مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1391)

بهینه سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*)

سارا کبیرنتاج[1]، جعفر ذوالعلی[2]، قربانعلی نعمت زاده[3*]، احسان شکری[4]

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 با هنر 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 مویین حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز از قابلیت سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه گیاهی برخوردار می‌باشند. در دو دهه‌ی اخیر توجه قابل ملاحظه‌ای به سنتز ترکیبات ثانویه ارزشمند در ریشه‌های مویین معطوف شده است، زیرا ریشه‌های تغییر یافته ژنتیکی برخلاف سوسپانسیون سلولی، متابولیت‌های ثانویه را با ثبات ژنتیکی و بیوسنتزی 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 مویین، کوتیلدون‌های گیاه کاسنی با سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح و بر روی سه محیط کشت گیاهی مختلف کشت شدند. تعداد ریشه‌های تولید شده در تیمارهای مختلف محیط کشت ثبت گردید و تائید ریشه‌های مویین با استفاده از واکنش PCR برای تکثیر اختصاصی ژن‌های *rol*B و*rol*C 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 مویین کاسنی تعیین گردیدند. سویه‌های A4، A13 و 15834 موفق به القای ریشه مویین در گیاه کاسنی شدند و محیط کشت MS به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت به منظور القای ریشه‌های مویین و تثبیت کشت آنها معرفی گردید.

کلمات کلیدی: *آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین، کاسنی، متابولیت‌های ثانویه.*

* نویسنده مسئول: قربانعلی نعمت زاده تلفن: 01513822744 Email:Kabirs.bio@gmail.com

مقدمه

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 نوترکیب 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-DNAی پلاسمید Ri از این باکتری به سلول‌های گیاهی باعث تولید ریشه‌های مویین می‌شود. باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز قادر است که علاوه بر T-DNAی پلاسمید Ri خود، T-DNAی 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). اخیرا استفاده از ناقلین بیان دوگانه برای انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم رایزوژنز 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*., 1993) و گیاه *Scoparia dulics* (Yamazaki et el., 1996) گزارش شده است.

استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز 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 رایزوژنز 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 تغییریافته به نژاد آگروباکتریوم انتخاب شده، انتقال T-DNA توسط آگروباکتریوم به گیاه با فراوانی زیاد و در نهایت

گزینش سلول‌های گیاهی تراریخته و باززایی گیاه از آنها.

در تحقیق حاضر تاثیر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و محیط هم کشتی برای القای ریشه‌های مویین 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 صفرا، 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 مویین در این گیاه، از نظر بررسی قابلیت‌های بیوسنتزی ریشه‌های مویین آن حائز اهمیت است. همچنین با ارزیابی میزان پاسخ دهی کاسنی به آلودگی با آگروباکتریوم رایزوژنز 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 و سپس در دمای 2±25 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 مویین، از باکتری *A. rhizogenes* سویه‌های 11325، A13، 15834 و A4 استفاده شد. برای اثبات ریشه زا بودن باکتری‌ها، پس از استخراج DNAی آنها به روش Corbin *et al.* (2001)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های *rol*B و *rol*C انجام شد. بدین منظور از الیگونوکلئوتیدهای آغازگر اختصاصی ژن *rol*B: 5´- GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3´ و 5´- GAAGGTGCAAGCTACCTCTC -3´ و برای ژن *rol*C: 5´- CTCCTGACATCAAACTCGTC -3´ و 5´- TGCTTCGAGTTATGGGTACA -3´ استفاده شد. طول قطعه‌ی تکثیر شونده از ژن‌های *rol*B و *rol*C 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

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/l آنتی بیوتیک ریفامپیسین (به استثنای سویه A13) و 100µM استوسیرینگون در دمای 2±28 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 100µM استوسرینگون 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 2±25 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. 48 ساعت پس از انجام تلقیح، به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت‌جامد مربوطه حاوی 500 mg/l آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری از اطراف ریزنمونه‌ها تکرار شد.

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 2±25 درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی و بر روی شیکر چرخشی با سرعت rpm 90 نگهداری شدند. پس از گذشت چهار هفته 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. 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 منشاء 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

در حال رشد در هر کلون قطع شد و هر نوک ریشه بطور جداگانه به ارلن‌های 250 میلی لیتری حاوی50 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.

تائید مولکولی ریشه‌های مویین

جهت تائید مولکولی ریشه‌های مویین، از تکنیک PCR بر روی DNA ژنومی ریشه‌های مویین برای تکثیر بخشی از ژن *rol*B و بخشی از ژن *rol*C بطور اختصاصی استفاده شد. بدین منظور پس از استخراج DNA از ریشه‌های مویین به روشCTAB، تکثیر ژن‌های *rol*B و *rol*C بطور جداگانه در دو واکنش PCR به روال ذکر شده برای تائید باکتری نوترکیب، انجام شد.

نتایج

تائید قابلیت ریشه‌زایی سویه‌های آگروباکتریوم

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و *rol*C بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از سویه‌های مختلف باکتری، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی bp 430 با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و قطعه‌ای به طول تقریبی bp 612 با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C گردید که مبین حضور ژن‌های مزبور در سویه‌های باکتری مورد آزمایش بود. تائید حضور ژن‌های *rol*B و*rol*C مبین وجود پلاسمید Ri سالم و قابلیت بیماریزایی سویه‌های باکتری حامل می‌باشد.

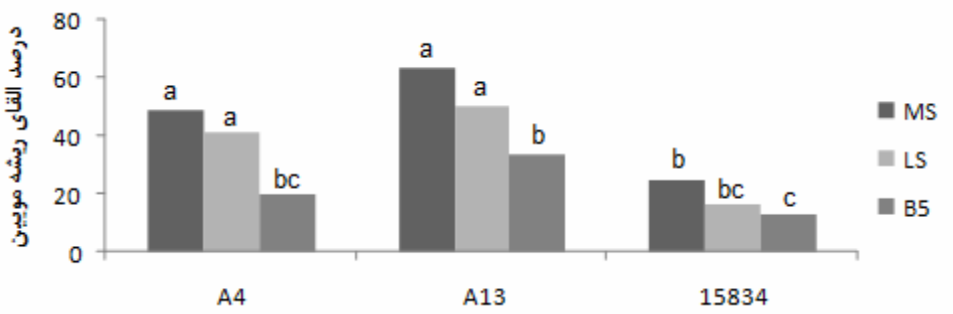
مقایسه کارآیی سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* و نوع محیط هم کشتی در تراریزش کاسنی

اولین ریشه‌های مویین 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 تومور مانندی در محل زخم شد و درصد ریشه زایی 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 مویین نمودند. علاوه بر این، محیط کشت MS با 45/34 درصد ریشه زایی، بهترین ترکیب

محیطی برای ظهور ریشه‌های مویین 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 مویین حاصل از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در ریزنمونه‌های کوتیلدونی 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 مویین گیاه کاسنی توسط ترکیبات مختلفی از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز 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.

انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرایند پیچیده‌ای است که تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری (Chaboud *et al.*, 2003; Crane *et al.*, 2006)، دوره‌ی پیش کشتی (Chen *et al.*, 2008;Kim *et al* 2004)، نوع ریز نمونه گیاهی (Kim *et al.*, 2004; Geier *et al.*, 1996)، دما (Baron *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2009) و دوره‌ی هم کشتی (Barik *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004) 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

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 ـ پاتوژن قابل بحث است که یک واریته 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 رایزوژنز به کوتیلدون‌های جداسازی شده از گیاه کاسنی، تولید می‌گردند. لیکن همه نژادهای باکتری در ایجاد این تراریزش طبیعی از کارآیی 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 رایزوژنز 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 رایزوژنز به گیاه *Capsicum frutescens*، سویه‌ی A13 را به عنوان مستعدترین سویه معرفی کردند.

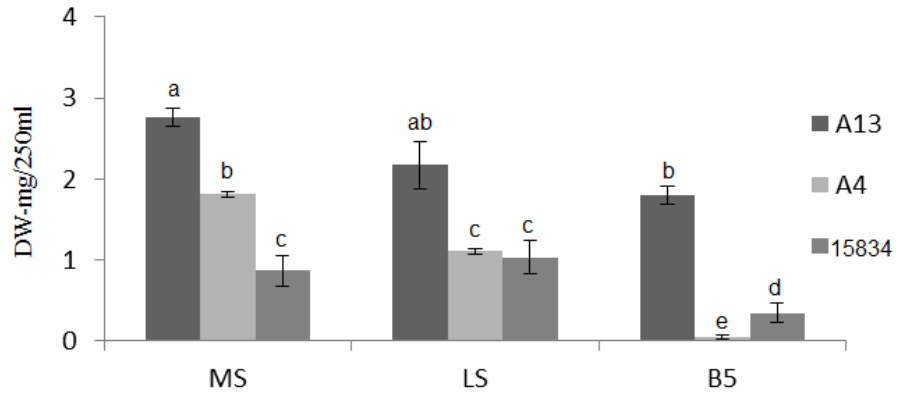
نتایج حاصل از بررسی قابلیت سه محیط کشت MS، LS و B5 در حمایت از القا و تثبیت ریشه‌های مویین گیاه کاسنی حاکی از تاثیر کاملا متفاوت این محیط کشت‌ها به نفع محیط کشت MS بود. این مشاهدات نشان می‌دهد که ترکیبات محیط کشت تاثیر بسزایی بر القای ریشه‌های مویین و فراوانی آنها دارد. نتایج بدست آمده با گزارشات ارائه 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 *Glycrrhiza glabra* در سال 2008، از بین چهار تیمار محیط کشت MS، NB، WP و B5، محیط کشت MS با کارآیی 47 درصد، به عنوان مناسب ترین محیط هم کشتی در القای ریشه مویین در نظر گرفته شد. محیط کشت NB و B5 با کارآیی 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 نسبت به برگ‌های 30 روزه صورت می‌گرفت (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

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 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).



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

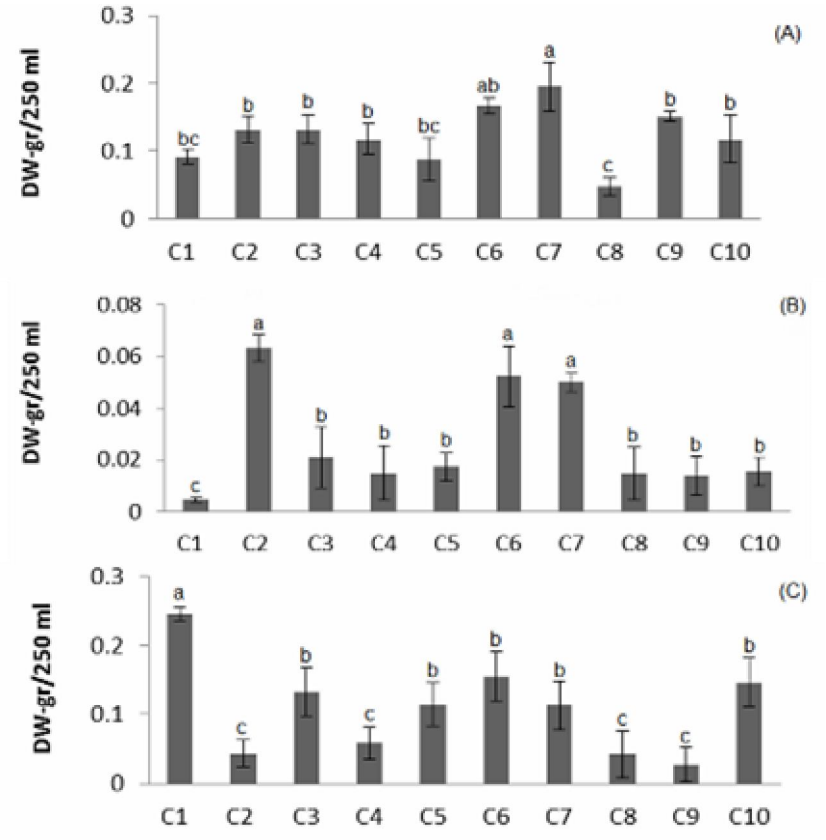
Figure 3- A comparison of the effects of different combinations of *Agrobacterium* strains and plant tissue culture media on dry weight of Chicory hairy roots.

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 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

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 *Glycrrhiza glabra* در سال 2008 نشان می‌دهد که از میان چهار تیمار محیطی MS، NB، WP وB5، 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 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).



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

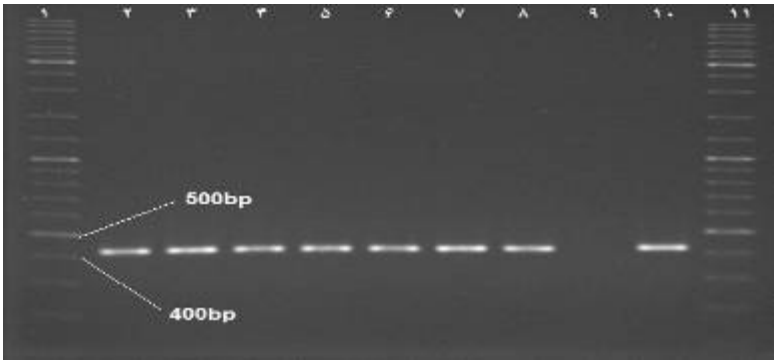
Figure 4- Growth rates of Chicory hairy root clones induced by different strains of *A. rhizogenes* based on dry weight. A, B and C: hairy root clones induced by strains A13, 15834 and A4, respectively.

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 ثانویه مشاهده می‌شود. Mano *et al.* (1989) 45 کلون از ریشه‌های مویین 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 مویین کاسنی

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

فاقد هورمون، معرف ریشه‌های مویین مورد مطالعه بود، با این حال بررسی ماهیت تراریخته آنها توسط تکنیک PCR برای تکثیر قطعه‌ای از دو ژن *rol*B و *rol*C با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی بطور جداگانه انجام شد. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش‌های PCR و آشکارسازی باندها، حضور دو ژن *rol*B (تکثیر قطعه 430 bp مورد انتظار) و *rol*C (تکثیر قطعه 612 bp مورد انتظار) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین را تائید نمود (شکل‌های 5 و 6).



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

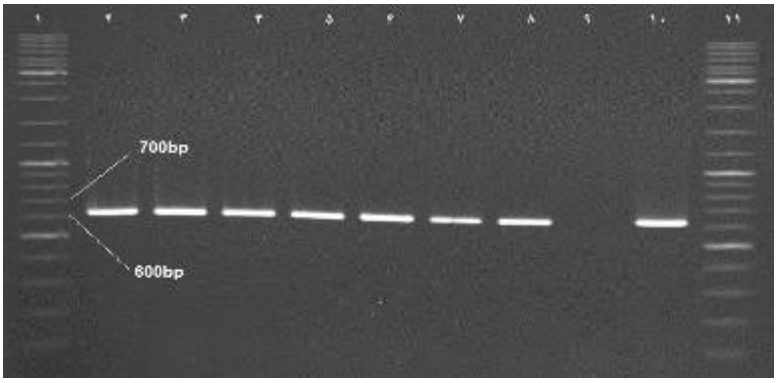
Fig 5- PCR amplified DNA fragments with the expected size (430 bp) using specific primers for *rol*B gene of *A. rhizogenes* on Chicory hairy root DNA. 1: 1 kb DNA ladder, 2-8: amplified fragments from DNA of hairy root clones induced by A4 strain. 9: no PCR product from normal Chicory root DNA, 10: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

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، مبین وجود ژن خارجی مورد نظر در مواد گیاهی می‌باشد. همانگونه که قبلا ذکر گردید، ظهور ریشه‌های مویین ناشی از آگروباکتریوم رایزوژنز، 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 *rol*A، *rol*B و

*rol*C هستند، انجام داد (Krolicka *et al.*, 2001).

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به انجام رسید.



شکل 6- تکثیر قطعه DNAی منطبق بر اندازه مورد انتظار (612 bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C آگروباکتریوم رایزوژنز بر روی DNA ریشه‌های مویین کاسنی: 1: نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی ، 2-8: قطعه تکثیر شده از DNAی کلون‌های ریشه مویین حاصل از سویه A4، 9: عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNAی 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 *rol*C 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 byoverexpression of Arabidopsis vacuolar Na(+)/H(+) antiporter geneAtNHX1 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 stilbenoidsarachidin-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 PJT Purcell JP (2001). Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tabacco 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). Mercel dekker Inc.new York. 4: 143-162

Geier T, Sangwan RS (1996). Histology and chimeral segregationreveal 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, Prasal B, Chayapathy N, Gururaj HB, Ravishahnkar 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. Boletin de la RealSociedad Espanola 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 *Hyoscyamusmuticus*. 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 onproduction 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 Amnlonia-Lyase Gene.Plant Biotechnolog 15: 189-193.

Tepfer D (1984). Transformation of several species of highplants 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 Agricultureal 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 *rol*B and *rol*C 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