DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2015.12231

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۲۶۰-۲۵۱ (۱۳۹۳)

القای ریشه‌های مویین با استفاده از *اگروباکتریوم رایزوژنز* در گیاه باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.)

فروغ منتظری[1*]، منصور امیدی[2]، فرنگیس خیالپرست[3] و منیژه سبکدست[4]

۱ * -نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
پست الکترونیک:montazeri1386fm@yahoo.com

۲- استاد، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳- استادیار، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- مربی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۰۱

چکیده

باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) گیاه ارزشمند دارویی، صنعتی از خانواده چتریان و بومی ایران می‌باشد که درحال انقراض است. اخیراً تلاش‌های زیادی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی صورت گرفته است. در پژوهش حاضر، امکان دست‌ورزی ژنتیکی این گیاه با هدف القای ریشه‌های مویین بررسی شد. هم‌کشتی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ، ریشه، جنین‌های ۱۴-۱۰روزه و کالوس، با استفاده از چهار سویه اگروباکتریوم رایزوژنز شامل ۱۵۸۳۴، A4، ۱۷۲۴و ۲۶۵۹ انجام شد. اثر سه محیط کشت فاقد هورمونMS۱، ۱/۲MS و۱/۴MS بر ریشه‌زایی، بررسی شد. طبق نتایج بدست آمده، القای ریشه مویین در گیاه باریجه، تحت تأثیرسویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنزو نوع ریزنمونه قرار گرفت، به‌نحوی که بعد از حدود ۱۴روز از تلقیح فقط ریزنمونهٔ جنین‌های۱۴-۱۰روزه و سویه اگروباکتریوم ۱۵۸۳۴ منجر به القای ریشه مویین گردید. محیط ۱/۲MSبرای ظهور ریشه‌های مویین مؤثر بود. الکتروفورز محصولات PCR، تلفیق موفق T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین را اثبات کرد.

واژه‌های کلیدی : باریجه، اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌های مویین، کشت جنین، ریزنمونه.

مقدمه

گیاه دارویی باریجه *Ferula gummosa* B.، با نام انگلیسی Galbanum از شاخه نهاندانگان و از رده دولپه‌ای‌ها و خانواده چتریان می‌باشد که به‌علت زادآوری پایین و برداشت بی‌رویه در حال انقراض است. این گیاه چند ساله و منوکارپیک بوده و بوی تند و مخصوصی در تمام دوره رشد و نمو، از آن استشمام می‌شود که از نشانه‌های مشخص گیاه باریجه است (Omidbaigi, 1997; Zaragari, 1990). شیرابه و اسانس باریجه در صنایع مختلف از جمله صنایع داروسازی، غذایی، عطرسازی، چسب‌سازی و نظامی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله مصارف صنعتی صمغ باریجه، کاربرد آن در صنایع عطر و ادکلن‌سازی، نقاشی، نساجی و داروسازی است (Mortazaienezhad & Sadeghian, 2006). مشخص شده

است که آلفا–پینن و بتا-پینن دو ترکیب اصلی اسانس باریجه‌های ایران را تشکیل می‌دهند (Talebi *et al*., 2008). همچنین ۱۳۰ ترکیب منوترپنی در الئوگم رزین باریجه ایران شناسایی شده است (Jalali *et al*.,2012).

از عصاره این گیاه جهت تسکین سندروم محرومیت از مورفین استفاده می‌شود (Ramezani *et al*., 2001)؛ همچنین فعالیت ضد صرع و ضد تشنج بذر این گیاه بر روی موش ثابت شده است (Sayyah *et al*., 2002). همچنین از آن به‌عنوان شوینده‌های آنتی‌باکتریال خوشبو استفاده می‌شود (Ghasemi *et al*., 2005).

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه اصلاحات ژنتیکی این گیاه صورت نگرفته است. Nadjafi و همکاران (۲۰۰۵) با تحقیق بر روی جوانه‌زنی بذر این گیاه، روش‌هایی برای شکستن خواب بذر گیاه باریجه ارائه داده اند. Sarabadani (۲۰۰۸) اثر سطوح هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی و باززایی گیاه باریجه را بررسی نموده و از کشت جنین به‌عنوان یک روش مؤثر در برابر خواب بذر باریجه استفاده کردند. با استفاده از کشت جنین باریجه به‌صورت عمودی در محیط MS ۱/۴حاوی ۰/۵گرم در لیتر زغال فعال، می‌توان گیاهچه‌های قوی‌تر و بیشتری را در زمان کمتر، به‌منظور تهیه ریزنمونه مناسب، تولید نمود (Montazeri *et al*., 2010). لذا با توجه به‌اهمیت زیاد دارویی و صنعتی این گیاه بومی و در حال انقراض، به‌عنوان یک مقوله صادراتی ارزشمند و ارزآور برای کشور، استفاده از روش‌های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، از جمله القا ریشه‌های مویین، با هدف اصلاح این گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن، ضروری به‌نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تقاضای روزافزونی برای داروهای با منشاء گیاهی بوجود آمده است (Shrikumar & Ravi, 2007). اما متابولیت‌های ثانویه‌ای که در گیاهان دارویی ساخته می‌شوند، غالبا محدود می‌باشند. علاوه براین، جمع‌آوری بسیاری از گیاهان دارویی از طبیعت، حیات آنها را به مخاطره می‌اندازد (Verpoorte & Memelink , 2002). از آنجا که متابولیت‌های ثانویه اغلب در مقادیر اندک در بافت‌های تمایز یافته تولید می‌شوند، استخراج، جداسازی و خالص‌سازی آنها عموما به‌عنوان یک مشکل اساسی تولید مطرح است (Kim *et al*., 2002).

امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در درون شیشه از طریق کشت بافت‌های گیاهی امکان پذیر می‌باشد، اما به‌منظور غلبه بر مشکلات سیستم‌های کشت سلول‌های گیاهی، رهیافت نسبتا نوینی برای تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه پدید آمده است که مستلزم دست‌ورزی ژنتیکی گونه‌های مولد ترکیبات هدف با استفاده از سیستم یک ناقل طبیعی به‌نام اگروباکتریوم رایزوژنز(*Agrobacterium rhizogenes*) می‌باشد. این باکتری‌گرم‌منفی خاک مولد بیماری ریشه مویین(Hairy root) در گیاهان می‌باشد. T-DNA پلاسمیدهای Ri دارای مجموعه‌ای مشتمل برچهار ژن *rol A,B,C,D* هستند که وظیفه اصلی تولید ریشه‌های مویین را به‌عهده دارند. ورود بخش T-DNA از پلاسمید Ri (القا ریشه) باکتری *A. rhizogenes* به ژنوم گیاهی، باعث ایجاد تظاهر مورفولوژیکی رشد بافت ریشه‌های تراریخت از قسمت‌های آلوده شده گیاه می‌شود (Riker *et al*.,1930 & Hildebrand *et a*l.,1934). ریشه‌های جدا شده از گیاهان ترانسفورم شده با پلاسمید Ri توانایی رشد درون شیشه در شرایط استریل را دارند، به‌صورت ژنتیکی پایدارند و توانایی سنتز فراوان متابولیت‌هایی که به‌صورت نرمال در ریشه‌ها و اندام‌های دیگر یافت می‌شوند را دارند (Li *et al*.,2000, Oksman *et al*.1996). این ریشه‌ها که با نام " ریشه‌های مویین" یا "ریشه‌های تراریخت" شناخته می‌شوند، بیش از دو دهه است که در علم گیاهی استفاده می‌شوند، و به‌عنوان یک ابزار ضروری در فیزولوژی گیاهی، بیوشیمی، و بیولوژی مولوکولی مطرح می‌باشند (Kuzovkina *et al*., 2006).

ماهیت برهمکنش میان اگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی هنوز به‌طور کامل درک نشده است. به‌منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی باید بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون گردد. علاوه بر ژنوتیپ، عوامل دیگری همچون سن، نوع و

وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه نیز می‌توانند در تعیین سازگاری ژنوتیپ و سویه باکتری حائز اهمیت باشند (Hu,z *et al.*,2006).

در پژوهش حاضر امکان دست‌ورزی ژنتیکی در گیاه دارویی باریجه *Ferula gummosa* B.، با استفاده ازانواع ریزنمونه‌های ممکن و۴ سویه متفاوت اگروباکتریوم رایزوژنز، با هدف القای ریشه‌های مویین، بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

بذر گیاه باریجه *F.gummosa* B. مورد استفاده در این پژوهش از مناطق کوهستانی استان اصفهان جمع‌آوری شد. بذرهاپس از شستشو با آب و صابون مایع، به‌مدت ۴۸ ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس به‌مدت ۶۰ ثانیه در محلول اتانول ۷۰٪، و پس از آن به‌مدت ۲۵ دقیقه در محلول۲/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم حاوی چند قطره صابون مایع، در زیر هود هوای استریل همراه با تکان دادن، قرار داده شد. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر دو بار استریل، شستشو شدند. بعد از آن آب اضافی آنها توسط کاغذ صافی استریل گرفته شد. محور جنینی پس از ضد عفونی بذور و جهت تولید گیاهچه‌های سترون برای بدست‌آوردن ریزنمونه، توسط پنس و اسکالپل از پوشش بذر خارج گردید و جنین‌ها در محیط کشت MS ۱/۴ از عناصر ماکرو و میکرو همراه با ۳۰گرم در لیتر ساکارز و ۷گرم در لیتر آگار (pH =5.8-6) حاوی ۰/۵گرم در لیتر زغال فعال و بدون هورمون (Montazeri *et al.*, 2010)، کشت شدند. ظروف کشت، لیوان‌های شیشه‌ای بودند که ۵ جنین سالم در هر کدام کشت و به اتاقک رشد با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰lux برای ۱۶ ساعت دوره روشنایی منتقل شدند.

تهیه ریزنمونه مناسب

پس از دستیابی به گیاهچه‌های سترون قوی و با بنیه مناسب (۳۰-۲۰ روزه)، از قسمت‌های مختلف گیاه شامل محور زیرلپه‌ای (هیپوکوتیل)، لپه‌ها (کوتیلدون‌ها)، برگ اصلی و ریشه، ریزنمونه تهیه شد. همچنین، از جنین‌های ۱۴-۱۰ روزه، کالوس‌های با منشأ ریشه و کالوس‌های با منشا جنین برش یافته، نیز مستقیما به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد.

برای تهیه کالوس، ریزنمونه‌های جنین برش‌یافته و ریشه، به محیط ۱/۴MS با ترکیب هورمونی mg/l^{-1} NAA ۱۰و mg/l^{-1} BAP ۲ منتقل شده، در شرایط تاریکی در دمای۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها هر ۱۰ روز یکبار واکشت شدند و پس از حدود یک ماه کالوس‌های مناسب به‌دست آمدند.

سویه‌های باکتریایی

به منظور القای ریشهٔ مویین، در این پژوهش از چهار سویهٔ اگروباکتریوم ریزوژنز شامل دو سویهٔ آگروپینی (۱۵۸۳۴، A4)، یک سویهٔ میکی موپینی (۱۷۲۴) و یک سویهٔ کوکوموپینی (۲۶۵۹) استفاده شد. سویهٔ A4 از دانشگاه فردوسی مشهد و بقیه سویه‌ها از آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی دانشگاه تهران تهیه شدند. کشت سوسپانسیون باکتری در فالکون‌های ml ۳۰ حاوی محیط کشت مایع LB در شیکر دورانی با دور ۱۸۰rpm در تاریکی و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۲۸ انجام شد. سپس باکتری به‌کمک دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۵۰۰ رسوب داده شد و ml ۵ محیط کشت مایع MS کامل به آن اضافه شده مجددا به‌مدت ۳/۵ تا ۴ ساعت در شیکرقرار داده شد. پس از اطمینان از حضور پلاسمید مورد نظر در باکتری، بقیه مراحل انجام شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها

به منظور بررسی اثر چهار سویه اگروباکتریوم رایزوژنز (A4، ۱۵۸۳۴، ۲۶۵۹، ۱۷۲۴) بر ۷ نوع ریزنمونه به‌شرح بالا، در یک طرح کاملا تصادفی برای هر سویه باکتری، ۱۲ پتری در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر پتری ۱۰ ریزنمونه از همهٔ انواع آن، به‌صورت تصادفی قرار داده شد. ریزنمونه‌ها توسط سوزن یا اسکالپل آغشته به باکتری زخمی شدند. بعد به‌کمک پنس به‌طور جداگانه به سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر منتقل شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در آن غوطه ور شدند. سپس

آنها را از سوسپانسیون باکتری خارج کرده و مایع اضافی توسط کاغذ صافی استریل زدوده شد. در نهایت، ریزنمونه‌ها به‌منظور کشت توام با باکتری، به پتری‌های حاوی محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۷ ٪ آگار منتقل شدند. پتری‌ها به اتاق تاریکی با دمای ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافتند. یک‌سری پتری نیز بدون تیمار با باکتری، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

زدودن باکتری

به‌منظور حذف باکتری، ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از تلقیح، ریزنمونه‌ها توسط آب مقطردوبار استریل، شسته شدند. سپس با کاغذ صافی خشک شده و با پنس آغشته به آنتی‌بیوتیک، به محیط جامد تازه ۱/۲MS حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime)، منتقل شدند. دو روز بعد نمونه‌ها به محیط مشابه با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، منتقل شده و در اتاق تاریکی نگهداری شدند.

پس از بررسی نتایج، بهترین سویه باکتری و بهترین ریزنمونه (یعنی سویه باکتری ۱۵۸۳۴ و ریزنمونه جنین‌های ۱۴–۱۰ روزه) که منجر به تولید ریشه مویین گردیدند، انتخاب شده و در ادامه پژوهش ریزنمونه‌ها و باکتری‌هایی که نتوانسته بودند موجب ریشه‌زایی شوند، حذف شدند. روش‌های مورد استفاده برای زدودن باکتری، مثل انتقال مستقیم ریزنمونه‌ها به محیط حاوی سفوتاکسیم بدون شستشو با آب مقطر، یا واکشت ریزنمونه‌ها هر دو روز یکبار باعث از دست‌رفتن ریزنمونه‌ها شد. همچنین استفاده از سطوح بالاتر سفوتاکسیم مثل ۵۰۰ یا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر که به‌طور معمول متداول است، باعث زردشدن و از بین‌رفتن ریزنمونه‌ها شد. شستشوی ریزنمونه‌ها با آب مقطر دوبار استریل، اثر قابل توجهی در حذف باکتری‌ها و زنده‌ماندن بافت گیاهی داشت. همچنین استفاده از ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم در محیط جامد، بعد از گذشت دو روز از تلقیح، و کم‌کردن تدریجی سطح آنتی‌بیوتیک به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بعد از یک هفته، و سپس انتقال به محیط کشت مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک، باعث زنده‌ماندن ریزنمونه‌ها و تحریک ریشه‌زایی گردید. بعد از گذشت حدود ۱۴ روز از تلقیح، ریشه‌ها ظاهر شدند.

بهینه‌سازی ظهور ریشه‌های مویین

به منظور بهینه‌سازی محیط کشت برای تلقیح جنین‌های ۱۴–۱۰ روزه با باکتری ۱۵۸۳۴، اثر ۳ محیط کشت فاقد هورمون ۱MS، ۱/۲MS و۱/۴MS بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها، در یک طرح کاملا تصادفی با ۱۱ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هر پتری به‌منزله یک تکرار قلمداد گردید و ۵ ریزنمونه با فاصله مناسب در آن قرار داده شد. عملیات تلقیح با باکتری، هم‌کشتی و زدودن باکتری به‌شرح بالا انجام پذیرفت . بعد از گذشت ۱۴ روز از تلقیح، که ریشه‌ها ظاهر شدند، از همه پتری‌ها برای صفات تعداد ریشه، به‌وسیله شمارش و طول ریشه، به‌کمک اندازه گیری با خط کش، آمارگیری شد.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

به منظور اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین، DNAی دو کلن مختلف از ریشه‌های مویین تولید شده، استخراج و با یک جفت آغازگر اختصاصی باتوالی‌های زیر برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol B* با طول حدود ۴۲۳ جفت باز، وارد واکنش PCR گردید:

5´-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3´

و 5´-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC- 3´

به‌منظور تهیه DNA ژنومی، از ریشه‌های مویین که به‌مدت سه ماه بدون آلودگی رشد کرده بودند، استفاده شد. استخراج DNA ژنومی به‌روش CTAB (Reichardt & Rogers, 1994) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS و دسته‌بندی میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

تعیین ریزنمونه مناسب

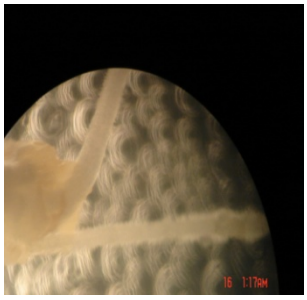
از میان۷ نوع ریزنمونه مورد آزمایش، جنین‌های ۱۴-۱۰ روزه، بهترین و تنها گزینه‌هایی بودند که منجر به تولید ریشه مویین گردیدند. در مورد ریزنمونه‌های محور زیرلپه‌ای، لپه‌ها، برگ اصلی و ریشه، پس از تلقیح با اگروباکتریوم، یا هیچ تغییری حاصل نشد و یا بعد از چند روز زرد شده و از بین رفتند . همچنین در بعضی موارد حالت کالوسی به خود گرفتند (شکل۱). استفاده از هیچ‌کدام از انواع کالوس‌ها نیز منجر به‌تولید ریشه مویین نشد.

شکل ۱- تمایل به تشکیل کالوس دربعضی از ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه ۱۷۲۴

تعیین بهترین باکتری

بعد از گذشت حدود ۱۵-۱۱ روز از تلقیح، فقط در بعضی از پتری‌ها که مربوط به سویه باکتری ۱۵۸۳۴ بودند و در مورد ریزنمونه‌ها (جنین‌های ۱۴-۱۰ روزه)، ریشه‌ها ظاهر شدند (شکل۲ و ۳). در مورد باکتری‌های (A4، ۲۶۵۹و ۱۷۲۴) و ۶ریز نمونه دیگر، حتی بعد از گذشت دو تا سه ماه و انجام واکشت‌های متعدد در مورد بعضی از پتری‌ها و یا عدم واکشت زیاد در مورد پتری‌های دیگر، هیچ پاسخ مناسبی مشاهده نشد. طبق نتایج مشاهده شده، تفاوت بسیار معنی‌داری میان سویه‌های مختلف باکتری از نظر القای ریشه‌زایی مویینه در ریزنمونه‌های مورد استفاده مشاهده شد. به‌طوری‌که از میان ۴ سویه اگروباکتریوم ریزوژنز مورد استفاده در این پژوهش، تنها سویه‌ای که توانست نتایج قابل قبولی را در مقایسه با شاهد، در القای ریشه‌های مویین فراهم کند، سویه ۱۵۸۳۴ بود. اکثر ریزنمونه‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم سویه ۱۷۲۴ به‌سمت کالوس‌دهی پیش رفتند.

شکل ۲- ظهور ریشه‌های مویین ***F. gummosa*** حدود ۱۴ روز پس از تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز



شکل ۳- نمای کرکین ریشه‌های مویین تراریخت ***F.gummosa*** در زیر بینوکولار

بهینه‌سازی ظهور ریشه‌های مویین

بر اساس داده‌های جدول تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر روی هر دو صفت تعداد ریشه و طول ریشه معنی‌دار (در سطح ۵٪) تشخیص داده شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر صفات تعداد و طول ریشه مویین گیاه ***F .gummosa***

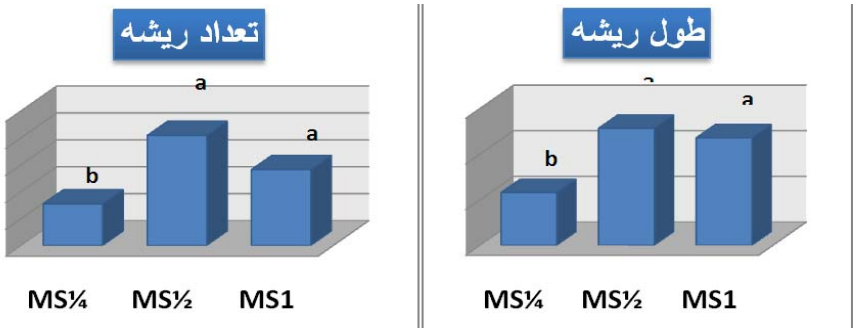
منابع تغییر	DF	طول ریشه (mm)	تعداد ریشه
تیمار	۲	۱/۵۸۹*	۱۷/۸۱۸*
خطا	۳۰	۰/۱۹۷	۲/۷۶۶

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ns: غیر معنی‌دار

دسته‌بندی میانگین‌ها نشان داد که در هر دو صفت تعداد ریشه و طول ریشه، بهترین محیط‌ها به‌ترتیب محیط‌های ۱/۲MS، MS ۱ بود و۱/۴MS عملکرد پایین‌تری داشت. در مورد تعداد ریشه، محیط MS ۱/۲ به‌عنوان بهترین محیط شناخته شد و ۱MS نیز در هر دو گروه قرار گرفت. اما در مورد صفت طول ریشه، محیط‌های ۱/۲MS و ۱MS تفاوت چندانی نشان ندادند (شکل ۴).

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

پس از بررسی نتایج، الکتروفورز محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز (شکل ۵) حضور ژن مورد نظر را که بیانگر تلفیق موفق T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین است، تصدیق نمود.

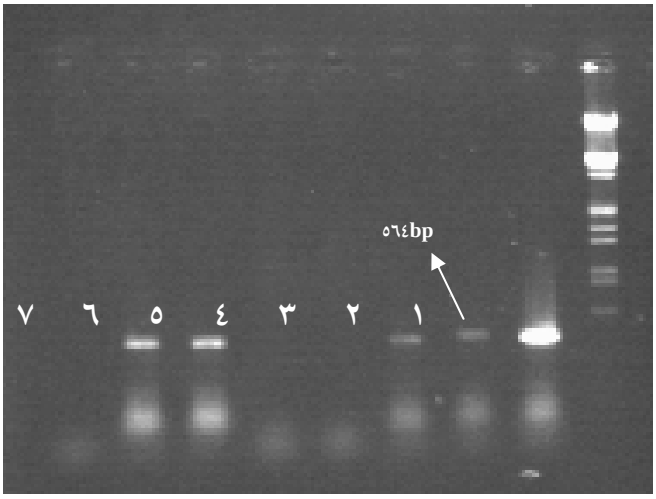


شکل ۴- بررسی اثر محیط کشت بر طول و تعداد ریشه مویین گیاه ***F.gummosa*** با آزمون دانکن

همانطور که مشاهده می‌شود واکنش PCR با DNAی استخراج شده از ریشه‌های مویین موجب تکثیر قطعه‌ای با طول حدود ۴۲۳ جفت باز گردید که دقیقا به اندازه قطعات تکثیرشده از روی پلاسمید سویه ۱۵۸۳۴ می‌باشد. بنابراین از آنجا که واکنش PCR با DNAی ریشه‌های معمولی تولید هیچ قطعه‌ای را به‌دنبال نداشت، حضور T-DNAی پلاسمیدهای باکتریایی در ژنوم ریشه‌های مویین تأیید می‌گردد.

بحث

در پژوهش حاضر، امکان القای ریشه‌های مویین با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه باریجه *F. gummosa* B. بررسی شد. وجود تفاوت در سویه‌های مختلف این باکتری، در مورد توانایی انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های یک گونه خاص و متعاقبا القای ریشه‌های مویین، که در این تحقیق نشان داده شد، در مطالعات زیادی به‌خوبی به اثبات رسیده است.



شکل ۵- انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *rol B*: باند تکثیر شده از پلاسمید سویه ۱۵۸۳۴ (۱)، باند تکثیر شده از کلن ریشه مویین شماره ۱ (۳و۲)، عدم تکثیر باند از DNAی ریشه‌های طبیعی (۵و۴)، باند تکثیر شده از کلن ریشه مویین شماره ۲ (۷و۶)، کنترل منفی (۸)، با استفاده از سایز ماکر Lambda DNA / EcoRI + HindIII

به‌عنوان مثال Zhao و همکاران (2004) با القای ریشه‌زایی مویینه در ریزنمونه‌های گیاه *Saussurea medusa* توسط چهار سویه A4، LBA9402 ، R1000 و R1601 گزارش کردند که تنها، کاربرد سویه R1000 در رابطه با ریشه‌های مویین این گیاه موفقیت‌آمیز بود و همانند پژوهش حاضر، در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌ها با سویه‌های دیگر، هیچ ریشه‌ای تشکیل نگردید. در مورد گیاه *Rubia tinctorum* نیز در مقایسه چهار سویه ۱۵۸۳۴, ۲۶۲۸, R1000و ۹۳۶۵، سویه ۱۵۸۳۴ با ۷۵ ٪ ریشه‌زایی، بیشترین آمار ریشه‌زایی را به‌خود اختصاص داد (Ercan *et al*., 1999) که این با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین Akramian و همکاران (۲۰۰۸) در مقایسه اثر ۵ سویه باکتری A4،۱۷۲۴، ۱۵۸۳۴، ۲۶۵۹، LBA9402 در گونه‌های هیوسیاموس، سویه ۱۵۸۳۴ را به‌عنوان مناسبترین سویه برای القای ریشهٔ مویین، در ریزنمونه‌های برگی *H. arachnoideus* معرفی کردند که با این پژوهش همخوانی دارد.

وجود تفاوت در نوع ریزنمونه، در میزان توانایی ریشه‌زایی مویینه نیز در پژوهش حاضر به‌خوبی مشخص بود. از میان انواع ریزنمونه‌های مورد استفاده، جنین‌های ۱۴-۱۰ روزه که از قسمت هیپوکوتیل توسط سوزن ظریف زخمی شدند، چون بافت جوان‌تری داشته، همچنین مواد مؤثره کمتری در آنها تولید شده و به‌بیماری مبتلا نشدند، بعداز تلقیح مدت زمان بیشتری می‌توانند زنده بمانند تا ژن‌های منتقل شده توسط اگروباکتریوم بتوانند بهتر بیان شوند. در واقع می‌توان اینطور نتیجه‌گیری کرد که هیپوکوتیل مکان مناسبی برای ایجاد القای ژنتیکی در این گیاه می‌باشد اما چون ریزنمونه‌های این گیاه بسیار ظریف و حساسند و زود دچار بیماری شده و ازبین می‌روند، قطع‌نکردن کوتلیدون‌ها و ریشه‌چه می‌تواند به زنده‌ماندن بیشتر ریزنمونه و محافظت در برابر اثرات سوء واکشت‌های متعدد، هم‌کشتی با اگروباکتریوم و اثر آنتی‌بیوتیک کمک کند. در ضمن Park و همکاران (2000) با استفاده از ریزنمونه‌های حاصل از جوانه‌های پنج روزه و جنین سوماتیکی، Le و همکاران (2004) نیز با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل، موفق به القای ریشهٔ مویین در گیاه *Papaver somniferum* شدند، که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. به‌منظور القای ریشه موئین در گیاه*Anethum graveolens* از خانواده چتریان، Santos و همکاران (2002) از گیاهچه‌های جوانه زده ۳ تا ۴ هفته‌ای استفاده کرده و به‌کمک سوزن استریل هیپوکوتیل و قسمت‌های گره‌ای را زخمی کرده و سپس آنها را در

سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور ساختند، که این دقیقا با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. همچنین Sudha و همکاران (2003) به‌منظور القای ریشهٔ مویینه در گیاه *Rauvolfia micrantha* از ریزنمونه‌های مختلف آن شامل ساقه، برگ، هیپوکوتیل و لپه‌ها استفاده کردند و مشاهده کردند که بیشترین ریشه در ریزنمونه هیپوکوتیل تشکیل شد.

همانطور که مشخص شد، نوع ترکیبات محیط کشت می‌تواند بر میزان رشد این ریشه‌ها مؤثر باشد. در همین زمینه Vanhalو همکاران (1995) گزارش کردند که نوع محیط کشت مورد استفاده اثر معنی‌داری بر تشکیل ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های بنگ‌دانه مصری داشت که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در ریشه‌های مویین حاصل ازگیاه *Artemisia vulgaris* نیز همانند پژوهش حاضر، محیط کشت ۱/۲MS، بهترین محیط برای افزایش تولید بیومس شناخته شد (Sujatha *et al*., 2012). در بررسی‌های Santos و همکاران (2002) به‌منظور القای ریشهٔ موئین در گیاه هم‌خانواده باریجه، یعنی *Anethum graveolens* (*Apiaceae*)، از ۱/۲MS استفاده کردند که نتایج حاضر را تأیید می‌کند. در تحقیق مذکور نیز، از سطوح پایین‌تر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۲۵۰میلی‌گرم درلیتر) برای زدودن باکتری استفاده شده است. حتی در گیاهان دیگر این خانواده نیز مانند *Pimpinela anisum* از ۱۵۰ (میلی‌گرم در لیتر) سفوتاکسیم استفاده شده است که نتایج تحقیق حاضر را در حساسیت بالای این گیاه به آنتی‌بیوتیک و لزوم استفاده از سطوح پایین‌تر آن، تصدیق می‌کند. اما در مورد خانواده‌های دیگر گیاهان، از جمله *Papaver somniferum* (Le *et al*., 2004) و *Hyoscyamus muticus* (Zolala *et al*., 2007) و *Ruta graveolens L.* (Sidwa-Gorycka *et al*.,2009) برای زدودن باکتری از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک استفاده شد. به‌هرحال با توجه به تحقیقات مذکور که به خوبی نتایج پژوهش حاضر را تصدیق می‌کند، مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است تا شرایط رشدی ریشه‌های مویین باریجه از نظر نوع محیط کشت، غلظت مواد در محیط کشت، دما، نور و.... به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌طور کامل بررسی شود.

در نهایت نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که القای ریشه‌زایی مویینه در گیاه باریجه، تحت تاثیر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه است. به‌نحوی که تقریبا تنها ریزنمونه جنین‌های ۱۴–۱۰ روزه و سویه ۱۵۸۳۴ (از میان ۴ سویه ۱۵۸۳۴، A4، ۱۷۲۴ و ۲۶۵۹) منجر به القای ریشهٔ مویین گردید. محیط MS ۱/۲برای ظهور ریشه‌های مویین مؤثر بود. مطالعات دقیقتر در مورد شرایط تولید ریشه‌های مویین در این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از استادان و مسئولین محترم آزمایشگاه گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران و دانشگاه فردوسی مشهد، برای همکاری در تهیه باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

– Akramian, M., Fakhr Tabatabaei S.M. and Mirmasoumi, M., 2008.Virulence of different strains of agrobacterium rhizogenes on genetic transformation of four Hyoscyamus species. American-Eurasian J. Agric. & Environ, Sci., 5: 759-763.
– Ercan, A.G. and Taskin, K.M., 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* l. populations grown in Turkey. Tr. J. of Botany, 23: 373-377.
– Ghasemi, Y., Faridi, P., Mehregan, I. and Mohagheghzadeh, A., 2005. *Ferula gummosa B*,.Fruits: An aromatic antimicrobial agent. Chemistry of Natural Compounds, 41: 311-314.
– Hildebrand, E., 1934. Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. J. Agric. Res., 48: 857–885.
– Hu, Z. and Du, M., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering, Plant Biol., 48: 121-127.
– Jalali, H., Petronilho, S., Villaverde, J., Coimbra, M., Rosario, M., Ebrahimian, Z., Silvestre, A. and Rocha, S., 2012. Deeper insight into the monoterpenic composition of *Ferula gummosa* oleo-gum-resin from Iran. Industrial Crops and Products,v36: 500-507.
– Kim, Y., Wyslouzil, B.E. and Weathers P.J., 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro* Cell Dev.Pl., 38: 1–10.

– Sarabadani, T.R ., 2008. Evaluation of the effect of culture medium plant growth regulator levels and explant types on callus induction and Shoot organogenesis of *Ferula gummosa* B.. Dissertation, University of Tehran,70pp.
– Sayyah, M., Mandgary, A. and Kamalinejad, M., 2002. Evaluation of the anticovulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* against seizures induced by pentylenetrazole and electroconvulsive shock in mice. Journal of Ethnopharmacology, 82: 105-109.
– Shrikumar, S. and Ravi, T.K., 2007. Approach towards development and promotion of herbal drugs. PHCOG Rev, 1: 180-148.
– Sidwa-Gorycka, M., Krolicka, A. and Orlita, A., 2009. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by Agrobacterium rhizogenes: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 97: 59–69.
– Sudha, C.G., Reddy, B.O., Ravishankar, G.A. and Seeni, S., 2003. Production of ajmalicine and ajmalinein hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook F., a rare and endemic medicinalplant. Biotechnol Lett, 25: 631–636.
– Sujatha, G., Zdravkovic´-Korac´, S., C´ alic, D., Flamini, G. and Ranjitha Kumaria, B.D., 2012, High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis. Industrial Crops and Products, 6341: 1-10.
– Talebi, K. E., Naghavi, M. R. and Alayhs, M., 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 44: 124-126.
– Vanhal, L., Hiltunen R. and Oksman-caldenty K.M., 1995. Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell, 14: 236-240.
– Verpoorte, R. and Memelink, J., 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Curr. Opin. Biotech., 13: 181–187.
– Zargari, A.,1990.Medicinal Plants.Tehran University, 945pp.
– Zhao, D., Fu, C. and Chen, Y., 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosiden production, Plant Cell, 23: 468-474.
– Zolala, J., Farsi, M., Gordan, R.H. and Mahmoodnia, M., 2007. Producing a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. J.Agric.Sci. technol, 9: 327-339.
– Kuzovkina, I.N. and Schneider, B., 2006. Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences. Progress in Botany, Physiology, 67: 275-314.
– 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.
– Li, W., Asada, Y. and Yoshikawa, T., 2000. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Phytochemistry, 55: 447–456.
– Montazeri, F., Omidi, M., Imani N., 2010. Comparing various methods of seed and embryo culture and charcoal effects in optimizing *in vitro* culture of galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants, 26: 583-595
– Mortazaienezhad, F., and Sadeghian, M.M., 2006. Investigation of compounds from galbanum (*Ferula gummosa B.)*. Asian Jurnal of Plant Sciences, 5: 905-906.
– Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M., 2005. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. Journal of Arid Environment, 64: 542-547.
– Oksman-Caldentey, K.M. and Hiltunen, R., 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field Crop Res., 45:57–69.
– Omidbaigi, R.,1997. Production And Processing of Medicinal Plants. Tarrahan Nashr, 424pp.
– Park, S. and Facchini, P. J., 2000. *Agrobacterium rhizogenes*-madiated transformation of *Opium poppy, Papaver somniferum* L.,and *California poppy, Eschscholzia californica* Cham., root cultures. Jurnal of Experimental Botany, 51: 1005-1016.
– Ramezani, M., Hosseinzade, H. and Mojtahedi, K., 2001. Effects of *Ferula gummosa B.* Fraction on morphine dependence in mice. Jurnal of Ethnopharmacology, 77: 71-75.
– Reichardt, M. and Rogers, S.,1994. Preparation of plant DNA using CTAB. Current Protocols in Molecular Biology, 2.3.3-2.3.7.
– Riker, A.W., Banfield, W., Wright, W., Keitt, G. and Sagen, H., 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. J. Agric. Res., 41: 887–912.
– Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Lourenço, P.M.L. and Barroso, J., 2002. Hairy root cultures of *Anethum graveolens* (dill): establishment, growth, time-course study of their essential oil and its comparison with parent plant oils. Biotechnology Letters, 24: 1031–1036.

Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.)

F. Montazeri[1*], M. Omidi[2], F. Khialparast[3] and M. Sabokdast[4]

1*- Corresponding author, M.Sc., University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, I.R.Iran
Email: montazeri1386fm@yahoo.com
2-Prof., University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, I.R.Iran
3- Assoc. Prof., University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, I.R.Iran
4- M.Sc., University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, I.R.Iran

Received: 28.08.2013 Accepted: 23.07.2014

Abstract

Ferula gummosa B. an endangered and highly valuable medicinal plant belonging to the *Apiaceae* family is an endemic plant of Iran, on which mass production is exposed to serious problems. Recently hairy root research for production of important secondary metabolites has received a lot of attention. We studied the possibility of hairy root induction, on *F. gummosis B.* using four strains of *Agrobacterium rhizogenes* (15834, A4, 1724,2659) by infecting different explants (hypocotyle, cotyledons, leaf, 10-14 day old embryo and callus). Effects of three levels of hormone free MS medium (1, ½, 1/4) on hairy root production were examined. Results showed that different kinds of *Agrobacterium rhizogenes* and explants were affected by hairy root induction. Fourteen days after infection, only, 10-14 day old embryos produced hairy root by strain 15834. MS1/2 medium was effective for root emergence. In comparison with testifier, successful genetic transformations containing T-DNA, were confirmed by PCR.

Keywords: *Ferula gummosa* boiss., *agrobacterium rhizogenes* ,hairy root culture, embryo culture.