ترانسفورماسیون گیاه شابیزک *Atropa belladonna* توسط *Agrobacterium rhizogense*

بتول زارعی[1]، دانیال کهریزی*[2 و 3]، سید علی رضا موسوی[4]، علی اصغر نصراله نژاد قمی[5]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه رازی.
2- دانشیار اصلاح نباتات دانشگاه رازی.
3- گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشگاه رازی.
4- مربی دانشگاه ایلام.
5- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

تاریخ دریافت: 1391/3/24، تاریخ پذیرش: 1391/6/6

چکیده

شابیزک (*Atropa belladonna*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی خانواده سولاناسه می باشد. این گیاه حاوی منابع آلکالوئیدهای تروپانی است. این آلکالوئیدها بیشتر درریشه ها بیوسنتز می شوند. تحقیق حاضر به منظور افزایش ریشه های مویی شابیزک به روش انتقال ژن انجام شد. برای این منظور از سویه آگروباکتریوم رایزوژنز (AR_{15843}) استفاده شد. ابتدا ریزنمونه های ساقه با سوسپانسیون آگروباکتریوم دارای ژن *rolB* تلقیح شدند. سپس جهت باززایی مستقیم از پنج ترکیب (MS، MS + 3 mg/l KIN، B5، KIN MS+ 12 mg/l و B5 + 5mg/l KIN) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار استفاده شد. نتایج تجزیه آماری نشان داد که سطح هورمونی MS+12 mg/l KIN بیشترین باززایی مستقیم از نوساقه را دارا می‌باشد. برای آنالیز گیاهان تراریخت از دو روش فنوتیپی (مشاهده ریشه مویی از گیاهچه تراریخت) و تکثیر بخشی از ژن *rolB* (به روش PCR) استفاده شد.

کلمات کلیدی: *شابیزک، آگروباکتریوم ریزوژنز، تراریختی، آلکالوئید های تروپانی.*

* نویسنده مسئول: دانیال کهریزی تلفن: 08318323733 Email: dkahrizi@yahoo.com

مقدمه

گیاهان دارویی مهمترین منبع دارویی برای اکثر جوامع بشری می باشند. طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی بیش از 80% جوامع انسانی در کشورهای در حال توسعه برای مراقبت های بهداشتی اولیه به طور سنتی به گیاهان دارویی و تولیدات طبیعی تمایل دارند (Vines, 2004; Canter *et al*, 2005) ابزار بیوتکنولوژی برای انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ های حیاتی از گیاهان دارویی مهم هستند. باززایی در شرایط درون شیشه ای دارای پتانسیل شگرفی برای تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا است (Tripathi and Jaindra, 2003). گیاهان دارویی حاوی مواد شیمیایی مفید برای مصارف دارویی با چاشنی های غذایی، مواد خوشبو کننده و معطر هستند (Mulabagal and Tsay, 2004). یکی از روش های انتقال ژن، انتقال به واسطه آگروباکتریوم رایزوژنز می باشد که سبب تولید ریشه های موئین می شود (Tzfira and Vitaly, 2006).

شابیزک گیاهی است پایا و به ارتفاع یک تا یک و نیم متر می باشد که دارای ریشه هایی دراز، منشعب، ضخیم، گوشتدار و به رنگ حنائی است ساقه آن استوانه ای، پوشیده از تار و در انتها دارای تقسیمات دوتایی یا سه تایی است قسمت مورد استفاده این گیاه برگ، ریشه، میوه و دانه آن است (Rothe and Drager, 2002).

به علت گسترش زیاد ریشه (طول ریشه به 40 تا 60 سانتی متر می رسد)، برای کشت شابیزک باید از زمین هایی با خاک زراعِی عمِیق استفاده نمود. شابیزک در طول رویش به شرایط آب هوایِی مرطوب و آب فراوان نیاز دارد. این گیاه در مناطق خشک به کندی رشد می کند. از این رو، کاشت شابیزک در شرایط مرطوب در مناطقی که رطوبت هوا زیاد باشد، موفقیت آمیز خواهد بود خاکهای مناسب برای کاشت و تکثیر شابیزک، خاکهای شنی غنی از ترکیبات کلسیم دار و خاکهایی که حاوی مقادیر فراوان مواد و ترکیبات هوموسی می باشند (Hornok, 1987).

شابیزک بر روی سلسله اعصاب تاثیر کرده و اثرات آرام کننده و ضد تشنج دارد. از شابیزک در درمان بیماریهای مختلف مانند آسم، سیاه سرفه، سرع، دفع غیر عادی ادرار، سرعت انزال، دردهای معدی، یبوست های مقاوم، دردهای آپاندیسیت، دریا گرفتگی (به علت دارا بودن آتروپین)، سر گیجه، قولنج های کبدی و کلیوی، ترشح فراوان عرق، عرق شبانه مسلولین و در بسیاری موارد دیگر استفاده به عمل می آید. هیوسیامین قادر است انقباضاتی را که در اثر بکار بردن گلوکوزیدهای ملین در روده‌ها ایجاد می‌شود بدون کم کردن اثر مسهلی آنها برطرف نماید. اثر اسکوپولامین مشابه هیوسیامین است ولی روی مراکز عصبی موثرتر می‌باشد (Oksman *et al.*, 1991)

شابیزک گیاهی از خانواده ی سولاناسه و یکساله می باشد که یکی از آلکالوئیدهای تروپانی مهم به نام هیوسیامین را دارا می باشد. مواد موثر دارویی این گیاه در ریشه ها تولید می شود(Rothe and Drager, 2002). باکتری

آگروباکتریوم رایزوژنز عامل بیماری ریشه های مویی در گیاهان دو لپه و تعداد محدودی از گیاهان تک لپه می شود. پلاسمید بزرگ موجود در آن به نام*Ri*، با اتصال این باکتری ها به نواحی زخمی گیاهان میزبان، قسمت بیماریزای خود که T-DNA نام دارد(Sosa Alderete *et al*., 2009) و در بر گیرنده ی ژنهای rol A,B,*C* است را به ژنوم یاخته های میزبان منتقل می نمایند و باعث افزایش مواد موثر دارویی می شود و این ریشه ها به صورت ژنتیکی تغییر کرده و قابلیت بروز صفت ریشه ای را به نسل بعد دارا هستند (Tzfira and Vitaly, 2006). این مواد موثر (هیوستامین و آتروپین و...) بر روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک، قلب، چشم و غیره...تاثیر می گذارند (Rothe and Drager, 2002). سال 1987 اولین تحقیقات مهندسی متابولیک گیاهان دارویی را بر روی آلکالوئیدهای تروپانی انجام داده اند. آنها یک ژن هیوسامین 6 بتا هیدروکسیلاز را از *Hyoacyamus* به *Atropa belodonna* منتقل نمودند. گیاهان تراریخت، سطح بالاتری از تبدیل هیوسامین به اسکوپولامین که یک ترکیب دارویی مهمتر است را نشان دادند (Jung and Tepfer, 1987). هدف از این تحقیق معرفی سیستم کشت ریشه های موئین در جهت مهندسی متابولیت های ثانویه گیاهی و انتقال ژن rol B به گیاه شابیزک و اثبات حضور ژن در سطح فنوتیپی و در سطح DNA (با استفاده از PCR) بود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این مطالعه بذور شابیزک (آتروپا) از باغ گیاه شناسی سازمان جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. بذور نسبتاً ریز شابیزک به مدت 12 دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم (1/5%) ضد عفونی شدند. سپس به محیط MS (با غلظت قند 20 گرم در لیتر و 8% آگار که pH محیط روی 5/8 تنظیم و به مدت 20 دقیقه در 120 درجه سانتی گراد اتوکلاو گردید) منتقل شدند. پس از 35 روز گیاهچه های استریل تولید شدند.

تهیه باکتری و تلقیح

در این تحقیق از سویه آگروباکتریوم (AR_{15834}) تهیه شده از دانشگاه تربیت مدرس، استفاده شد. در داخل هر فالکون استریل، 5 میلی لیتر محیط کشت مایع LB ریخته شد و به هر یک µl 10 استوک باکتری و µl 300 ریفامیسین اضافه گردید. فالکون های محیط کشت حاوی باکتری در شرایط تاریکی، در دمای °C 27 و در داخل شیکر چرخشی با سرعت rpm 120 نگهداری شدند. پس از 48 ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت باکتری ها در محیط کشت مشخص گردید که برابر µg/ml 2- 1/8 بود. برای انجام تلقیح از سرنگ آزمایشگاهی 120µl استریل استفاده شد. محفظه سرنگ از کشت مایع (48 ساعته باکتری) پر شد و سپس با استفاده از سوزن بسیار نازک سرنگ، زخم بسیار ریزی در ریز نمونه های ساقه ایجاد شد و قطره بسیار

کوچکی از کشت باکتری در ناحیه زخم تلقیح گردید. ریز نمونه های تلقیح شده روی کاغذ صافی گذاشته شد تا باکتری های اضافی بر روی کاغذ صافی باقی بمانند، آنگاه ریزنمونه ها به محیط کشت MS وB5 منتقل گردیدند. پس از درزگیری ظروف کشت با پارافیلم، کشت ها در دمای 25 °C و فتوپریود 8:16 (نور: تاریکی) نگهداری شدند. پس از 48 ساعت تلقیح ریزنمونه ی ساقه با باکتری، سپس ریز نمونه ها به محیط کشت مورد نظر حاوی 300 mg/L آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و 100 mg/L کانامایسین، منتقل شدند. ریز نمونه ها هر 10 روز یک مرتبه به محیط کشت مشابه واکشت می شدند. برای باززایی به محیط های مختلف باززایی منتقل گردیدند. که برای این قسمت از تحقیق، از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج تیمار (MS، MS+ 12 mg/l KIN ،B5، MS + 3 mg/l KIN و B5 + 5mg/l KIN) استفاده شد. برای مقایسه میانگین از روش دانکن استفاده شد. برای نرمال کردن مشاهدات از تبدیل داده Arc sin√x استفاده گردید. برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده ها از نرم افزار SAS استفاده شد.

تایید تراریختی گیاهان باززایی شده به روش PCR

در این بخش از PCR با DNA ژنومی استخراج شده (به روش CTAB) از برگهای گیاه تراریخت برای تکثیر بخشی از ژن rol B به طور اختصاصی استفاده شد. با انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهایی اختصاصی (GAAGGTGCAAGCTACCTCTC و GCTCTTGCAGTGCTACATTT) انتظار می‌رود که قطعه ی 430 pb تکثیر شود.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول 1) نشان داد که بین سطوح مختلف Kin برای ساقه دهی ریزنمونه های تراریخت گیاه شابیزک اختلاف بسیار معنی داری وجود دارد.

همانطور که در جدول 2 (نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن) نشان داده شده است محیط MS+12 mg/l kin بیشترین نوساقه دهی را داشته است. ولی در غلظتهای بالاتر ریزنمونه ها تولید ساقه نکردند. برای باززایی سه فاکتور کلیدی نقش دارد 1- نوع ریز نمونه 2- غلظت هورمونی 3- شرایط کشت (Wei *et al.*, 2006). Feyzi (2006) به منظور باززایی مستقیم گیاه ذرت از ریز نمونه مریستم ساقه، از سطوح مختلف هورمون kin (0، 5/، 1) استفاده کردند و گزارش دادند که ریز نمونه مریستم ساقه در سطح هورمونی 1mg/l kin بیشترین باززایی را داشته است. در پژوهشی Wei *et al.* (2006) به منظور باززایی مستقیم گیاه *Plumbago zeylanica* از ریزنمونه هیپوکوتیل که با سویه ی LBA 4402 تلقیح شده، از غلظتهای مختلف BA و NAA استفاده کردند و گزارش شد در محیط 2mg/l BA و 0/75 mg/l NAA بیشترین باززایی را داشته است. در پژوهشی دیگر Li *et al.* (2008) به منظور باززایی گیاه *Sorghastrum*

nutans از ریزنمونه کالوس، در غلظتهای مختلف کینتین (5، 2، 1، 0/5، 0) استفاده کردند و گزارش دادند که در غلظت هورمونی mg/ l kin 5 بیشترین باززایی را داشته است. Peddaboina *et al.* (2006) به منظور باززایی گیاه *Capsicum ssp* از ریزنمونه مریستم ساقه، از سیتوکنین های مختلف (Zeatin , Kin, BA) استفاده کردند تنظیم کننده رشد Kin را در غلظتهای mg/l 4/6، 9/2، 13/9، 23/2 و 46/4 به کار بردند و گزارش دادند که در غلظت 46/4 بیشترین باززایی را داشته است. البته در مجموع برای باززایی Zeatin نسبت به Kin بهتر جواب داده است. در پژوهشی Li *et al.* (2003) برای باززایی مستقیم گیاه *Squash ssp* از ریز نمونه کوتیلدون استفاده کردند و گزارش دادند که در غلظت هورمونی BA mg/l 1 بهترین باززایی را داشته است. در پژوهشی Thakur *et al.* (2005) برای باززایی مستقیم گیاه *Himalayan polar* از ریزنمونه دمبرگ (که با آگروباکتریوم تومه فشنس تلقیح داده شده بود)، استفاده کردند. آنها گزارش دادند که سطح هورمونی mg/ l kin 1/5 و IAA 0/1 بهترین باززایی را داشته است. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش برآورد می شود هورمون Kin مناسب ترین سیتوکنین برای القاء شاخساره می باشد. در بررسی منابع هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از ریزنمونه ساقه شابیزک جهت تولید شاخساره به طور مستقیم مشاهده نشده است.

تایید تراریختی گیاهان باززا شده براساس فنوتیپ

پس از تولید گیاه تراریخت می توان مشاهده کرد که ریشه های مویی گیاه تراریخت نسبت به غیر تراریخت بیشتر است. شکل (1) نشان دهنده این است که ژن به گیاه انتقال یافته و در جای مناسب خود قرار گرفته است.

تأیید تراریختی گیاهان باززا شده بر اساس PCR

به منظور تأیید ماهیت تراریختی گیاهان باززایی شده و اثبات ژن منتقل شده از آگروباکتریوم به ژنوم گیاه، آنالیز PCR انجام گرفت. آزمایشات برای تأیید حضور ژن *rolB* به طول bp 430 انجام گرفت و حضور این ژن را در ژنوم سلولهای گیاهان باززایی شده را تأیید کرد (شکل 2).

جدول 1- تجزیه واریانس سطوح مختلف Kin بر ساقه دهی ریزنمونه های تراریخت گیاه شابیزک.

Table 1- Analysis of variance for effect of different Kin levels on shoot induction in transgenic *Atropa belladonna* explants

میانگین مربعات Mean of squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییرات Source of variation
0.437**	4	تیمار
0.002	10	خطا
	14	کل
CV= 4.76%		

** : اختلاف در سطح احتمال یک درصد Significant differences (p<0.01) **

جدول 2- مقایسه میانگین سطوح مختلف Kin بر ساقه دهی ریزنمونه های تراریخت **گیاه شابیزک**

Table 2- Mean comparison for effect of different Kin levels on shoot induction in transgenic *Atropa belladonna* explants

Ms+12mg/l kin	17.00 a
B5+5mg/l kin	14.22 ab
Ms+4mg/l kin	8.11 b
Ms	0.00 c
B5	0.00 c

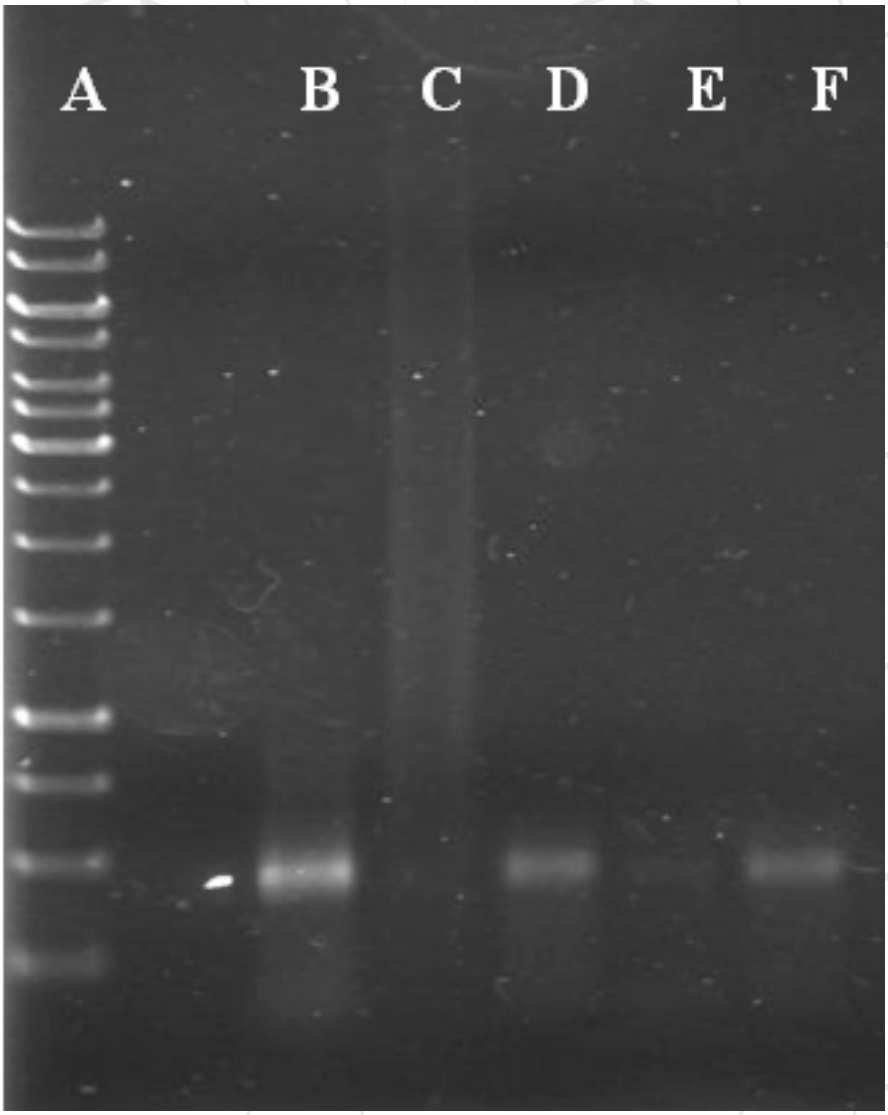
میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح احتمال 5 درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

Similar letters show that there is no significant difference **(p<0.05)**

A **B**

شکل 1- مقایسه ی گیاه تراریخت (A) و غیر تراریخت (B) در گیاه شابیزک. در گیاه تراریخت القاء ریشه های مویی اتفاق افتاده است.

Figure 1- Comparison of transgenic (A) and Non-transgenic (B) plants in *Atropa belladonna*. Induction of capillary roots is occurred in transgenic plants.



شکل 2- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR برای ژن rolB. A: سایز مارکر، B : کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن *rolB*)، C: کنترل منفی (ریشه‌های گیاه غیر تراریخت)، D، E، F : گیاهان تراریخت احتمالی.

Table 2- Electrophoresis of PCR product for rolB gene. A: Size marker, B: positive control (the plasmid that is harboring rolB gene), C: negative control (non-transformant plant root), D, E, F: putative transgenic plants.

منابع

Feyzi A (2006). Optimization of maize tissue culture. Master thesis. Faculty of Agriculture. Razi University.

Hornok, L (1978). Gyogynovenyek term sztese feldogozasa. Mezogazdasagi Kiado, Budapest, PP. 356-359.

Jung G. Tepfer D (1987). Use of genetic transformation by Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown *in vitro*. Plant Science 50: 145-151.

Li M, Leung WM (2003). Root inductio in *Pinus radiata* using *Agrobacterium rhizogenes* . Biotecnology Journal 6: 251-258.

Li Y, Gao J, Fei S (2009). High frequency *in vit*ro embryogemic callus induction and plant regeneration from indiangrass mature caryopsis. Science Horticulturae 119(3): 157-170.

Mulabagal V. Tsay HS (2004). Plant cell culture- An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of applied Science and Engineering 2: 29-48.

Oksman-Caldentey KM, Kivela O, Hiltunen R (1991). Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of Hyoscyamus muticus. Plant Science 78: 129-136

Peddaboina V, Thamidala C, Karampuri S (2006). *Invitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Gapsicum ssp* using thidiazuron. Science Horticulturae 107: 117-122.

Rothe G, Drager B (2002). Tropane alkaloids- metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of Atropa belladonna. Plant Science 163:979-985.

Sosa Alderete LG, Talano MA, Ibanez SG, Purro S, Agostini E, Milrad SR, Medina MR, (2009). Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidises and its application for phenol removal. Journal of biotechnology 139: 273-279.

Thakur AK, Srivastava DK (2005). Plant regeneration and genetic transformation studies in petiol tissue of Himalayan polar CURR [-NTSCIENCE]: 664-668.

Tripathi L, Jaindra NT (2003). Role biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of pharmaceutical Research 2: 243-253.

Tzfira T, Vitaly C (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants. Biology and Biotechnology Current Opinion in iotechnology 17:147-154.

Vines G (2004). Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants, plantlife international: www.plantlife.org.uk.

Wei X, Gou X, Yuan T (2006). A highly efficient in vitro plant regeneration system and Agrobacterium – mediated transformation in Plumbago zeylanica. Plant Cell 25: 513 - 521.

Agrobacterium rhizogense - mediated transformation of *Atropa belladonna*

Zarei B.[1], Kahrizi D.[*2,3], Mousavi S.A.[4], Nasrollahnezhad Ghomi A.A.[5]

1. MSc of Plant Breeding, Razi university, Kermanshah, Iran.
2. Associate Professor of Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran.
3. Research Department of Biotechnology for Drought Resistance, Kermanshah, Iran.
4. Lecturer of Ilam University, Ilam, Iran.
5. Assistant Professor of Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources University of Gorgan, Iran.

Abstract

Atropa belladonna is one of the most important medicinal plants in Solanaceae family. It contains tropani alkaloids that often are synthesised in root. Present study was conducted in order to induction of hairy root in *A.belladonna* using gene transfer via *Agrobacterium rhizogenes* method. The stem explants with *Agrobacterium* suspensions harbouring rolB gene were inoculated. Then, in order to direct regeneration, five compounds (MS, MS + 3 mg/l Kin , B5, MS+ 12 mg/l Kin, B5+ 5 mg/l Kin)) in a completely randomized design with three replications was used. The statistical analysis indicated that among treated hormone, 12 mg /l KIN level in MS medium showed the most shoots direct regeneration. Two methods for the analysis of transgenic plants, phenotypic (observed in hair roots of transgenic seedlings), gene amplification of the rolB (using PCR) was used.

Keyword*: Atropa belladonna, Agrobacterium rhizogenese*, Transgenic, and Tropane alkaloids

[*] Corresponding Author: Kahrizi D. Tel: 08318323733 Email: dkahrizi@yahoo.com

زارعی و همکاران، 1392