فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۰- ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

تراریختی ریسه‌های قارچ چربی‌ساز *Mortierella alpina* با استفاده از سیستم تراریختی AMT (*Agrobacterium* Mediated Transformation)

آیدا جوانمرد: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، aida.javanmard@gmail.com
فروغ سنجریان *: استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، fsanjarian@nigeb.ac.ir
زهره حمیدی اصفهانی: دانشیار بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، hamidy_z@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: قارچ رشته‌ای *Mortierella alpina* منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع به‌خصوص آراشیدونیک اسید است. این ماده پیش‌ساز تولید تعدادی از ایکوزانوئیدهاست که در رئولوژی خون، فعال‌سازی پلاکت‌ها و عملکرد لوکوسیت‌ها و ویژگی‌های عملکردی غشای سلولی نقش دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه انتقال ژن *بتا گلوکورونیداز* به قارچ *M. alpina* CBS754/68 با استفاده از باکتری‌های *Agrobacterium rhizogenes* و *Agrobacterium tumefaciens* بررسی شد. باکتری‌های حاوی ناقل pBI121 برای تراریختی ریسه‌های قارچ استفاده شد. ریسه‌های سه روزه با سه تیمار یک، دو و سه ساعت در معرض قرارگیری سلول‌های باکتری در حضور استوسیرینگون به‌عنوان بافت هدف استفاده شد. پایداری میتوزی تراژن تا نسل سوم (T2) در قارچ‌های تراریخت با استفاده از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد بیشترین درصد تراریختی مربوط به باکتری *A. tumefaciens* و بیشترین پایداری میتوزی در تراریخت‌های حاصل از کاربرد *A. rhizogenes* است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که برای حصول نتیجه با بازده تراریختی بیشتر و پایدارتر استفاده از گونه مناسب *Agrobacterium* فاکتوری اساسی است. نوع گونه و سویه قارچ و شرایط آزمایش در انتقال ژن به این روش بسیار مؤثر است. این اولین گزارش برای تراریختی قارچ اتوتروف *M. alpina* با استفاده از *Agrobacterium* است.

واژه‌های کلیدی: پایداری ژنتیکی، تراریختی، رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS، *Agrobacterium*، *Mortierella alpina*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

قارچ‌ها جزء یوکاریوت‌های پستی هستند که فضای امیدبخشی را در پژوهش‌های زیست‌فناوری ایجاد کرده‌اند. این موجودات به دلیل داشتن ویژگی رشد خوب در محیط‌های متفاوت، پژوهش‌های بسیاری را به خود جلب کرده است (۱- ۲). امروزه از قارچ‌ها به‌شکل گسترده‌ای در صنعت کشاورزی و پزشکی استفاده می‌شود که این امر مرهون قابلیت این موجودات در سنتز آنزیم‌های تک‌یاخته‌ای، انواع اسیدهای آلی، پروتئین و روغن‌های تک‌سلولی[1] است (۳- ۴).

قارچ *Mortierella alpina* قارچی رشته‌ای، خاکزی و از راسته زیگومیست‌ها[2] است که منبع مهم و سرشاری از انواع اسیدهای چرب غیراشباع به‌ویژه آراشیدونیک اسید است (۵). آراشیدونیک اسید میکروبی از سال ۱۹۹۸ در فرمول غذایی کودک در استرالیا و نیوزلند استفاده می شد. در برخی از کشورهای اروپایی نیز از سال ۱۹۹۴ در فرمول غذای کودک اضافه شد. در سال ۲۰۰۱ تا ۱۷درصد فرمول غذای کودک آراشیدونیک اسید میکروبی استفاده می‌شد که در مدت ۶ ماه به‌حدود ۷۸درصد رسید (۶). کارلسون[3] و همکاران در سال ۱۹۹۳ پیشنهاد دادند که آراشیدونیک اسید بهبود رشد کودکان نارس در سال اول زندگی‌شان را به دنبال دارد (۷).

تاکنون روش‌های مختلف تراریختی از جمله تراریختی پروتوپلاست قارچی، استفاده از تفنگ ژنی، تیمار با لیتیوم استات، الکتروپوریشن و استفاده از *Agrobacterium* در قارچ‌ها به کار برده شده است (۸- ۱۶). ویژگی‌های بارز تراریختی با واسطه *Agrobacterium* از این قرار است: بازده بالای تراریختی، پایین‌بودن هزینه تراریختی و قابلیت استفاده از بافت‌های هدف مختلف (۱۷). تراریختی مخمر *Sacharomyces cerevisae* با کمک *A. tumefaciens* در سال ۱۹۹۵ بانداک[4] و همکاران گزارش شد (۱۸). گووکا[5] و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ تراریختی‌های موفقی را در قارچ‌های رشته‌ای توسط *A. tumefaciens* گزارش کرده‌اند(۱۸ و ۱۹). اولین گزارش تراریختی قارچ رشته‌ای با استفاده از *A. rhizogenes* توسط وی[6] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ ارایه شد (۲۰).

با توجه به بررسی مطالعات پیشین هدف از اجرای این پژوهش، بررسی و معرفی روشی با بازده بالا و کم‌هزینه جهت تراریختی قارچ *M. alpina* بود. به این منظور با استفاده از باکتری‌های *A. tumefaciens* و *A. rhizogenes*، میسلیوم های قارچ تراریخت شدند و بازده تراریختی و پایداری میتوزی بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از قارچ *M. alpina* CBS 754/68 که از مجموعه میکروبی کشور هلند به‌صورت میسیلیوم در لوله آزمایش شیب‌دار خریداری شده بود و از باکتری‌های *A. rhizogenes* سویه *ATCC15834* و *A. tumefaciens* سویه *LBA4404* که هر دو حاوی ناقل pBI121 بودند استفاده شد.

به‌منظور شناسایی نشانگر مناسب برای تراریختی قارچ چهار نشانگر، آنتی بیوتیک کانامایسین و هیگرومایسین B با غلظت‌های ۵۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سنجش فلوروسنت داخلی (بررسی میسیلیوم‌های قارچی زیر میکروسکوپ فلوروسنت) و ژن نشانگر *gus* بررسی شد.

جهت تراریختی این قارچ از محیط‌های کشت القا[7] و هم کشتی[8] (۱۶)، برای رشد و نگهداری قارچ از محیط

کشت مالت اکسترکت آگار و برای رشد باکتری‌ها از محیط کشت *Luria-Bertani* استفاده شد.

جهت شناسایی بهترین سن ریسه برای تراریختی از ریسه‌های ۱، ۳ و ۶ روزه استفاده شد. برای القای تراریختی قارچ توسط باکتری از محیط کشت القا استفاده شد. اجزای این محیط کشت عبارت بودند از (۱۶):

(10 mM K_2HPO_4, 2.5 mM NaCl, 10mMKH_2PO_4, 2mMM$gSO_4.7H_2O$, 0.7mM $CaCl_2$, 9 µM $FeSO_4.7H_2O$, 4 mM (NH4)2SO4, 10 mM glucose, 0.5% glycerol (w/v), 200 µM acetosyringone, 40 mM 2-[*N*-morpholino] ethanesulfonic acid (MES), pH:5.3)

محیط کشت هم کشتی دارای اجزایی تقریباً مشابه با محیط کشت القاء بود؛ با این تفاوت که مقدار گلوکز از ۱۰ میلی‌مولار به ۵ میلی‌مولار تقلیل یافته بود و ۱/۵درصد آگار برای ایجاد محیط کشت جامد به آن افزوده شده بود (۱۶).

از محیط کشت مالت اکسترکت آگار حاوی ۲۰۰ ماکرومولار آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[۹] برای حذف سلول‌های باکتریایی استفاده شد.

برای تهیه سلول‌های قارچی موردنیاز جهت تراریختی ۳ روز پس از کشت سویه قارچی، به کمک لوپ، ریسه‌های قارچی از روی محیط کشت مالت اکسترکت آگار جمع‌آوری شد و در دو و نیم میلی‌لیتر آب مقطر استریل محلول شد. به هر ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت القاء ۱۰۰ ماکرولیتر سلول‌های باکتریای تازه از کشت شبانه (OD_{660}=0.6) و ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های قارچی اضافه شد. استوسیرنگون در این محیط کشت به‌منظور فعال‌سازی ژن‌های *vir* باکتریایی اضافه شد.

سپس محیط کشت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد. پس از طی تیمارهای ۱، ۲ و ۳ ساعته محیط کشت القاء به‌مدت ۳ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفوژ شد. ۷ میلی لیتر از مایع رویی بیرون ریخته شد و مابقی به محیط کشت هم کشتی که سطح آن با فیلترهای غشایی پوشانده شده بود، منتقل شد. مخلوط سوسپانسیون سلول‌های قارچی و باکتریایی به‌مدت ۵ روز در این محیط و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جهت جلوگیری از رشد سلول‌های باکتریایی، فیلترهای غشایی به محیط کشت انتخاب‌گر مالت اکسترکت آگار حاوی سفوتاکسیم منتقل شدند که این عمل ۴ تا ۵ بار به فواصل یک تا دو روز تکرار شد. پس از گذشت حدود ۷ روز از ظاهرشدن کلونی‌های قارچی و با اطمینان از نابودی تمام سلول‌های باکتریای از طریق مشاهده زیر میکروسکوپ و کشت دوباره در محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک و رشدنکردن سلول‌های باکتری در روی محیط کشت، رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS با جداکردن قسمتی از کلونی‌های قارچی رشدکرده انجام شد و در محلول رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS در تاریکی به‌مدت ۵ تا ۷ روز قرار داده شد (۲۱). با به‌دست‌آوردن نسبت تعداد کلونی‌هایی که به آزمون GUS جواب مثبت داده بودند به کل کلونی‌های رشدکرده، راندمان تراریختی به دست آمد. به‌طور تصادفی از قارچ‌هایی که بیان ژن *gus* در آن‌ها مثبت بود هشت کلونی انتخاب و استخراج DNA به‌روش صفایی و همکاران[۱۰] در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت (۲۲). این DNA جهت آزمون PCR استفاده شد. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای[۱۱] پیش‌برنده و معکوس برای راه‌انداز[۱۲] انجام گرفت. اثبات وجود این راه‌انداز در قارچ، درواقع اثبات ورود قطعه خارجی به قارچ و تراریخت‌شدن آن است.

توالی آغازگر برای راه‌انداز CaMV 35S عبارت بودند از: آغازگر پیش‌برنده

5′ GCTCCTACAAATGCCATCA 3′

و آغازگر معکوس

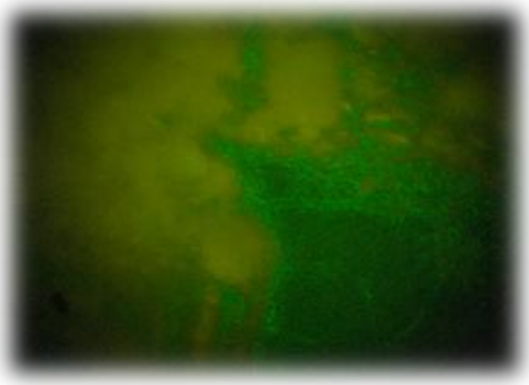
5′ GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3′

شرایط دمایی واکنش PCR عبارت بود از واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، اتصال ۶۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و طویل‌شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه که ۳۰ سیکل تکرار می‌شد.

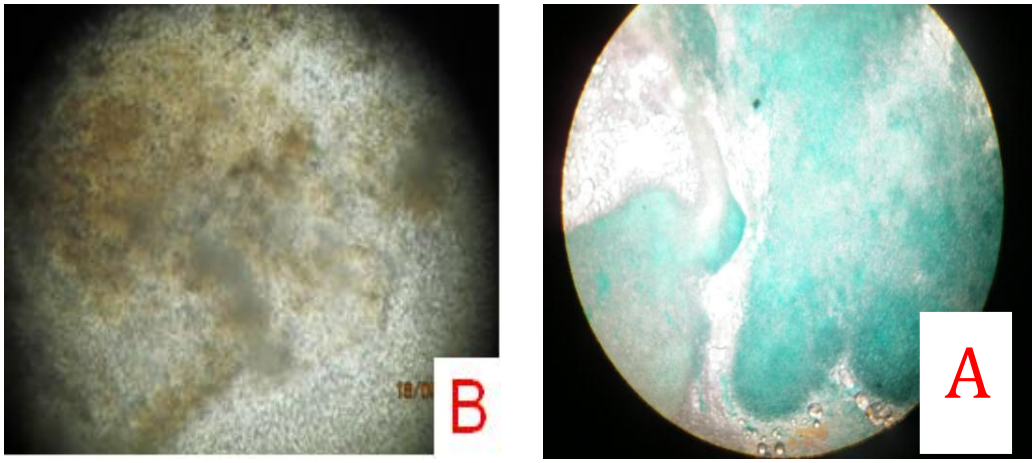
به‌منظور بررسی میزان پایداری ژنتیکی در کلونی‌های قارچی تراریخت ۱۰ روز پس از کشت در محیط کشت مالت اکسترکت آگار جدید بار دیگر آزمون رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS بر روی قارچ‌های تراریخت انجام گرفت. ورود و بیان ژن خارجی *gus* با این رنگ‌آمیزی اثبات می‌شود. با بررسی تعداد کلونی‌های قارچ‌هایی که تغییر رنگ داده بودند نسبت به تعداد کل کلونی‌های آزمون‌شده هیستوشیمیایی، میزان پایداری میتوزی ژنتیکی برآورد می‌شد. این آزمون برای نسل T2 نیز تکرار شد.

نتایج

مقایسه میزان رشد میسلیوم‌های قارچی در محیط‌های کشت حاوی کانامایسین و هیگرو مایسین B نشان داد که هیچ‌کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها، اثر بازدارنده‌ای بر روی رشد قارچ ندارند. بررسی میسیلیوم‌های قارچی زیر میکروسکوپ فلوروسنت، وجود میزان زیادی از فلوروسنت داخلی را در تیپ وحشی این قارچ نشان داد که این امکان استفاده از ژن *gfp* به‌عنوان ژن گزارشگر را سلب می‌کرد (شکل ۱).



شکل ۱- میزان بیان بالای فلورسنت داخلی در تیپ وحشی قارچ *M. alpina* سویه CBS 754/68



شکل ۲- مقایسه بافت قارچی تراریخت A) و غیرتراریخت (B) *M. alpina* در پاسخ به رنگ‌آمیزی هیستو شیمیایی GUS

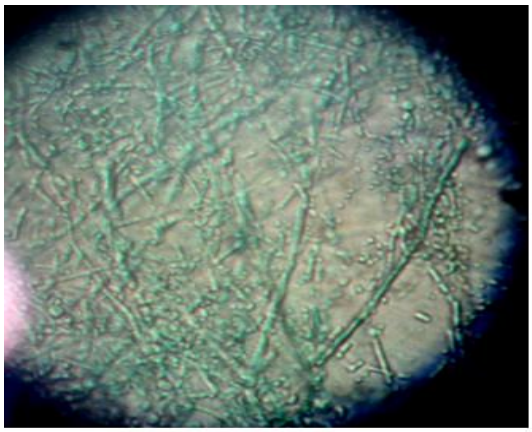
با مقایسه نشانگرهای آزمون‌شده ژن نشانگر *gus* برای تراریختی این قارچ انتخاب شد(شکل ۲).

در بررسی سن مناسب ریسه برای تراریختی، نتایج نشان از مناسب‌بودن ریسه ۳روزه بود. زیرا با توجه به رشد اندک میسیلیوم‌ها بر روی محیط کشت در روز اول جداسازی میسیلیوم‌های قارچی امکان‌پذیر نبود و در قارچ‌های ۶روزه پلیت قارچی تشکیل‌شده پس از جدایی از محیط کشت به‌سختی در آب استریل از هم جدا می‌شد و سلول‌های قارچی اغلب به‌صورت توده‌ای به‌هم‌پیوسته بودند که بی‌تردید بر روی انتقال ژن به‌طور مستقیم بر روی تک‌تک سلول‌های قارچی اثر عکس به جا می‌گذاشت. جداسازی سلول‌های میسیلیومی ۳روزه از هم، با ورتکس شدید راحت‌تر انجام می‌گرفت و سوسپانسیون سلولی مناسب‌تر و یکنواخت‌تری را ایجاد می‌کرد. به‌این‌ترتیب، تک‌ریسه‌های سه‌روزه با باکتری دارای پلاسمید pBI121 تراریخت شد و بیان ژن *gus* در کلونی‌های رشدیافته از تک‌ریسه تراریخت، ارزیابی شد (شکل ۳).

بررسی داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش مدت‌زمان القا و نوع باکتری (جدول ۱) به‌وضوح بیانگر این نکته بود که مدت‌زمان القای سلول‌های قارچی با اگرو *باکتریوم* به‌میزان زیادی بر روی فراوانی سلول‌های تراریخت اثرگذار است؛ به این دلیل که استوسیرینگون اضافه‌شده به محیط کشت القا بر ژن‌های *vir* باکتری تأثیر مستقیم دارد و درنهایت باعث افزایش بازده تراریختی می‌شود (جدول ۱).

راندمان تراریختی در هنگام استفاده از *A. tumefaciens* بیش از *A. rhizogenes* بود؛ اما پایداری میتوزی تراریخت‌های حاصل از *A. rhizogenes* بیش از تراریخت‌های حاصل از *A. tumefaciens* بود (جدول ۱).

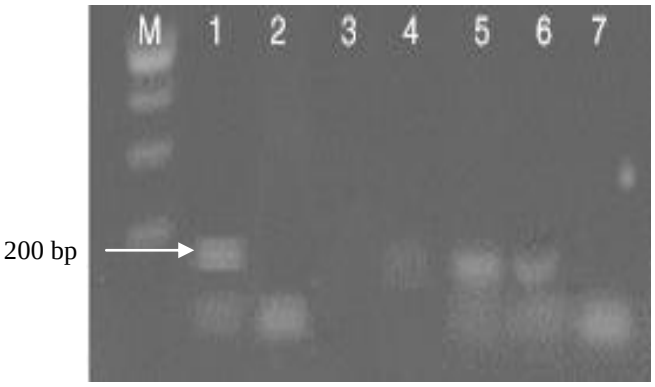
با مشاهده باند موردنظر (قطعه ۲۰۰ جفت بازی) در نتایج آزمون زنجیره‌ای پلیمراز انجام‌شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی راه‌انداز CaMV 35S بر روی هشت کلونی منتخب، انتقال ژن *gus* را در سطح مولکولی تأیید کرد (شکل ۴).



شکل ۳- عکس میکروسکوپی تک‌ریسه (X۱۰) بافت قارچی تراریخت *M. alpina* با پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus*

جدول ۱- اثر نوع باکتری و مدت‌زمان تیمار بر روی درصد تراریختی و اثر نوع باکتری بر روی پایداری میتوزی

تیمار		درصد تراریختی	پایداری میتوزی نسل ۲	پایداری میتوزی نسل ۳
باکتری	مدت‌زمان القا (ساعت)			
A. tumefacines	۱	۴درصد	۲۰درصد	۳۵درصد
	۲	۲۰درصد		
	۳	۷۰درصد		
A. rhizogenese	۱	۰درصد	۵۵درصد	۷۰درصد
	۲	۵درصد		
	۳	۴۷درصد		



شکل ۴- محصولات PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی راه‌انداز CaMV 35S از ژنوم قارچ *M. alpina*. M: 1Kb ladder (Fermentas). ۱: کنترل مثبت (ناقل pBI121)، ۲ و ۷: قارچ *M. alpina* غیرتراریخت بدون بیان ژن *gus*، ۴-۶: قارچ‌های تراریخت دارای بیان ژن *gus*، ۳: کنترل منفی (واکنش بدون الگو)

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طورکلی برای تراریخت‌کردن قارچ‌های رشته‌ای از روش‌های مختلفی استفاده شده است. در این مطالعه با اشاره به این نکته که هرکدام از روش‌ها معیارهای خاص خود را دارند و به‌منظور بهینه‌سازی آن‌ها نیاز به وقت و هزینه زیادی است، از سامانه AMT استفاده شد. با توجه به اینکه قارچ *M. alpina* 1S-4 از جمله قارچ های صنعتی مهم در تولید آراشیدونیک اسید است، انتقال ژن‌های مؤثر در تولید این ماده (۲۳) توسط تراریختی کارآمد و پایدار می‌تواند در معرفی سویه‌هایی از قارچ با توان افزایش یافته در تولید آراشیدونیک اسید مؤثر باشد. با آزمایش‌های مختلف و مقایسه روش‌های مختلف تراریختی شناخته‌شده، روشی سراسری برای تراریختی این قارچ با استفاده از بمباران ژنی را تاکنو[۱۳] و همکاران در سال ۲۰۰۴ تعریف کردند. در روش آن‌ها از اسپورهای قارچی *M. alpina* 1S-4 جهش‌یافته اگزوتروف اوراسیل استفاده شده است (۲۴). در سال ۲۰۰۹، آندو[۱۴] و همکارانش سامانه ATMT[۱۵] (با استفاده از باکتری *A. tumefaciens* سویه *C58C1* و ناقل pBIG2RHPH2) را برای تراریخت‌کردن قارچ *M. alpina* 1S-4 اگزوتروف یوراسیل به کار بردند و این فناوری را برای ایجاد تراریخت‌های با ثبات میتوزی را موفقیت‌آمیز توصیف کردند. بافت هدف آن‌ها برای تراریختی به این روش، اسپورهای قارچی به‌دست‌آمده با استفاده از کشت قارچ در محیط Czapek-Dox بود (۱۶).

پژوهش حاضر، نخستین پژوهش در رابطه با تراریختی میسیلیوم‌های قارچ *M. alpina* و اولین گزارش تراریختی بر قارچ *M. alpina* سویه *CBS754.68* است. تاکنون اغلب پژوهش‌های انجام‌گرفته بر قارچ‌های اگزوتروف بوده است و با توجه به ضعیف‌بودن قارچ‌های جهش‌یافته نسبت به تیپ وحشی معرفی ژن نشانگر مناسب و بهینه‌سازی روش تراریختی برای قارچ تیپ وحشی، ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این نکته که راه‌انداز استفاده‌شده در این تراریختی قارچ نیز برای نخستین بار استفاده شد و در سایر قارچ‌های رشته‌ای نیز به‌ندرت استفاده شده است. میزان بیان بالای ژن بتاگلوآورونیداز (*gus*) در قارچ‌های تراریخت به‌دست‌آمده، این راه‌انداز را راه‌اندازی مناسب برای تراریختی قارچ‌ها به‌خصوص این قارچ معرفی می‌کند.

با وجود تازگی این روش تراریختی در قارچ‌های رشته‌ای، مطالعات نسبتاً وسیعی در این زمینه انجام شده است. ولی توجه به این نکته با اهمیت است که نوع گونه و سویه قارچ و شرایط آزمایش در این روش بسیار مؤثر است. با مقایسه تیمار مدت‌زمان القا با استوسیرینگون می‌توان گفت اضافه‌کردن استوسیرینگون برای فعال‌سازی ژن‌های *vir* باکتری و انتقال ژن مؤثر، مهم است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که برای حصول نتیجه با بازده تراریختی بالاتر و پایدارتر استفاده از گونه مناسب *اگروباکتریوم*، فاکتوری اساسی است. براساس یافته‌های به‌دست‌آمده، بازده تراریختی با *A. tumefaciens* بالاتر بود ولی پایداری میتوزی بیشتر زمانی به دست آمد که از *A. rhizogenese* برای تراریختی میسیلیوم‌های قارچی استفاده شده بود. اشاره به این نکته ضروری به نظر می‌رسد که چون انتقال ژن با استفاده از *A. rhizogenese* تاکنون در قارچ‌های رشته‌ای تنها یک بار گزارش شده است (۲۰)، برای اطلاع از علت پایداری میتوزی بیشتر تراریختی به‌هنگام استفاده از این باکتری نیاز به مطالعه و بررسی‌های بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این طرح قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول است. نویسندگان از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک به دلیل فراهم کردن امکان این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Iwashita K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi-review. *Bioscience and Bioengineering* 2000; 94 (6): 530- 5.

(2) Ashengroph M. Isolation and characterization of a native strain of *Aspergillus niger* ZRS14 with capability of high resistance to zinc and its supernatant application towards extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Biological Journal of Microorganisms* 2013; 2 (7): 29-44.

(3) Magnuson JK., Lasure LL. *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. NewYork: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004.

(4) Wiebe MG. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi-problems and improvements. *Mycologist* 2003; 17(3): 140- 5.

(5) Nisha A., Kumar Rastogi N., Venkateswaran G. Optimization of Media Components for Enhanced Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina* under Submerged Cultivation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2011; 16: 229- 37.

(6) Food Standards Australia New Zealand. DHASCO and ARASCO oils as sources of long chain polyunsaturated fatty acids in infant formula. A safety assessment. *Technical report Series NO.22*., Canberra, Australia: FSANZ; 2003.

(7) Carlson SE., Werkman SH., Peeples JM., Cooke RJ., Tolley EA. Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proceeding of National Academic Science of USA* 1993; 97: 1073-7.

(8) Moradi S., Sanjarian F., Mousavi A. Optimization of transformation of *Fusarium* graminearum by Helios gene gun...The 16th national and 4th international conference of biology. Mashhad, Iran; 2010.

(9) Turgeon BG., Condon B., Liu J., Zhang N. Protoplast transformation of filamentous fungi. *Methods in Molecular Biology* 2010; 638: 3- 19.

(10) Leclerque A., Wan H., Abschutz A., Chen S., Mitina GV., Zimmermann G., et al. *Agrobacterium* -mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Current Geneicts* 2004; 45: 111- 19.

(11) Ruiz- DõÂez B. Strategies for the transformation of ®lamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 92, 189- 95.

(12) Kawai S., Hashimoto W., Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*and other fungi. *Bioengineered Bugs* 2010; 1(6): 395- 403.

(13) Kumar JA. Development of electroporation- mediated transformation system for axenically cultivable root endophyte fungus *Piriformospora indica*. *Protocol Exchange* 2010; doi: 10.1038/nprot.2010.57

(14) Wood JP., Helinecke EL., Goldman WE. Electro-transformation and Expression of Bacterial Genes Encoding Hygromycin Phosphotransferase and b-Galactosidase in the Pathogenic Fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity* 1998; 66 (4): 1697- 707.

(15) Zhang T., Qi Z., Wang Y., Zhang F., Li R., Yu Q., et al. *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation of *Penicillium expansum* PE-12 and its application in molecular breeding. *Microbiological Research*. 2013; 168: 130- 7.

(16) Ando A., Sumida Y., Negoro H., Anggraini Suroto D.,Ogawa J., Sakuradani E., et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. *Environmental Microbiology* 2009; 75(17): 5529- 35.

(17) Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi-Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 2008; 26 (2): 177- 85.

(18) Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hoykaas PJJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *European Molecular Biology Organization* 1995*;* 14 (13): 3206- 14.

(19) Gouka RJ., Gerk C., Hooykaas PJJ., Bundock P., Musters W., Verrips CT., et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*- mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology* 1999; 17 (6): 598- 601.

(20) Wei DS., Zhang Y-H., Li M-C. *Agrobacterium rhizogenese* mediated transformation of a high oil producing filamentous fungus *Umbelopsis isabellina*. *Applied Genetics* 2010; 51 (2): 225- 32.

(21) Cervera M. Histochemical and fluorometric assays for *uid*A (*GUS*) gene detection. *Transgenic Plants: methods and Protocols* 2004; 203- 13.

(22) Safaee N., Alizade E., Saidi A., Rahimian H., Adam G. Molecular identification and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat. *Iranian Journal of Plant Patology* 2005; 41: 171- 89.

(23) Sakuradani E., Nojiri M., Suzuki H., Shimizu S. Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 84 (4): 709- 16.

(24) Takeno S., Sakuradani E., Murata S., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., et al. Establishment of an overall transformation system for an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Microbiology and Biotechnology* 2004; 65 (4): 419- 25.

[1]- Single cell protein and oil
[2]- Zygomycota
[3]- Carlson
[4]- Bundock
[5]- Gouka
[6]- Wei
[7]- Incubation
[8]- Co-Coltivation
[9]- Cefotaxime
[10]- Safaee et al
[11]- Primer
[12]- Promoter
[13]- Takeno
[14]- Ando
[15]- Agrobacterium Tumefaciens Mediated Transformation

Transformation of *Mortierella alpina* (fatty acid supplier) myceliums via AMT system (Agrobacterium Mediated Transformation)

Aida Javanmard
M.Sc. of Agricultural biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, aida.javanmard@gmail.com
Forough Sanjarian *
Assistant Professor of Cellular and Molecular biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, fsanjarian@nigeb.ac.ir
Zohreh Hamidi-Esfahani
Associate Professor of Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, hamidy_z@modares.ac.ir

Abstract

Introduction: *Mortierella alpina* is one of the most important fungi in food industry because of having ability of synthesizing unsaturated fatty acids, particularly Arashidonic Acid. This is a precursor of Eicosanoidregulate-lipoprotein metabolism which is involved in blood rheology, platelet activation and leukocyte-function, and the functional characteristics of the cell membrane.

Materials and methods: In this study genetic transformation of *M. alpina* CBS754.68 fungus was evaluated via *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes.* Agrobacteriums containing pBI121 vector were used for transformation of three days of old mycelia. Three days old hyphae were exposed to the bacteria with three level of time (one, two and three hours) in the present of acetosyringone. Mitotic stability of the third generation of transgenic (T2) was confirmed by GUS assay and amplification of CaMV 35S promoter by polymerase chain reaction.

Results: The highest percentage of transformation and mitotic stability were obtained by using *A. tumefaciens* and *A. rhizogenese*, respectively.

Discussion and conclusion: The results showed that to obtain more efficient and more stable transformation, the fundamental factor is the use of suitable species of Agrobacterium. It is the first report for transformation of autothroph strain of *M. alpine* via Agrobacterium.

Key words: *Agrobacterium*, *Mortierella alpina,* GUS assay، Transformation, Genetic stability

* Corresponding author
Received: December 17, 2014 / **Accepted:** July 4, 2015