

القا و بهینه سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*)

محمدرضا دینی ترکمانی^۱ Ph.D Student*، ناصر عباسپور^۲ Ph.D، مراد جعفری^۲ Ph.D، افسانه صمدی^۴ Ph.D

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ارومیه

۲- دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ارومیه

۳- دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات، ارومیه

۴- دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه فرهنگیان، پردیس فاطمه الزهرا، تبریز

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: dr.torkamani@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۸

چکیده

هدف: در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین، ریزنمونه‌های حاصل از برگ، ریشه و هیپوکوتیل با باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز تلقیح و سپس اثر چهار محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ مایع با ترکیبات و دمای متفاوت بر رشد ریشه‌های موئین به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به‌منظور القای ریشه‌های موئین از دو سویه A13 و ۹۵۳۴ باکتری آگروباکتریوم به دو روش اسپری و دیسک برگی استفاده شد. برای تایید تراریخت بودن ریشه‌ها و عدم آلودگی، واکنش PCR برای تکثیر اختصاصی ژن *rol-B* و *virD* انجام شد. ریشه‌های موئین به‌دست آمده در محیط‌های کشت پایه موراشیک و اسکوگ تحت تیمارهای مختلف در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار کشت شده و وزن خشک ریشه‌ها بعد از گذشت دو ماه اندازه گیری شد.

نتایج: بعد از ۸ روز ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ گیاهچه‌ها مشاهده شد. بیشترین درصد تراریختی ریزنمونه‌ها مربوط به برگ بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک ریشه‌های موئین (۰/۱۹ گرم) مربوط به محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ مایع با ۳ درصد ساکارز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین رشد (۰/۰۵ گرم) مربوط به محیط کشت MS پایه غنی شده با ۰/۲ گرم بر لیتر هورمون اکسین بود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج نشان داد که نوع ترکیبات محیط کشت و دما نقش مهمی در افزایش زیست توده کلی ریشه موئین دارند.

واژگان کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، ریزنمونه، سنبل الطیب، محیط کشت

مقدمه

هزاران سال است که گیاهان از مهم‌ترین منابع درمانی محسوب می‌شوند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (۱). از آنجا که ساخت شیمیایی ترکیبات گیاهی به راحتی میسر نمی‌باشد، محققان سعی بر آن دارند که چنین ترکیباتی را از طریق تکنیک‌های فن‌آوری زیستی به دست آورند. کشت سلول‌های گیاهی در بعضی موارد موفقیت آمیز بوده است اما بزرگترین چالش در این زمینه ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است (۲). بنابراین برای غلبه بر این محدودیت‌ها استفاده از آگروباکتريوم رایزوزنز و کشت ریشه‌های موئین به علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (۳). علاوه بر این، ریشه‌های موئین یک سیستم مدل ارزشمند برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان هستند. ریشه‌های موئین از طریق تراریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط باکتری آگروباکتريوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogens*) تشکیل می‌شوند و همانند سلول‌های معمولی دارای پایداری ژنتیکی در طول دوره کشت می‌باشد (۴). برای افزایش زیست توده توسط ریشه‌های موئین موارد آزمایشی مختلفی باید انجام شود، این موارد می‌تواند شامل: بهینه‌سازی شرایط محیط از قبیل دما، نوع ترکیبات، انتخاب لاین‌های مناسب از ریشه‌های موئین که رشد مطلوبی داشته باشند و پیدا نمودن یک نژاد آگروباکتريوم که ژنوتیپ گیاهی مورد نظر را به نحو مطلوب آلوده نماید. در تحقیق حاضر تاثیر تیمارهای مختلف برای افزایش زیست توده ریشه‌های موئین در گیاه دارویی سنبل الطیب بررسی گردید. گیاه سنبل الطیب با نام علمی *Valeriana officinalis* L. از زمان‌های گذشته به عنوان گیاه دارویی ارزشمند همواره مورد توجه و استفاده انسان بوده است. ریشه و ریزوم این گیاه در طب سنتی برای درمان ناراحتی‌های مختلف از جمله اختلال‌های عصبی مانند صرع، بی‌خوابی، سرگیجه، تپش قلب و همچنین به عنوان آرام بخش استفاده می‌شود (۵). Granicher و همکاران (۶) برای اولین بار موفق به تولید ریشه موئین در *Valeriana sambucifolia* شدند. همچنین آن‌ها در تحقیق دیگری موفق شدند مشتقاتی از روغن

اساسی (Essential oil) در ریشه موئین مشاهده کنند که در ریشه‌های طبیعی وجود نداشت (۷). یک همبستگی قوی بین سن ریز نمونه و فراوانی تشکیل ریشه‌های موئین در گیاه گندم مشاهده شده است (۸). علاوه بر موارد مذکور، در یک مطالعه سن ریز نمونه به عنوان یک عامل مهم در رشد هر چه بیشتر ریشه‌های موئین شناخته شده است (۹). القا و بهینه‌سازی شرایط محیط کشت ریشه‌های موئین در گیاه سنبل الطیب از نظر بررسی قابلیت‌های بیوسنتزی ریشه‌های موئین آن حائز اهمیت است. همچنین با ارزیابی میزان پاسخ دهی سنبل الطیب به آلودگی با آگروباکتريوم رایزوزنز می‌توان از آن به عنوان یک مدل بالقوه برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک در جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه با استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی نیز سود جست.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها: بذرهای گیاه سنبل الطیب در پاییز ۱۳۹۰ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور تسریع جوانه زنی و شکست خواب، بذرها توسط غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید (۴۰۰ ppm، ۸۰۰ و ۱۶۰۰) و اسید سولفوریک (۱۰ و ۱۵ درصد) تیمار شدند، سپس برای استریل نمودن بذرها به ترتیب زیر انجام شد: ۱- ۶۰ ثانیه شستشو با اتانول ۷۰ درصد ۲- شستشو با آب مقطر استریل ۳- شستشو با هیپوکلریت ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴- شستشو با آب مقطر استریل شده. در پایان بذرها به منظور جوانه زنی در محیط کشت پایه MS (۱۰) و با مراقبت کامل در شیشه‌ها کشت شده و به اتاق رشد یا فیتوترون منتقل شدند، دمای اتاق رشد ۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت آن ۲۲ درصد و میزان نور آن ۲۰۰۰ لوکس بود. ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای از گیاهچه‌های استریل ۵ هفته‌ای به منظور تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

القای ریشه‌های موئین: به منظور القای ریشه‌های موئین در سنبل الطیب از دو سویه A13 و ۹۵۳۴ باکتری آگروباکتريوم رایزوزنز به دو روش دیسک برگی و اسپری استفاده شد. به منظور آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح، ابتدا یک محیط کشت باکتری (LB) تهیه و باکتری‌ها ابتدا به مدت ۴۸ ساعت و سپس یک کشت مجدد به مدت ۷ ساعت تهیه شد. در همه محیط‌های کشت باکتری، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک ریفامپیسین اضافه شد. سپس دو نوع سوسپانسیون باکتری (باکتری ۴۸

شرایط دمای PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۸۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر توسط آنزیم Taq polymerase ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بررسی تولیدات تکثیر شده، از الکتروفورز افقی (Bio- Rad) با ژل آگاروز ۱ درصد حاوی Ethidium bromide (غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت یک ساعت و ۲۰ ثانیه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده گردید. سپس از ژل حاصله توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (Gel ۲۰۰۰ doc) عکس‌برداری صورت گرفت.

بررسی اثر تیمارهای مختلف بر میزان رشد ریشه‌های

موئین: ۸ روز پس از ظهور اولین ریشه‌ها از ریزنمونه‌های گیاه سنبل‌الطیب درصد ریزنمونه‌های هر سه نوع بافت که موفق به تولید ریشه موئین شدند نسبت به کل ریزنمونه‌های مورد آزمایش به‌طور جداگانه محاسبه گردید. از آنجا که هر ریشه موئین محصول یک سلول تراریخته در یک ریزنمونه (لایین) می‌باشد، بنابراین هر ریشه موئین را می‌توان یک کلون در نظر گرفت. براین اساس در تحقیق حاضر حدود ۹ کلون از هر ریزنمونه برگ، هیپوکوتیل و ریشه انتخاب و پس از قطع از محل رویش به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۵ میلی‌لیتر MS مایع منتقل شدند. ریشه‌های موئین حاصل از رشد کلون‌ها پس از ۴ هفته و ۴ مرحله واكشت وزن کشتی شدند. به‌منظور بررسی اثرات هر کدام از محیط‌های کشت بر میزان افزایش زیست توده ریشه‌های موئین ۴ کلون انتخاب و نوک ریشه‌های فعال در حال رشد هر کلون قطع و با وزن تقریبی ۲۰۰ میلی‌گرم به ۴ محیط کشت شامل: HRGM-A محیط کشت پایه MS مایع با ۳ درصد ساکارز، HRGM-B محیط کشت پایه MS مایع با ۳ درصد ساکارز و غنی شده با ۰/۲ گرم بر لیتر هورمون اکسین (NAA)، HRGM-C محیط کشت پایه MS مایع با ۱/۵ درصد ساکارز، HRGM-D محیط کشت پایه MS مایع با ۳ درصد ساکارز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند، دمای محیط‌های کشت HRGM-A، HRGM-B و HRGM-C ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. به این ترتیب ۱۲ محیط کشت با سه تکرار برای هر کدام از شرایط اعمال شده ایجاد شد. محیط‌های کشت در تاریکی و دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد براساس

ساعته و باکتری (۷ ساعته) با هم مخلوط گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۶۰۰ rpm جهت رسوب سلول‌های باکتری سانتریفوژ گردید. پس از کشت، باکتری‌ها در محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر استوسرینگان (Acetosrington) به‌طور کامل حل و در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد. این محلول به مدت ۲ ساعت در یک شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در ۱۰۰ rpm قرار گرفت. در روش دیسک برگی ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای در اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر تهیه و در محلول‌های سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور و به شیکر انکوباتور منتقل و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در ۸۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. همچنین در روش اسپری، محلول سوسپانسیون باکتری به‌وسیله سرنگ استریل شده بر روی ریزنمونه‌ها پاشیده شد. در مرحله بعد برای هم کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت پایه MS منتقل شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت در روش دیسک برگی و ۷۲ ساعت در روش اسپری ریزنمونه‌ها به‌منظور حذف باکتری به محیط کشت MS مایع حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک سفاتاکسیم (Cefotaxime) انتقال یافتند و به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۸۰ rpm شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه‌های شستشو شده، تحت شرایط استریل در یک محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک سفاتاکسیم کشت شدند. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف شدن کامل باکتری تکرار شد.

آنالیز مولکولی ریشه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز (PCR): استخراج DNA ژنومی ریشه‌های موئین و طبیعی به‌روش CTAB انجام شد (۱۱). برای تایید تراریختی ریشه‌های موئین و عدم آلودگی آن‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *roIB* و *virD* انجام شد. به این منظور از تسوالی‌های آغازگر اختصاصی ژن *virB* و *virD* به‌ترتیب زیر استفاده شد.

5'-GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3'

5'-CAGTTTTCGCATCTTGACAG-3'

5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3'

5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCT-3'

همچنین از پلاسمید القاکنده ریشه‌های موئین (Ri) باکتری آگروباکتریوم سویه A13 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

در سطح آماری ۵ درصد بین این دو روش وجود داشت. همچنین بیشترین میانگین درصد تلقیح حاصل از دو روش مربوط به ریزنمونه های برگ (۸۶/۵ درصد) و کمترین درصد تلقیح مربوط به ریزنمونه های ریشه (۶۶/۱ درصد) بود (شکل B - ۳). در تحقیق حاضر علاوه بر سویه A13 سویه ۹۵۳۴ نیز به کار برده شد که در این سویه درصد ریشه‌زایی صفر بود و تنها در بعضی ریزنمونه‌ها تشکیل کالوس در محل زخم رویت شد. همچنین نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه‌ها نشان داد که مناسب ترین سن ریزنمونه‌های گیاهی در پذیرش ژن بیگانه مربوط به گیاهچه‌های ۵ هفته‌ای (۷۸/۱ درصد) بود. با کاهش و افزایش سن گیاهچه‌ها در مقایسه با این دوره سنی کاهش درصد تلقیح قابل ملاحظه بود. به طوری که در ۳ هفته صفر درصد و در ۶ هفته به ۵۷ درصد رسید.

تایید قابلیت ریشه‌زایی سویه A13

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و *virD* به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۸۰ bp و ۳۳۸ bp گردید که وجود باندهای درخشان از ژن *rolB* در ژنوم ریشه‌های موئین حاکی از تراخته شدن ریزنمونه های گیاهی می باشد (شکل A- ۱). همچنین عدم حضور ژن *virD* در ریشه‌های موئین، که در خارج از T-DNA قرار دارد دلیلی بر عدم وجود هر گونه آلودگی باکتریایی ریشه‌های موئین است (شکل B- ۱).

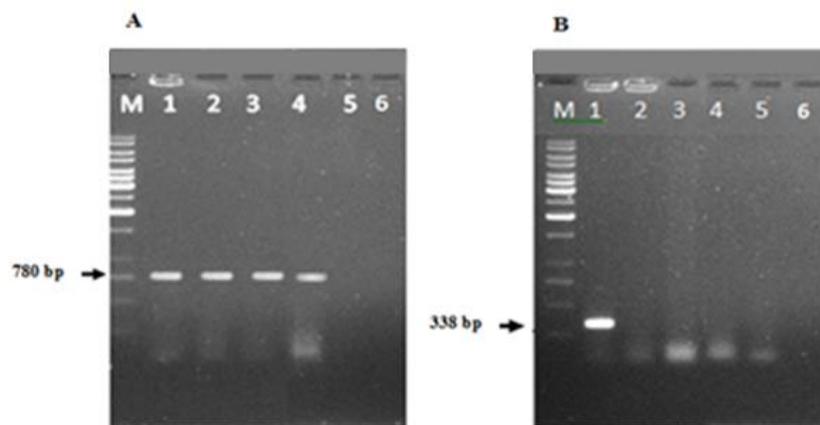
آزمایش‌های طراحی شده بر روی شیکر انکوباتور با سرعت rpm ۱۰۰ به مدت ۲ ماه نگهداری شدند، نمونه‌ها در هر ۱۰ روز واکنش می‌شدند. پس از گذشت ۲ ماه به منظور اندازه‌گیری وزن خشک ریشه‌های موئین، نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند تا وزن آن‌ها ثابت شود.

آنالیز آماری: کلیه آزمایش‌ها بر اساس یک طرح کامل تصادفی با حداقل ۳ تکرار انجام گردید. میانگین داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس (ANOVA) قرار گرفت، و میانگین‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده به روش دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه گردید.

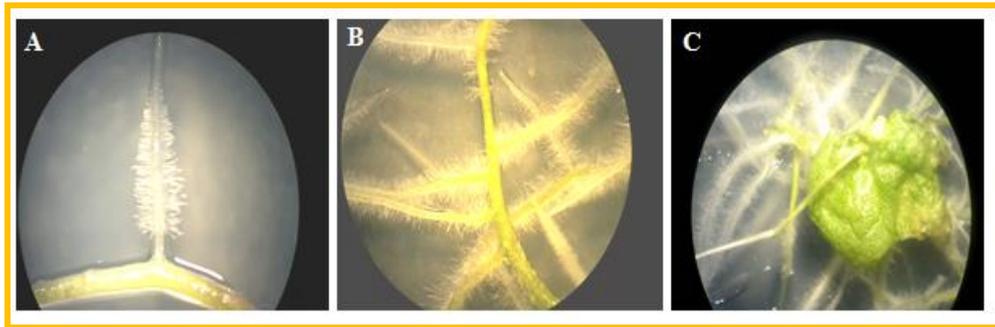
نتایج

درصد تراریختی ریزنمونه‌ها در دو روش دیسک برگ و اسپری

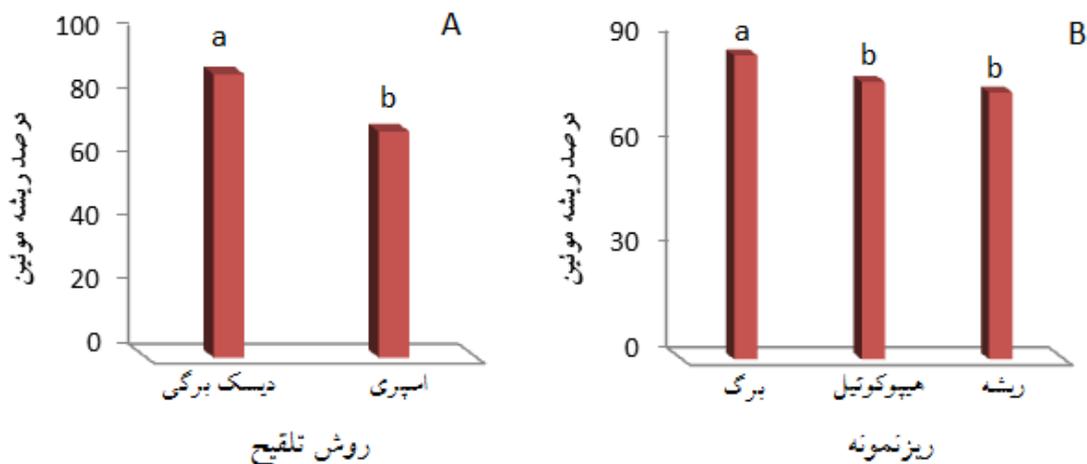
اولین ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با سویه A13 پس از گذشت ۸ روز در ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ مشاهده گردید. مورفولوژی رشدی ریشه‌های موئین در هر سه نوع ریزنمونه با خصوصیات ریشه‌های موئین یعنی پلاژیوتروپیک و تولید انشعابات متعدد قابل مقایسه بود (شکل ۲). میانگین درصد تلقیح ریزنمونه‌ها در دو روش دیسک برگ و اسپری در شکل (A- ۳) نشان داده شده است، بر اساس نتایج به دست آمده، در روش دیسک برگ بالاترین کارایی در انتقال T-DNA در ریزنمونه‌ها مشاهده شد (۸۴/۳ درصد) که اختلاف معنی‌داری



شکل ۱: A) آنالیز PCR برای ریشه‌های موئین *V. officinalis* سویه A13 با استفاده از پرایمرهای ژن‌های *rolB* (M: DNA Ladder 1Kb): ۱: پلاسמיד *Ri* از *A. rhizogenes* به عنوان کنترل مثبت، ۲ و ۳: ریشه‌های موئین تراریخته شده از ریزنمونه‌ها، ۵: ریشه گیاه بدون انتقال ژنتیکی به عنوان کنترل منفی اول، ۶: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی دوم. شکل B- ۱: آنالیز PCR برای ریشه‌های موئین *V. officinalis* سویه A13 با استفاده از پرایمرهای ژن‌های *virD* (M: DNA Ladder 1Kb): ۱: پلاسמיד *Ri* از *A. rhizogenes* به عنوان کنترل مثبت، ۲ و ۳: ریشه‌های موئین تراریخته القا شده از ریزنمونه‌ها، ۵: ریشه گیاه بدون انتقال ژنتیکی به عنوان کنترل منفی، ۶: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی دوم.



شکل ۲: ظهور ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح: A, B, C به ترتیب مربوط به هیپوکوتیل، ریشه و برگ می‌باشد.

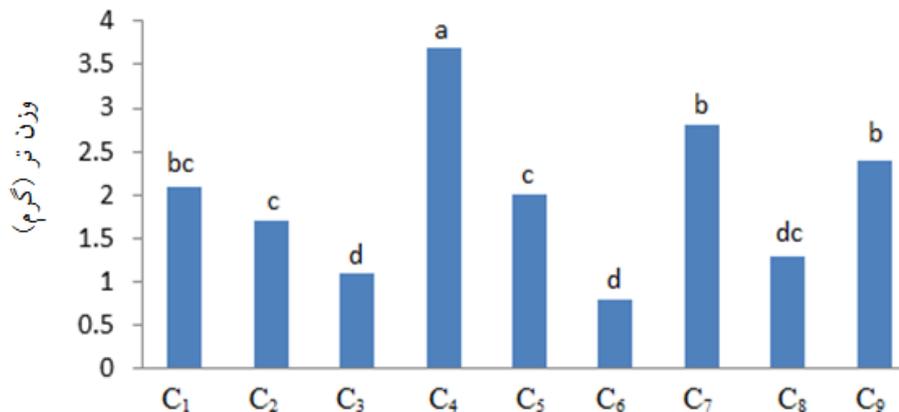


شکل ۳: میانگین درصد القای ریشه‌های موئین حاصل از B ریز نمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و ریشه، A: روش تلقیح. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن ($p < 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

ارزیابی فنوتیپ رشد کلون‌های ریشه موئین

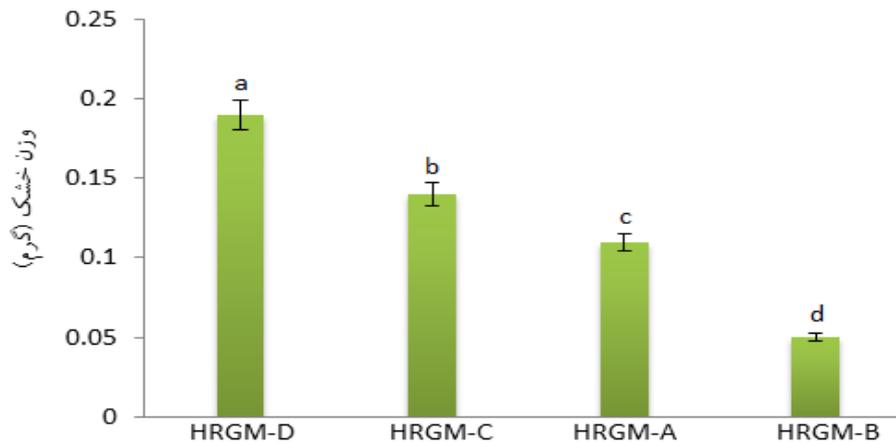
وجود دارد (شکل ۴). بر مبنای وزن تر کلون‌ها، فنوتیپ رشدی ریشه‌های موئین به صورت سه گروه کلون‌های تند، متوسط و کند رشد در نظر گرفته شد. بر این اساس کلون‌های C₇، C₄ و C₉ به عنوان کلون تند رشد، همچنین کلون‌های C₁، C₂ و C₅ به عنوان رشد متوسطه و بقیه‌ی کلون‌ها به عنوان کلون‌های با رشد کند انتخاب شدند.

به منظور مقایسه فنوتیپ رشد ریشه‌های موئین مربوط به هر کلون، حدود ۹ کلون از ریز نمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و ریشه به مدت یک ماه در محیط کشت MS مایع کشت شدند. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میانگین وزن تر کلون‌های ریشه موئین نشان داد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان رشد آن‌ها



شکل ۴: میزان رشد ۹ کلون (C₁ - C₉) از ریشه موئین سنبل الطیب بر اساس وزن تر. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن ($p < 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

می‌دهد (شکل ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان وزن خشک ریشه‌های موئین در محیط کشت MS مایع با ۳ درصد ساکارز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (HRGM-D) و کمترین میزان در محیط کشت MS مایع غنی شده با ۰/۲ گرم لیتر اکسین (HRGM-B) به ترتیب برابر با ۰/۱۹ و ۰/۰۵ گرم بود.



شکل ۵: اثر محیط‌های کشت مختلف بر رشد ریشه‌های موئین بر اساس وزن خشک. حروف غیر مشابه بیانگر معنی دار بودن ($p < 0/05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

مطالعه انجام شده است. برای مثال ریزنمونه‌های اپی کوتیل بادام زمینی با سویه A13 آلوده شده و منجر به تولید ریشه‌های موئین شده است (۱۸). همچنین القا ریشه‌های موئین از قطعات برگ گیاه *Crotalaria juncea* با استفاده از باکتری آگروباکتریوم سویه A13 توسط Ohaara نیز گزارش شده است (۱۹). Lee و همکاران (۲۰) در بررسی قدرت مهاجمی و قابلیت آلودگی پنج سویه مختلف آگروباکتریوم به این نتیجه رسیدند که سویه A13 بر روی گیاه *Aglaiia elliptica* کارایی موثرتری داشت. هورمون‌های گیاهی خارجی، سطح قند، منابع نیتروژن و مقدار نسبی آن‌ها، نور، دما و حضور مواد شیمیایی می‌توانند میزان رشد و زیست توده کلی و همچنین مقدار متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار دهند. بهینه سازی این اجزا می‌تواند رشد ریشه‌های موئین را افزایش دهد. نتایج به‌دست آمده از بررسی اثرات ۴ محیط کشت بر میزان افزایش زیست توده ریشه‌های موئین نشان دهنده اثر متفاوت این محیط کشت‌ها به سود محیط کشت پایه MS نگهداری شده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود. در مقابل محیط کشت حاوی ۰/۲ گرم بر لیتر NAA دارای حداقل رشد بود. چندین گزارش وجود دارد که نشان می‌دهد مکمل‌های قند و اکسین در محیط کشت موجب تحریک رشد ریشه‌های موئین می‌شود (۲۱). در این تحقیق

مقایسه اثرات محیط‌های کشت بر وزن خشک ریشه‌های موئین

در این مطالعه به منظور افزایش میزان رشد، ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب در چهار محیط کشت متفاوت به مدت ۲ ماه کشت شدند. نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های موئین تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان

بحث

به منظور تکثیر قطعه‌ی مورد نظر (T-DNA - Transferred) DNA باکتریایی از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده می‌گردد (۱۲). انتقال ژنتیکی موفق به دو روش می‌تواند ثابت گردد: ۱- روش مستقیم ۲- روش غیرمستقیم که این دو روش به ترتیب به وسیله شناسایی و تعیین توالی‌های T-DNA و اوپین‌ها می‌باشد. به دلیل اینکه تولید اوپین‌ها پایدار نبوده و حتی ممکن است از بین بروند، روش مستقیم یعنی تعیین توالی T-DNA ترجیح داده می‌شود (۱۳). انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است که درصد موفقیت آن به عواملی از قبیل سویه باکتری (۱۴)، نوع ریزنمونه گیاهی (۱۵) و دوره هم کشتی (۱۷) بستگی دارد. در بین موارد ذکر شده نوع سویه باکتری نقش کلیدی در این فرآیند دارد. دلیل این پدیده را می‌توان در قالب اثرات متقابل گیاه - پاتوژن بررسی کرد. در تحقیق حاضر از دو سویه A13 و ۹۵۳۴ برای القای ریشه موئین استفاده گردید که این دو سویه از عمل کرد یکسانی برخوردار نبودند، طوری که ریزنمونه‌های گیاه سنبل الطیب پاسخ مثبت به سویه ۹۵۳۴ نشان ندادند. از طرفی سویه A13 در سطح قابل ملاحظه‌ای عمل کرد. تولید موفقیت آمیز ریشه‌های موئین با استفاده از باکتری آگروباکتریوم سویه A13 در چندین

کرد که برای کوتاه کردن زمان افزایش زیست توده کلی ریشه‌های موئین بهینه‌سازی شرایط محیط کشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. طوری که میزان رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت پایه MS نگهداری شده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با سایر کشت‌ها بیشتر بود. همچنین مشخص شد که نوع سویه باکتری نقش کلیدی در فرآیند انتقال ژن به سلول گیاهی دارد. در پلاسמידهای سویه‌های باکتری *A. rhizogenes* توالی‌هایی به نام توالی‌های تحریک کننده انتقال T-DNA وجود دارد که دفعات تکرار این توالی در سویه‌ها متفاوت می‌باشد. در سویه‌های میکیموپین که سویه A13 نیز از همین گروه می‌باشد، توالی مذکور ۱۲ بار تکرار شده است در حالی که در سویه‌های مانوپین و اگروپین این توالی ۶ و ۵ بار به ترتیب تکرار شده است (۲۷). به نظر می‌رسد که این مطلب تا حدودی علت قدرت تهاجمی بالای سویه A13 را توجیه نماید.

تشکر و قدردانی

از کلیه افراد محترم به خصوص آقای دکتر سبزی و مشکی کارشناسان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر مساعدت‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان قدردانی می‌کنم. همچنین از تحصیلات تکمیلی دانشگاه ارومیه به واسطه تصویب و حمایت از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Yaniv Z. Handbook of Medicinal Plant. 7th Ed. New York, London & Oxford: Food Product, Haworth Medical & Imprints of the Haworth Press. 2005; pp 365.
2. Ming KJ, Khang GN, Sail GL, Fatt CT. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta. Pha. Sin. 2003; 24: 7-21.
3. Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: Recent trends and application. Bio. Adv. 2000; 18: 1-22.
4. Tepfer D. Transformation of several species of highplants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenot Cell. 1984; 37: 959 - 967.
5. Krystal AD, Ressler I. The use of valeriana in neuropsychiatry. CNS. Spectr. 2001; 6(10): 841-847
6. Granicher F, Christen P, Kapetanidis I. Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. sambucifolia. Phytochemistry. 1995; 40: 1421-1424.

نتایج به دست آمده با گزارش‌های ارائه شده در زمینه تاثیر اندک اکسین بر رشد ریشه‌های موئین مشابه است (۲۲). هر چند جدیداً ثابت شده است که آزمون منظم اثرات هورمون‌های مختلف بر روی ریشه‌ها و متابولیت‌های ثانویه می‌تواند در بعضی موارد منجر به افزایش رشد ریشه‌های موئین و متابولیت‌ها گردد (۲۳). این نتایج متضاد را می‌توان در میزان آندوژنی هورمون‌ها بررسی کرد. از آنجا که میزان آندوژنی هورمون‌ها در گیاهان متفاوت می‌باشد، بنابراین استفاده از هورمون‌های گیاهی خارجی منجر به پاسخ‌های متفاوت در گیاهان می‌شود. در مطالعه حاضر به منظور بررسی و تعیین مناسب‌ترین نوع و سن ریزنمونه‌های گیاهی در تولید ریشه موئین، مشخص گردید که با افزایش سن ریزنمونه‌های گیاهی تا ۵ هفتگی توانایی ریزنمونه‌ها برای پذیرش ژن بیگانه افزایش یافت (داده‌های مربوط به سن ریزنمونه‌ها نشان داده نشده است). همچنین در گیاه سنبل الطیب، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فراوانی ریشه‌های موئین ایجاد شده در ۳ نوع ریزنمونه وجود داشت. Mehrota و همکاران (۲۴) نیز گزارش دادند میزان آلودگی و فراوانی تشکیل ریشه‌های موئین تحت تاثیر دو عامل سن و نوع ریزنمونه می‌باشد، بر اساس نتایج مطالعه مذکور، ریزنمونه‌های برگ‌ی بیشترین موفقیت را به خود اختصاص دادند. این مشاهدات حاکی از آن است که سن و نوع ریزنمونه معیار اساسی در این زمینه می‌باشد، به دلیل این که سن و نوع ریزنمونه فاکتور مهمی است که خصوصیات فیزیولوژیکی سلول را تغییر می‌دهد. بر اساس وزن تر ریشه‌های موئین حاصل از کلون‌ها، تفاوت فنوتیپ رشد در بین کلون‌ها مشاهده گردید. در بررسی‌های انجام شده تفاوت رشدی قابل ملاحظه‌ای در بین کلون‌های حاصل از تلقیح یک نژاد مشاهده شد (۲۵). دلیل این تنوع می‌تواند به مواردی همچون ورود مقادیر مختلفی از DNA - T باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و همچنین بیان متفاوت ژن‌های DNA - T با توجه به محل قرار گیری این ژن‌ها ارتباط داشته باشد. سارا و همکاران (۲۶) در بررسی میزان رشد ۱۰ کلون ریشه موئین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) حاصل از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوترنز دریافتند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد کلون‌های حاصل از هر سویه وجود دارد و بر این اساس آن‌ها را در ۳ گروه قرار دادند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان استنباط

7. Granicher F, Christen P, Kapetanidis I. High-yield production of valepotriates by hairy root cultures of *valeriana officinalis* L.var.sambucifolia Mikan. Plant Cell Rep. 1992; 11(7): 339-342.
8. Pastrol GM, Wilkinson MD, Steele SH, Sparks CA, et al. Age dependent transformation frequency in elite wheat varieties. J. Exper. Bot. 2001; 52(7): 857-863.
9. Vergauwe A, Van G, Inze D, Van Montagu M, et al. Factors influencing *A. tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua* L. Plant Cell Rep. 1998; 18 (2): 105-110.
10. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. J. Plant Phy. 1962; 15(3): 473-497.
11. Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. Afr. J. I. Bio. 2007; 6:175-178.
12. Palazon J, Moyano E, Cusido RM, Bonfill M, et al. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the h6h gene. Plant Sci. 2003; 165:1289-1295.
13. Sevón N, Oksman-Caldentey KM. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med. 2002; 68: 859-868.
14. Chabaud M, Carvalho-Niebel F, Barker DG. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hyper virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Rep. 2003; 22(1): 46-51.
15. Geier T, Sangwan RS. Histology and chimera segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria internode* explants. Plant Cell Rep. 1996; 15: 386-390.
16. Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Rep. 2004; 23: 386-390.
17. Barik DP, Mohapatra U, Chand PK. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Plant Cell Rep. 2005; 24: 523-531.
18. Akasaka Y, Mii M, Daimon H. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Annals of Bot. 1998; 81:355-362.
19. Ohara A, Akasaka Y, Paimon H, Mii M. Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria Juncea* L. Plant Cell Rep. 2000; 56: 563-568.
20. Lee SK, Cui B, Mehta RR, Kinghorn AD, et al. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1.Hcyclopenta [2] benzofuran lignans isolated from *Aglaiia elliptica*. Chem. Biol. Interact. 1998; 115: 215-228.
21. Nilsson O, Olsson O. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. Physiol. Plant. 1997; 100: 463-473.
22. Doran PM. Foreign Protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. Trends. Biotechn. 2006; 24: 426-432.
23. White PR. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 1943; 9: 585-600.
24. Mehrota T, Kukreja AK, Khanuja S, Mishra BN. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyhiza glabra* in bioreactor. Ele. J. Biotech. 2008; 11:2: 1-7.
25. Sevón N, Oksman KM. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med. 2002; 68: 859-868.
26. Sara K, Jafar Z, Gorbanalli N, Ehsan S. Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Biotech. J. of Agri. 2012; 4(2):61-75.
27. Veena V, Taylor C. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 2007; 43: 383-403.

Induction and Optimization of Hairy Root Growth Condition for *Valeriana officinalis* L. Through Inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*

Dini Torkamani MR , Ph.D. Student ¹, Abaspour N, Ph.D.², Jafari M, Ph.D.³, samadi A, Ph.D.⁴

1. Ph.D. Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, West Azarbyjan

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, West Azarbyjan

3. Department of Agriculture, Faculty of Sciences, Urmia University, West Azarbaijan

4. Ph.D. in Plant Physiology, Farhangian University, Fatemeh Al-Zahra Pardis, Tabriz, Iran

* Email corresponding author: dr.torkamani@gmail.com

Received: 27 Jan. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

Abstract

Aim: In this study, with the aim of optimizing hairy root growth conditions, leaf, hypocotyl and root explants were inoculated by strain 'A13' of *Agrobacterium rhizogenes*. Then effect of four basal MS liquid media was considered with different combinations and temperature on rate of hairy roots growth.

Material and methods: In order to hairy root induction via spary and leaf disc methods, two strains of *Agrobacterium rhizogenes* (A13 and 9534) were used. For confirmation of transformation but not infection of hairy roots, PCR reaction was performed through specific amplification of *rolB* and *virD* genes. Obtained hairy roots in a basal liquid MS medium were cultured under different treatments in based on completely randomized design (CRD) with three replicates and dry weight of hairy roots was measured after two months.

Results: Hairy roots were observed in root, hypocotyl and leaf explants after 8 days. The highest percentage of transformation was found in leaf explants. The obtained results showed that the highest (0.19 gr) and the lowest (0.05 gr) rate of hairy root dry weight related to basal liquid MS medium containing 30 g/l sucrose in 35°C and basal MS liquid medium containing 0.2 gr / 1 NAA hormone, respectively.

Conclusion: The results indicate the main role of culture medium compounds and temperature in enhancing of hairy root biomass.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Culture medium, Explant, *Valeriana officinalis*