جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ۳۰-۲۳

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

محمدرضا دینی ترکمانی .Ph.D Student [۱*]، ناصر عباسپور .Ph.D [۲]، مراد جعفری .Ph.D [۳]، افسانه صمدی .Ph.D [۴]

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 دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: در این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین، ریزنمونه‌های حاصل از برگ، ریشه و هیپوکوتیل با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز 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 *vir*D 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.

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

واژگان کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه، سنبل الطیب، ، محیط کشت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

هزاران سال است که گیاهان از مهم‌ترین منابع درمانی محسوب می‌شوند. تقریبا یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به‌دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (۱). ازآنجا که ساخت شیمیایی ترکیبات گیاهی به‌راحتی میسر نمی‌باشد، محققان سعی برآن دارند که چنین ترکیباتی را از طریق تکنیک‌های فن‌آوری زیستی به‌دست آورند. کشت سلول‌های گیاهی دربعضی موارد موفقیت آمیز بوده است اما بزرگترین چالش دراین زمینه ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است (۲). بنابراین برای غلبه بر این محدودیت‌ها استفاده از اگروباگتریوم رایزوژنز و کشت ریشه‌های موئین به‌علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگه‌داری و توانایی سنتز گستره‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به‌عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت های 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 تاریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogens*) تشکیل می شوند 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 اگروباکتریوم 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 به‌عنوان گیاه دارویی ارزشمند همواره مورد توجه و استفاده انسان بوده است. ریشه و ریزوم این گیاه درطب سنتی برای درمان ناراحتی‌های مختلف ازجمله اختلال‌های عصبی مانند صرع، بی‌خوابی، سرگیجه، تپش قلب و همچنین به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 سنبل‌الطیب به آلودگی با آگروباکتریوم رایزوژنز می‌توان از آن به‌عنوان 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 سنبل‌الطیب در پاییز ۱۳۹۰ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به‌منظور تسریع جوانه زنی و شکست خواب، بذرها توسط غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید (۴۰۰ppm ، ۸۰۰ و ۱۶۰۰) و اسید سولفوریک (۱۰ و ۱۵ درصد) تیمار شدند، سپس برای استریل نمودن بذرها به‌ترتیب 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 به‌منظور جوانه‌زنی 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 ازگیاهچه‌های استریل ۵ هفته‌ای به‌منظور تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

القای ریشه‌های موئین: به‌منظور القای ریشه‌های موئین در سنبل‌الطیب از دو سویه A13 و ۹۵۳۴ باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به‌دو روش دیسک برگی و اسپری استفاده شد. به‌منظور آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح، ابتدا یک محیط کشت باکتری (LB) تهیه و باکتری‌ها ابتدا به‌مدت 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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ساعته و باکتری ۷ ساعته) با هم مخلوط گردیده و به‌مدت 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 (Acetosringon) 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 ۱۰۰rpm 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، ریز نمونه‌ها 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 به‌مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با۸۰rpm شستشو داده شدند. سپس ریز نمونه‌های 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 زنجیره ای پلیمراز(PCR) : استخراج DNA ژنومی ریشه‌های موئین و طبیعی به‌روش CTAB انجام شد (۱۱). برای تایید تراریختی ریشه‌های موئین و عدم آلودگی آن‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol*B و *vir*D انجام شد. به این منظور از توالی‌های آغازگر اختصاصی ژن *vir*B و *vir*D به‌ترتیب زیر استفاده شد.

5'-GTTCTCGCGAGAAGATGCA -3′

5'-CAGTTTCGCATCTTGACAG-3'

5'- ATGCCCGATCGAGCTCAAGT -3'

5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCT-3'

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

شرایط دمای PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به‌مدت 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) به‌مدت یک ساعت و ۲۰ ثانیه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده گردید. سپس از ژل حاصله توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (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 (لاین) 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 ارلن های ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۵ میلی‌لیتر MS مایع منتقل شدند. ریشه‌های موئین حاصل از رشد کلون‌ها پس از ۴ هفته و ۴ مرحله واکشت وزن کشی 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

Archive of SID

آزمایش‌های طراحی شده بر روی شیکر انکوباتور با سرعت rpm ۱۰۰ به‌مدت ۲ ماه نگه‌داری شدند، نمونه‌ها در هر ۱۰ روز واکشت 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 به‌دست 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.

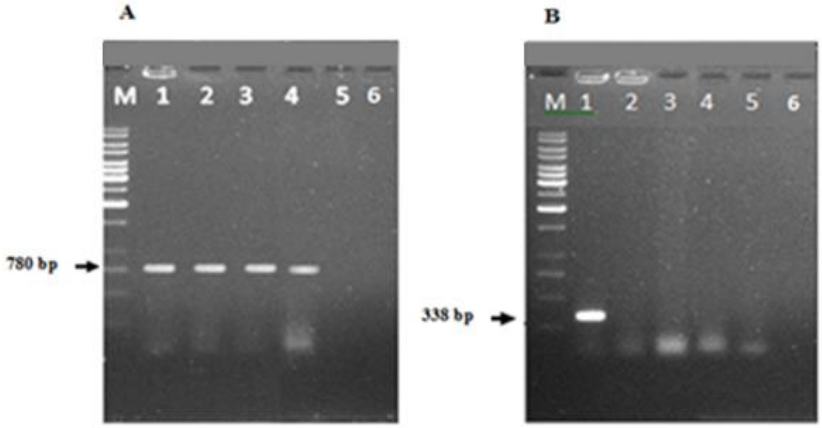
نتایج

درصد تراریختی ریزنمونه‌ها در دو روش دیسک برگی 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 برگی و اسپری در شکل (A -۳) نشان داده شده است، بر اساس نتایج به‌دست آمده، در روش دیسک برگی بالاترین کارایی در انتقال T-DNA در ریزنمونه‌ها مشاهده شد (۸۴/۳ درصد) که اختلاف معنی‌داری 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 ریزنمونه‌های ریشه (۶۶/۱ درصد) بود (شکل B – ۳). در تحقیق حاضر علاوه بر سویه A13 سویه ۹۵۳۴ نیز به‌کار 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. به‌طوری‌که در ۳ هفته صفر درصد و در ۶ هفته به ۵۷ درصد رسید.

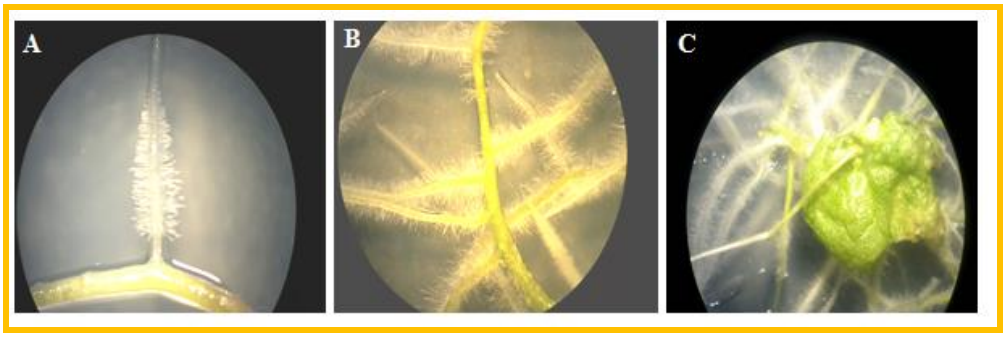
تایید قابلیت ریشه‌زایی سویه A13

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و *vir*D به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۷۸۰bp و ۳۳۸ bp گردید که وجود باندهای درخشان از ژن*rolB* در ژنوم ریشه‌های موئین حاکی از تراریخته شدن ریزنمونه های گیاهی می باشد (شکلA -۱). همچنین عدم حضور ژن *vir*D در ریشه‌های موئین، که در خارج از T–DNA قرار دارد دلیلی بر عدم وجود هر گونه آلودگی باکتریایی ریشه‌های موئین است (شکل B -1).

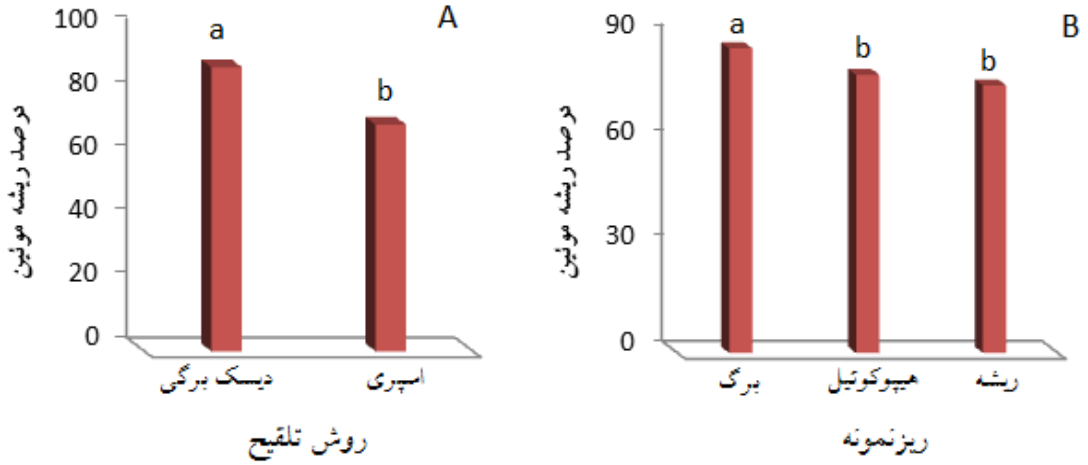


شکل ۱: A) آنالیز PCR برای ریشه‌های موئین V. officinalis سویه A13 با استفاده از پرایمرهای ژن‌های rolB . M : DNA Ladder 1Kb، ۱: پلاسمید Ri از A. rhizogenes به‌عنوان کنترل مثبت، ۲ و۳ و ۴: ریشه‌های موئین تراریخته شده از ریزنمونه‌ها، ۵: ریشه گیاه بدون انتقال ژنتیکی به‌عنوان کنترل منفی اول، ۶: واکنش PCR بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی دوم. شکل ۱- B: آنالیز PCR برای ریشه‌های موئین V. officinalis سویه A13 با استفاده از پرایمرهای ژن‌هایvirD. M: DNA Ladder 1Kb، 1: پلاسمید Ri از A. rhizogenes به‌عنوان کنترل مثبت، ۲و۳ و۴ : ریشه‌های موئین تراریخته القا شده ریزنمونه‌ها، ۵: ریشه گیاه بدون انتقال ژنتیکی به‌عنوان کنترل منفی، ۶: واکنش PCR بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی دوم.

Archive of SID



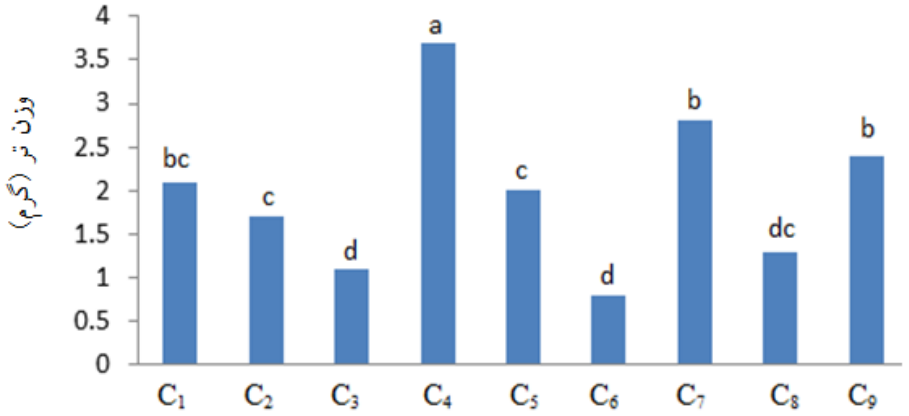
شکل ۲: ظهور ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح: A, B, C به‌ترتیب مربوط به هیپوکوتیل ، ریشه و برگ می‌باشد.



شکل ۳: میانگین درصد القای ریشه‌های موئین حاصل از B: ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و ریشه، A: روش تلقیح. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن ($p<۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

ارزیابی فنوتیپ رشد کلون‌های ریشه موئین

به‌منظور مقایسه فنوتیپ رشد ریشه‌های موئین مربوط به هر کلون، حدود ۹ کلون از ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و ریشه به‌مدت یک ماه در محیط کشت MS مایع کشت شدند. نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میانگین وزن تر کلون‌های ریشه موئین نشان داد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان رشد آن‌ها وجود دارد (شکل ۴). بر مبنای وزن تر کلون‌ها، فنوتیپ رشدی ریشه‌های موئین به‌صورت سه گروه کلون‌های تند، متوسط و کند رشد در نظر گرفته شد. بر این اساس کلون‌های C_7, C_4 و C_9 به‌عنوان کلون تند رشد، همچنین کلون‌های C_2, C_1 و C_5 به‌عنوان رشد متوسطه و بقیه‌ی کلون‌ها به‌عنوان کلون‌های با رشد کند انتخاب شدند.

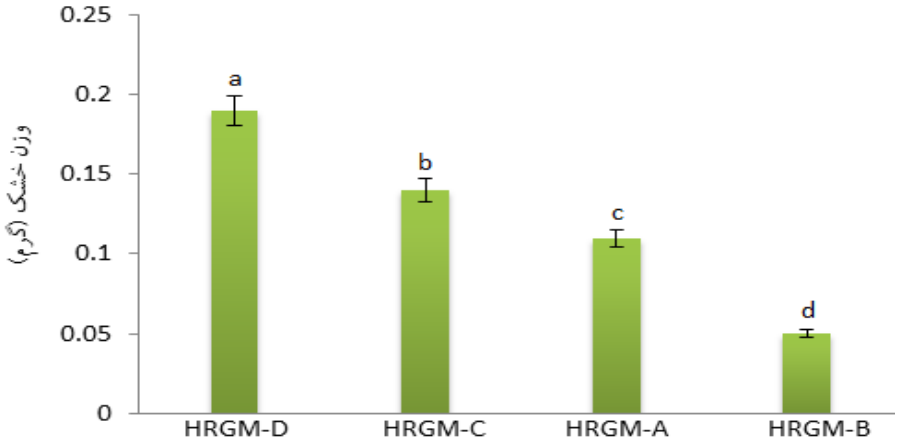


شکل ۴ : میزان رشد ۹ کلون (C1 – C9) از ریشه موئین سنبل الطیب بر اساس وزن تر. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن ($p<۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Archive of SID

مقایسه اثرات محیط‌های کشت بر وزن خشک ریشه‌های موئین

در این مطالعه به‌منظور افزایش میزان رشد، ریشه‌های موئین گیاه سنبل‌الطیب در چهار محیط کشت متفاوت به‌مدت ۲ ماه کشت شدند. نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های موئین تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان 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) به‌ترتیب 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 می باشد.

بحث

به‌منظور تکثیر قطعه‌ی مورد نظر T – DNA (Transferred-DNA) باکتریایی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌گردد (۱۲). انتقال ژنتیکی موفق به‌دو روش می‌تواند ثابت گردد: ۱- روش مستقیم ۲- روش غیرمستقیم که این دو روش به‌ترتیب به‌وسیله شناسایی و تعیین توالی‌های T-DNA و اوپین‌ها می‌باشد. به‌دلیل 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 اگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است که درصد موفقیت آن به عواملی از قبیل سویه باکتری (۱۴)، نوع ریزنمونه گیاهی (۱۵ و ۱۶) و دوره هم کشتی (۱۷) بستگی دارد. در بین موارد ذکر شده نوع سویه باکتری نقش کلیدی در این فرایند 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 عمل‌کرد یکسانی برخوردار نبودند، طوری‌که ریزنمونه‌های گیاه سنبل‌الطیب 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 مطالعه انجام شده است. برای مثال ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل بادام زمینی با سویه A13 آلوده شده و منجر به تولید ریشه‌های موئین شده است (۱۸). همچنین القا ریشه‌های موئین از قطعات برگی گونه *Crotalaria juncea* با استفاده از باکتری اگروباکتریوم سویه A13 توسط Ohaara نیز گزارش شده است (۱۹). Lee و همکاران (۲۰) در بررسی قدرت تهاجمی و قابلیت آلودگی پنج سویه مختلف آگروباکتریوم به این نتیجه رسیدند که سویه A13 برروی گیاه *Aglaia 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

Archive of SID

نتایج به‌دست آمده با گزارش‌های ارائه شده در زمینه تاثیر اندک اکسین بر رشد ریشه‌های موئین مشابه است (۲۲). هر چند جدیدا 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 می باشد، بنابراین استفاده از هورمون‌های گیاهی خارجی منجر به پاسخ‌های متفاوت در گیاهان می‌شود. در مطالعه حاضر به‌منظور 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 سنبل‌الطیب، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فراوانی ریشه‌های موئین ایجاد شده در۳ 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 به‌خود اختصاص دادند. این مشاهدات حاکی از آن است که سن و نوع ریزنمونه معیار اساسی در این زمینه می‌باشد، به‌دلیل این‌که 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 T – DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و همچنین بیان متفاوت ژن‌های T- DNA 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 رایزوژنز 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 به‌دست آمده از این تحقیق می‌توان استنباط کرد که برای کوتاه کردن زمان افزایش زیست توده کلی ریشه‌های موئین بهینه‌سازی شرایط محیط کشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. طوری‌که 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 پلاسمیدهای سویه‌های باکتری *A. rhizogenes* توالی‌هایی به‌نام توالی‌های تحریک کننده انتقال T-DNAوجود دارد که دفعات تکرار این توالی در سویه‌ها متفاوت می‌باشد. درسویه‌های میکیموپین که سویه A13 نیز از همین گروه می‌باشد، توالی مذکور ۱۲ بار تکرار شده است درحالی‌که در سویه‌های مانوپین و اگروپین این توالی۶ و ۵ بار به‌ترتیب تکرار شده است (۲۷). به‌نظر می‌رسد که این مطلب تا حدودی علت قدرت تهاجمی بالای سویه A13 را توجیه نماید.

تشکر و قدردانی

از کلیه افراد محترم به‌خصوص آقای دکتر سبزی و مشکی کارشناسان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به‌خاطر مساعدت‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان قدردانی می‌کنم. همچنین از تحصیلات تکمیلی دانشگاه ارومیه به‌واسطه 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 fram normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. sambucifolia. Phytochemistry. 1995; 40: 1421-1424.

Archive of SID

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. Arevised 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. l. 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. Sevon 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 chimeral segregationreveal 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 *Aglaia 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. Foreigen 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 *Glycyyhiza glabra* in bioreactor. Ele. J. Biotech. 2008; 11:2: 1-7.

25. Sevon 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.

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2014; 5(1): 23-30

Original Article

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. PhD. 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 *rol*B and *vir*D 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 / l NAA hormone,respectively,.

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

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