تعبير جين الاختزال الحيوي P4502E1 في نباتي اذان الفأر (*Arabidopsis thaliana*) والسيسبان (*Sesbania grandiflora*)

رغد سلمان محمد* كاظم محمد ابراهيم**

نورية عبد الحسين علي*** انطونيوس الداوود****

الملخص

هدفت الدراسة الحالية الى تحوير نبات السيسبان الشائع الزراعة في الكثير من دول العالم ومنها العراق وراثياً وزيادة قابليته على إزالة الملوثات البيئية. تعتمد تكنولوجيا استعمال النباتات في معالجة الأراضي الملوثة أساساً في تحمل النباتات للملوثات من خلال مقدرتها على تجميع تراكيز عالية من المواد السامة في أنسجتها دون أن تتأثر دورة حياتها. ويجب فهم مقاومة النباتات للتأثير السام والضار للملوثات سواء أكانت عضوية ام غير عضوية لكي يتم تطوير نباتات متحملة للملوثات. حور نباتي اذان الفار (*Arabidopsis thaliana*) والسيسبان (*Sesbania grandiflora*) بنقل الموروث *P4502E1* المعزول من كبد الارنب باستخدام بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*، والكشف عن وجود المورث، وتعبير الجين في النباتات المحورة باستخدام جهاز البلمرة الحراري (PCR). أظهرت النتائج تخليق مسار ايضي جديد في نباتي السيسبان واذان الفار المحورة وراثياً قادرة على تحطيم العديد من الملوثات البيئية. وضع العمل الحالي اساساً في تحوير نباتي السيسبان واذان الفار وراثياً وإكثارهما خارج الجسم الحي (*In vitro*) مما يسهل من عمليات التحوير الوراثي مستقبلاً لهذين النباتين بمورثات جديدة وتطبيق هذه التقانة على نباتات اخرى. تقلل التقانة الحالية من كلف استصلاح الأراضي الملوثة بشكل كبير مقارنة بالطرائق التقليدية المتبعة في استصلاح الاراضي اضافة الى المردودات الاخرى من خفض درجات الحرارة وزيادة الغطاء النباتي وتحسين البيئة عموماً لأغراض جمالية وصحية واجتماعية.

المقدمة

تعرف المعالجة النباتية او الاستصلاح الحيوي النباتي (Phytoremediation) بأنها التقانة التي توظف فيها النباتات الخضراء لمعالجة التربة والمياه والهواء الملوثة بالكيميائيات والمواد المشعة وغيرها. تستعمل النباتات مايزيد على خمس آليات في معالجة الملوثات (**6**). يعتمد تحمل النبات للعناصر الثقيلة على عوامل عده منها ارتباط العنصر بجدر الخلايا، وجود غشاء مقاوم للملوثات، النشاط الزائد للخلايا للتخلص من الملوثات، وجود إنزيمات تساهم في زيادة المقاومة للعناصر لتلك الملوثات مثل Nitroreductases المحطمة للمواد المتفجرة و Dehalogenases المحطمة للمواد الهالوجينية وEsterases المحطمة للمبيدات و Oxidases المحطمة للمواد الهيدروكسيدية، حصر الملوثات في مكان واحد مثل فجوات الخلايا (Vacuoles)، خلب العناصر بواسطة الروابط العضوية أو غير العضوية وتكوين مركبات العناصر قليلة الذوبان (**12**). أوضح Meagher وجماعته (**14**). ان حدوث عمليات بيوكيميائية تساعد على مقاومة النباتات للعناصر الثقيلة مثل مركب (NADPH) في جدر الخلايا والـ ATPase في غشاء بلازما خلايا الجذور اذ يؤديان عملاً هماً في التحولات التي تحدث للعناصر الثقيلة

وزارة العلوم والتكنولوجيا–بغداد، العراق.

كلية العلوم– جامعة النهرين– بغداد، العراق.

معهد الهندسة الوراثية– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

هيئة الطاقة الذرية السورية، سوريا.

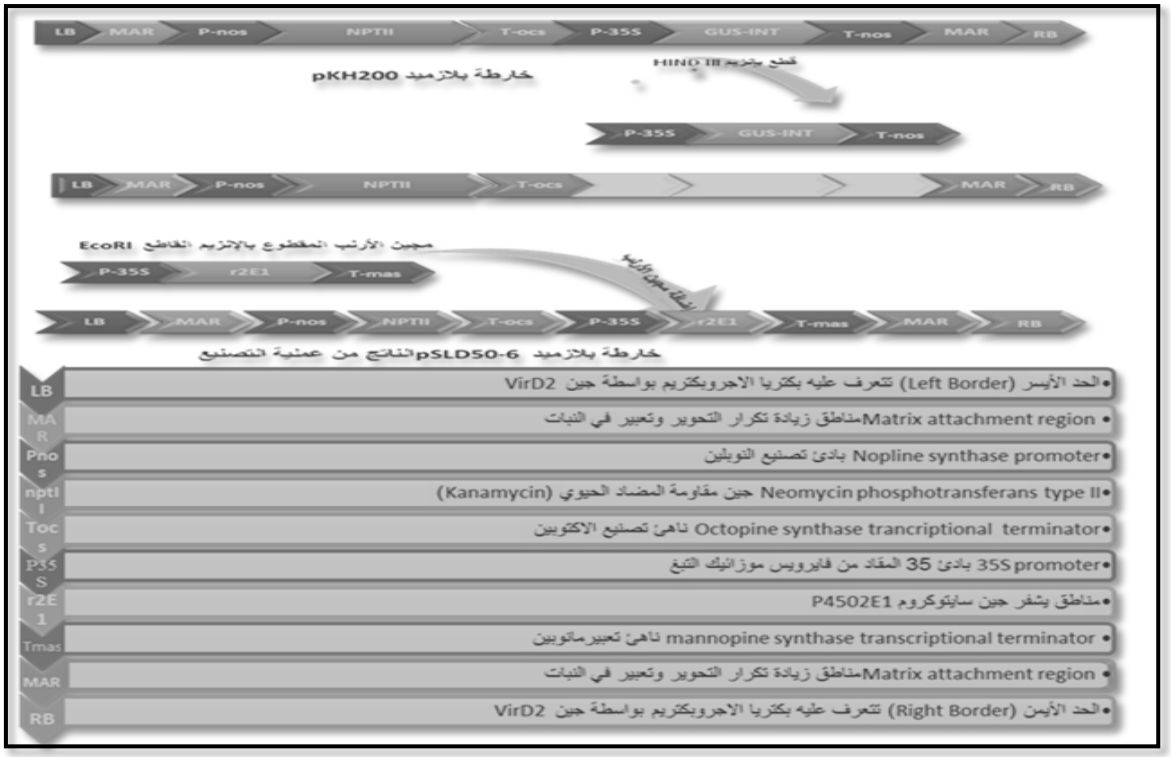
Inui وجماعته (**10**) والتي تؤدي إلى إزالة الأثر السام للملوثات في النبات. توجد الآن بعض النظريات التي تعزو فيها مقاومة النباتات للعناصر الثقيلة إلى وجود مورث معين متخصص. أثبتت الدراسة التي قام بها Ortiz وجماعته (**18**). وجود مورث مقاوم للعناصر الثقيلة داخل بعض النباتات يعمل على التحكم في انتقال الكادميوم Cd القابل للامتصاص عبر غشاء الخلية إلى مكان التخزين في خلايا الخميرة المقاومة. تتم اغلب التفاعلات الحيوية بواسطة الإنزيمات التي تكون هدفاً للملوثات (**7**). فالملوث أما أن يحفز أو يثبط إنزيم معين مؤدياً الى تحفيز أو اثباط التفاعل الحيوي الذي يتوسط هذا الإنزيم وهذا ما يدعى بالأيض (Metabolism) وهو مصطلح يشير الى التحوير الكيميائي للمركب في الجسم الحي (**11**).

تعد التقانات الجزيئية (Molecular techniques) في الوقت الحاضر من أحدث التقنيات المهمة علمياً في استغلال القدرة الطبيعية للنباتات بعد تحويرها وراثياً لانتزاع المواد الكيميائية من الماء والتربة وتقليل كمية الغبار من الجو وازالة الملوثات عموماً. وخلافاً للمعالجة باستخدام الجراثيم فان النباتات لا تحتاج الى تقانات مكلفة ومعقدة وقد يمثل الخشب الناتج من زراعة الأشجار القادرة على المعالجة كالحور والصفصاف والسيسبان مصدراً إضافياً لدخل المزارع وجماعته (**4**، **5**). يمكن ان يستخدم المورث P450s المحتوي على صفوف عدة من المورثات في معالجة كثير من العناصر المعدنية الثقيلة والمتفجرات والمواد المشعة والملوثات العضوية وغير العضوية، وإزالة النباتات أبسط وأوفر كلفة من إزالة أطنان من الترب الملوثة (**3**). توفر المعالجة النباتية الكثير من التقانات والعملة الصعبة اللازمة لإنشاء واستيراد مصافي ومرشحا المياه من الخارج، كما يعد إنشاء محطات المعالجة النباتية للمياه الملوثة داخل وخارج المعامل والمنشئات الصناعية من أساسيات لتطور وارتقاء البلد. اضافة الى ان زيادة الغطاء النباتي يساهم في تنقية الجو من الزيادة في ثنائي اوكسيد الكربون وتعد مصدات رياح ايضاً. كما تساهم في خفض درجات الحرارة مما يقلل من كلف التبريد وتلطيف البيئة لحد كبير. كما تعد مصدراً للتنوع البيولوجي وزيادة المصادر الوراثية (**4**). تهدف الدراسة الحالية الى إستنسال جين الاختزال الحيوي *P4502E1* في نبات السيسبان ومقارنة التعبير الجيني الذي يحصل في النبات مع التعبير الجيني في نبات اذان الفار ذات الخريطة الوراثية المعلومة.

المواد وطرائق البحث

السلالات البكتيرية: تم الحصول على سلالتين من عزلات بكتيرية بموجب اتفاقية علمية مع المعهد القومي للصحة (جامعة واشنطن، الولايات المتحدة الامريكية) تضمنت:

1. بكتريا السيطرة الموجبة وهي عزلة *Agrobacterium tumefaciens* نوع C58Cl الحاوية على البلازميد pSLD 50-6 الحاملة لمقطع مجين (1.6 kb) معزول من كبد الارنب (CYP2E1 cDNA) وجين يمنح المقاومة للمضاد الحيوي الكانامايسين (شكل **1**).
2. بكتريا السيطرة السالبة وهي عزلة *Agrobacterium tumefaciens* نوع CG47 الحاوية على البلازميد pKH200 المتكون من control vector والجين المسؤول عن الانزيم *B-galactosidase* الذي يفكك اللاكتوز الى جلوكوز وجالكتوز (شكل **1**).



شكل 1. الخريطة الوراثية للبلازميد pSLD50-6 وموقع المورث بين الحد الايسر LB والحد الايمن RB التي تتعرف من خلالها الاجروبكتريم (*A. tumefaciens*) وبوجود Vir D2 جين على دنا الجزء النباتي للاندماج معه. وMAR هي مناطق للاندماج مع دنا النبات، P-nos- NPTII- T-ocs بادئ تصنيع سكر النوبالين– انريم ناقل النوبالين– ترجمة النوبالين– الناهي لترجمة سكر الاكتوبين(التصميم من عمل الباحث الاول).

تحضير المعلقات البكتيرية

استخدمت سلالات بكتريا ***Agrobacterium tumefaciens*** الحاوية على نوعين من البلازميدات بهدف التحوير الوراثي لنباتي السيسبان واذان الفار وذلك بالاعتماد على طريقة **Mouhamad** وجماعته (**15**). اذ نُميت البكتريا على وسط **LB** (**13**) الحاوي على **10**مل لتر$^{-1}$ من مستخلص الخميرة، **10**غم لتر$^{-1}$ (**Bactotryptone**)، **5** غم.لتر$^{-1}$(NaCl) والمزود بمضادات حيوية مكونة من الكاربنسلين بتركيز **100** ملغم لتر$^{-1}$ والكانامايسين بتركيز**50** ملغم لتر$^{-1}$. حضنت مزارع البكتريا على درجة حرارة **28** درجة مئوية (**16**).

استخلاص الدنا البلازميدي

استخلص الدنا الكلي من الخلايا البكتيرية بطريقة التمليح الخارجي (**Salting out**) الموصوفة من قبل **Han** وجماعته (**8**).

الترحيل الكهربائي

حدد المحتوى البلازميدي للعزلات البكتيرية بعد ترحيل المحتوى الوراثي المستخلص على هلام الاكاروز بتركيز **2%** وحسب الطريقة الموصوفة من قبل **Doty** وجماعته (**2**)

المادة النباتية

تم الحصول على بذور السيسبان ***S. grandiflora*** من قسم التقانة الاحيائية، كلية العلوم، جامعة النهرين، العراق وبذور نبات اذان الفار ***A. thaliana*** من هيأة الطاقة الذرية السورية. عقمت البذور بمحلول الايثانول **70%** ثم

20% (ح/ح) هيبوكلورات الصوديوم لمدة 10 دقائق وغسلت بماء مقطر معقم 4 مرات وحفظت على شكل معلق في 0.3% (وزن/حجم) من الوسط الغذائي MS Mwrahig and Skoog (17) نصف الصلب قبل زراعتها على ألواح من الآجار. حفظت ألواح الاجار على درجة 4 مئوية لمدة 48 ساعة لحين انبات البذور. حضنت بعدها البادرات على درجة 22 مئوية تحت ظروف إضاءة مستمرة. حضر الوسط الزرعي موراشيج وسكوج (MS) بإذابة المركبات الموصوفة في ذلك الوسط (4300 ملغم/لتر) في الماء المقطر (750 مليلتر)، واضيف 100 ملغم/لتر من مادة Myoinositol و 30 غم سكروز. عُدل الاس الهيدروجيني (pH) الى 5.7–5.8 بإضافة قطرات من HCL (1N)، واضيف 8 غم/لتر مادة الاجار (Agar) واكمل الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر واضيفت لها الكاينيتين (0.5 ملغم/لتر)، واندول حامض الخليك (IAA) بمقدار 0.1 ملغم/لتر لوسط الاخلاف كما اضيف اندول حامض البيوترك (IBA) بمقدار 0.1 ملغم/لتر لوسط التجذير. ولغرض اجراء التحوير الوراثي لنباتي اذان الفار والسيسبان، فقد زرعت مستعمرة واحدة من سلالات الأجروبكتريم (*A. tumefaciens*) في 50مل من وسط Luria Broth (LB) وحضنت على درجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 12 ساعة لاستخدامها فيما بعد في تحوير النباتين. استخلص الدنا الكلي من خلايا النباتين بطريقة التمليح الخارجي (Salting out) الموصوفة من قبل Muohammed وجماعته (15).

الترحيل الكهربائي لدنا النبات

حدد محتوى الدنا للنباتي بعد ترحيل المحتوى الوراثي المستخلص على هلام الاجاروز بتركيز 2% وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Doty وجماعته (2).

الكشف عن التعبير الجيني

حدد محتوى الخلايا النباتية من بروتين السايتوكروم CYP4502E1 على هلام كبريتات دوديكل الصوديوم متعدد الأكريلامايد (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Doty وجماعته (2).

النتائج والمناقشة

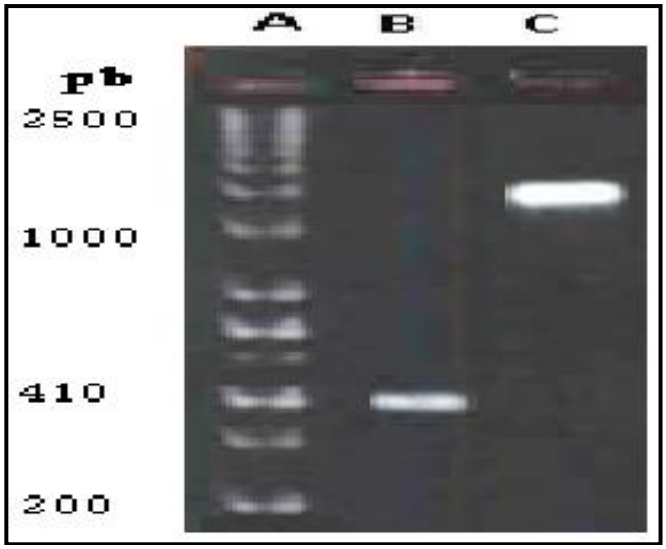
الكشف عن وجود المورث في بكتريا الاجروبكتريوم

تم الكشف عن وجود المورث في بكتريا الاجروبكتريم (*A. tumefaciens*) باستخدام جهار البلمرة الحراري (PCR) بعد عزل البلازميد واستخلاص الدنا وتصميم تتابع البادئات التالي:

الموجه (5'-**CATCGGGAATCTTCTCCAGTTGG**-3')

ومقابله (5'-**TGAAGGGTGTGCAGCCGATGACAA**-3')

والناتج من التضخيم، ووجد بان جين السايتوكروم (CYP2E1) كان بحجم 410 قواعد نتروجينية (الشكل 2) ومطابقاً لما ذكر في Hwei-Ming and Coon (9).



شكل **2**: هلام الاجاروز (**2%**) الحاوي على DNA المستخلص من بكتريا الاجروبكتريم (*A. tumefaciens*) المفصول بجهاز الترحيل الكهربائي (**70** فولتاً لمدة **60** دقيقة).

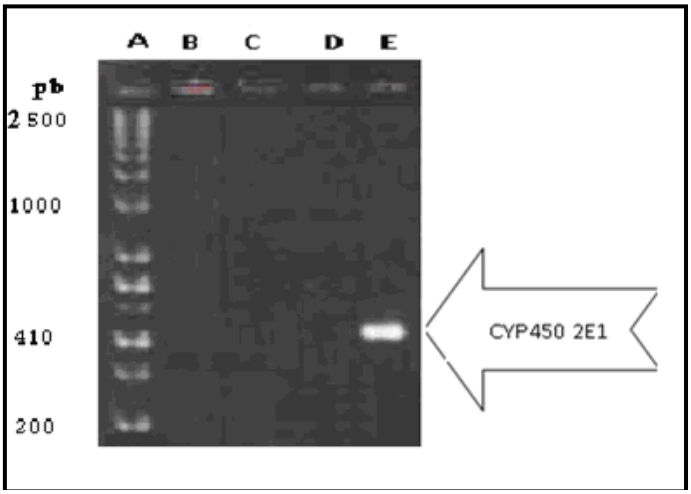
A. الدنا القياسي ذو حجم من **200–2500** قواعد نتروجينة ؛

B. قطع دنا من جين السايتوكروم الناتج من التضخيم بجهاز PCR

C. دنا البلازميد pSLD50-6 الحاوي على مجين الارنب ذو الحجم **410** قواعد نتروجينية

الكشف عن وجود الجين في النبات قبل التحوير

تم التأكد من عدم وجود جين السايتوكروم في النباتين قبل التحوير الوراثي، اذ استخدمت البكتريا المحورة وراثيا والحاوية على المورث CYP4502E1 كقياس موجب على وجود الجين. اعيد تضخيم الجين باستخدام جهاز البلمرة الحراري مع دنا النباتين ولم تظهر نتائج موجبة دليلاً على عدم وجود جين السايتوكروم P4502E1 او أية طفرة وراثية في النباتين (شكل **3**).



شكل **3**: هلام الاجاروز (**2%**) المفصول بجهاز الترحيل الكهربائي (**70** فولت لمدة **60** دقيقة).

(A) الدنا القياسي ذو الحجم من **200–2500** قواعد نتروجينة

(B) نبات اذان الفار

(C) نبات السيسبان

(D) بكتريا حاوية على بلازميد pKH200

(E) بكتريا حاوية على بلازميد pLSD50-6

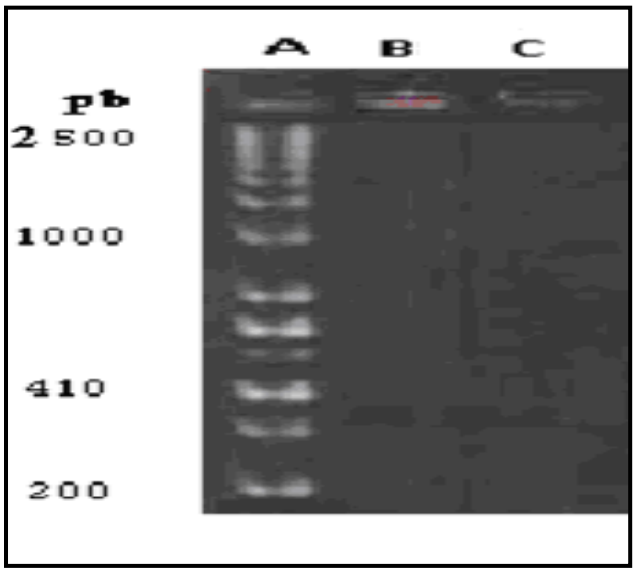
الكشف عن الطفرات الوراثية في النبات قبل التحوير

تم الكشف عن وجود اية طفرة وراثية في النباتين المرشحين للتعديل الوراثي بالاستعانة بمراجعة المصادر العالمية وبنك الجينات ولتأكيد هذا الافتراض صممت برايمرات للكشف عن الطفرات الوراثية فيما اذا كانت موجودة وكما يلي:

(5'-CGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGG-3')XH2 الموجه

(5'-CAGTCATAGCCGAATAGCCGAATAGCCTCTCCACCC-3')Km2 مقابله

اذ تم الكشف عن وجود المورث الطفرة الوراثية في النباتات باستخدام جهار البلمرة الحراري (شكل **3**) اعتماداً على طريقة Hwei-Ming and Coon (**9**)



شكل **3**. هلام الاكاروز (**2%**) المفصول بجهاز الترحيل الكهربائي (**70** فولطاً لمدة **60** دقيقة).

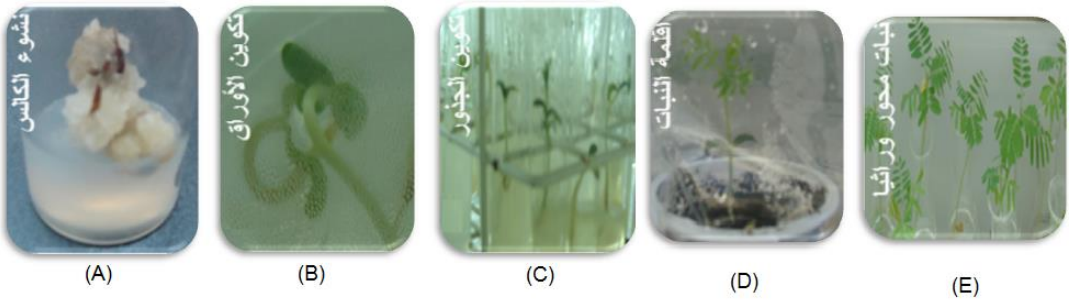
(A) الدنا القياسي ذو الحجم من **200–2500** قواعد نتروجينة

(B) دنا نبات اذان الفار

(C) دنا نبات السيسبان

التحوير الوراثي لنبات السيسبان

حُور نبات السيسبان وراثياً بإضافة **50** ملغم/لتر من كبريتات الكانامايسين و**400** ملغم/ لتر كاربنسلين الى **12** مكرراً تمثل **40** نباتاً محوراً مع البلازميد pSLD50-6 الحاوي على سايتوكروم الأرنب *P450 2E1* مع اثنين من مكررات تحول مع بلازميد لا يحتوي على pSLD50-6 كمقارنة. سُجل متوسط عدد الوريقات المتكونة في اعلى النموات الخضرية النامية في وسط MS المجهز بـ **1.50** ملغم/لتر KIN و**0.10** ملغم/لتر IAA. نمت النباتات بصورة جيدة بوجود الكانامايسين والكاربنسلين. أُنتج الجيل الأول من نبات السيسبان بالزراعة النسيجية وكما موضح في الشكل **4** بالاعتماد على تحري إدخال المورثات باستخدام PCR ومراقبة نمو النباتات على وسط انتخابي.

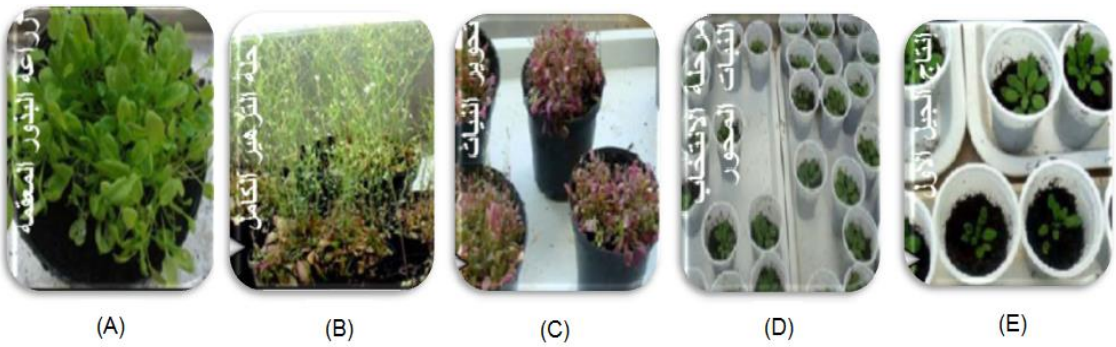


شكل(4). تحوير نبات السيسبان بزراعة الاجزاء النباتية في وسط MS حاوٍ على مضادات حيوية بعد حضنها على درجة حرارة 25 ^{o}م.

(A) تحفيز نشوء الكالس على الاجزاء النباتية، (B) استطالة الافرع النباتية وتكوين الاوراق Shoot regeneration، (C) تكوين الجذور على الافرع النباتية المحورة Root formation، (D) اقلمة نباتات السيسبان المحورة وراثياً، عمل فتحات تهوية في غطاء انابيب الاختبار، نقل النباتات المحورة الى اصص صغيرة وتغطيتها في كيس بلاستك للحفاظ على رطوبة نسبية عالية حول النبات، (E) تحضير النباتات لاختبارات التحول الوراثي.

التحول الوراثي لنبات اذان الفار

أُنتج الجيل الأول من نبات اذان الفار بطريقة تحوير الأزهار، اذ غمرت الأعضاء الزهرية (Floral dip method) في الوسط الزرعي لبكتريا الاجروبكتريوم المحورة وراثياً بدون استعمال مزارع النبات النسيجية. حضر المحلول البكتيري (**10**^{8} خلايا بكتريا/مليلتر) بعد زراعة مستعمرة واحدة من السلالة البكتيرية في **50**ملليلتر من وسط النمو LB وتحضينها على درجة حرارة **28**^{o} مئوية لمدة 16 ساعة لتكون البكتريا جاهزة للنقل الى النبات. بعد اكتمال تزهير النبات ونمو الشماريخ الزهرية الثانوية، لوثت الاعضاء الزهرية بمحلول حاوٍ على **5**% سكروز و**1**% من المادة الناشرة (Tween 20) و**500** ملليلتر ماء معقم و**5**ملليلتر من المحلول البكتيري المحضر في اعلاه. غطت الاصص لمدة يومين للمحافظة على رطوبة نسبية عالية حول النبات وكشفت بعد ذلك وتمت خدمتها لحين نضج البذور. أُنتج الجيل الأول من نبات اذان الفار، وكما موضح في الشكل **5**. وتم التحري عن إدخال المورثات باستخدام المبلمر الحراري PCR ومراقبة نمو النبات على وسط انتخابي وحسب ما ذكر سابقاً، وأُنتج الجيلان الثاني والثالث (شكل **5**).

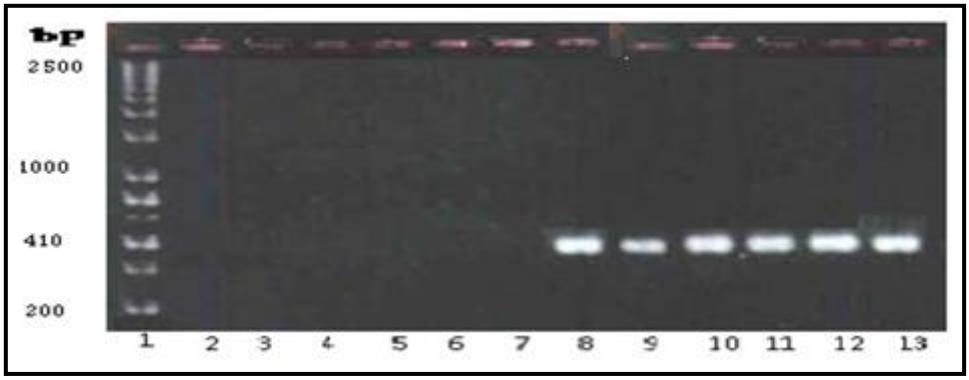


شكل5: تحوير نبات اذان الفار

(A) زراعة بذور النبات في اصص سعة **500** غم تربة، (B) وصول النبات الى مرحلة التزهير الكامل، (C) ترك الازهار الى مرحلة النضج الكامل بعدها قطعت الشماريخ الزهرية الناضجة، (D) اعادة زراعة البذور في اصص صغيرة (انتخاب النبات المحور)، (E) انتاج الجيل الاول واعادة زراعة البذور لانتاج الجيلين الثاني والثالث.

الكشف عن وجود الجين في النباتات المحورة

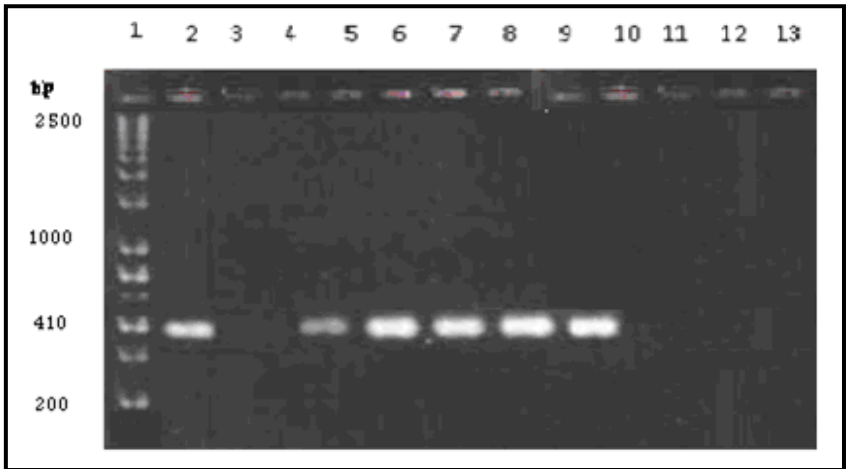
اختبرت **35** شتلة من نبات السيسبان المحور وراثياً بوجود البكتريا الموجبة (pSLD50-6)، اذ اعطت نتيجة موجبة (حزمة) عند **410** قواعد نتروجينية (الشكل **6**).



شكل(6). الترحيل الكهربائي على هلام الاجاروز لحزم الدنا المكثرة بتقانة PCR لنبات السيسبان المحور وراثياً.

المسار رقم **1** DNA القياسي (المعلم) طوله من **200–2500** قواعد نتروجينية. طول حزمة السايتوكروم **410** قواعد نتروجينية، المسارات من **2–4**: نباتات السيسبان البري غير المحورة وراثياً، المسارات **5و6**: نباتات السيسبان المحورة وراثياً مع بكتريا السيطرة (pKH200)، المسار **7**: بكتريا السيطرة السالبة (pKH200) المسارات من **8–12**: نباتات سيسبان محورة وراثياً، المسار **13**: بكتريا السيطرة الموجبة الحاوية على البلازميد (pSLD50-6).

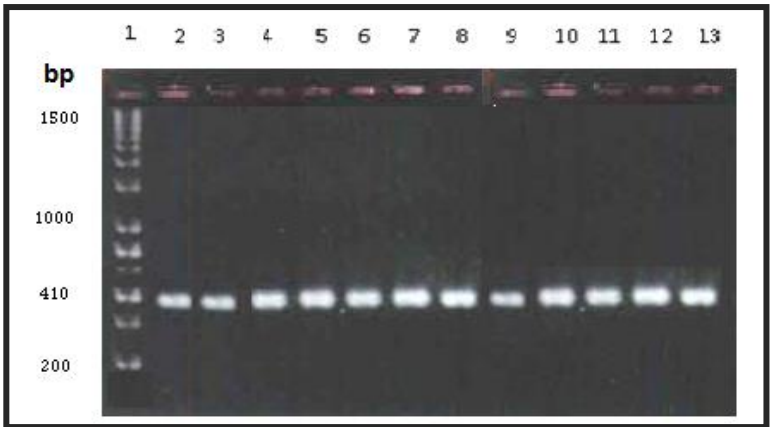
اختبر **25** نبات من اذان الفار المحور وراثياً بتقانة PCR عن طريق الكشف عن وجود الجين مع البكتريا الموجبة (pSLD50-6) اذ اعطت نتيجة موجبة عند القواعد النتروجينية **410** (الشكل **7**). اتفقت هذه النتائج مع ما توصلت اليه كل من Doty وجماعته (**2**،**5**) وMouhamad وجماعته (**15**)



شكل 7. الترحيل الكهربائي على هلام الاجاروز لحزم الدنا المكثرة بتقانة PCR لنبات اذان الفار المحور وراثياً.

المسار رقم **1**: DNA القياسي(المعلم) طوله من **200–2500** قواعد نتروجينية. طول حزمة السايتوكروم **410** قواعد نتروجينية. المسار **2**: بكتريا السيطرة الموجبة (pSLD50-6). المسار **3**: بكتريا السيطرة السالبة (pKH200). المسارات من **5–9**: نباتات اذان الفار محورة وراثياً مع البكتريا الموجبة (pSLD50-6). المساران **10و11**: نباتات اذان الفار محورة وراثياً مع بكتريا السيطرة (pKH200). المساران **12و13**: نباتات ذان الفار البري.

انتخبت نباتات اذان الفار والسيسبان المحورة وراثياً بوجود البكتريا الموجبة (pSLD50-6) فقط، واعطت نتيجة موجبة عند **410** قواعد نتروجينية (الشكل**8**). توافقت النتائج مع ما توصلت اليه كل من Doty وجماعته (**2**، **5**) وMouhamad وجماعته (**15**)

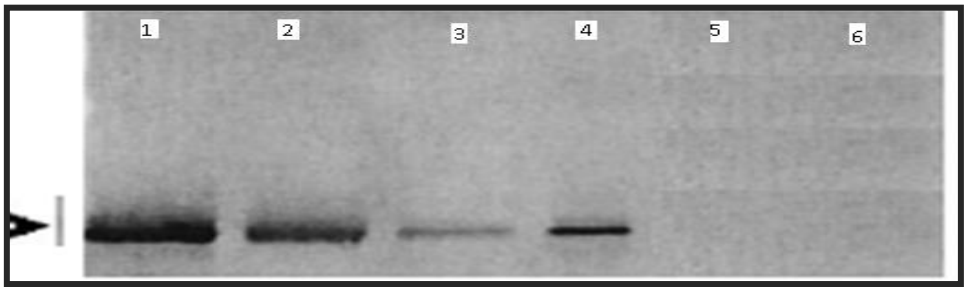


شكل 8. الترحيل الكهربائي على هلام الاجاروز لحزم الدنا المكثرة بتقانة PCR لنباتات اذان الفار محورة وراثياً.

المسار رقم **1** للدنا القياسي طوله من **200–2500** قواعد نتروجينية. طول حزمة السايتوكروم **410** قواعد نتروجينية. المسارات من (**2–7**) لنبات اذان الفار المحور وراثياً والمسارات (**8–13**) لنبات السيسبان المحور وراثياً.

الكشف عن تعبير الجين CYP450 2E1

تم اختيار 6 نباتات سيسبان و 6 نباتات اذان الفار المحورة وتم التحقق من وجود بروتين جين السايتوكروم P450 2E1 باستخدام الجسم المضاد المخفف P450 2E1 للأرنب (الجين)–الإنسان مضاد الجين (الانتيجين). وتم الكشف عن بروتين السايتوكروم P450–2E1 في نباتات اذان الفار جميعها وفي خمس نباتات سيسبان مختارة (الشكل 9).



الشكل 9: الترحيل الكهربائي على هلام كبريتات دوديكل الصوديوم متعدد الأكريلامايد (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) لحزم بروتين نبات اذان الفار المحور وراثياً

(المساران **1و2**) ولنبات السيسبان المحور وراثياً (المساران **3و4**) والمساران **5** و**6** هي لنباتات سيطرة من اذان الفار والسيسبان على التوالي باستخدام تقانة Western Blotting Technique.

اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه دراسات سابقة (2، 15) استنتجت الدراسة الحالية امكان استعمال النباتات في التخلص من الملوثات المختلفة بعد تحويرها وراثياً بجين السايتوكروم المنقول من حيوان الارنب.

المصادر

1- **Banerjee, S.; Q.T. Shang; A.M. Wilson; A.L. Moore; S.E. Strand; S.D. Cunn**
Phyto
Advances in Agronomy, 56:55-114.

2- **Doty, S.L.; C.A. James, A.L. Moore; A. Vajzovic; G.L. Singleton; C. Ma; Z. Khan; G. Xin; J.W. Kang and J.Y. Park (2007). Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. Proc. Nature Acad. Sci.,104:6816–6821.**

3- **Doty, S.L. (2008). Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. New Phytol., 179:318-333.**

4- **Doty, S. L.; Q.T. Shang; A.M. Wilson; A. L. Moore; L.A. Newman, S.E. Strand and M. Gordon, (2003). Metabolism of halogenated compounds by the tropical leguminous tree, *Leucaena leucocephala*. Water Res. 37:441–449.**

5- **Doty, S.L.; Q.T. Shang; A.M. Wilson; J. Tangen; A. Westergreen; L.A. Newman; S.E. Strand and M. P. Gordon (2000). Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian *P450 2E1*. Proc. Nature Acad. Sci. 97:6287–6291.**

6- **Doucleff, M. and N. Terry (2002). Expressing a modified bacterial *merA* gene. Proc. Nature Acad. Sci. 97:6287–6291.**

7- **French, A.; G. Kumar; G.F. Payne and S.K. Dube (1997). Plant cell biodegradation of a xenobiotic nitrate ester nitroglycerin. Nat. Biotech. 15:174–177.**

8- **Han, K.H.; R. Meilan; C. Ma and S.H. Strauss (2000). An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus Populus). Plant Cell Reports,19:315–320.**

9- **Hwei-Ming, P. and J. Coon (1998). Regulation of Rabbit cytochrome *P450 2E1* expression in *HepG2* cells by insulin and thyroid hormone. Molecular Pharmacology, 54:740–747.**

10- **Inui, H.; N. Shiota; Y. Motoi; T. Inoue; Y. Ohkawa and H. Ohkawa (2001). Metabolism of herbicides and other chemicals in human cytochrome *P450* species and in transgenic potato plants coexpressing human *CYPA1,CYP2B6,* and *CYP2C19*. J. of Pesticide Sci. 26:28–40.**

11- **Kang, J.W.; H.W. Wilkerson; , F.M. Farin; T.K. Bammler,; R.P. Beyer; S.E. Strand, and S.L. Doty (2010). Mammalian cytochrome *CYP2E1* triggered differential gene regulation in response to trichloroethylene (TCE) in a transgenic poplar. Functional Integrative Genomics, 10:417-424.**

12- **Kang, J.W.; Z. Khan; S.L. Doty (2012). Biodegradation of Trichloroethylene by an Endophyte of hybrid Poplar. Appl. Environ. Microbiol.78(9):3504-3507.**

13- **Luria, S.E.; J. N. Adams and R.C. Ting (1960). Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. Virology.12:348-3900.**

14- **Meagher, R.B.; C.L. Rugh; M.K. Kandasam; G. Gragsonand N.J. Wang (2000). Engineered phytoremediation of mercury pollution in soil and water using bacterial genes. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (Terry, N. and Banuelos, G. eds). Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 203-221.**

15- **Mouhamad, R.; I. Ghanem; M. AlOrfi,; K.M. Ibrahim; N. Ali and A. Al-Daoude (2012). Phytoremediation of Trichloroethylene and Dichlorodiphenyltrichloroethane polluted water using transgenic *Sesbania grandiflora* and *Arabidopsis thaliana* plants harboring rabbit cytochrome *P450 2E1*. Int. J. Phytoremediation, 14:656-668.**

16- **Muckerman, C.C.; S.S. Sprighorn; B. Green and A. BergSanford (1982). Transformation of restriction edonuclease phenotype in *Streptococcus pneumoniae.* J. Bacteriol., 152 (1):183 – 190.**

17- Murashige, T. and F. Skoog, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. Physiol. Plant., 15:473-497.

18- Ortiz, D.F.; L. Kreppel; D.M. Speiser; G. Scheel; G. McDonald and D.W. Ow (1995). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. Embo J., 11:3491-3499.

EXPRESSION OF *P4502E1* phytoremediation GENE IN *Arabidopsis thaliana* AND *Sesbania grandiflora*

R.S. Mohammad* K.M. Ibrahim**

N.A. Ali* A. Al-Dawood******

ABSTRACT

The present study was conducted with the aim of genetic modification of the commonly grown *Sesbania grandiflora* plant in many regions of the world including Iraq. Phytoremediation is the use of plants for the remediation of contaminated land mainly in bearing plants and pollutants, which means the ability of plants to tolerate or assemble high concentrations of toxic or harmful substances whether they are organic or inorganic in their tissues without affecting their life cycle in order to produce tolerant plants. Two plant species were subjected to genetic modification in this study namely, *Sesbania grandiflora* and *Arabidopsis thaliana*. The bacterium victor *Agrobacterium tumefacies* was used to transform the two plant species with the cytochrome gene *P4502E1* which has been isolated from rabbit liver. The presence of the gene was investigated in plants using polymers chain reaction (PCR) after designing primers for this purpose to detect the presence and expression of the transferred genes. Transformation was proved after gene expression of *P4502E1*. Results showed generation of a new metabolic pathway in the genetically modified plants towards their ability in degrading many environmental pollutants. The current work has built the principles for *S. grandiflora A. thaliana* genetic modification and propagation *in vitro* which facilitates the processes of genetic modification in the future for these plants with a new plant genes and apply this technology to other plants. This approach will lead to reduce land reclamation cost much less than traditional methods, in addition to other advantages such as lowering atmospheric temperatures, increasing vegetation and improving the overall environment for aesthetic, health and social considerations.

* Ministry of Sci. and Tech. – Baghdad, Iraq.

** College of sci. - Al-Nahrain Univ.– Baghdad, Iraq.

*** Genetic Eng. and Biotech. Institute for post Graduate Studies-Baghdad, Iraq.

**** Board of Atomic energy- Syria. – Baghdad, Iraq.