

بهبود سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*)

سارا کبیرنتاج¹، جعفر ذوالعلی²، قربانعلی نعمت زاده^{3*}، احسان شکری⁴

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
- 2- استادیار بخش بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.
- 3- استاد و محقق ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
- 4- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

تاریخ دریافت: 1390/7/27، تاریخ پذیرش: 1391/4/7

چکیده

ریشه‌های موین حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز از قابلیت سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه گیاهی برخوردار می‌باشند. در دو دهه‌ی اخیر توجه قابل ملاحظه‌ای به سنتز ترکیبات ثانویه ارزشمند در ریشه‌های موین معطوف شده است، زیرا ریشه‌های تغییر یافته ژنتیکی برخلاف سوسپانسیون سلولی، متابولیت‌های ثانویه را با ثبات ژنتیکی و بیوستتزی بیشتری تولید می‌کنند. کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاهی دارویی، دو ساله یا پایا و متعلق به تیره گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) است. این گیاه حاوی ترکیبات دارویی بسیار مهمی از جمله اینولین، اسکولین، ترکیبات فرار، کومارین، فلاونوئیدها و ویتامین‌ها است. در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه موین، کوتیلدون‌های گیاه کاسنی با سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز تلقیح و بر روی سه محیط کشت گیاهی مختلف کشت شدند. تعداد ریشه‌های تولید شده در تیمارهای مختلف محیط کشت ثبت گردید و تأیید ریشه‌های موین با استفاده از واکنش PCR برای تکثیر اختصاصی ژن‌های *rolB* و *rolC* انجام شد. بر اساس شدت ریشه‌زایی حاصل از سویه‌های آگروباکتریوم در محیط کشت‌های مختلف، بهترین سویه آگروباکتریوم به همراه محیط کشت بهینه جهت تثبیت کشت ریشه‌های موین کاسنی تعیین گردیدند. سویه‌های A4، A13 و 15834 موفق به القای ریشه موین در گیاه کاسنی شدند و محیط کشت MS به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت به منظور القای ریشه‌های موین و تثبیت کشت آنها معرفی گردید.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، ریشه موین، کاسنی، متابولیت‌های ثانویه.

(1993) و گیاه *Scoparia dulcis* (Yamazaki et al.)

(el., 1996) گزارش شده است.

استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز و کشت ریشه‌های مویین بعلت رشد سریع، زمان دوبرابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گستره‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را بعنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (Giri et al., 2000). علاوه بر این، ریشه‌های مویین یک سیستم مدل ارزشمند برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان هستند. ریشه‌های تراریخته از قابلیت باززایی گیاهان کامل برخوردارند. با وجود این که گیاهان باززایی شده دچار تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله برگ‌های چروکیده و کوچکتر، کاهش غالبیت انتهایی و کوتاه شدن میانگره‌ها می‌شوند، اما ثبات ژنتیکی آنها بسیار مطلوب است (Tepfer, 1984). برای استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز در انتقال ژن به گیاهان، موارد آزمایشی مختلفی باید بهینه سازی شوند. این موارد عبارتند از بهینه سازی شرایط محیط کشت، پیدا نمودن یک نژاد آگروباکتریوم که ژنوتیپ گیاهی مورد نظر را به نحو مطلوب آلوده نماید، طراحی و ساخت T-DNA تغییر یافته‌ای که امکان بیان ژن در سلول‌های گیاهی را فراهم نماید، انتقال T-DNA تغییر یافته به نژاد آگروباکتریوم انتخاب شده، انتقال T-DNA توسط آگروباکتریوم به گیاه با فراوانی زیاد و در نهایت

بهبود فعالیت و جهت دهی مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها در سلول‌های گیاهی، از اهداف اصلی دانش مهندسی متابولیک محسوب می‌شود. تکمیل، ترسیم و تفسیر جامع نقشه‌های متابولیکی، امکان دستورزی و مطالعه بهتر مسیرهای بیوسنتزی در گیاهان را برای محققان فراهم می‌کند. تکنولوژی DNA نو ترکیب و انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم عمده ترین تکنیک‌هایی هستند که در مهندسی متابولیک برای ایجاد گیاهان هدف واجد صفات مورد نظر استفاده می‌شوند. باکتری *Agrobacterium rhizogenes* یک باکتری خاکزی است که موجب تولید ریشه مویین در محل زخم می‌شود. انتقال T-DNA پلاسمید Ri از این باکتری به سلول‌های گیاهی باعث تولید ریشه‌های مویین می‌شود. باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز قادر است که علاوه بر T-DNA پلاسمید Ri خود، T-DNA موجود بر روی هر ناقل دوگانه دیگری را که در این باکتری حضور داشته باشد، بطور همزمان به سلول گیاه هدف منتقل نماید. بدین ترتیب در طی یک فرایند تراریزش مضاعف باعث القای ریشه‌های مویین تراریخته می‌گردد (Lee et al., 2004; Tomilov et al., 2007). اخیراً استفاده از ناقلین بیان دوگانه برای انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم رایزوزنز به گیاهان مختلفی مانند سیب زمینی *(Solanum tuberosum)* (Visser et al., 1989)، بلادن *(Atropa belladonna)* (Saito et al., 1992)، سیب زمینی شیرین *(Otani et al., 1992)*

و سپس در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند. کوتیلدون‌های استریل 5 تا 7 روزه به منظور تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی باکتری

به منظور القای ریشه‌های موین، از باکتری *A. rhizogenes* سویه‌های 11325، A13، 15834 و A4 استفاده شد. برای اثبات ریشه‌زا بودن باکتری‌ها، پس از استخراج DNA آنها به روش *Corbin et al.* (2001)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های *rolB* و *rolC* انجام شد. بدین منظور از الیگونوکلئوتیدهای آغازگر اختصاصی ژن *rolB*: 5'-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3' و 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3' و برای ژن *rolC*: 5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3' و 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3' استفاده شد. طول قطعه‌ی تکثیر شونده از ژن‌های *rolB* و *rolC* با استفاده از این آغازگرها به ترتیب 430bp و 612bp می‌باشد. شرایط دمایی PCR برای ژن‌های مذکور شامل واسرشتگی اولیه 94 درجه سانتیگراد 5 دقیقه، واسرشتگی 94 درجه سانتیگراد 1 دقیقه، اتصال آغازگرها 54 درجه سانتیگراد 1 دقیقه، بسط 72 درجه سانتیگراد 1 دقیقه و بسط نهایی 72 درجه سانتیگراد 7 دقیقه بود. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده، از الکتروفورز در ژل

گزینش سلول‌های گیاهی تراریخته و باززایی گیاه از آنها.

در تحقیق حاضر تاثیر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز و محیط هم کشتی برای القای ریشه‌های موین در گیاه دارویی کاسنی بررسی گردید. کاسنی حاوی متابولیت‌های ثانویه شناخته شده‌ی فراوان و مهمی از جمله اینولین، اسکولین و کومارین است که درصد بالایی از ماده‌ی خشک این گیاه را تشکیل می‌دهند (Munoz, 2004; Yang, 2009). در طب از ریشه‌ی این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی و محل زخم و همچنین به عنوان اشتها آور، هاضم، مسهل صفر، تصفیه کننده، مدر، تنظیم کننده قاعدگی و تب بر استفاده می‌شود (Mao et al., 2009; Yang, 2009). بهینه سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موین در این گیاه، از نظر بررسی قابلیت‌های بیوسنتزی ریشه‌های موین آن حائز اهمیت است. همچنین با ارزیابی میزان پاسخ دهی کاسنی به آلودگی با آگروباکتریوم رایزوزنز و بهینه سازی شرایط باززایی، می‌توان از آن بعنوان یک مدل بالقوه برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک مسیرهای متابولیکی سود جست.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

به منظور تهیه گیاهچه استریل، بذور کاسنی پس از ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم 5 درصد به مدت 30 دقیقه و شستشو با آب استریل به مدت 15 دقیقه، در محیط کشت MS حاوی 3 درصد ساکاروز و 0/8 درصد آگار کشت گردیدند

بررسی اثر نوع محیط کشت و سویه باکتری بر میزان القا و رشد ریشه‌های مویین

یک هفته پس از ظهور اولین ریشه‌ها از کوتیلدون‌های گیاه کاسنی، درصد کوتیلدون‌هایی که موفق به تولید ریشه مویین شدند نسبت به کل کوتیلدون‌های مورد آزمایش به طور جداگانه برای هر تیمار محیط کشت و هر سویه باکتری محاسبه گردید. به منظور انتخاب محیط کشت و سویه باکتری بهینه از نظر میزان رشد ریشه‌های مویین القا شده، ریشه‌های حاصل از یک کلون از هر سویه باکتری به طور جداگانه در سه محیط کشت MS، LS و B5 مایع با pH=5/7 و در سه تکرار کشت و در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی و بر روی شیکر چرخشی با سرعت 90 rpm نگهداری شدند. پس از گذشت چهار هفته ریشه‌ها خارج شده و پس از خشک کردن در آن در دمای 80 درجه سانتیگراد به مدت 2 روز، وزن خشک آنها یادداشت برداری شد. پس از تجزیه واریانس داده‌ها، میانگین تیمارها برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده به روش دانکن در سطح 5 درصد مقایسه گردید.

بررسی میزان رشد ریشه‌های مویین

از آنجا که هر ریشه مویین از یک سلول تراریخته منشأ می‌گیرد، بنابراین می‌توان هر ریشه مویین را یک کلون در نظر گرفت. بر این اساس برای بررسی فنوتیپ رشدی کشت‌های کلون ریشه مویین، ده کلون القا شده توسط هر سویه باکتری انتخاب شد. سپس نوک ریشه‌های فعال

آگاروز 1/2 درصد با ولتاژ 85 ولت استفاده شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری

به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون تلقیح، سویه‌های باکتری در محیط کشت LB (Luria-Bertani) مایع حاوی 50 mg/1 آنتی بیوتیک ریفامپیسین (به استثنای سویه A13) و $100 \mu\text{M}$ استوسیرینگون در دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد به صورت شبانه رشد داده شدند. کشت باکتریایی در دمای 4 درجه سانتیگراد و سرعت rpm 4500 رسوب داده شد و پلت باکتری در محیط کشت MS نیم غلظت حاوی $100 \mu\text{M}$ استوسیرینگون به آرامی حل شد. سپس ریزنمونه‌های کوتیلدونی پس از جدا شدن از گیاهچه در سوسپانسیون تلقیح به مدت 2 دقیقه غوطه ور شدند و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، بر روی سه محیط کشت MS، LS و B5 با pH=5/7 کشت گردیدند. پلیت‌های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به مدت 48 ساعت و در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. 48 ساعت پس از انجام تلقیح، به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد مربوطه حاوی 500 mg/1 آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری از اطراف ریزنمونه‌ها تکرار شد.

اختصاصی ژن *rolC* گردید که مبین حضور ژن‌های مزبور در سویه‌های باکتری مورد آزمایش بود. تأیید حضور ژن‌های *rolB* و *rolC* مبین وجود پلاسمید Ri سالم و قابلیت بیماری‌زایی سویه‌های باکتری حامل می‌باشد.

A. مقایسه کارایی سویه‌های مختلف *rhizogenes* و نوع محیط هم کشتی در تراریزش کاسنی

اولین ریشه‌های موبین پس از گذشت 8 روز از زمان تلقیح باکتری ظاهر شدند. مورفولوژی رشدی این ریشه‌ها منطبق بر خصوصیات مورد انتظار شامل رشد پلاژیوتروپیک و سریع با تولید انشعابات فراوان بود (شکل 1). درصد ریزنمونه‌هایی که به تلقیح سویه‌های مختلف باکتری در سه محیط کشت مختلف MS، LS و B5 پاسخ مثبت داده‌اند، در شکل 2 نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، سویه‌ی A13 در محیط کشت MS، بالاترین کارایی در انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های کوتیلدونی را نشان داد (63/15 درصد). در بین چهار سویه بکار برده شده، سویه 11325 تنها منجر به ظهور کالوس و توده‌ی تومورمانندی در محل زخم شد و درصد ریشه‌زایی برای آن صفر در نظر گرفته شد. همچنین در اثر تلقیح با سویه‌های A4 و 15834 به ترتیب 36/47 درصد و 18/2 درصد ریزنمونه‌ها تولید ریشه موبین نمودند. علاوه بر این، محیط کشت MS با 45/34 درصد ریشه‌زایی، بهترین ترکیب

در حال رشد در هر کلون قطع شد و هر نوک ریشه بطور جداگانه به ارلن‌های 250 میلی لیتری حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت MS مایع در سه تکرار انتقال یافت. ظروف کشت در تاریکی و دمای 25 درجه سانتیگراد بر روی شیکر چرخشی با سرعت 90 rpm به مدت یک ماه نگهداری شد. پس از گذشت 28 روز ریشه‌ها خارج شده و پس از خشک کردن در آون در دمای 80 درجه سانتیگراد به مدت 2 روز، وزن خشک آنها یادداشت برداری شد.

تأیید مولکولی ریشه‌های موبین

جهت تأیید مولکولی ریشه‌های موبین، از تکنیک PCR بر روی DNA ژنومی ریشه‌های موبین برای تکثیر بخشی از ژن *rolB* و بخشی از ژن *rolC* بطور اختصاصی استفاده شد. بدین منظور پس از استخراج DNA از ریشه‌های موبین به روش CTAB، تکثیر ژن‌های *rolB* و *rolC* بطور جداگانه در دو واکنش PCR به روال ذکر شده برای تأیید باکتری نوترکیب، انجام شد.

نتایج

تأیید قابلیت ریشه‌زایی سویه‌های آگروباکتریوم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و *rolC* بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از سویه‌های مختلف باکتری، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی 612 bp با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و قطعه‌ای به طول تقریبی 430 bp با آغازگرهای

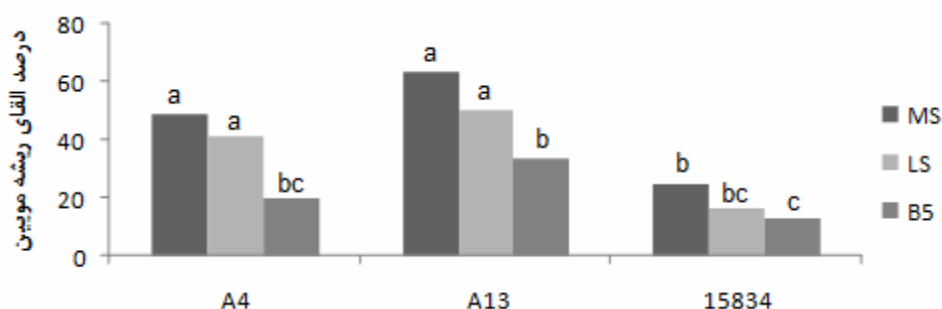
کبیرنتاج و همکاران، 1391

محیطی برای ظهور ریشه‌های موین کاسنی در مجموع سویه‌ها بوده است. محیط کشت LS و B5 به ترتیب با 35/94 و 22/22 درصد تاثیر کمتری در ریشه زایی داشتند.



شکل 1- ظهور ریشه‌های موین حاصل از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در ریزنمونه‌های کوتیلدوننی گیاه کاسنی.

Fig 1- Hairy root induction from cotyledonous segments of chicory plants by different strains of *A. rhizogenes*.



شکل 2- مقایسه درصد القای ریشه‌های موین گیاه کاسنی توسط ترکیبات مختلفی از سویه‌های آگروباکتریوم ریزوژنز با محیط کشت بافت گیاهی.

Figure 2- A comparison of hairy root induction from Chicory on different combinations of plant tissue culture media and *A. rhizogenes* strains.

Baron *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1996)، دما (et al., 2009) و دوره‌ی هم کشتی (Barik *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005) می‌باشد. بدیهی است که نه تمامی سویه‌های آگروباکتریوم برای انتقال ژن به سلول گیاهی قابلیت بیماری زایی دارند، و نه تمامی گیاهان آماده‌ی پذیرش ژن بیگانه و

انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرایند پیچیده‌ای است که تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری (Chaboud *et al.*, 2006; Crane *et al.*, 2003)، دوره‌ی پیش کشتی (Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004)، نوع ریزنمونه گیاهی (Kim *et al.*, 2004; Geier

مویین و فراوانی آنها دارد. نتایج بدست آمده با گزارشات ارائه شده در زمینه تاثیر ترکیبات محیط کشت بر القای ریشه مویین در گیاه *Physalis minima* مشابه است (Azlan et al., 2002; Kumar et al., 2006). همچنین در مطالعات انجام شده بر روی گیاه *Glycyrrhiza glabra* در سال 2008، از بین چهار تیمار محیط کشت MS، NB، WP و B5، محیط کشت MS با کارایی 47 درصد، به عنوان مناسب ترین محیط هم کشتی در القای ریشه مویین در نظر گرفته شد. محیط کشت NB و B5 با کارایی 20 درصد تاثیر کمتری بر تثبیت ریشه مویین داشتند و محیط کشت WP با کارایی صفر درصد موفق به تثبیت ریشه مویین از ریزنمونه‌های گیاهی نشد (Shakti et al., 2008). بر اساس گزارشات ارائه شده، نوع و سن ریز نمونه گیاهی تاثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه مویین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین کننده‌ی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است. مشاهدات این تحقیق حاکی از آن بود که با افزایش سن ریزنمونه‌های گیاهی، توانایی سلول‌ها برای پذیرش ژن بیگانه کاهش می‌یابد. به طوری که القای ریشه‌های مویین در کوتیلدون‌های 5 تا 7 روزه به مراتب سریعتر و با کارایی بالاتری (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). در یک بررسی که در سال 2005 در زمینه تولید ریشه مویین در گیاه *Gmelina arborea* انجام شد نیز تولید ریشه‌های مویین بیشتری در کوتیلدون‌های گیاهی نسبت به سایر اندام‌ها و همچنین در کوتیلدون‌های 5 روزه

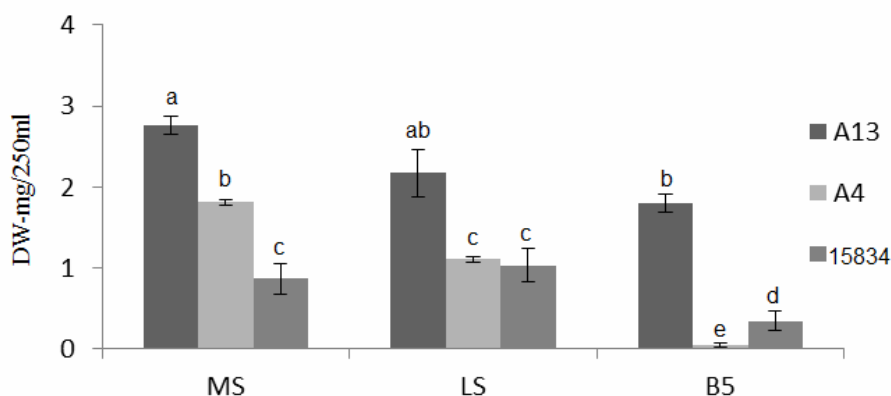
باززایی هستند (De Busk et al., 1998). دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و فقط می‌توان گفت که چنین حالتی در قالب اثرات متقابل گیاه - پاتوژن قابل بحث است که یک وارپته گیاهی پاسخ‌های متفاوتی را به نژادهای مختلف یک گونه بیماری‌زا می‌دهد. بنابراین، بهبود بیماری زایی باکتری و آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش بسزایی دارد. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که ریشه‌های مویین در پاسخ به تلقیح آگروباکتریوم ریزوژنز به کوتیلدون‌های جداسازی شده از گیاه کاسنی، تولید می‌گردند. لیکن همه نژادهای باکتری در ایجاد این تراریزش طبیعی از کارایی یکسانی برخوردار نبوده و برخی از نژادها مانند A13 در مورد کاسنی مؤثرتر عمل می‌کنند. در پژوهشی Vanhala et al. (1998) در بررسی قابلیت نژادهای مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز برای تولید ریشه‌های مویین در گیاه *H. muticus* به نتایج مشابهی دست یافتند. همچنین Tamakawa et al. (1998) در بررسی قابلیت انتقال ژن به کمک سه سویه آگروباکتریوم ریزوژنز به گیاه *Capsicum frutescens*، سویه A13 را به عنوان مستعدترین سویه معرفی کردند. نتایج حاصل از بررسی قابلیت سه محیط کشت MS، LS و B5 در حمایت از القا و تثبیت ریشه‌های مویین گیاه کاسنی حاکی از تاثیر کاملا متفاوت این محیط کشت‌ها به نفع محیط کشت MS بود. این مشاهدات نشان می‌دهد که ترکیبات محیط کشت تاثیر بسزایی بر القای ریشه‌های

محیط کشت‌های مورد آزمایش، وزن خشک بیشتری نسبت به سویه‌های دیگر داشتند. همچنین اثر نوع محیط کشت بر میزان رشد ریشه‌های مویین ناشی از سویه A4، در هر سه محیط کشت MS، LS و B5 معنی دار بود. بدین ترتیب که رشد ریشه‌ها در محیط کشت MS حداکثر و در محیط کشت B5 حداقل بود. در حالیکه میزان وزن خشک ریشه‌ها در محیط کشت LS و B5 برای سویه A13 و همچنین MS و LS برای سویه 15834، تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل 3).

نسبت به سایر سنین کوتیلدونی گزارش شد (Shrutika Dhakullar et al., 2005).

مقایسه اثر سویه باکتری و نوع محیط کشت بر وزن خشک ریشه‌های مویین

بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین میزان وزن خشک ریشه مویین، در محیط کشت MS و تراریزش با سویه A13 و کمترین وزن خشک ریشه مویین در محیط کشت B5 و در اثر تراریزش با سویه A4 مشاهده شد. بطور کلی ریشه‌های مویین حاصل از سویه A13 در تمامی



شکل 3- مقایسه اثر ترکیبات مختلفی از سویه‌های آگروباکتریوم رایزورژنز با محیط کشت بافت گیاهی بر وزن خشک ریشه‌های مویین گیاه کاسنی.

Figure 3- A comparison of the effects of different combinations of *Agrobacterium* strains and plant tissue culture media on dry weight of Chicory hairy roots.

ژنوم گیاهی است (Doran, 2002). تفاوت در ویژگی‌های رشدی و مورفولوژیکی کلون‌های ریشه مویین حاصل از سویه‌های مختلف باکتری، علاوه بر عوامل فوق به چگونگی تاثیر ژن‌های *rol* نیز نسبت داده می‌شود. بیان این ژن‌ها، سطوح داخلی هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی و یا

علاوه بر بازده متفاوت تراریزش، نژاد باکتری مورد استفاده اثر قابل ملاحظه‌ای بر فنوتیپ رشدی ریشه‌های مویین دارد. خصوصیات مختلف کلون‌های ریشه مویین حاصل از یک سویه باکتری ناشی از تفاوت در تعداد رونوشت و محل ورود ژن‌های Ri به درون

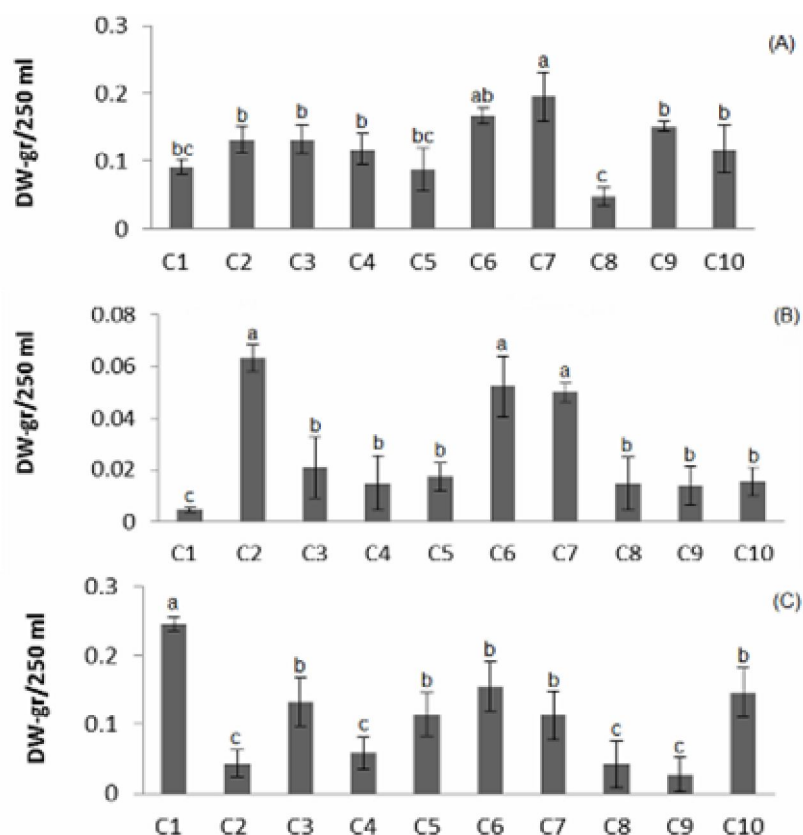
ژنوتیپ گیاهی و تفاوت در نیازهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاه و همچنین نوع سویه‌ی باکتری مورد استفاده نسبت داد (Shakti et al., 2008).

تعیین فنوتیپ رشد ریشه‌های مویین

بر مبنای وزن خشک کلون‌ها، فنوتیپ رشدی ریشه‌های مویین حاصل از هر تیمار باکتری، به صورت سه گروه کلون‌های تند، متوسط و کند رشد در نظر گرفته شد. بر این اساس، کلون C1 از باکتری A4، کلون C6 و C7 از باکتری A13 و کلون C2، C6 و C7 از باکتری 15834 به عنوان کلون تند رشد، همچنین کلون‌های C2، C4، C8 و C9 از باکتری A4، کلون C8 از باکتری A13 و کلون C1 از باکتری 15834 به عنوان کلون کند رشد و بقیه کلون‌ها به عنوان کلون‌های با رشد متوسط انتخاب شدند. بیشترین وزن خشک مربوط به کلون تند رشد C1 از باکتری A4 با 250 میلی گرم ماده خشک و کمترین آن متعلق به کلون کند رشد C1 از باکتری 15834 با 4/6 میلی گرم ماده خشک بود (شکل 4). در بررسی‌های انجام شده تفاوت رشد قابل ملاحظه‌ای در بین کلون‌های ریشه مویین حاصل از نژادهای مختلف باکتری و نیز کلون‌های حاصل از تلقیح یک نژاد ملاحظه شد که چنین تنوعی بطور قطع در مورد مقدار آلکالوئید تولیدی توسط کلون‌های مختلف نیز وجود خواهد داشت (Sevon et al., 1998).

میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطوح داخلی هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهد (Shen et al., 1988). در این میان، اکسین داخلی تاثیر ویژه‌ای بر رشد ریشه‌های مویین، ازدیاد انشعابات و توقف رشد خطی دارد. همچنین تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد ریشه‌های مویین دارد و بدیهی است که هر چقدر اختلاف بیشتری در غلظت مواد مغذی ایجاد شود، اختلاف بیشتری نیز در میزان رشد یک کلون ریشه مویین مورد انتظار است. بنابراین بهینه سازی ترکیبات محیط کشت به منظور افزایش تجمع متابولیت‌ها به یکی از اهداف مهم در کشت ریشه‌های مویین تبدیل شده است (Condori et al., 2010; Shinde et al., 2010).

در این بررسی داده‌ها نشان دادند که بیشترین میزان وزن خشک ریشه مویین، در محیط کشت MS و تراریزش با سویه A13 و کمترین وزن خشک ریشه مویین در محیط کشت B5 و در اثر تراریزش با سویه A4 حاصل شده است. به طور نسبی می‌توان گفت اثر محیط کشت MS بر رشد ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی در تمام سویه‌های مورد آزمایش، بیشتر از سایر محیط کشت‌ها بود. اگرچه مطالعات انجام شده بر روی گیاه *Glycyrrhiza glabra* در سال 2008 نشان می‌دهد که از میان چهار تیمار محیطی MS، NB، WP و B5، محیط کشت NB بیشترین تاثیر را بر سرعت رشد و در نتیجه وزن خشک آن داشته است، این تفاوت را می‌توان به تفاوت در نوع



شکل 4- میزان رشد کلون‌های ریشه موئین کاسنی حاصل از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز بر اساس وزن خشک. A، B و C: به ترتیب کلون‌های ریشه موئین حاصل از سویه‌های A13، 15834 و A4.

Figure 4- Growth rates of Chicory hairy root clones induced by different strains of *A. rhizogenes* based on dry weight. A, B and C: hairy root clones induced by strains A13, 15834 and A4, respectively.

ثانویه مشاهده می‌شود. Mano *et al.* (1989) 45 کلون از ریشه‌های موئین گیاه *Duboisia leichhardtii* را بررسی کردند و دریافتند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد، تجمع متابولیت‌های ثانویه و بازدهی کلون‌ها وجود دارد.

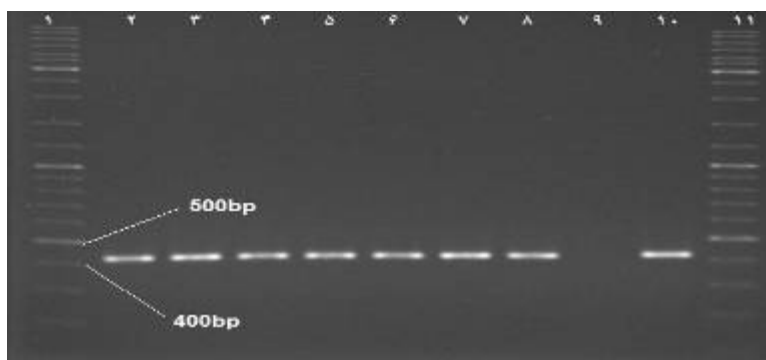
تائید مولکولی ریشه‌های موئین کاسنی

اگرچه مورفولوژی رشد پلاژیوتروپیک سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت

دلیل این تنوع سوماکلونال قابل ملاحظه هنوز مشخص نگردیده است و فقط دلایلی همچون حضور دزهای مختلفی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف، توسط محققان بیان گردیده است. همچنین محققان دریافته‌اند که با توجه به محل ورود T-DNA به ژنوم سلول گیاهی، الگوهای متفاوتی در تجمع متابولیت‌های

حاصل از تفکیک محصولات واکنش‌های PCR و آشکارسازی باندها، حضور دو ژن *rolB* (تکثیر قطعه 430 bp مورد انتظار) و *rolC* (تکثیر قطعه 612 bp مورد انتظار) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین را تأیید نمود (شکل‌های 5 و 6).

فاقد هورمون، معرف ریشه‌های مویین مورد مطالعه بود، با این حال بررسی ماهیت تراریخته آنها توسط تکنیک PCR برای تکثیر قطعه‌ای از دو ژن *rolB* و *rolC* با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی بطور جداگانه انجام شد. نتایج



شکل 5- تکثیر قطعه DNA منطبق بر اندازه مورد انتظار (430 bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی DNA ریشه‌های مویین کاسنی: 1؛ نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی، 2-8؛ قطعه تکثیر شده از DNA کلون‌های ریشه مویین حاصل از سویه A4، 9؛ عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی، 10؛ قطعه تکثیر شده از DNA باکتری *A. rhizogenes* سویه A4، 11؛ نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی

Fig 5- PCR amplified DNA fragments with the expected size (430 bp) using specific primers for *rolB* gene of *A. rhizogenes* on Chicory hairy root DNA. 1: 1 kb DNA ladder, 2-8: amplified fragments from DNA of hairy root clones induced by A4 strain. 9: no PCR product from normal Chicory root DNA, 10: amplified fragment from DNA of *A. rhizogenes* strain A4, 11: 1 kb DNA ladder.

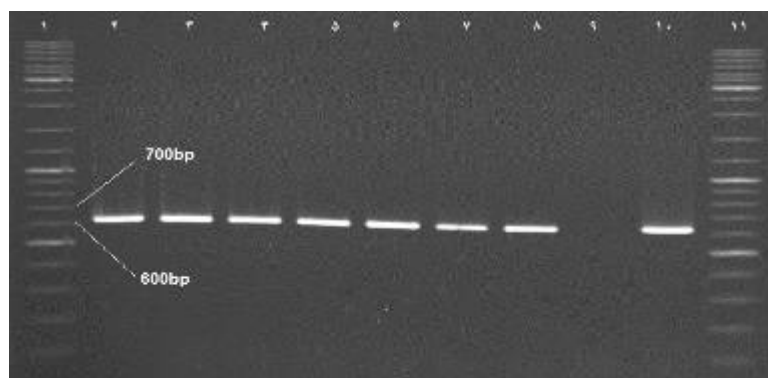
مبین وجود ژن خارجی مورد نظر در مواد گیاهی می‌باشد. همانگونه که قبلاً ذکر گردید، ظهور ریشه‌های مویین ناشی از آگروباکتریوم رایزوزنز، حاصل انتقال T-DNA پلاسمید Ri این باکتری به سلول‌های گیاهی می‌باشد. بنابراین بررسی ماهیت تراریخته ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر روی T-DNA این باکتری که مهمترین آنها ژن‌های *rolA*، *rolB* و

تکنیک PCR روشی قوی برای پی بردن به حضور توالی ترانسژن در ژنوم مواد گیاهی تراریخته است. بدین منظور یک جفت آغازگر اختصاصی برای ساختار ژنی مورد استفاده در فرایند تراریزش طراحی گردیده و پس از استخراج DNA مواد گیاهی، این آغازگر را در یک واکنش PCR برای تکثیر قطعه اختصاصی مورد نظر وارد می‌نمایند. تکثیر قطعه مورد انتظار،

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشکده

ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به

انجام رسید.



شکل 6- تکثیر قطعه DNA منطبق بر اندازه مورد انتظار (612 bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی DNA ریشه‌های موین کاسنی: 1؛ نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی، 2-8؛ قطعه تکثیر شده از DNA کلون‌های ریشه موین حاصل از سویه A4، 9؛ عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی، 10؛ قطعه تکثیر شده از DNA باکتری *A. rhizogenes* سویه A4، 11؛ نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی.

Fig 5- PCR amplified DNA fragments with the expected size (430 bp) using specific primers for *rolC* gene of *A. rhizogenes* on Chicory hairy root DNA. 1: 1 kb DNA ladder, 2-8: amplified fragments from DNA of hairy root clones induced by A4 strain. 9: no PCR product from normal Chicory root DNA, 10: amplified fragment from DNA of *A. rhizogenes* strain A4, 11: 1 kb DNA ladder.

منابع

- Azlan GJ, Marziah M, Radzali M, Johari R (2002). Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of Physalins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 271-278.
- Barik DP, Mohapatra U, Chand PK (2005). Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 24: 523-531.
- Baron C, Domke N, Beinhofer M, 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.

- Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y, Han T (2009). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 96: 45-52.
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hyper virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* 22: 46-51.
- Chen L, Zhang B, Z Xu (2008). Salt tolerance conferred by overexpression of Arabidopsis vacuolar Na(+)/H(+) antiporter gene AtNHX1 in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Research* 17: 121-132.
- Condori J, Sivakumar G, Hubstenberger J, Dolan M, Sobolev V, Medina-Bolivar F (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids sarachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiol. Biochem* 48: 310-318.
- Corbin DR, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Green PJ, Purcell JP (2001). Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. *Plant physiology* 126: 1116-1128.
- Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang ZY (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.
- De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of Arabidopsis thaliana root explants and tobacco protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 449-457.
- Doran PM (2002). Properties and applications of hairy-root cultures. *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (Eds. K. M. Okasman-Caldenty and W. H. Barz). Marcel Dekker Inc. New York. 4: 143-162
- Geier T, Sangwan RS (1996). Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. *Plant Cell Reports* 15: 386-390.
- Giri A, Narasu ML (2000). Transgenic hairy root: recent trends and application. *Biotechnology advances* 18: 1-22.
- Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Reports* 23: 386-390.
- Krolicka A, Stanszewska I, Bielawski K, Malinski E, Szafranek J, Lojkowska E (2001). Establishment of hairy roots of *Ammimajus*. *Plant Science* 160: 259-264.
- Kumar V, Sharma A, Prasad B, Chayapathy N, Gururaj HB, Ravishankar GA (2006). *A. rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 143-151.
- Lee MH, Yoon ES, Jeong JH, Choi YE (2004). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Plant Cell Reports* 22: 822-827.
- Mano Y, Ohkawa H, Yamada Y (1989). Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science* 59: 191-201.
- Mao Q, Sultan H, Tursun S, Mavlanja (2009). Determination of Total Flavonoids from *Cichorium intybus* L. *Biotechnology* 19: 78-80.
- Munoz CLM 2004. Spanish medicinal Plants: *Cichorium intybus* L. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 99: 41-47.

- Otani M, Mii M, Handa T, Kamada H, Shimada T (1993). Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci* 94: 151-159.
- Saito K, Yamazaki M, Anzai H, Yoneyama K, Murakoshi I (1992). Transgenic herbicide-resistant *Atropa belladonna* using an Ri binary vector and inheritance of the transgenic trait. *Plant Cell Rep* 11: 219-224.
- Sevon N, Hiltunen R, Oksman-Caldentey KM (1998). Somaclonal variation in *Agrobacterium* transformed roots and protoplast-derived hairy root clones of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Med.* 64: 37-41.
- Shakti M, Arun KK, Suman PSK, Bhartendu NM (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 0717-3458.
- Shen WH, Petit A, Guern, J, Tempe J (1988). Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 85: 3417-3421.
- Shinde A, Malpathak N, Fulzele D (2010). Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of natural medicines* 64: 346-353.
- Shrutika Dhakulkar TR, Ganapathi SB (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169: 812-818
- Tamakawa T, Sekiguchi S, Kodama T, Smith S, Yeoman MM (1998). Transformation of Chilli Pepper (*Capsicum frutescens*) With a Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene. *Plant Biotechnolog* 15: 189-193.
- Tepfer D (1984). Transformation of several species of high plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenot *Cell* 37: 959-967.
- Tomilov A, Tomilova N, Yoder JI (2007). *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic-plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. *Planta* 225: 1059-1071.
- Vanhala L, Hiltunen R, Oksman-Caldentey KM (1995). Virulence of different *agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. *Plant cell Rep* 14: 236-240.
- Visser RGF, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra WJ (1989). Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet* 78: 594-600.
- Woodhead M, Davies HV, Brennan RM, Taylor MA (1998). The isolation of genomic DNA from black currant (*Ribes nigrum* L.). *Mol. Biotechnol* 9: 243-246.
- Yamazaki M, Son L, Hayashi T, Morita N, Asamizu T, Murakoshi I, Saito K (1996). Transgenic fertile *Scoparia dulcis* L., a folk medicinal plant, conferred with a herbicide-resistant trait using an Ri binary vector. *Plant Cell Rep* 15: 317-321.
- Yang Y (2009). Process Optimization of Extracting Phenols from *Cichorium intybus* cv. Puna with Response Surface Methodology. *J. Northwest Forest University* 24: 118-120.

Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*

Kabirnataj S.¹, Zolala J.², Nematzadeh G. A.^{*3}, Shokri E.⁴

1- M.Sc Student in Agricultural Biotechnology, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

2- Assist. Professor in Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of kerman, kerman, Iran

3- Professor in plant genetics, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

4- M.Sc in plant breeding, Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

Abstract

Agrobacterium rhizogenes induced hairy roots gain of the potential of production and accumulation of plant secondary metabolites. In recent decades, many researchers have focused on the biosynthesis of valuable secondary metabolites in hairy roots, because genetically modified roots produce such compounds with more genetic and biosynthetic stability than cell suspension cultures. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a biennial or perennial medicinal plant from *Asteraceae*. The plant contains many important metabolites including inulin, scoline, coumarin, vitamins, flavonoids and aromatics. In this study, with the aim of optimizing hairy root culture establishment, cotyledons of Chicory plants inoculated with different strains of *Agrobacterium rhizogenes* were cultured on different plant tissue culture media. Numbers of hairy roots produced in different experiments were recorded and molecular confirmation of hairy root clones was performed through specific amplification of *rolB* and *rolC* genes in PCR reactions. Based on the efficiency of hairy root induction in different experiments, the best combination of bacterial strain-culture medium for establishing hairy root cultures of Chicory were determined. *Agrobacterium rhizogenes* strains A4, A13 and 15834 induced hairy roots in Chicory and MS medium was considered as the best culture medium for developing and establishment of hairy root cultures.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, Chicory, secondary metabolites.

*Corresponding Author: Nematzadeh G. A.

Tel: 01513822715

Email: Kabirs.bio@gmail.com