Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Transgenic induction in *Sesamum indicum* with recombinant pBI121 expression construct containing CYP81Q1 and aroA genes using *Agrobacterium tomfacensis*

Abbasali Yadollahi

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Payame Noor University, Tehran, Iran. E-mail address: hi.a@live.com

Ghazal Ghajari

MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail address: ghajari.ghazal74@gmail.com

Abstract

Objective

Oilseeds are the second-largest source of calories for human societies after cereals. *Sesamum indicum* has been considered recently due to its oil quality and content of 43-46% unsaturated fatty acids. To investigate the possibility of transferring the recombinant aroA-CYP81Q1 gene through Agrobacterium tumefaciens to *the Sesamum indicum* plant (reported for the first time in the country), after optimizing tissue culture and selecting the best hormonal combination, a factorial experiment was performed.

Materials and methods

In this experiment, the recombinant aroA-CYP81Q1 gene was synthesized and transformed into an Agrobacterium strain (LB4404). Gene cloning was confirmed by PCR and then confirmed by sequencing. The efficacy and frequency of transgenic *Sesamum indicum* were evaluated in the selected medium containing 50 mg/l kanamycin. Finally, to confirm the transgenicity of the regenerated plants, PCR analyzes were performed with specific primers on selected plants. Also, the expression of the sesamin-producing gene (CYP81Q1) in control groups and transgenic groups was measured at a significant level of $P < 0.01$.

Results

Statistical analysis showed that the percentage of regeneration of transgenic seedlings using Agrobacterium (LB4404) in the selected medium containing kanamycin was 33%. Also, PCR analysis of transgenic plants showed a prevalence of transgenics of 33%. In addition, amplification of the bp fragment indicated the accuracy of cloning in transgenic plants. The results indicate the successful transfer of this gene to the sesame plant to increase its industrial properties. The results of the analysis of variance showed that there was a significant difference in the expression of sesamin-producing genes between transgenic cultivar and control groups ($P < 0.01$).

Conclusions

Since pBI121-based expression vectors are more efficient than other expression vectors and are widely used in the transfer of recombinant genes to plants, the recombinant vector constructed in this study indicates successful gene transfer. Sesame to sesame plant to increase its industrial properties**.**

Keywords: Expressive vector, cloning, Sesamin, *Sesamum indicum*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Yadollahi A. and Ghajari Gh, (2022) Transgenic induction in *Sesamum indicum* with recombinant pBI121 expression construct containing CYP81Q1 and aroA genes using *Agrobacterium tomfacensis*. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 223-242.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 223-242. DOI: 10.22103/jab.2022.19687.1408

Received: June 10, 2022. Received in revised form: July 15, 2022.

Accepted: July 16, 2022. Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

القای تراریختی در کنجد با سازه بیانی نوترکیب pBI121 واجد ژن های CYP81Q1 و aroA با استفاده از *آگروباکتریوم تومفاسینس*

عباسعلی یداللهی

*نویسنده مسئول: استادیار، عضو هیات علمی گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ص.پ. ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷، تهران. ایران.
رایانامه: hi.a@live.com

غزل قجری

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: ghajari.ghazal74@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۵

چکیده

هدف: گیاهان روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین‌کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می شوند. گیاه کنجد به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای ۴۳-۴۶٪ اسید های چرب غیر اشباع، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. به منظور بررسی امکان انتقال ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 با واسطه *Agrobacterium tumefaciens* به کنجد که برای اولین بار در کشور گزارش شده است، پس از بهینه سازی کشت بافت و انتخاب بهترین ترکیب هورمونی و بهترین ریزنمونه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش ژن نوترکیبaroA-CYP81Q1 سنتز شده و در سویه آگروباکتریوم (LB4404) ترانسفورم شد. کارآیی و فراوانی تراریختگی کنجد در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی¬گرم در لیتر کانامایسین مورد ارزیابی گرفت. در نهایت به منظور تایید تراریختگی گیاهان بازرا شده، آنالیزهای PCR با آغازگرهای اختصاصی روی گیاهان انتخابی انجام شد. همچنین میزان بیان ژن مولد سزامین (CYP81Q1) در گروه های کنترل و گروه های تراریخت در سطح معناداری $P<0.01$ سنجیده شد.

نتایج: تجزیه آماری نشان داد که درصد باززایی گیاهچه‌های تراریخته با استفاده از آگروباکتریوم (LB4404) در محیط انتخابی حاوی کانامایسین به میزان ۳۳ درصد بود. همچنین تجزیه PCR ژن هدف در گیاهان تراریخته، فراوانی تراریختگی را ۳۳ درصد نشان داد. به علاوه، تکثیر قطعه ۱۶۳۴ جفت بازی، نشان دهنده صحت همسانه‌سازی در گیاهان تراریخته بود. نتایج بیانگر انتقال

موفق ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 به گیاه کنجد می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بسیار معنی داری در بیان ژن مولد سزامین در بین رقم تراریخت شده و گروه های کنترل وجود دارد (P<0.01).

نتیجه‌گیری: از آنجایی که ناقل های بیانی مبتنی بر pBI121 نسبت به سایر ناقل های بیانی، کارایی بالایی داشته و به طور گسترده در انتقال ژن های نوترکیب به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند، ناقل نوترکیب ساخته شده در این پژوهش بیانگر انتقال موفق ژن مولد سزامین به گیاه کنجد برای افزایش ویژگی های صنعتی آن می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: همسانه سازی، سزامین، کنجد، ناقل بیانی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: یداللهی عباسعلی، قجری غزل (۱۴۰۱) القای تراریختی در کنجد با سازه بیانی نوترکیب pBI121 واجد ژن های CYP81Q1و aroA با استفاده از *آگروباکتریوم تومفاسینس*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۳)، ۲۲۳-۲۴۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

کنجد (Sesamum indicum) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان روغنی زراعی است که توسط انسان کشت می‌شود (Verma et al. 2021). از حدود ۲۰ گونه وحشی، جنس *Sesamum indicum* L از نظر اقتصادی ارزش بیشتری دارد (Verma et al. 2021). گیاهان روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند و از اهمیت اقتصادی زیادی نیز در کشاورزی برخوردار می‌باشند و بیشترین روغن خوراکی بشر را تامین می‌کنند(Myint et al. 2020). در بین دانه‌های روغنی موجود، کنجد به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب غیر اشباع تک زنجیره و چند زنجیره، مورد توجه قرار گرفته است (Naylor et al. 2016). از طرفی روغن کنجد مقاومت بالا در برابر اکسیده شدن دارد. از این رو، اصلاح این گیاه سبب توسعه کشت آن خواهد شد. روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در بهبود گیاهان زراعی و باغی به منظور تولید گیاهان تراریخته با توانایی بیان ژن‌های خارجی برای ایجاد مقاومت به عواملی مانند ویروس‌ها، حشرات، علف‌کش‌ها، عوامل فساد بعد از برداشت و افزایش فرآورده‌های ذخیره‌ای به کار گرفته شده است (Callender et al. 2021). از این رو بهینه شدن سیستم کشت بافت این گیاهان و انتقال ژن و ایجاد گیاهان زراعی با خصوصیات جدید ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی امری ضروری است (Ishida et al. 2020). آنتی اکسیدان‌های موجود در روغن کنجد شامل توکوفرول و سزامین ماندگاری آن را در برابر حرارت در مقایسه با سایر روغن‌ها افزایش می‌دهد (Hussain et al. 2018). بیشتر خواص روغن کنجد به دلیل ترکیباتی

مثل سزامول، و سزامولین و سزامین مربوط است که تمام این ترکیبات از نوع لیگنان هستند(Andargie et al. 2021). ارتباط مثبت و قابل ملاحظه‌ای در مقدار روغن دانه و مقدار سزامین وجود دارد. مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز لیگنان‌ها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشد (Pathak et al. 2019). مسیر متابولیک فوفوران لیگنان‌های کنجد و تولید سزامین، تحت تاثیر آنزیم سیتوکروم P450 است. این سیتوکروم به عنوان هموپروتئین شناخته شده و به‌صورت CYP450 نمایش داده می‌شود (Jan et al. 2012). آنزیم سیتوکروم P450 سنتز سزامین را در کنجد افزایش می‌دهد. به دنبال افزایش بیان ژن رمزکننده این آنزیم (CYP81Q1) محتوای سزامین نیز افزایش می‌یابد (Jan et al. 2012). سزامین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و افزایش بیان آن در گیاه کنجد منجر به افزایش مرغوبیت روغن این گیاه می‌شود. از این رو، علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک برای القاء ژن‌های مولد در گیاهان مختلف، توجه محققان را به خود جلب کرده است - (Muthulakshmi et al. 2021). برای کشت زراعی گیاهان مفید و دستکاری شده ژنی، معمولا با مشکلات عمده‌ای ازجمله وجود علف‌های هرز مواجه هستیم. استفاده عمده از علف‌کش‌ها اگرچه کارآیی خوب مقطعی داشت اما به تدریج با مقاومت گیاهی همراه شد. استفاده از علف‌کش‌های با خطر زیست‌محیطی کمتر می‌تواند گزینه مطلوبی برای مقابله با علف‌های هرز به شمار بیاید. گلایفوسیت یا N–فسفونومتیل گلایسین علف‌کشی وسیع‌الطیف و غیرانتخابی است که به آسانی در خاک به اجزاء غیر سمی تجزیه شده و پس از استفاده سریعاً در خاک جذب می‌شود، از این رو اثرات سوء زیست‌محیطی کمتری به دنبال دارد (Chen et al. 2021). متابولیسم کربوهیدرات‌ها و بیوسنتز ترکیبات حلقوی در گیاهان، برخی از قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها توسط میرشیکیمات به هم مرتبط می‌شوند (Chen et al. 2021). آنزیم EPSPS هدف اصلی علف‌کش گلایفوسیت می‌باشد. این علف کش با اتصال به کمپلکس- S3P EPSPS، منجر به غیرفعال شدن آن می‌گردد (Leino et al. 2021). لازم به ذکر است که آنزیم EPSPS توسط ژن aroAکد می‌شود. برای استفاده از این سم در کنترل علف‌های هرز باید گیاهان زراعی را تا حد امکان نسبت به این علف‌کش مقاوم ساخت. برای دستیابی به این هدف می‌توان از روش بیوتکنولوژی استفاده کرد که شامل وارد نمودن ژنی که محصول آن باعث تجزیه گلایفوسیت شود، می‌باشد. در رابطه با استفاده از سیستم انتقال ژن، واسطه آگروباکتریوم بسیار کاربردی است (Hwang et al. 2017, Piri-Gharaghie et al 2022).

مطالعات مختلف تاثیر سویه‌های آگروباکتریوم (GUSInt P35 و LBA4404 حاوی پلاسمید pB1121)، نوع آنتی‌بیوتیک، عامل انتخابی و هورمون‌های تنظیم کننده رشد را روی باززایی و کارآیی تراریختگی کنجد بررسی کردند. نتایج شمارش تراریخته‌های بیان‌کننده آنزیم بتاگلوکورونیداز نشان داد که سویه P35GUSImt/ EHA105 بسیار موثرتر از سویه LBA4404/pB1121 عمل کرده است. در ایران، اولین گزارش در مورد انتقال سازه دستورزی شده آنزیم EPSPS به گیاه روغنی کلزا به منظور ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت گزارش شده است (Kahrizi et al. 2007). در این تحقیق از باکتری Agrobacterium tumefaciens برای انتقال سازه فوق استفاده کرده و با آنالیزهای مولکولی حضور ژن در پلاسمید (توسط آزمونPCR)، با آزمون لکه‌گذاری سادرن تعداد نسخه ها و با تیمار علف‌کش، میزان بیان ژن را در گیاه اثبات کرد (Kahrizi et al. 2007). در این مطالعه،

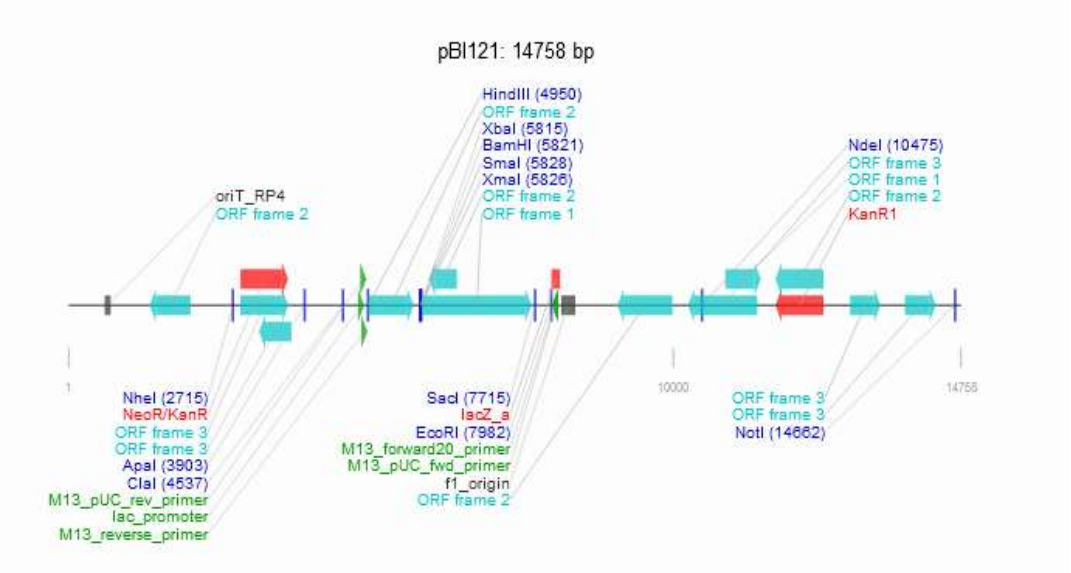
برای کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت با این آنزیم دستورزی لازم روی ژن انجام شد. نتایج نشان داد که به کارگیری ژن‌های جهش یافته کد کننده آنزیم EPSPS باکتریایی در کلزا، باعث ایجاد گیاهان نسبتا مقاوم به گلایفوسیت می‌شود. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[1] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). با توجه به این که هیچ گونه گزارشی در خصوص تراریختگی ارقام کنجد در ایران منتشر نشده است، از این رو برای اولین بار در این تحقیق پس از بهینه شدن سیستم کشت بافت، به مقایسه باززایی گیاه کنجد و انتقال ژن جهش‌یافته aroA باکتریایی و CYP81Q1 پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: مواد گیاهی، سازه پلاسمید و باکتری مورد استفاده در این تحقیق از کنجد رقم کرج ۱ از بخش دانه‌های روغنی (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران) تهیه و پس از ضدعفونی در محیط موراشیگ و اسکوگ قرار داده شدند. پس از ۴ هفته اندام های رویشی شامل برگ و ساقه جمع آوری شده و برای ماندگاری بیشتر درون ورقه های آلومینیومی، بسته بندی شدند. سپس بلافاصله در ازت مایع تثبیت شده و نمونه ها تا زمان آزمایش در فریز ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

[1] DNA

همسانه سازی: برای انتقال سازه ژنی به کنجد از سویه های A. tumefaciens LBA4404 مقاوم به استرپتومایسین استفاده شد. سازه ژنی در پلاسمید pBI121 همسانه سازی شد. در این سازه به جای ژن gus در پلاسمید pBI121 ژن جهش یافته aroA باکتریایی (کد کننده آنزیم EPSPS) قرار گرفت. این ژن سپس توسط لینکر GGGS به ژن CYP81Q1 با طول ۲۵۰ جفت باز، توسط شرکت Shenzen (چین) متصل شد. این ژن سپس تحت کنترل پروموتر CaMV35S و خاتمه دهنده NOSقرار گرفت (شکل ۱). در واقع ، پلاسمید pBI121 به عنوان ناقل بیانی گیاهی مورد استفاده قرار گرفت و منظور بیان قطعات کلون شده در گیاه استفاده شد. منشاء ژن aroA از باکتری E. coli (K12) ، بوده که اسیدهای آمینه آلانین شماره ۱۸۳و گلایسین شماره ۹۶ به ترئونین جهت کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت تغییر یافته اند. این ژن ۱۳۸۴ جفت باز طول داشته که اطلاعات مربوط به آن در بانک ژن با آدرس (www.ncbi.nlm.nih.gov) و شماره دسترسی X00557 موجود است. همچنین ژن CYP81Q1 با شماره دسترسی AB194714.1 در همین پایگاه داده قابل مشاهده است. از آگروباکتریوم های دارای ناقل pB1121که حاوی ژن ترکیب شده aroA-CYP81Q1 با طول ۱۶۳۴ جفت باز بودند، کشت شبانه در محیط LB مایع دارای ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین در دمای ۲۸°C بر روی شیکر ۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. زمانی که($OD_{600} = ۱$)، جهت تراریختی استفاده شد.



شکل ۱. ساختار خطی پلاسمید pBI121 طراحی شده با نشانگر انتخابی کانامایسین (KanR1)

Figure 1. Plasmid pBI121 designed in this study

بررسی صحت همسانه سازی: ابتدا استخراج DNA به روش سمبروک و راسل با کمی تغییرات انجام شد. از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در جدول ۱ برای انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. برای ردیابی ژن‌های مذکور واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۱۳ میکرولیتر مسترمیکس (یکتاتجهیزآزما، ایران)، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهایF و

R ، ۲ میکرولیتر از DNA و ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی فوق شامل یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۸۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۷۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته با طول 1634 جفت باز در PCR از الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. در این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر مرحله از آزمایش در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاس- لیتوانی) روی ژل ۱ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت در حدود ۳۵ دقیقه الکتروفورز شد و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه ترانس‌لومیناتور UV (UVitech، انگلستان) تصویر به دست آمده ثبت شد.

سپس محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگارز (دنازیست، ایران) خالص شد. پلاسمید هدف با دو آنزیم برشی BamHI و SacI هضم دوگانه شد. واکنش اتصال پلاسمید به DNA نوترکیب با استفاده از آنزیم T4-DNA لیگاز (فرمنتاس، آمریکا) انجام شد و محصول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول های مستعد اشرشیاکلی سویه XL1blue که در چگالی نوری ۰/۵ به روش کلرید کلسیم تهیه شده بودند، انتقال داده شد. باکتری های تراریخت روی محیط کشت جامد نوترینت آگار حاوی کانامایسین کشت داده شد. پس از ۱۶ ساعت تیمار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعدادی از کلنی ها به عنوان کلنی‌های نوترکیب انتخاب شد و با استفاده از آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

تیمارها، عملیات تراریختگی، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با تجزیه آماری دو فاکتور در ۳ تکرار اجرا شد. ارقام کنجد به عنوان فاکتور اول و سویه ی آگروباکتریوم (LB4404) حامل ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند.

عملیات تراریختگی: در این آزمایش، پس از بدست آمدن محیط بهینه برای باززایی گیاهچه‌ها یعنی ترکیب (۲BAP و NAA ۰/۱) میلی گرم در لیتر و همچنین بهترین ریزنمونه (کوتیلدون) (داده ها نشان داده نشدند)، مراحل انتقال ژن روی این محیط و ریزنمونه انجام گرفت. جهت آلوده‌سازی ریزنمونه‌های کوتیلدون هر دو رقم، مقداری از سوسپانسیون هر دو سویه باکتری (۱= OD_{600})، را در زیر هود لامینار در دو پتری دیش استریل جداگانه ریخته و برگ های کوتیلدونی استریل را پس از برش و ایجاد زخم به مدت ۲-۱ دقیقه در سوسپانسیون‌ها نگه داشته و سپس روی کاغذهای صافی استریل گذاشته تا باکتری های آغشته شده به آن خشک شوند. در مرحله بعد، کوتیلدون‌ها به محیط کشت بهینه باززایی MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BAP منتقل شدند. کوتیلدون ها به مدت ۴۸ ساعت در این محیط (محیط هم کشتی) نگه داشته شدند تا آگروباکتریوم بتواند در این فاصله زمانی T- DNA خود را به گیاه منتقل کند. در مرحله بعد، ریز نمونه ها به محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفاتوکیم و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند که آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

انتخابی پلاسمید pBI121 و جهت انتخاب گیاهچه‌های تراریخته و سفاتوکسیم به منظور حذف آگروباکتریوم به کار برده شد. ریزنمونه‌ها هر ۱۵ روز یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. برخی از ریزنمونه ها روی محیط انتخابی به گیاهچه های سبز باززا شدند که تعداد آنها یادداشت گردید. برای افزایش تعداد گیاهچه ها و متعاقب آن گیاهچه های تراریخته، مراحل فوق چندین بار تکرار گردید. فراوانی (عبارت از تعداد گیاهچه باززایی شده سبز بر روی محیط گزینش گر به تعداد ریزنمونه کشت شده) یادداشت شد. بررسی های ژنومیک جهت بررسی گیاهان تراریخته و اثبات حضور ژن نوترکیب مورد نظر از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primer sequence used in this research

پرایمر **Primer**	توالی **Sequence**	سایز **Size (bp)**
aroA-CYP81Q1	F: 5'-CGGGATCCATGGAATCCCTGACGTTACAA-3' R: 5'-ACTGAGCTCTCAAACGTTGGAAACCTGACG-3'	1634

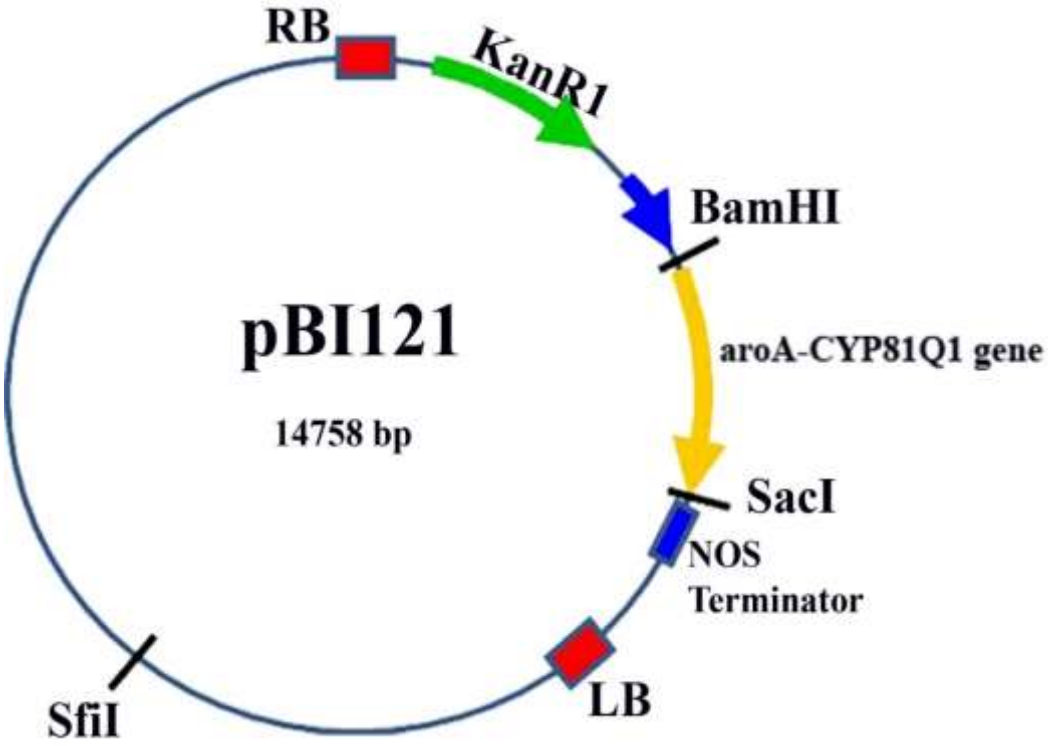
استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز کنجد به روش CTAB انجام شد و برای استخراج پلاسمیدها از کلنی سویه های A. tumefaciens از روش لیز قلیایی در مقیاس کم استفاده گردید. برای تعیین کمی و کیفی DNA از اسپکتوفتومتر استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

بررسی Real-Time PCR: برای بررسی میزان بیان *CYP81Q1* در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان تراریخت نشده آزمون Real-Time PCR به صورت ۳ بار تکرار انجام شد. برای ردیابی میزان بیان ژن‌های مذکور واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر واجد ۷ میکرولیتر مسترمیکس(یکتاتجهیزآزما، ایران)، ۱میکرولیتر از زوج پرایمرهای F و R، ۲ میکرولیتر از DNA و ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی فوق شامل یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۸۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۷۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. نتایج این آزمون توسط آزمون دانکن آنالیز گردید.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام گرفت و قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده های مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

تایید صحت ساخت پلاسمید نوترکیب: استخراج DNA از بافت برگ و ساقه گیاه کنجد از کمیت و کیفیت قابل قبولی برخوردار بود. نتایج همسانه سازی سازه ژنی در شکل ۲ قابل مشاهده است.

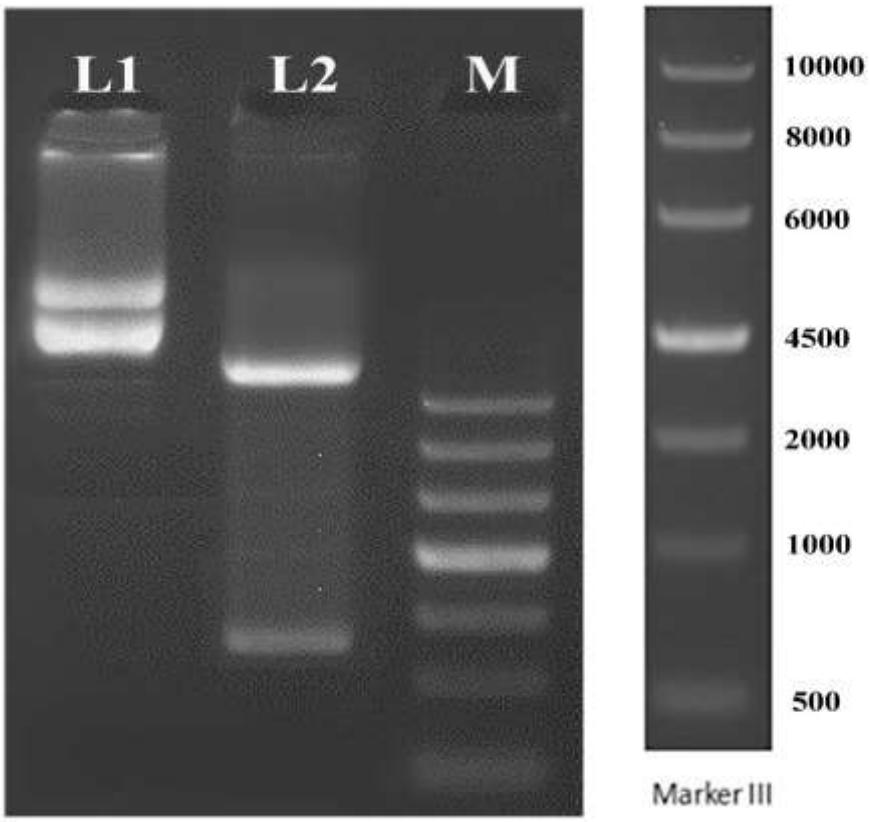


شکل ۲. همسانه سازی ژن aroA-CYP81Q1 در پلاسمید pBI121 وایجاد سازه ژنی نوترکیب

Figure 2 .Cloning of aroA-CYP81Q1 gene in plasmid pBI121 and formation of recombinant gene structure

نتایج حاصل از هضم دوگانه پلاسمید با آنزیم های SacI و BamHI، قطعات ۱۳۱۲۴جفت بازی و ۱۶۳۴ جفت بازی است که در شکل ۳ قابل رویت می باشد. در این شکل قطعات ۱۳۱۲۴جفت بازی مربوط به پلاسمید pBI121 و قطعه ۱۶۳۴ جفت بازی مربوط به ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 می باشد. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب، درستی ساخت پلاسمید نوترکیب را تایید کرد. همچنین نتایج توالی یابی DNA، صحت قطعه همانندسازی شده را تایید نمود. پس از توالی‌یابی و بلاست مشخص شد که توالی ژن هدف در کنجد رقم کرج با توالی موجود این ژن در پایگاه داده NCBI تطابق دارد.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۳. نتایج حاصل از هضم دوگانه پلاسمید با آنزیم های SacI و BamHI، قطعات ۱۳۱۲۴جفت بازی و ۱۶۳۴ جفت بازی است. L1: پلاسمید نوترکیب، L2: قطعات ۱۳۱۲۴جفت بازی مربوط به پلاسمید pBI121 و قطعه ۱۶۳۴ جفت بازی مربوط به ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1، M: مارکر ۱ کیلوبازی

Figure 3 .The results of double digestion of plasmids with SacI and BamHI enzymes are 13124 bp and 1634 bp fragments. L1: Recombinant plasmid, L2: 13124 bp fragment related to pBI121 plasmid and 1634 bp fragment related to recombinant aroA-CYP81Q1 gene, M: 1 kb marker

نتایج حاصل از تراریختگی: نتایج حاصل از تجزیه آماری (جدول ۲) و مقایسه میانگین برای صفت باززایی گیاهچه های سبز (درصد تراریختگی) نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین رقم و سویه‌ی آگروباکتریوم وجود دارد. همچنین ،اثر متقابل بین این دو عامل غیر معنی دار شده است که مستقل بودن ارقام و سویه ها در پاسخ به باززایی گیاهچه های تراریخته را آشکار می سازد. در خصوص مقایسه میانگین ها، رقم کنجد کرج در سویه مورد استفاده در این پژوهش (LBA4404) فراوانی تراریختگی بالایی را نشان داد. به عبارتی دیگر در این آزمایش، سویه LBA4404 توانایی بالایی نسبت به انتقال ژن به سلول های گیاهی کنجد داشته است.

جدول ۲. جدول تجزیه واریانس برای صفت باززایی گیاهچه های تراریخته

Table 2. Analysis table of variance for regeneration of transgenic seedlings

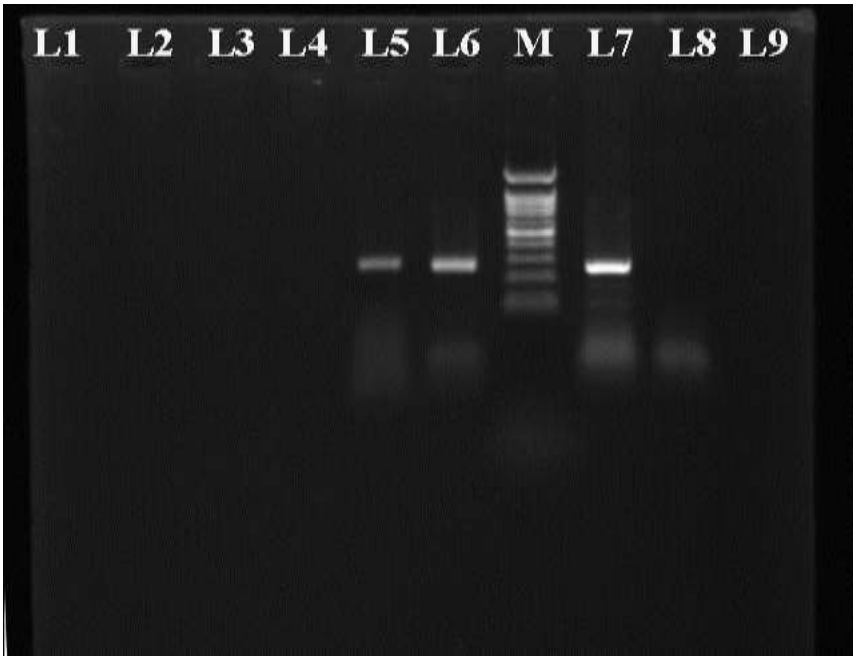
منابع تغییر Sources of changes	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات average of squares
فاکتور A (جنس) Factor A (sex)	1	141.07**
فاکتور B (رقم) Factor B (plant cultivar)	1	153.86**
فاکتور A × فاکتور B Factor A × Factor B	1	31.83^{ns}
ضریب خطای آزمایشی Experimental error coefficient	8	10.15
ضریب تغییرات (CV%) Change coefficient (CV%)	---	15.87

** P<0.01 ns معنادار نمی باشد. .ns is not a significant

رشد گیاهچه ها روی محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین می‌تواند تایید اولیه‌ای بر تراریخته بودن آنها باشد. با وجود این، به منظور اطمینان از تراریختگی گیاهچه‌های باززا شده، تجزیه PCR با آغازگرهای اختصاصی برای در ۹ نمونه‌ی تراریخت شده برای ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 روی گیاهان مثبت حاصل از محیط انتخابی کانامایسین انجام شد. مطابق با نتایج شکل ۴ از هر ۹ نمونه آزمون تراریختگی تعداد ۳ نمونه تراریخته مثبت به دست آمد که بیانگر نسبت ۳۳٪ موفقیت می‌باشد. با توجه به نتایج جدول ۳، پس از آنالیز PCR فراوانی تراریختگی در رقم کنجد کرج، ۳۳ درصد مشاهده گردید. همچنین، تکثیر قطعه ۱۶۳۴ جفت بازی نشان دهنده حضور این ژن در گیاهان تراریخت می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود، ظهور باند ۱۶۳۴ جفت بازی در نمونه های L5، L6 و L7 در مقایسه با کنترل منفی حاکی از تراریختگی آنها با ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 است. عدم ظهور باند در کنترل منفی (L1) نشان دهنده عدم وجود هر گونه آلودگی می‌باشد. لازمه هر فرایند تراریختگی موفق، قابلیت باززایی گیاهچه ها از سلول‌های منفردی است که DNA خارجی به طور پایدار وارد ژنوم آن شده باشد. نکته قابل توجه در به کارگیری ریزنمونه کوتیلدون، وجود مریستم انتهایی در بین برگ‌های اولیه است، در صورتی که این بخش کاملا حذف نگردد، پس از آلوده‌سازی با آگروباکتریوم و کشت گیاه بر روی محیط‌های کشت، جوانه اصلی سریعاً رشد نموده و محقق دچار اشتباه می‌شود. هرچند، این گیاهچه‌های اولیه پس از نگهداری بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین حذف می‌گردند. مزیت

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

استفاده از هیپوکوتیل را آسان بودن برش و راحتی تلقیح آنها با سوسپانسیون آگروباکتریوم گزارش نموده‌اند. تاثیر رقم و پاسخ آن به کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه های تراریخته و غیر تراریخته در این آزمایش کاملاً مشهود بود.



شکل ٤. آنالیز نمونه های تراریخت شده توسط PCR. L1: کنترل منفی، L2, L3, L4, L8, L9: نمونه های عدم موفقیت تراریختگی. L5, L6, L7: نمونه های موفقیت تراریختگی با باند ١٦٣٤ جفت باز. M: مارکر مولکولی ۱ کیلو باز

Figure 4. Analysis of transgenic samples by PCR. L1: Negative contro. L2, L3, L4, L8, L9: Examples of transgenic failure. L5, L6, L7: Successful examples of translocation with 1634 bp band. M: Molecular marker 1 kb

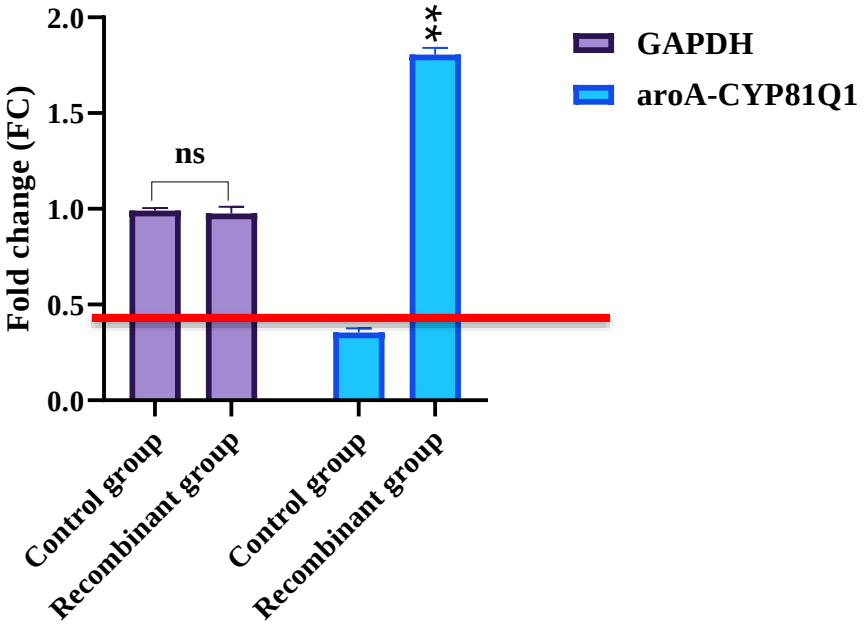
جدول ۳. فراوانی تراریختگی در کنجد رقم کرج در این پژوهش

Table 3. Frequency of transgenics in sesame cultivar Karaj in this study

فراوانی تراریختگی (٪) Frequency of (٪) transgenics	آنالیز نتایج PCR Analysis of PCR results	تعداد کوتیلدون آلوده شده Number of infected cotyledons	رقم گیاه Plant cultivar
33	3	90	کنجد کرج Sesame of Karaj

نتایج بررسی بیان ژن نوترکیب: بررسی بیان ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 در گروه های کنترل (عدم تراریختگی) با گروه نوترکیب (گروه تراریخت شده) توسط آزمون real-time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که میزان بیان CYP81Q1 در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان گروه کنترل ۵ برابر افزایش یافته است. میزان بیان ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 در گیاهان

تراریخت برابر با ۱٫۸ و در گیاهان کنترل ۰٫۳۵ به دشت آمد که تفاوت معناداری در سطح P<0.01 را از نظر آماری نشان دادند. این افزایش بیان تایید کننده صحت تراریختگی می‌باشد.



شکل ۵. میزان بیان ژن نوترکیب aroA-CYP81Q1 در گیاهان گروه کنترل در مقایسه با گیاهان تراریخته شده. **P<0.01

Figure 5. Expression of recombinant aroA-CYP81Q1 gene in control group plants compared to transgenic plants. ** P <0.01

تا سال‌های اخیر، تحقیقات در زمینه کشت بافت کنجد تنها روی ارقام خاصی از این گیاه انجام شده است که اکثر آنها بومی هندوستان می‌باشند. همچنین، مطالعه در زمینه مهندسی ژنتیک و انتقال ژن فقط روی رقم آمریکایی و ارقام هندی به تعداد محدود در مورد ژن‌های گزارش گر و گزینش گر مانند GUS و NPTII صورت گرفته است (Pathak et al. 2014). در این تحقیق از سویه آگروباکتریوم (سویه های LBA4404 مقاوم به استرپتومایسین) استفاده شد. نکته قابل توجه این است که این سویه دارای سرعت رشد و عادت رشدی متفاوت می باشد، به طوری که سویه LBA4404 دارای سرعت رشد بالا بوده و سوسپانسیون سلولی یکنواختی را ایجاد می‌کند. با توجه به جدول ۳ و شکل ۴ برتری سویه LBA4404 در تراریختگی گیاه کنجد کاملا مشهود است. در واقع، این سویه توانایی بالایی جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی داشته است. همان طور که قبلا اشاره شده پس از تجزیه PCR فراوانی تراریختگی در رقم کنجد کرج ۳۳٪ نشان داده شد. این امر بیان کننده کاهش مشهود در باززایی می‌باشد. کاهش در باززایی گیاهچه‌های تراریخته ممکن است به علت اثرات بازدارنده کانامایسین در محیط انتخابی یا اثرات نامطلوب T DNA پلاسمید

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

باشد. این در حالی است که در مطالعه‌ای فراوانی گیاهچه‌های باززاشده از کالوس‌های تراریخته با سویه LBA4404 حاصل از ریزنمونه برگ در رقم کنجد حدود ۱۵ درصد در مقایسه با ۲۶ درصد باززایی از کالوس‌های غیر تراریخته بوده است. در مطالعه‌ای دیگر، فراوانی تراریختگی با سویه LBA4404 در ریز نمونه‌های گیاه روغنی ۳۴-۲۳ درصد گزارش شده است (Sankata Rao and Rohini et al. 1999).

همچنین، در مقایسه دو سویه آگروباکتریوم با یکدیگر در کارآیی تراریختگی گیاه کلزا ، برتری سویه LBA4404 با بیشترین میزان تراریختگی (۲۸/۹۵ درصد) نسبت به سویه GV3101 گزارش شده است (Zebarjadi et al 2006 Kahrizi .2007 et al). این نتایج همسو با مطالعه ما می باشد به طوری که تایید کننده کارایی سویه LBA4404 در ایجاد گیاهان تراریخته می باشد. در تحقیقی دیگر در خصوص تراریختگی با سویه LBA4404 جهت تغییر ترکیب اسید چرب اروسیک کلزا، فراوانی تراریختگی را حدود ۲۹ درصد در محیط انتخابی حاوی ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین ، گزارش کردند (Zeharjadi et al. 2006) . در تحقیقی دیگر، مقایسه سویه‌های LBA4404 و GV3101 آگروباکتریوم در خصوص تراریختگی در رقم کلزا انجام گردید (Zebarjadi et al , 2006, Piri-Gharaghie et al. 2022).

در این تحقیق ، برتری سویه LBA4404 با میزان تراریختگی ۳۳ درصد گزارش گردید. با توجه به معنی دار شدن اثر سویه های آگروباکتریوم در جدول تجزیه واریانس، به نظر می رسد که علیرغم قدرت بالای بیماریزایی LBA4404 ، میزان گیاهان تراریخته و باززایی شده در آن مناسب است. به علاوه معنی دار نشدن اثر متقابل رقم و سویه در تحقیق حاضر، با نتایج به دست آمده توسط این محققان (Zebarjadi et al. 2006, Kahrizi et al. 2007) مغایرت داشت؛ زیرا آنان اثر متقابل معنی داری را بین سویه آگروباکتریوم و ارقام کلزا مشاهده کردند. به نظر می‌رسد که این نتیجه به علت محدودیت ژنوتیپ های مورد استفاده باشد. محققان گزارش نمودند که معنی دار شدن اثر متقابل سویه های آگروباکتریوم با سایر عوامل به علت تنوعی است که بین سویه های A. tumefaciens وجود دارد و چنانچه برای انتقال ژن از سویه های A. rhizogenes استفاده شود ممکن است اثرات متقابل معنی دار نشود (Menze and Mollers. 1999). سویه‌های A. tumefaciens شدیدا وابسته به ژنوتیپ گیاه مورد استفاده هستند ولی در A. rhizogenes این وابستگی وجود ندارد (chive Menze and Mollers 1999; Stefanov et al. 1994). در این پژوهش، هدف نهایی افزایش مقدار آنتی اکسیدان سزامی موجود در دانه کنجد بود. برای دستیابی به این هدف ابتدا همسانه سازی ژن هدف رمز کننده سیتوکروم P450 در گیاه کنجد رقم کرج انجام شد. نتایج این پژوهش باید سبب القای بیان بالاتر و اختصاصی این ژن و افزایش مقدار سزامین دانه می شد. تاکنون پژوهشی برای افزایش مقدار این ماده در گیاه کنجد انجام نشده است.

در پژوهشی Kato et al. (1998) آنزیمی که پینورزینول را به به ترتیب به پایپریتول و سزامین تبدیل می کند، در میکروزوم های دانه کنجد شناسایی کردند. در پژوهشی دیگر Jiao et al. (1998) آنزیم شناسایی شده توسط پژوهش پیشین را در دسته سیتوکروم P450 وابسته به مونواکسیژناز طبقه بندی کردند که تشکیل پلی متیلن دی اکسی روی حلقه آروماتیک در هر دو انتهای

پینورزینول را کاتالیز می‌کند. ژن هدف این مطالعه توسط .Ono et al (2006) شناسایی شده و بیان آن در مخمر، فعالیت این ژن را به صورت تشکیل پل در پینورزینول تایید کرده و در نتیجه این آنزیم پایپریتول سزامین سنتاز نام گرفته است. در حالیکه در ابتدا دو آنزیم سیتوکروم P450 با نام‌های سنتاز- پایپریتول و سنتاز- سزامین برای این واکنش پیشنهاد شده بود.

در پژوهش‌های بعدی .Kim et al (2009)با استفاده از تکنیک RNA مداخله گر مانع بیان ژن رمزکننده متایرزینول، لیگنان اصلی یاس زرد در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه شدند و با انتقال ژن CYP81Q1 مسیر بیوسنتز این لیگنان را به سمت تولید سزامین هدایت کردند. در این پژوهش نیز همسو با پژوهش‌های بالا، ژن مربوط به آنزیم سیتوکرون P450 که از آنزیم های ضروری در مسیر سنتز سزامین می‌باشد، از کنجد رقم کرج، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. پس از برش قطعه ژن و پلاسمید هدف با آنزیم های برش دهنده، قطعه ژنی به ناقل بیانی متصل شد. میزان موفقیت تراریختگی سنجیده شد و میزان بیان سزامین در ۲ سویه تیمار شده و تیمار نشده سنجیده شد. نتایج این پژوهش نشان دهنده افزایش بیان سزامین در گیاه تراریخته می‌باشد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این پژوهش ژن CYP81Q1 به طور موفقیت آمیز در گیاه کنجد رقم کرج بیان شد که نتیجه آن باع افزایش میزان خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه می باشد. از آنجایی که ناقل های بیانی مبتنی برpBI121 نسبت به سایر ناقل های بیانی، کارایی بالایی داشته و به طور گسترده در انتقال ژن های نوترکیب به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند، ناقل نوترکیب ساخته شده در این پژوهش بیانگر انتقال موفق ژن مولد سزامین به گیاه کنجد برای افزایش ویژگی های صنعتی آن می‌باشد.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم/فرض می‌دانند از آقای دکتر توحید پیری قراقیه مدیرعامل شرکت BIO3P از هلدینگ آمیتیس ژن به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

منابع

عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۷۷-۱۹۲.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانیmRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.

محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

Andargie M, Vinas M, Rathgeb A, et al. (2021) Lignans of Sesame (*Sesamum indicum* L.): A Comprehensive Review. Molecules Basel 26(4), e883.

Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200 (In Persian).

Callender P, Wettig D (2021) Phase Behavior of Non-Ionic Surfactant-Medium Chain Triglyceride-Water Microemulsion Systems. J Surfactants Deterg 24(4), 603-629.

Chen J, Yu Q, Patterson E, et al. (2021) Dinitroaniline herbicide resistance and mechanisms in weeds. Front Plant Sci 12, 507.

Hussain A, Hameed A, Ajmal I, et al. (2018) Effects of sesame seed extract as a natural antioxidant on the oxidative stability of sunflower oil. J. Food Sci. Technol 55(10), 4099–4110.

Hwang H, Yu M, Lai M (2017) Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. TAB 15, e0186.

Ishida Y, Hiei Y, Komari T (2020) Tissue culture protocols for gene transfer and editing in maize (*Zea mays* L.). Plant Biotechnol 37(2), 121–128.

Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA (2022) Fabrication and Characterization of pcDNA3. 1 (+) Location within Chitosan/Nanoparticles Complexes for Enhanced Gene Delivery. Iran. J. Biotechnol 20(3), 88-100. doi: 10.30498/ijb.2022.297534.3110.

Jan K, Chang Y, Hwang L, et al. (2012) Tissue distribution and cytochrome P450 inhibition of sesaminol and its tetrahydrofuranoid metabolites. J Agric Food Chem 60(35), 8616–8623.

Jiao Y, Davin LB, Lewis NG (1998) Furanofuran lignan metabolism as a function of seed maturation in Sesamum indicum: Methylenedioxy bridge formation. Phytochemistry49(2):387-94.

Kahrizi D, Salmanian A, Afshari A, et al. (2007) Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of E. coli (k12) and transformation of rapeseed (Brassica napus L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Rep 26(1), 95–104.

Kato M, Chu A, Davin L, et al. (1998) Biosynthesis of antioxidant lignans in Sesamum indicum seeds. Phytochemistry 47(4):583-91.

Kim H, Ono E, Morimoto K, et al. (2009) Metabolic engineering of lignan biosynthesis in Forsythia cell culture. Plant Cell Physiol 50(12):2200-9.

Leino, L, Tall T, Helander M, et al. (2021) Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. J Hazard Mater 408, 124556.

Masoudzadeh S, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Menze A, Mollers C (1999) Transformation of different Brassica napus cultivars with three different strains of Agrobacterium rhizogenes. New Horizos for an old crop, in: Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Piri-Gharaghie T, Beiranvand S, Riahi A, et al. (2022) Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: Improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. Chem. Biodivers 19(3), e202100426.

Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (Foeniculum vulgare) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. Heliyon 7 (12), e08542.

Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. Agric Biotechnol J 12, 191-208 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12 (1), 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Muthulakshmi C, Sivaranjani R, & Selvi S (2021) Modification of sesame (*Sesamum indicum* L.) for Triacylglycerol accumulation in plant biomass for biofuel applications. Biotechnol Rep 32, e00668.

Myint D, Gilani S, Kawase M, et al. (2020) Sustainable sesame (Sesamum indicum L.) production through improved technology: An overview of production, challenges, and opportunities in Myanmar. Sustainability 12(9), 3515.

Naylor R (2016). Oil crops, aquaculture, and the rising role of demand: A fresh perspective on food security. Glob Food Sec 11, 17-25.

Ono E, Nakai M, Fukui Y, et al. (2006) Formation of two methylenedioxy bridges by a Sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin. Proc Natl Acad Sci 103(26):10116-21.

Pathak N, Bhaduri A, Rai A (2019) Sesame: Bioactive compounds and health benefits. *Food* Chem 181-200.

Pathak N, Rai A, Kumari R, et al. (2014) Value addition in sesame: A perspective on bioactive components for enhancing utility and profitability. Pharmacogn Rev 8(16), 147–155.

Piri-Gharaghie T, Jegargoshe-Shirin N, Saremi-Nouri S, et al. (2022) Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant Staphylococcus Epidermidis biofilm formed. Sci rep 12(1):1-3.

Sankara Rao K, Rohini VK (1999) Gene transfer intoIndian cultivars of safflower (Carthamus tinctorius L.) using Agrobacterium tumefaciens. Plant Biotechnol 16:201-206.

Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (Foeniculum vulgare) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.

Stefanov I, Fekets S, Bogre L, et al. (1994) Differential activity of the mannopine synthase and CaMV 35S promoters during development of transgenic rapeseed plants. Plant Science 95:175-186.

Verma H, Theunuo S, Kumar A, et al. (2021) Prospects of Sesame Cultivation in North Eastern India. *Current biotica* 3(5), 330-331.

Zebarjadi AR (2005) The effect of transferred sense and anti-sense constructs of gene encoding β-ketoacyl CoA synthase on production of erucic acid in rapeseed. Ph. thesis, Tarbiat Modares University. (In Farsi).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500