تحریک ریشه‌های موئین تراریخت در گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.) با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*)

احمد جلیلیان[1]، احمد اسماعیلی[2]*، فرهاد نظریان فیروزآبادی[3] و سیده زهرا حسینی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۲*- **نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان (ismaili.a@lu.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۴- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

چکیده

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان داروئی شناخته شده است. با توجه به این‌که پتانسیل مواد دارویی گیاهان دارویی در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد، از این رو کشت بافت گیاهی به‌عنوان یکی از روش‌های کاربردی نقش مهمی در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارد. از میان سیستم‌های کشت بافت، سیستم ریشه‌های موئین در شرایط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد بسیار پایدار است و به دلیل ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی ذاتی، متابولیت‌های ثانویه را در طی یک دوره‌ی طولانی تولید می‌کنند. در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه‌های موئین از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC15834، A4 و GMI9534)، محیط‌های کشت MS و ½MS، دو دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس در دوره هم‌کشتی و دو نوع ریزنمونه‌ی اندام هوایی و محور زیرلپه استفاده گردید. صفت‌های درصد تحریک ریشه موئین، تعداد ریشه موئین در ریزنمونه و تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر از ریزنمونه اندازه‌گیری شد. واکاوی نتایج نشان داد که سویه‌ی ATCC15834، محیط کشت MS ½، دمای ۲۵ درجه سلسیوس همکشتی و ریزنمونه اندام هوایی بهترین ترکیب تیماری جهت تحریک ریشه موئین در گیاه شقایق هستند. با استفاده از واکنش PCR تأیید تراریختی ریشه‌های موئین با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B انجام گرفت.

کلید واژه‌ها: ریشه موئین، آگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه، شقایق، سویه، محیط کشت، دما.

مقدمه

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان داروئی است که تولیدکننده انواع آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین‌ها با ساختار متنوع است (Balandrin *et al.*, 1985). که دارای فواید دارویی زیادی است؛ به‌عنوان نمونه بسیاری از آن‌ها دارای فعالیت‌های دارویی بالقوه، از جمله مسکن‌های نارکوتیک، داروی ضدسرطان نوسکاپین، عامل ضد میکروبی سنگوئی نارین و گشادکننده‌ی عروق پاپاورین می‌باشند (Desgagne Penix and Facchini, 2012).

آلکالوئیدهای شقایق (به غیر از تبائین، کریپتوپین و پروتوپین) در هیچ جنس گیاهی به غیر از *Papaver* وجود ندارد، که این مسئله اهمیت گیاه شقایق را به‌عنوان تنها منبع آلکالوئیدهای گروه مورفین (مورفین، تبائین،

کدوئین، نارکوتین و ...) روشن می‌کند (Tetenyi, 1997). کشت ریشه‌های موئین تراریخته یک سیستم مدل مفید جهت بررسی بیوسنتز آلکالوئیدها و دیگر متابولیت‌های ثانویه متنوع است (Rostampour *et al*., 2009).

گونه‌ی *Agrobacterium rhizogenes* یکی از مهم‌ترین منابع ژن‌های تنظیم‌کننده رشد است که به‌طور گسترده‌ای برای تراریختی گیاهان استفاده می‌شود. سندرم ریشه موئین ناشی از *A. rhizogenes* در نتیجه‌ی تلفیق ژن‌های تنظیم‌کننده رشدی متمرکز یافته در T-DNA پلاسمید Ri در داخل ژنوم گیاه است. این ژن‌ها عامل تغییر در تعادل تنظیم کننده رشدی و یا مسیر پیام‌رسانی در گیاه هستند (Chandra, 2012).

ریشه مویئن نوعی بیماری گیاهی است که توسط یک باکتری گرم منفی خاکزی به نام آگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می‌شود. زمانی‌که باکتری وارد گیاه می‌شود، تعدادی از ژن‌ها از پلاسمید باکتری، به گیاه منتقل شده و وارد ژنوم هسته‌ای گیاه میزبان می‌شود. حاصل این انتقال تولید ریشه موئین در نزدیکی جایگاه ورود باکتری است (Sevon and Caldentey, 2002). شاخصه‌ی ریشه‌های موئین ناشی از *A. rhizogenes*، شامل رشد سریع ریشه‌ها و انشعاب‌های زیاد با تراکم زیست توده بالا روی یک محیط عاری از تنظیم کننده رشد است. این ریشه‌های پایدار، به دلیل ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی ذاتی، متابولیت‌های ثانویه را در طی یک دوره طولانی تولید می‌کنند (Majumdar *et al*., 2011). هم‌چنین آن‌ها در حال حاضر یک پتانسیل بالقوه برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش در لاین‌های با عملکرد بالا هستند که این لاین‌ها خود از طریق بهینه‌سازی شرایط تلقیح، ترکیبات مواد غذایی محیط کشت و استفاده از محرک‌ها به‌دست می‌آیند (Sharifi *et al*., 2014). بسیاری از محصولات مورد علاقه نیز در بافت‌های سازمان یافته (ریشه) سنتز شده، اما در کشت‌های سوسپانسیون و یا پینه[1] (ساقه و برگ) تشکیل نمی‌شوند. بنابراین بیشترین توجه روی کشت‌های ریشه متمرکز شده است (Mishra and Ranjan, 2008). اکنون پژوهش‌های محدودی روی ریشه موئین در گیاه شقایق انجام شده است.

Yoshimatsu and Shimomura (۱۹۹۲) اولین کسانی بودند که گزارشی از موفقیت‌آمیز بودن تراریختی گیاه *P. somniferum* L. به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز سویه MAFF 03-01724 ارائه دادند که از ریزنمونه‌ی محور زیرلپه جهت تراریختی استفاده شد و درصد القای نسبتاً کمی (کمتر از ۲۰ درصد) به‌دست آمد. Park and Facchini (۲۰۰۰) یک گزارش کارآمد برای استقرار کشت ریشه موئین در گیاه *P. somniferum* و *Eschscholzia californica* با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز ارائه دادند. در این مطالعه از پنج سویه *A. rhizogenes* جهت تولید ریشه‌های موئین در گیاهچه شقایق و پینه‌های جنین‌زای شقایق کالیفرنیا استفاده کردند که در بین آن‌ها ۳ سویه دارای تونایی تحریک و تشکیل ریشه موئین، در بین ۲ گونه بودند درحالی‌که دو تا سویه‌ی دیگر به سبب رشد تومور پاسخ ندادند. در یک پژوهش دیگر از ۲ سویه (LBA9402 و 15834) *A. rhizogenes* و یک سویه *A. tumefaciens* (GV3101 (PMP90RK, p35SGUS-2)) و چهار محیط کشت برای توانایی آن‌ها جهت تحریک تشکیل ریشه موئین روی محور زیرلپه‌های زخمی *P. somniferum* استفاده شد. پنج هفته بعد از آلودگی با *A. rhizogenes* سویه‌ی LBA9402، ریشه‌های موئین در ۸۰ درصد محور زیرلپه‌ها پدیدار شدند (Le Flem-Bonhomme *et al*., 2004).

بر اساس آنچه که در بالا اشاره شد، لازم است پژوهش‌های گسترده‌تری جهت بهینه‌سازی شرایط تحریک ریشه موئین در این گیاه صورت گیرد. بر این اساس عوامل مؤثر متنوعی در مورد تراریختی *A. rhizogenes* در گیاهان مختلف گزارش شده است و این تحقیق به‌منظور دستیابی به روش مناسب و با کارایی بالا جهت تحریک

1- Callus

ریشه‌های موئین در گیاه *P. somniferum* طراحی گردیده است.

مواد و روش‌ها

بذر و جوانه زنی

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان در سال ۹۳-۹۲ اجرا گردید. ابتدا بذرهای گیاه *P. somniferum* توسط اتانول ۷۰ درصد (v/v) به مدت ۳۰ ثانیه گندزدایی سطحی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. در ادامه بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در تماس با هیپوکلریت سدیم۲ درصد (v/v) قرار گرفت و درنهایت ۱۰-۷ بار با آب مقطر شستشو داده شد. به تقریب ۳۰ بذر در هر فلاکس حاوی ۵۰ml محیط کشت پایه B5 با ۰/۶ درصد فیتوآگار استفاده شد (Gamborg *et al.*, 1968). pH محیط کشت پیش از افزودن آگار روی ۵/۸ تنظیم شد. سپس توسط اتوکلاو در فشار $1.1\ kg.cm^{-2}$ (121˚C) برای ۲۰ دقیقه استریل شد. سپس بذرهای کشت شده تحت شرایط دمای ۲۵ ˚C و زیر نور سفید فلورسنت و طول روز ۱۶ ساعت برای جوانه‌زنی قرار گرفتند.

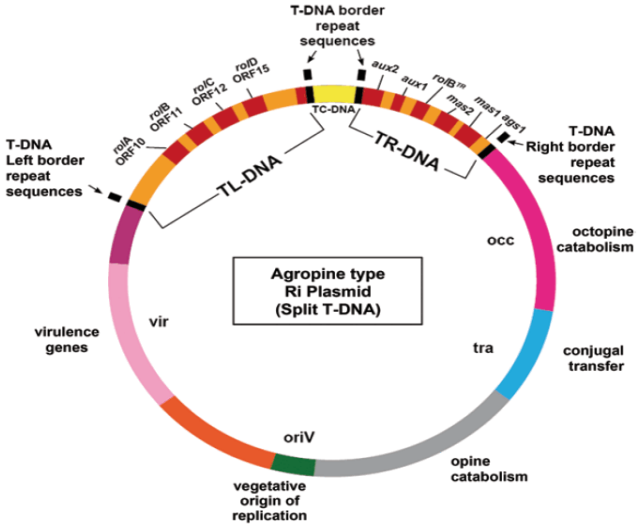
آماده سازی سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز

به‌منظور تحریک ریشه‌های موئین، از آگروباکتریوم *A. rhizogenes* سویه‌های ATCC15834، A4 و GMI9534 استفاده شد. شماتیک نقشه ژنی پلاسمید Ri نوع آگروپین (مانند pRi15834) *A. rhizogenes* در شکل (۱) نشان داده شده است. باکتری‌ها در فاز mid-log phase (A_{600}=0.5) در دمای ۲۸ سانتی گراد روی شیکر با سرعت ۱۸۰rpm در محیط مایع LB (۱ درصد (w/v) تریپتون، ۵ درصد (w/v) عصاره مخمر و ۱ درصد (w/v) NaCl pH 7.0) حاوی $50\ mg\ L^{-1}$ ریفامپیسین در تاریکی رشد کردند. کشت باکتریایی توسط سانترفیوژ در دمای ۴ ˚C با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شدند و دوباره هر کدام از باکتری‌ها در محیط کشت تلقیح مایع MS (Murashinge and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ویتامین و نمک با تراکم سلول A_{600}=1.0 سوسپانسیون شدند.

هم‌کشتی و تحریک ریشه‌های موئین

از ریزنمونه‌های نوساقه بدون ریشه یا اندام هوایی[1] (با حذف اندام ریشه از یک گیاهچه این ریزنمونه تشکیل می‌شود و شامل محور زیرلپه[2] و لپه‌ها می باشد) و محور زیرلپه گیاه ۱۰-۸ روزه شقایق جهت هم‌کشتی با سویه‌های ATCC15834، A4 و GMI9534 استفاده شد. اندازه ریزنمونه‌ی اندام هوایی و محور زیرلپه به ترتیب حدود ۱ و ۰/۶ تا ۱ سانتی‌متر بود. ریزنمونه‌ها به‌وسیله اسکالپل به صورت تصادفی و با پراکنش و تعداد نسبتاً یکسان زخم شدند و در محیط کشت تلقیح مایع *A. rhizogenes* غوطه‌ور شدند و درنهایت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰rpm روی دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس به کاغذ صافی استریل جهت خشک کردن انتقال یافتند و روی محیط‌های کشت فیتوآگار MS و MS ½ جامد در تاریکی تلقیح شدند. پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت و در ۲ سطح دمایی ۲۵ و ۱۷ درجه درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت انجام تلقیح، به‌منظور حذف باکتری‌های اضافی، ۴-۳ بار ریزنمونه‌ها را با آب مقطر استریل شستشو داده و ریزنمونه‌ها به محیط کشت‌های جامد انتخابی MS و MS ½ حاوی نمک‌ها و ویتامین‌ها، ۲ درصد (W/V) ساکارز، ۴۰۰ mg/L (W/V) سفوتاکسیم عاری از تنظیم‌کننده رشد جهت حذف باکتری و ۶ g/L فیتوآگار انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها در فواصل ۱۲-۱۰ روز یک بار زیرکشت شدند. ظاهر شدن ریشه‌های موئین در جایگاه‌های زخم از روز هشتم به بعد (البته در برخی تیمارها) مورد ثبت قرار گرفت. هم‌چنین، از کشت ریزنمونه‌های بدون تلقیح به‌عنوان شاهد استفاده شد.

1- Excised shoot
2- Hypocotyl



شکل ۱- شکل شماتیک نقشه ژنی پلاسمید Ri نوع آگروپین در *A. rhizogenes* (Ozyigit *et al.*, 2013)

Fig. 1. Schematic representation of Agropine type Ri plasmid of *A. rhizogenes*

آنالیز آماری

آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد که فاکتورهای آزمایش شامل دمای دوره‌ی هم‌کشتی در دو سطح دمایی ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس، سویه‌های آگروباکتریوم در سه سطح ATCC15834، A4 و GMI9534 و محیط کشت پایه در دو سطح MS و ½MS برای دو نوع ریزنمونه‌ی اندام هوایی و محور زیرلپه بود. در هر پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۸ ریزنمونه کشت شد و هر پتری دیش به‌عنوان یک تکرار لحاظ گردید. در پتری‌دیش‌های شاهد، تلقیحی صورت نگرفت. یادداشت‌برداری به‌صورت روزانه تا ۲۴ روز بعد از تلقیح برای هر پتری‌دیش انجام گرفت. صفت‌های مورد مطالعه شامل درصد تحریک ریشه موئین، تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر از ریزنمونه و تعداد ریشه‌های موئین در ریزنمونه بودند. قابل ذکر است که در ریزنمونه‌های محور زیرلپه به دلیل واکنش ضعیف به آگروباکتریوم رایزوژنز، فقط صفت درصد تحریک ریشه موئین اندازه‌گیری شد. در تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار MSTATC استفاده گردید و به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. رسم نمودارها و جداول توسط نرم‌افزار Excel 2010 صورت گرفت.

آنالیز مولکولی ریشه‌های موئین با استفاده از PCR

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های معمولی و موئین شقایق با استفاده از تغییراتی در روش Edward و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت. به این صورت که ۱۵۰ میلی‌گرم از وزن تر ریشه‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج با استفاده از هاون همگن شد که بافر استخراج شامل (W/V) ۰/۵درصد SDS، ۲۵۰ mM NaCl، ۱۰۰ mM Tris-HCl، تنظیم روی pH=8 و ۲۵ mM EDTA بود. سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه محلول رویی به ویال جدید انتقال داده شد و برابر با مقدار حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. سپس به مدت ۳۰-۲۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در آخر پس از بخار شدن محلول رویی، DNA ژنومی در ۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris-HCl، تنظیم روی pH=۷/۴ و ۱ mM EDTA) سوسپانسیون شد.

به‌منظور تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ti در ریشه‌ها از آغازگرهای ژن *rolB*، با توالی آغازگر رو

به جلو:

5´-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3´

و آغازگر برگشتی:

5´-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3´

برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید (Fumer *et al.*, 1986). شرایط دمایی برای تکثیر ژن *rol*B شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه تکثیر DNA (واسرشته‌سازی DNA الگو به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگرها به DNAی تک رشته‌ی در مدت ۱ دقیقه و دمای ۵۵ درجه سلسیوس، توسعه آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس) و توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل AG 22331 انجام شد. جهت مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد حاوی gel read (جهت رنگ‌آمیزی) با ولتاژ ثابت ۹۰ به مدت یک ساعت و نیم استفاده شد. سپس از ژل حاصله توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل داک مدل UVi Tech عکس‌برداری انجام گرفت.

نتایج و بحث

همه سویه‌های *A. rhizogenes* موفق به تحریک ریشه موئین در گیاه شقایق شدند ولی در نمونه‌های شاهد هیچ ریشه موئینی تولید نشد. نتایج تجزیه واریانس برای ویژگی مورد بررسی در دو ریزنمونه‌ی اندام هوایی و محور زیرلپه در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برای ویژگی‌های مورد بررسی در ریزنمونه اندام هوایی و محور زیرلپه

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) for studied traits in excised shoot and hypocotyl explants

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)			
		میزان تحریک ریشه موئین(درصد)[a] Percent of induced hairy root[a]	میزان تحریک ریشه موئین(درصد)[b] Percent of induced hairy root[b]	تعداد انشعاب فرعی در طول ۱ سانتی متر[c] Number of lateral branches/1cm[c]	تعداد ریشه موئین در ریزنمونه[d] Number of hairy root per explant[d]
دما Temperature	1	5472**	11.2*	5.2**	5.2*
سویه Strain	2	1731.7**	2.3	8.3**	11.8**
دما × سویه Temperature× strain	2	403.64	2.8	2.9*	0.152
محیط کشت Medium	1	2373**	11.1*	3.9*	5.5*
دما × محیط کشت Temperature × Medium	1	550.2	0.684	0.012	0.001
سویه × محیط کشت Strain × Medium	2	1093.75*	1.4	0.255	0.829
دما × سویه × محیط کشت Temperature × Strain × Medium	2	52.08	3.4	0.109	0.134
خطا Error	36	291.9	3.6	0.544	0.933
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		22.16	18.69	12.75	16.24

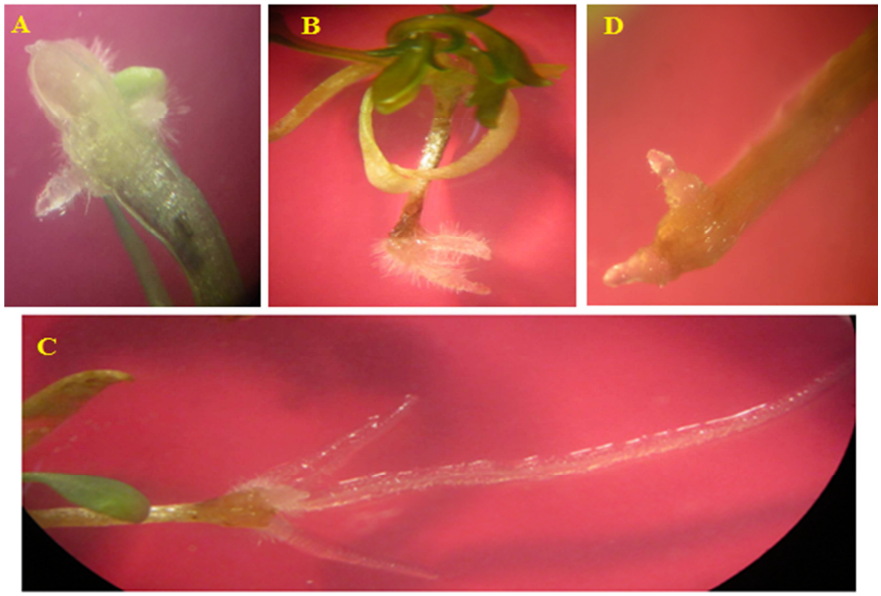
* و ** به‌ترتیب بیان‌کننده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ می‌باشد. a، c و d برای ریزنمونه اندام هوایی؛ b برای ریزنمونه زیرلپه.

* and ** Significant at 0.01 and 0.05 probability levels, respectively. a, c and d for excised shoot; b for hypocotyl.

اولین ریشه‌های موئین پس از گذشت ۸ روز از تلقیح با باکتری در ریزنمونه اندام هوایی ظاهر شدند. ریخت‌شناسی این ریشه‌ها با ریشه طبیعی گیاه متفاوت بود به‌طوری‌که به‌صورت متراکم و از یک نقطه در محل زخم و یا نزدیک به آن ظاهر شدند. ویژگی‌های رشدی ریشه‌های موئین منطبق بر رشد سریع و تولید انشعابات فراوان بود (شکل ۲).

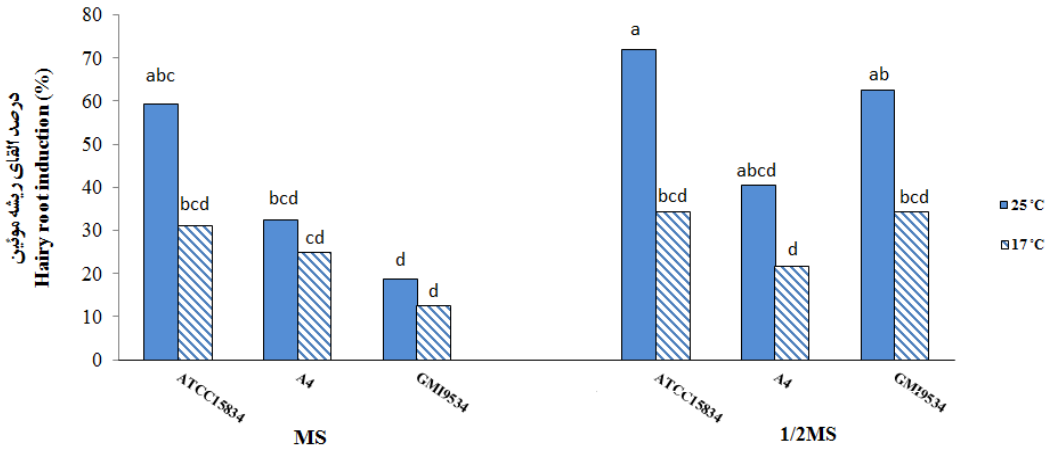
درصد تحریک ریشه موئین

درصد تحریک ریشه موئین در محیط‌های مختلف و برای سویه‌های مختلف در ۲ دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس هم کشتی در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل ۲- توسعه ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی گیاه شقایق بعد از ۸ (A)، ١٦ (B) و ٢٤ (C) روز پس از تلقیح با *Agrobacterium rhizogenes* و نیز ریزنمونه محور زیرلپه ۱۲ روز بعد از تلقیح (D).

Fig. 2. Development of hairy roots in excised shoot explants of *P. somniferum* L. A, B, C: 7, 16 and 24 days after inoculation, respectively, and D: 12 days after inoculation of hypocotyle explant.



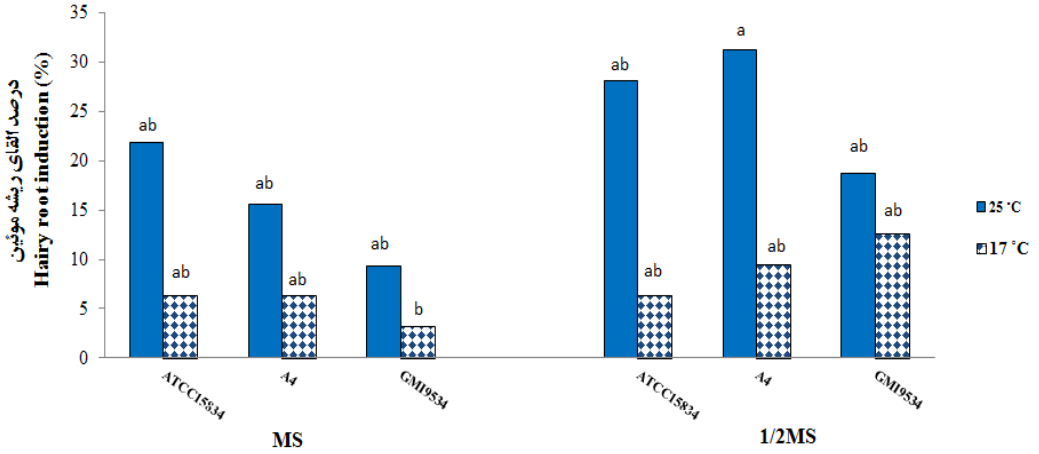
شکل ۳- اثر دما، سویه و محیط کشت بر درصد تحریک ریشه موئین برای ریزنمونه اندام هوایی.

Fig. 3. Effects of temperature, strain and medium on hairy root induction in excised shoot explant (P≤0.01).

همان‌طور که مشاهده می‌شود سویه‌ی ATCC15834 در محیط کشت MS ½ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، بالاترین کارایی در انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های اندام هوایی را (به میزان ۷۱/۸۷ درصد) نشان داد. هم‌چنین در محیط کشت MS ½ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس سویه‌های GMI9534 و A4 به‌ترتیب داری ۶۲/۵ و ۴۰/۶۲ درصد تولید ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی بودند. ۲ روز پس از هم‌کشتی با آگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه‌ها به محیط جامد انتخابی بدون تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند. نخستین ریشه موئین‌ها پس از ۸ روز، از محل زخم ریزنمونه‌ها پدیدار شدند (شکل ۲-A). پس از ۱۲ تا ۱۶ روز ریشه موئین‌های تراریخته گیاه شقایق رشد سریع داشتند (شکل ۲-B). پس از زیرکشت‌های متوالی ریزنمونه‌ها و انتقال به محیط تازه، سرعت رشد بالایی در ریشه‌های موئین ایجاد شد (شکل ۲-C). ریزنمونه اندام هوایی بالاترین واکنش را به تحریک ریشه موئین نشان داد به‌طوری‌که در ریزنمونه‌ی اندام هوایی بالاترین درصد تحریک ریشه موئین مربوط به سویه ATCC15834 به میزان ۷۱/۸۷ درصد بود که در محیط MS ½ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس حاصل گردید (شکل ۳). اما ریزنمونه‌ی محور زیرلپه به میزان قابل توجهی در تحریک ریشه موئین ضعیف بود. به‌صورتی که در ریزنمونه‌ی محور زیرلپه، بالاترین درصد تحریک ریشه موئین مربوط به سویه A4 به میزان ۳۱/۲ درصد بود که در محیط MS½ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌دست آمد. لازم به ذکر است که درصد تحریک ریشه موئین در این ریزنمونه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای سویه‌ی ATCC15834 به میزان ۲۸/۱ درصد در محیط MS ½ بود (شکل ۴). به طور کلی میزان تحریک ریشه موئین در محیط MS ½ نسبت به محیط MS برای ریزنمونه‌ی محور زیرلپه، در همه‌ی سویه‌ها بیشتر بود.

تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر از ریزنمونه

بیشترین تعداد انشعاب فرعی در یک سانتی‌متر مربوط به سویه ATCC15834 به میزان ۴/۶ عدد در محیط MS و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌دست آمد (شکل ۵). محیط MS به‌طورکلی در همه شرایط تعداد انشعاب فرعی بیشتری در مقایسه با MS ½ (به‌ترتیب ۳/۲ عدد در مقابل ۲/۷ عدد) تولید کرد. جالب توجه است که سویه GMI9534 در محیط MS و دمای ۱۷ درجه سلسیوس تعداد انشعاب فرعی در یک سانتی‌متر بالاتری به میزان ۳/۸ عدد نسبت به دیگر سویه‌ها در این دما داشت (شکل ۵).



شکل ٤- اثر دما، سویه و محیط کشت بر درصد تحریک ریشه موئین برای ریزنمونه محور زیرلپه.

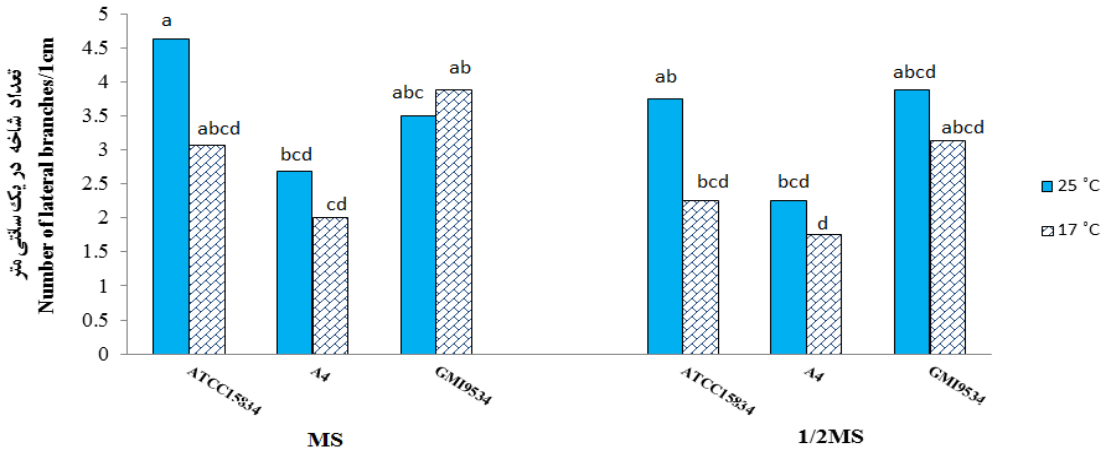
Fig. 4. Effects of temperature, strain and medium on hairy root induction in hypocotyl explant (P≤0.05).

تعداد ریشه موئین در ریزنمونه

بیشترین تعداد ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی برای سویه ATCC15834 و محیط M ½ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به میزان ۴/۵ عدد به‌دست آمد. هم‌چنین این سویه در شرایط ذکر شده ولی دمای ۱۷ درجه سلسیوس نیز با ۳/۶ عدد بالاترین تعداد ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی را نسبت به دیگر سویه‌ها در این دما تولید کرد (شکل ۶). سویه GMI9534 در هر دو دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس نسبت به سویه A4 تعداد ریشه موئین بیشتری در ریزنمونه اندام هوایی تولید کرد (شکل ۶). محیط MS ½ نسبت به محیط MS برای تمامی سویه‌ها و در هر دو دما، تعداد ریشه موئین در ریزنمونه‌ی اندام هوایی بیشتری (۳/۲ عدد در مقابل ۲/۵ عدد) تولید کرد.

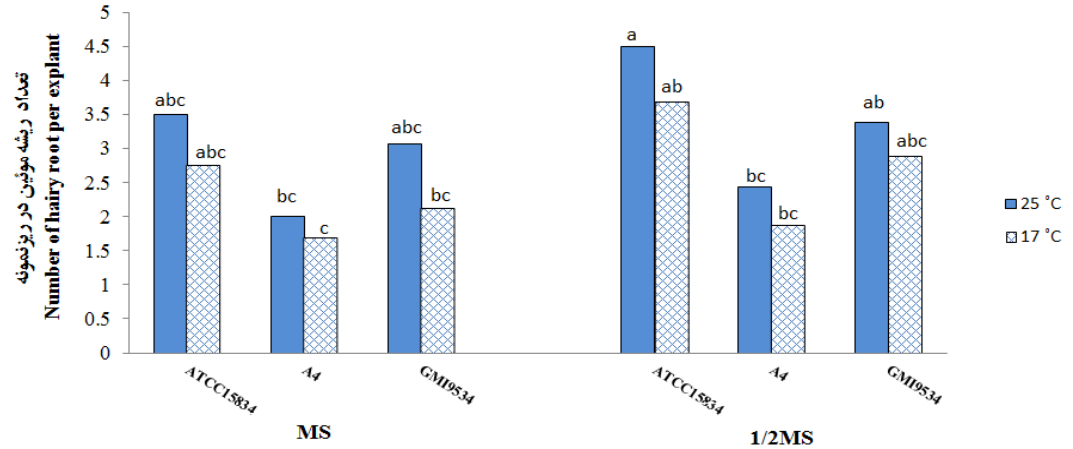
روند تولید ریشه موئین برای سویه‌های مختلف

بررسی میزان تحریک ریشه‌های موئین در روزهای ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ (روزهای بعد از هم‌کشتی) برای سویه‌های *A. rhizogenes* (شکل ۷) نشان داد که سویه‌ی ATCC15834 نسبت به سایر سویه‌ها سرعت پیدایش ریشه موئین بیشتری داشت (۸ روز بعد هم‌کشتی). به‌طوری‌که در محیط MS ½ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس تنها سویه‌ی ATCC15834 در روز هشتم به میزان ۶/۳ درصد تحریک ریشه موئین داشت. در حالی‌که دو سویه‌ی دیگر با شرایط مشابه سویه‌ی مذکور، در روز دوازدهم به این میزان تحریک ریشه موئین رسیدند (شکل C–۷).



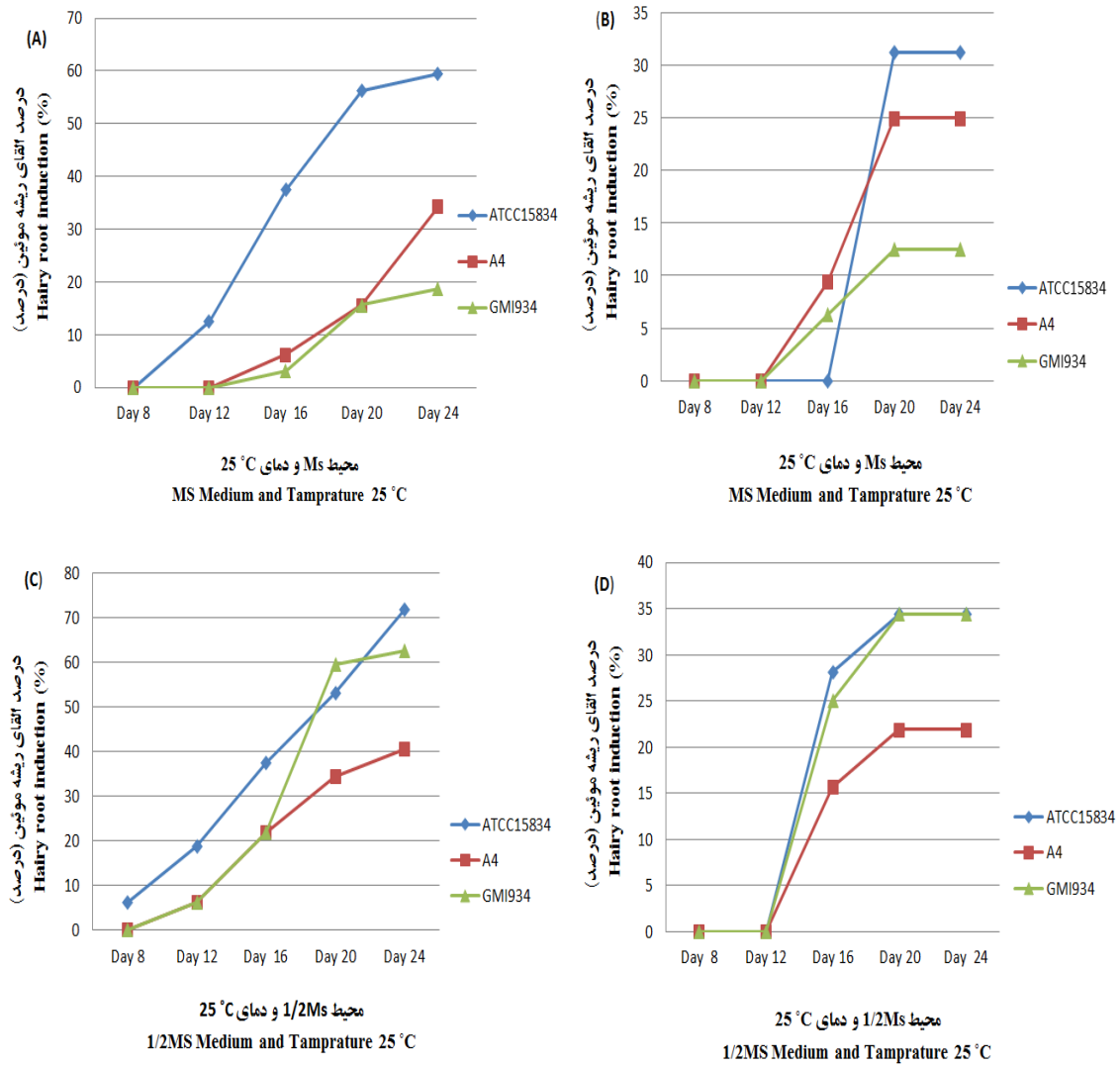
شکل ۵- اثر دما، سویه و محیط کشت بر تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر برای ریزنمونه اندام هوایی.

Fig. 5. Effects of temperature, strain and medium on number of lateral branches per 1cm in excised shoot explant (P≤0.01).



شکل ٦- اثر دما، سویه و محیط کشت بر تعداد ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی.

Fig. 6. Effects of temperature, strain and medium on number of hairy root per explant in excised shoot explant (P≤0.01).



شکل ۷- روند میزان تولید ریشه‌های موئین (در ریزنمونه اندام هوایی) برای سویه‌های *A. rhizogenes* در روزهای ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴. A و B: به ترتیب در محیط MS و دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس C و D: به ترتیب در محیط MS ½ و دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس.

Fig. 7. The rate of hairy root production (in excised shoot) by *A. rhizogenes* strains after 8, 12, 16 and 24 Days after inoculation (DAI). A, B: in MS medium and temperature 25 and 17 ˚C, respectively. C, D: in ½ MS Medium and temperature 25 and 17 ˚C, respectively.

بررسی تراریختی ریشه‌های موئین با PCR

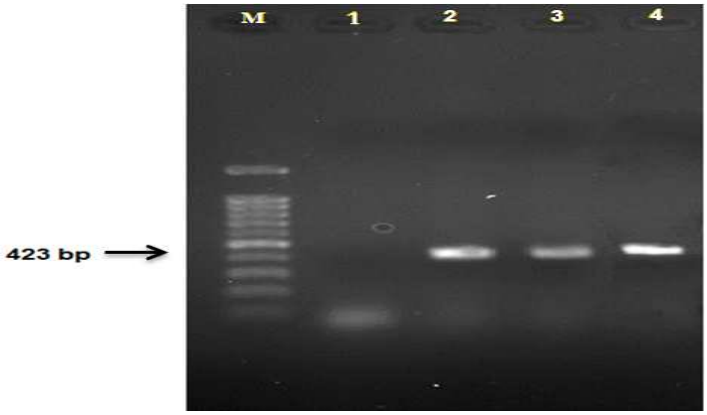
از آنجا که ژن *rol*B در قسمت T-DNA باکتری قرار دارد بر این اساس می‌توان ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین را اثبات کرد. به‌منظور بررسی تراریختی ریشه‌های موئین در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از آغازگرهای ویژه ژن *rol*B استفاده شد و همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعاتی به طول ۴۲۳ bp تکثیر گردید. که نشان‌دهنده انتقال توالی T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی و در نتیجه تراریخت بودن ریشه‌های موئین است. درحالی‌که این قطعات در روی ژل الکتروفورز برای ریشه‌های غیر تراریخته ظاهر نشد و در نتیجه نشان داده شد که این ژن در ریشه‌های غیرتراریخته وجود ندارد (شکل ۸).

میزان درصد تراریختی ریشه‌های موئین در گیاه شقایق با PCR ۱۰۰ درصد بود زیرا لازمه وجود این ریشه‌های موئین، تراریخت بودن آن‌ها است. به عبارتی دیگر، ریشه‌های موئین در صورتی تشکیل می‌شوند که ژن‌های

*rol*A، *rol*B و *rol*C که در قسمت T-DNA پلاسمید باکتری قرار دارند به گیاه انتقال یابند. در نتیجه‌ی انتقال این ژن‌ها، ریشه‌های موئین تراریخت پدیدار می‌شوند (Ozyigit *et al*., 2013). انتقال T-DNA از باکتری *A. rhizogenes* به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است (Ozyigit *et al*., 2013). آگروباکتریوم رایزوژنز دارای پلاسمید Ri است و ژن‌های *rol*A، *rol*B و *rol*C در قسمت T-DNA پلاسمید باکتری قرار دارند.

با انتقال این ژن‌ها به گیاه در محل زخم ریشه‌های موئین تراریخت پدیدار می‌شوند. با توجه به اثرات متقابل گیاه-پاتوژن، نوع سویه باکتری نقش اساسی در این فرآیند ایفا می‌کند. واضح است که انتخاب یک سویه آگروباکتریوم برای تولید کشت‌های ریشه موئین تراریخته خیلی به گونه گیاهی وابسته است و باید به‌صورت تجربی تعیین شود. تفاوت در بیماریزایی، ریخت‌شناسی و سرعت رشد، تاحدی به تنوع پلاسمید موجود در هر سویه باکتریایی مرتبط است. در تحقیق حاضر از سویه‌های ATCC15834، A4 و GMI9534 به منظور تحریک ریشه موئین در گیاه شقایق استفاده گردید که این سویه‌ها هر کدام عملکرد متفاوتی نشان دادند به طوری‌که در ریزنمونه‌ی اندام هوایی، سویه ATCC15834 از کارایی بالایی در این گیاه برخوردار بود ولی در سویه A4 این میزان کمتر بود. تولید ریشه موئین به واسطه‌ی سویه ATCC15834 در چندین مطالعه گزارش شده است. در طی یک بررسی از دو سویه‌ی ATCC15834 و GMI9534 به‌منظور تحریک ریشه موئین در گیاه *Tribulus terrestris* L. استفاده شد که سویه ATCC15834 در این گیاه دارای کارایی بهتری بود (Shrifi *et al*., 2014).

در مطالعه‌ای دیگر از سویه‌های ATCC15834، C318، 9435 و A4 در جهت تحریک ریشه موئین در گیاه *Portulaca oleracea* استفاده شد که سویه ATCC15834 نسبت به سویه‌های دیگر دارای بالاترین درصد تراریختی بود (Pirian *et al*., 2012). هم‌چنین به‌منظور بررسی تحریک ریشه‌های موئین در بین گونه‌های مختلف جنس *Hyoscyamus* از ۵ سویه‌ی 1724، 2659، ATCC15834، A4 و LBA9402 استفاده شد که در گونه *H. arachnoideus* بالاترین درصد تحریک ریشه موئین برای سویه ATCC15834 و کمترین درصد برای سویه A4 به‌دست آمد (Akramian *et al*., 2008).



شکل ۸- نتایج واکاوی PCR جهت تأیید تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B در گیاه شقایق. M: DNA Ladder 100 bp، ۱: کنترل منفی (ریشه‌های معمولی)، ۲: کنترل مثبت (پلاسمید Ri از *A. rhizogenes*)، ۳ و ٤: ریشه‌های موئین تراریخته.

Fig. 8. Polymerase chain reaction (PCR) analysis for detection of the *rol*B gene in transgenic hairy roots of *P. somniferum* L. Lane M: molecular size marker (100 bp ladder, Fermentase); lane 1: negative control (non-transformed root); lane 2: positive control (Ri plasmid); lanes 2-4: transgenic hairy roots.

نتایج حاصل از بررسی قابلیت دو محیط کشت MS و MS ½، در جهت تحریک و تثبیت ریشه‌های موئین گیاه شقایق حاکی از این بود که فاکتور محیط کشت، اثر معنی داری در تحریک ریشه موئین داشت و محیط کشت MS ½ تأثیر ویژه‌ی در تحریک ریشه موئین در این گیاه داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات محیط نقش بسزایی در تحریک ریشه‌های موئین و فراوانی آن‌ها دارد (Bensaddek *et al*., 2008). در یک مطالعه از محیط‌های MS، MS ½، MS ¼ و B5 به منظور بهینه‌سازی محیط کشت تحریک ریشه موئین در گیاه *Hypericum perforatum* L. استفاده شد که درصد تحریک ریشه موئین در محیط MS ½ به نسبت بیشتر از MS بود (Bivadi *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر از دو ریزنمونه اندام هوایی و محور زیرلپه در گیاه شقایق استفاده شد که ریزنمونه اندام هوایی نسبت به ریزنمونه محور زیرلپه در سویه‌های مختلف دارای درصد تحریک بالاتری بود. بر اساس گزارش‌های ارائه شده نوع ریزنمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه موئین دارد. برای مثال در یک بررسی، ریزنمونه‌های مختلف گیاه *Papaver bracteatum* پاسخ‌های متفاوتی به تراریختی با سویه‌های *A. rhizogenes* دادند به‌طوری‌که ریزنمونه اندام هوایی برای همه سویه‌ها دارای درصد تحریک ریشه موئین بالاتری بود و ریزنمونه محور زیرلپه پاسخ ضعیفی داشت (Sharafi *et al*., 2013). دما یکی از عواملی مؤثر بر میزان انتقال T-DNA از باکتری آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی است (Baron *et al*., 2001). در این تحقیق برای دوره‌ی هم‌کشتی از دو دمای ۲۵ و ۱۷ درجه سلسیوس جهت هم‌کشتی سویه‌های *A. rhizogenes* استفاده شد که دمای ۲۵ درجه سلسیوس مناسب تری برای سویه‌های مختلف بود. در مطالعه دیگری جهت بررسی شرایط تراریختی گیاه سویا با *A. rhizogenes* از دماهای مختلف استفاده گردید که دمای ۲۵ درجه سلسیوس دمای مناسب‌تری بود (Cao *et al*., 2009). قابل ذکر است که پاسخ گیاهان مختلف به اثر دما در طی دوره هم کشتی می‌تواند متفاوت باشد. برای مثال در طی یک مطالعه از باکتری *A. rhizogenes* سویه‌ی A4RS جهت تراریختی گیاه *Coffea arabica* و بهینه‌سازی شرایط تراریختی از دمای‌های مختلف (۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۸ درجه سلسیوس) برای دوره هم‌کشتی استفاده گردید که بیشترین کارایی تراریختی در دمای ۱۸ درجه سلسیوس به‌دست آمد (Alpizar *et al*., 2006).

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی حاکی از این است که عوامل مختلفی از قبیل نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه، دمای دوره هم کشتی و محیط کشت پایه بر تحریک ریشه موئین در گیاه شقایق موثر بود که پیشنهاد می‌گردد جهت رسیدن به بالاترین درصد تحریک ریشه موئین در این گیاه از آگروباکتریوم سویه ATCC15834، محیط کشت MS ½، دمای ۲۵ درجه سلسیوس در دوره‌ی هم‌کشتی و ریزنمونه اندام هوایی استفاده گردد. هم‌چنین در تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود که اثر فاکتورهای بیشتری از جمله محرک‌های زیستی و غیرزیستی[1]، سویه‌های دیگر و همچنین با فن‌آوری مهندسی متابولیک مسیرهای آلکالوئیدی گیاه بررسی گردد.

References

1. Akramian, M., Tabatabaei, S.M.F., and Mirmasoumi, M. 2008. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four

1- Biotic and abiotic elicitors

Hyoscyamus species. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 3: 759-763.

2. Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S,. Royer, M., Lecouls, A.C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., and Etienne, H. 2006. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. Plant Cell Reports, 25: 959-967.

3. Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., and Bollinger, W.H. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. Science, 228: 1154-1160.

4. Baron, C., Domke, N., Beinhofer, M., and Hapfelmeier, S. 2001. Elevated temperature differentially affects virulence, virB protein accumulation, and t-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. Journal of Bacteriology, 183: 6852-6861.

5. Bensaddek, L., Villarreal, M.L., and Fliniaux, M.A. 2008. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3: 2-9.

6. Bivadi, V., Zakaria, R.A., Zare, N., and Yazdani, B. 2014. Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in Hypericum perforatum L. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8: 597-604.

7. Cao, D., Hou, W., Song, S., Sun, H., Wu, C., Gao, Y., and Han, T. 2009. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96: 45-52.

8. Chandra, S. 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. Biotechnology Letters, 34: 407-415.

9. Desgagne Penix, I., and Facchini, P.J. 2012. Systematic silencing of benzylisoquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. The Plant Journal, 72: 331-344.

10. Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 19: 13-49.

11. Furner, I.J., Huffman, G.A., Amasino, R.M., Garfinkel, D.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. 1986. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. Nature, 319: 422-427.

12. Gamborg, O.L.C., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.

13. Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., and Fliniaux, M.A. 2004. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. Planta, 218: 890-893.

14. Majumdar, S., Garai, S., and Jha, S. 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant Cell Reports, 30: 941-954.

15. Mishra, B.N. and Ranjan, R. 2008. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. Biotechnology and Applied Biochemistry, 49: 1-10.

16. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

17. Ozyigit, I.I., Dogan, I., and Tarhan, E.A. 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In Crop Improvement, pp: 1-48.

18. Park, S.U. and Facchini, P.J. 2000. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. Journal of Experimental Botany, 51: 1005-1016.

19. Pirian, K., Piri, Kh., and Ghiyasvand, T. 2012. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3: 642-649.

20. Rostampour, S., Sohi, H.H., Jourabchi, E., and Ansari, E. 2009. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzylisoquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): preliminary report .World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 1807-1814.

21. Sevon, N. and Caldentey, K. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. Planta Med, 68: 859-868.

22. Sharafi, A., Sohi, H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, K., and Otang Ntui, v. 2013. A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113: 1-9.

23. Sharifi, S., Sattari, T.N., Zebarjadi, A., Majd, A., and Ghasempour, H. 2014. The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and ß-carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L. Physiology and Molecular Biology of Plants, 20: 69-80.

24. Tetenyi, P. 1997. Opium poppy (*Papaver somniferum*), botany and horticulture. Horticultural Reviews, 19: 373-408.

25. Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. 1992. Transformation of opium poppy (*Papaversomniferum* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. Plant Cell Reports, 11: 132-136.