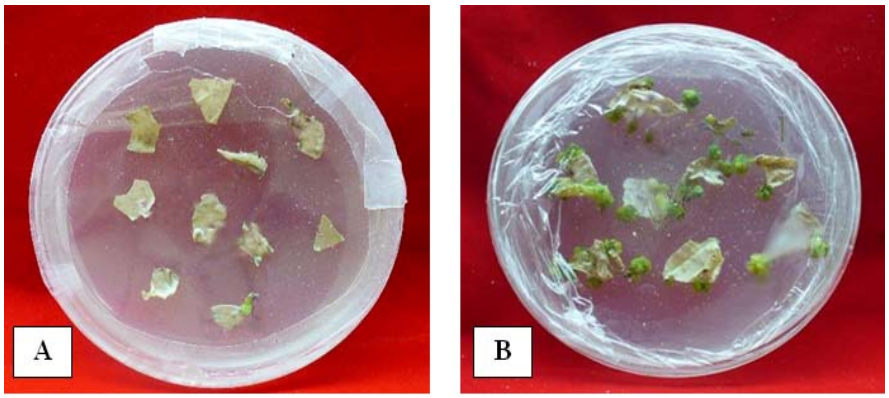
نتایج

نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی کانامایسین، قطعات برگی که عمل انتقال ژن در آنها صورت گرفته بود در مقایسه با شاهد سبز ماندند (شکل۱). این قطعات پس از ۱۰ روز در محیط کشت باززایی با ترکیب MS حاوی BAP (۱ mg/L)، کانامایسین (۲۵ mg/L) و سفاتوکسیم (۷۰۰ mg/L) کالوس تشکیل داده و به تدریج در کالوس حاصله پس از انتقال به روشنایی عمل باززایی صورت گرفت. پس از طی چهل و پنج روز نوساقه‌های تراریخت باززایی شده با انتقال به محیط MS ساده حاوی ۲۵ mg/L کانامایسین و۲۰۰ mg/L سفاتوکسیم ریشه تشکیل دادند و گیاه کامل تراریخت از آنها به دست آمد (شکل۲). نوساقه رشد یافته در محیط حاوی کانامایسین بیانگر انتقال موفق ژن T-DNA به گیاهان حاصله بود. طی ۸ بار انجام co-culture در هر بار حدود ۱۸ پلیت حاوی ۷ قطعه ایجاد شد و علاوه بر آن در هر بار دو پتری حاوی

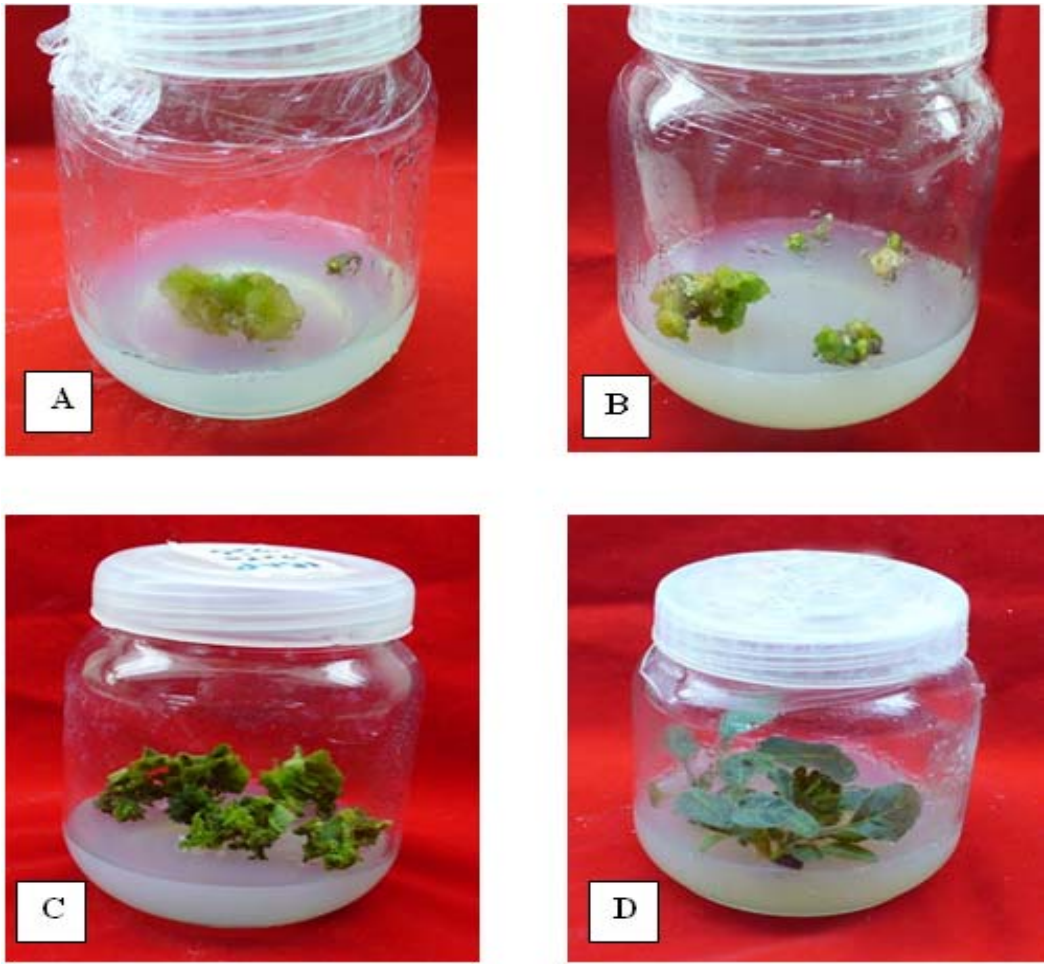
www.SID.ir

Archive of SID

قطعات برگ بدون co-culture شدن با باکتری به عنوان شاهد جهت مقایسه اولیه ایجاد شدند. بنابراین از ۱۰۰۸ قطعه برگ که co-culture شدند ۱۳۱ عدد از آنها یعنی حدود ۱۳ درصد از نمونه‌ها باززایی شده و گیاه تراریخت ایجاد نمودند.



شکل ۱- انتخاب نوساقه های تراریخت داتورا متل در محیط کشت باززایی(MS+ 1mg/l BAP) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین(30 mg/L) دو هفته بعد از کشت A: قطعات برگ شاهد (بدون تلقیح با باکتری) B: قطعات برگ با تلقیح باکتری.

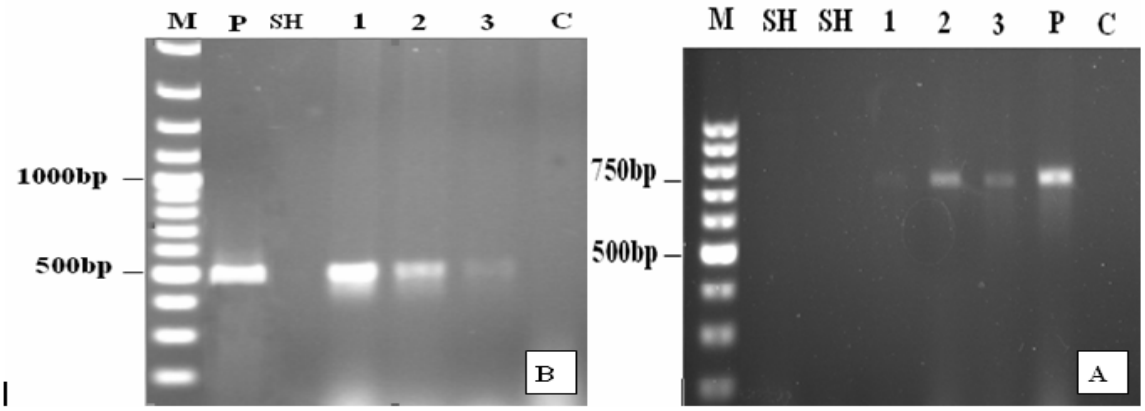


شکل ۲- مراحل باززائی گیاهان تراریخت داتورا متل روی محیط کشت باززائی حاوی کانامایسین. A: کالوس، B :تشکیل نوساقه، C: تشکیل برگ و ساقه کامل وD: رشد کامل گیاه تراریخت.

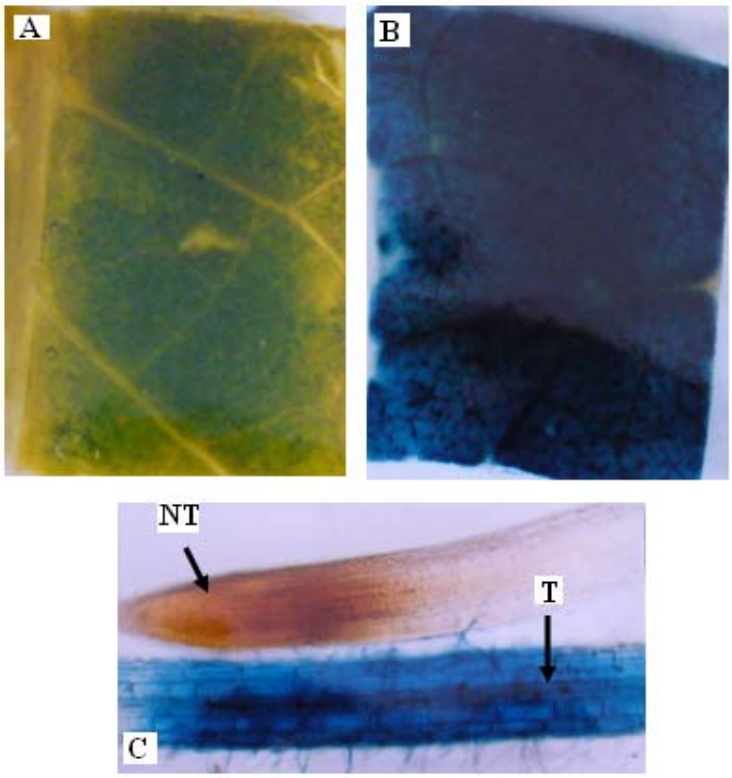
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای ترادف ژن مقاومت به کانامایسین باند حدود ۷۵۰ bp به‌عنوان محصول PCR تولید نمود (شکل A ۳). همچنین پرایمرهای به کار گرفته شده برای تکثیر بخشی از ترادف ژن بتاگلوکورونیداز(GUS). باند ۵۰۰ bp تشکیل داد (شکلB ۳). لاینهای ۱، ۲ و ۳ گیاهان تراریخت با به کارگیری دو پرایمر اختصاصی مذکور در نواحی مربوطه ایجاد باند نمودند. از لاینهای تأیید شده تراریخت برای ادامه آزمایشات استفاده شد.



شکل ۳- تأیید انتقال T-DNA به گیاهان تراریخت داتورا متل (لاینهای ۱، ۲ و ۳) از طریق آزمایشات PCR با پرایمرهای NPTII (A) و (B). M GUS: مارکر ، P: پلاسمید (کنترل مثبت) C: کنترل منفی، SH: گیاه شاهد.



شکل ۴- نتایج رنگامیزی GUS (ژن بتا گلوکورونیداز) در برگ گیاه غیر تراریخت (A) ، برگ گیاه تراریخت (B) و ریشه غیر تراریخت (C-NT) و تراریخت (C-T).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج رنگ آمیزی GUS : پس از رنگ آمیزی قطعات گیاه تراریخت و غیر تراریخت نتایج نشان داد ژن GUS در برگ و ریشه گیاه تراریخت بیان شده در حالی که گیاهان غیر تراریخت هیچ گونه آثاری از بیان ژن در سلولهای برگ و ریشه نشان ندادند (شکل ۴).

بحث

پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق حاوی T-DNA حامل ژنهای مقاومت به کانامایسین (NPTII) و بتاگلوکورونیداز (GUS) تحت پروموتور 35s Ca MV توسط آگروباکتریوم (*A. tumefaciens*) به سلولهای گیاه داتورا متل انتقال یافت. ژن NPTII به‌عنوان یک نشانگر قابل گزینش در جریان تراریختی (ترانسفورماسیون) در گیاهان و تولید گیاهان تراریخت استفاده می‌گردد. گیاهان باززایی شده مورد نظر در این آزمایش قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین بودند. مقاومت به کانامایسین و سبز ماندن و باززایی در محیط کشت حاوی کانامایسین اولین راه شناسایی وتمایز بین قطعات شاهد و تراریخت است. علاوه بر این ریشه دهی در چنین محیط کشتی نیز یکی از دلایل بسیار خوب برای انجام موفقیت آمیز تراریختی در گیاه می باشد (۱۲ و ۱۳). همچنین تشکیل ریشه در محیط حاوی کانامایسین در این مرحله تأیید دیگری بر تراریخت بودن گیاهان باززایی شده است. برای تأیید قطعی انتقال ژن توسط اگروباکتریوم وجود ژنهای گزینش گر (selectable marker) نظیر مقاومت به کانامایسین و ژنهای گزارشگر (reporter gene) نظیر ژن بتا گلوکورونیداز در گیاهان گزارش شده است (۷ و ۱۰). در مطالعات حاضر به منظور تأیید قطعی گیاهان تراریخت، آزمایشات PCR بر روی لاینهای حاصل از کشت همراه انجام گردید. آنالیزهای اولیه PCR با استفاده از پرایمرهای معرف ترادف NPTII باند حدود ۷۵۰ bp به‌عنوان محصول PCR تولید گردید که حضور قطعی ژن NPTII را در گیاهان تأیید کرد. همچنین آزمایشات PCR با استفاده از پرایمرهای ژن GUS و تولید باند حدود ۵۰۰ bp تأیید دیگری بر حضور قطعی ژن GUS در گیاهان تراریخت بود. بنابراین بر اساس این نتایج، یعنی رشد و باززایی گیاهان بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین و تأیید حضور ژن NPTII و GUS توسط آنالیزهای PCR، می‌توان تأیید کرد که گیاهان داتورا باززایی شده در این تحقیق، تراریخت و حاوی T-DNA بودند. در تأیید نتایج حاضر انتقال T-DNA به گیاه توسط آگروباکتریوم در سایر گیاهان نیز گزارش شده است (۱۴) علاوه بر این رنگ آمیزی GUS نیز نشان داد که T-DNA انتقالی در تمام گیاه بیان می شود. این مجموعه اطلاعات زمینه بسیار خوبی جهت انتقال سایر ژنها به این گیاه دارویی با ارزش را فراهم می نماید.

در تحقیق حاضر در گیاه داتورا متل تراریختی در ۱۳ درصد از قطعات برگ با موفقیت صورت گرفت. در مطالعات مشابه درصد انتقال ژن در گیاهان *Nicotinia tabacum* L. و نیز *Duboisia hybrid* L. به ترتیب ۷۸ و ۱۷ درصد گزارش شده بود (۱۴) درصد بالای انتقال ژن در گیاه تنباکو و پایین بودن آن در مطالعات حاضر بر روی گیاه *Datura metel* L. احتمالاً به دلیل تفاوتهای ژنتیکی این دو گیاه و همچنین نوع ژن انتقالی به گیاه می‌باشد. احتمالاً تنباکو از لحاظ ژنتیکی جهت دریافت T-DNA مستعدتر از *Datura metel* L. می‌باشد. البته شرایط محیطی مانند دما، حضور مواد فنلی مانند استوسیرینگون، کلسیم و حضور بعضی آنزیمها در محیط کشت نیز می‌تواند بر روی انجام موفق تراریختی اثر گذار باشد (۹) علاوه بر این لکتین تولید شده از سلولهای زخمی شده و همچنین ترشح احتمالی برخی از آلکالوئیدها از سلولهای زخمی شده ممکن است در کاهش نرخ انتقال ژن نقش داشته باشند. به‌هر حال اظهار نظر در این زمینه نیاز به مطالعات دقیق‌تر دارد.

اگرچه فراوانی گیاهان تراریخت به‌دست آمده در این پژوهش از نظر آماری پایین است ولی دو نکته بایستی

www.SID.ir

Archive of SID

مدنظر قرار گیرد. ۱) برای مطالعه روی گیاه تراریخت نیاز نیست حتماً تعداد بسیار زیادی گیاه تراریخت تولید شود، زیرا ایجاد تعداد محدود گیاه تراریخت می تواند تکثیر شده و حتی از آن بذر تهیه شود و مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است اگر بین لاینهای تراریخت اختلافاتی از نظر انتقال ژن نظیر تعداد کپی، محل ادغام در ژنوم و... وجود داشته باشد در تعداد محدود گیاه نیز شانس بروز دارند. ۲) در مقایسه با گیاهانی مثل تنباکو که نرخ تراریختی گزارش شده در مورد آن بالاست درصد تراریختی گزارش شده برای *Datura metel* L. کم (۱۲/۸) درصد گزارش شده است (۹ و ۱۷) و بنابراین با توجه به پایین بودن درصد تولید گیاه تراریخت داتورا متل در پژوهشهای انجام شده توسط سایر پژوهشگران، در این پژوهش ایجاد گیاه تراریخت داتورا با نرخ ۱۳ درصد میزان قابل قبول می باشد و حتی بالاتر از سایر گیاهان خانواده سیب‌زمینی نظیر اطلسی و نیز برخی از گیاهان به‌ویژه خانواده لگومها می‌باشد. البته اگر گیاهان خانواده تک لپه‌ایها در نظر باشد که انتقال ژن توسط آگروباکتریوم در آنها بسیار مشکل است. بنابراین این نسبت در گیاه داتورا با ارزش تلقی می شود (۳). شرایط بهینه شده در انتقال ژن در این مطالعه به گیاه، زمینه بسیار خوبی را جهت انتقال سایر ژنها به این گیاه در آینده فراهم نموده است.

تشکر و قدر دانی: نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش کمال سپاسگزاری را دارد.

منابع

۱- احسانپور، ع. ا. و امینی، ف. ۱۳۸۲. کشت سلول و بافت گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی، ۱۹۳-۱۸۷

۲- میرحیدر، ح. ۱۳۷۳. معارف گیاهی (کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها). جلد ۵. انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۳۶-۳۷.

3- Archana, G. and M. L. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: Recent trends applications: a review. Biotechnology. Advances. 18: 1-22.

4- Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. Journal of Bacteriology 186:595-600.

5- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, Ch., Delbart, F. C. and Tempe, T. 1982. *Agrobacterum rhizogenes* insert T-DNA into the genomes of the host root cells. Nature 295:432-434.

6- Dada Kuta, Danladi and Tripathi Leena 2005. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. African Journal of Biotechnology 4: 752-757.

7- Dellaporta, S. L., wood, j. and. Hicks, j. B. 1983. A plant DNA mini-preparation. ,*Plant Moecular. Biology. Reorter.*1: 19-21.

8- Ehsanpour, A. A. and Twell, D. 2005. Analysis of SFL1 and SFL2 Promoter Region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. Journal of Science, Islamic Republic of Iran. 303-309.

9- Esin, A. O. 2006. Alkaloid Production in Tissue Cultures of *Papaver somniferum* L. cv. Office-95. Plant Tissue Culture. & Biotechnology. 16: 1-4.

10- Gelvin SB: 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. Current Opinion in Biotechnology 9:227-232.

11- Gururaj, H. B., Kumar, V., Prasad, B. C. N., Ravishankar, G. A. and Sharma, A. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultra sonication and acetosyrigone treatment. Electronic Journal of Biotechnology. 9: 349-357.

12- Jelili T. 2006. Opabode. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. Biotechnology and Molecular Biology Review 1:12-20.

13- Li J, Vaidya M, White C, Vainstein A, Citovsky V, Tzfira T: 2005. Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. Proceeding of Natural Academy of Science USA 102:19231-19236.

14- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, j. and Pinol, M. T. 1999. Effect of *Agrobacterium rhisogenes*

www.SID.ir

Archive of SID

T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. Phytochemistry 52: 1287-1292.

15- Murashige,T. and Skoog,F.. A 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 1: 473-479.

16- Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M. H. 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules 13, 1722-1742.

17- Raufa, A.R., El-Wakil,H. El-Din, Abogabal, A. El-Said, Khalif, H.D. 2008. *Agrobacterium* mediated transformation of *Datura metel* L. and tropan alkaloids determination. Research Journal of Cell and Molecular Biology 2: 62-66.

18- Zhang, L., Kai, G. Y., Lu, B. B., Zhang, H. M., Tang, K. X., Jiang, J. H. and Chen, W. S. 2005. Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants. Journal of Integrative Plant Biology 47: 136-143.

Optimization of T DNA transformation and transgenic plant production of *Datura metel* L.

Homaei T.[1], Ehsanpour A.A.[1], Asghari Gh.R.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan. Isfahan, I.R. of Iran

[2] Pharmaceutical Science Dept., Isfahan University of Medicin, Isfahan, I.R. of Iran

Abstarct

In this study conditions for transformation of *Datura metel* was optimized. T-DNA from pZM1047 containing GUS and NPTII genes was transferred to Datura plant. Bacterial suspension was used for co culture with leaf segments., the they were transferred to MS medium supplemented with 1 mg/L BAP as regenerated medium. After 15-20 days calli with regeneration marks was appeared. The whole regenerated transgenic plants on kanamycin were checked using PCR. Transformation rate was about 13% which is 2% higher than previous study reported by others. .

Key words: *Datura metel*, alkaloids, transgenic, Atropine, Agrobacterium, β glucoronidase.

www.SID.ir