قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی چهار گونه گیاهی از خانواده سولاناسه پس از القا شدن با سویه‌هایی از باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*

زهرا شاکران و مهرناز کیهان‌فر*

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۳

چکیده

تشکیل ریشه‌های مویین به وسیله انتقال ژنهای خاصی از پلاسمید باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* به ریزنمونه‌های گیاهی صورت می‌گیرد. استفاده از این ریشه‌ها سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی می‌شود. یکی از مهم ترین عواملی که باعث عدم تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های گیاهی پس از مجاورت با سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* می‌شود، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها است. علت قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی احتمالاً آزاد شدن ترکیبات فنولی از محلهای زخم ریزنمونه‌ها و یا به منظور اجرای مکانیسمهای دفاعی توسط سلولهای گیاهی به منظور مقابله با آلودگی به وسیله باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* می‌باشد. در پژوهش حاضر، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی چهار گونه گیاهی از خانواده *سولاناسه* شامل (*آتروپا بلادونا*، *هیوسیاموس نایجر*، *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل*) پس از آلودگی با سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم رایزوژنز* (A4, AR9402 , A7 , AR9543 , AR15834, AR318) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که در هر چهار گونه گیاهی، کمترین میزان قهوه‌ای شدن (۲ و ۶ درصد) در ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه‌های A4 و AR15834 مشاهده گردید. بنابراین، استفاده از این دو سویه برای القای ریشه‌های مویین در گونه‌های مربوط به خانواده *سولاناسه* مناسب‌تر است.

واژه های کلیدی: ریزنمونه‌های برگی، *آگروباکتریوم رایزوژنز*، قهوه‌ای شدن، ریشه‌های مویین، *سولاناسه*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۴۴۰۲، پست الکترونیکی: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

مقدمه

در کشورهای درحال توسعه، گیاهان به عنوان مهم ترین منبع دارویی به حساب می‌آیند و مطابق با بیانیه سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد افرادی که در این کشورها زندگی می‌کنند (که تقریباً معادل ۴ میلیارد نفر هستند)، از داروهای سنتی برای اولین مرحله درمان بیماری خود استفاده می‌کنند (۱۹). بنابراین راهبردهای مختلفی برای بیوسنتز و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی فراهم آمده است. اغلب این راهبردها بر پایه استفاده از روشهای مرتبط با زیست فناوری طراحی شده‌اند (۲). تشکیل ریشه‌های مویین به وسیله انتقال ژن از پلاسمید باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* (*Agrobacterium rhizogenes*) به ریزنمونه‌های گیاهی صورت می‌گیرد. استفاده از این ریشه‌ها سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی شده است (۹). استرینهای بیماریزای *آگروباکتریوم* دارای پلاسمید ۲۰۰Kb هستند که نقش اساسی در القای تومور (که به همین دلیل پلاسمید Ti نامیده می‌شود و مربوط به باکتری *آگروباکتریوم تومی‌فشنس* (*Agrobacterium Tumifacience*) می باشد) و یا القای ریشه (مرتبط با پلاسمید Ri در باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* است) دارد. مهمترین قسمت این

پلاسمید ناحیه T-DNA است که به صورت پایدار داخل ژنوم هسته گیاهی وارد می‌شود (۵ و ۳۱). *آگروباکتریوم* باعث انتقال ژنهای *aux* و *ags* به سلول میزبان شده و بنابراین باعث رشد سریع و تولید اپین می‌گردند (۲۰). اولین پروتئینی که در فعالیت انتقال T-DNA درگیر است، *VirA* است که یک پروتئین حسگر دوتایی عبورکننده از غشاست (Dimeric Transmembrane sensor) و مولکولهای سیگنالی را شناسایی می‌کند. این مولکولهای سیگنالی عمدتاً ترکیبات فنولی کوچک مانند استوسیرینگون (Acetosyringone) هستند که از گیاه مجروح آزاد می‌شوند (۳۰).

یکی از مهم ترین عواملی که باعث عدم تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های گیاهی پس از مجاورت با سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* می شود، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌هاست. در مطالعه‌ای که برروی تولید ریشه های مویین گیاه باباآدم انجام گرفته ریزنمونه‌ها پس از آلوده شدن با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* در برخی از موارد قهوه‌ای شدند. در این تحقیق علت قهوه‌ای شدن وجود ترکیبات فنولی فراوان در این گیاه عنوان شده است (۲۸).

در تحقیقی که بر روی ریزنمونه‌های *فالانوپسیس ویولاسه* (*Phalaenopsis violacea*) انجام گرفته است ریزنمونه‌ها پس از مجاورت با باکتری *آگروباکتریوم تومی‌فشینس* قهوه‌ای شدند (۲۹). این پدیده مشابه پاسخ دفاعی گیاه به استرسهای زنده و غیرزنده در شرایط طبیعی می باشد و آن را می توان به مکانیسمهای دفاعی و مقاومت گیاه در برابر آلودگی با باکتری *آگروباکتریوم تومی‌فشینس* نسبت داد. همچنین مشخص شده است که گیاهان می‌توانند بیان ژنهای خود را در پاسخ به آلودگی به وسیله *آگروباکتریوم* تنظیم نمایند و این باکتری می‌تواند موجب راه‌اندازی ماشین دفاعی گیاه گردد (۷). نکروزه شدن و مرگ سلولهای گیاهی، یکی از دلایل مهم کاهش کارآمدی ترنسفورماسیون با واسطه *آگروباکتریوم* است (۱۶). قهوه‌ای شدن سبب کاهش بازده تولید ریشه‌های مویین و مرگ ریزنمونه‌های برگی می‌شود، که این مورد خود از عوامل مهم کاهش متابولیت‌های ثانویه به‌شمار می‌آید. در مطالعه حاضر، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی چهار گونه گیاهی از خانواده *سولاناسه* (*Solanaceae*) شامل (*آتروپا بلادونا*(*Atropa belladonna*) ، *هیوسیاموس نایجر* (*Hyoscyamus niger*) ، *داتورا استرامونیوم* (*Datura stramonium*) و *داتورا متل* (*Datura metel*)) پس از آلودگی با سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم رایزوژنز* (AR318 ,AR15834 , AR9543 , A7 , AR9402 ,A4) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مراحل تولید ریزنمونه‌های برگی و مجاورت آنها با *آگروباکتریوم رایزوژنز*: به منظور آلوده سازی ریزنمونه‌های ریشه‌ای چهار گونه گیاهی از خانواده سولاناسه (*آتروپا بلادونا*، *داتورا استرامونیوم*، *داتورا متل* و *هیوسیاموس نایجر*)، به وسیله سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* (AR318, AR15834, AR9543, A7, AR9402, A4) و بررسی میزان قهوه ای شدن در این ریزنمونه‌ها، مراحل آزمایش به شرح زیر اجرا گردید:

کشت بذور به منظور تولید گیاهچه: بذرهای هر چهار گونه گیاهی با آب و مایع ظرفشویی شستشو داده شدند و به این وسیله گرد و خاک و مواد اضافی اطراف بذرها زدوده گردید. سپس بذور در زیر هود استریل داخل اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند و پس از آن در هیپوکلریت سدیم (v/v) ۲۵ درصد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند تا هنگامی‌که هیپوکلریت سدیم از روی پوسته بذور دفع گردد. سپس بذرها بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) استریل قرار داده شدند و به‌منظور جوانه‌زنی به اتاقکهای

رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی مطلق منتقل گردید.

تهیه ریزنمونه برگی: گیاهچه‌های ۱۵ روزه مربوط به هر چهار گونه گیاهی انتخاب شد و پس از آن در شرایط استریل نمونه‌های برگی از هر کدام از این گیاهان جداسازی گردید. نمونه‌های برگی به قطعات کوچک ۱-۰/۵ سانتیمتر برش داده شد و خراشهای ریزی هم به وسیله اسکالپل برای افزایش سطح زخمی در آن ایجاد گردید تا به این وسیله نفوذ *آگروباکتریوم رایزوژنز* به آن بهتر و بیشتر صورت پذیرد. قطعات برگی به گونه‌ای برش داده شدند که آوند بزرگ مرکزی در تمام ریزنمونه‌ها موجود باشد، زیرا این آوندها مکان مناسبی برای جذب مواد مغذی از محیط کشت هستند. همچنین سعی شد برای تهیه ریزنمونه از برگهای جوان‌تر استفاده شود.

فعال و آماده سازی سویه‌های *آگروباکتریوم رایزوژنز* جهت آلوده نمودن ریزنمونه‌ها:

در شرایط استریل سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم* رایزوژنز که بر روی محیط کشت جامد LB به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده بودند انتخاب شدند. برای تهیه یک لیتر محیط کشت LB از تریپتوفان (۱۰ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۵ گرم در لیتر) و کلرید سدیم (۱۰ گرم در لیتر) محلول در آب دیونیزه استفاده شد. سپس pH بر روی عدد ۷ تنظیم گردید و برای تهیه محیطهای کشت جامد از آگار (۲۱ گرم در لیتر) استفاده شد. جهت استریل نمودن محیط کشت، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و با فشار ۱ اتمسفر درون اتوکلاو قرار داده و پس از سرد شدن، از آنتی‌بیوتیک ریفامپین (۵۱ میلی‌گرم در لیتر، به صورت حل شده در متانول) به منظور انتخاب گزینشی رشد باکتری استفاده گردید. پس از آن یک کلنی از باکتری *A. rhizogenes* کشت شده بر روی محیط کشت جامد LB در شرایط استریل انتخاب و در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB قرار داده شد. این محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک ریفامپین است که به جهت جلوگیری از رشد سایر باکتریها استفاده می گردد. سپس این محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت برروی همزن الکتریکی، (ساخت شرکت Infotce, gerhardt) با دور ۱۲۰rpm و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رشد و فعال شدن باکتریها و مشاهده ایجاد کدورت مناسب در داخل محیط کشت، غلظت سوسپانسیون باکتری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (OD600) تعیین شد و بر روی عدد ۰/۶ تنظیم گردید.

روش آلوده نمودن ریزنمونه‌های برگی به وسیله باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*: در این مرحله ریزنمونه‌های برگی تهیه شده در شرایط استریل درون سوسپانسیون LB حاوی باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. هر کدام از این ریزنمونه‌های مربوط به چهار گونه گیاهی در محلول حاوی سویه خاصی از باکتری قرار گرفتند. پس از اتمام مدت زمان مجاورت، ریزنمونه‌ها از داخل محلول خارج شده و بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند و باقیمانده سوسپانسیون باکتریایی اطراف ریزنمونه‌ها حذف گردید. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد ۱/۲MS منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت باکتری و به صورت همکشت با آن در اتاق رشد و در دمای ۲۷ درجه و با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. همزمان با آن، تعدادی از ریزنمونه‌های برگی به عنوان نمونه کنترل در مقدار اندکی از محیط کشت LB فاقد باکتری با شرایط مشابه قرار داده شدند و پس از آن به محیط کشت جامد ۱/۲MS منتقل گردیدند.

انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک به منظور حذف *آگروباکتریوم رایزوژنز*: پس از ۴۸ ساعت به منظور حذف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*، ریزنمونه‌های برگی به محیط کشت جامد ۱/۲MS حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انتقال یافتند.

در واکشتهای بعدی از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم استفاده شد (۱). برای ریزنمونه‌های کنترل نیز مراحل مشابهی اجرا گردید.

بررسی میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های برگی پس از آلوده شدن به وسیله‌ی *آگروباکتریوم رایزوژنز*: مشاهده روزانه جهت بررسی میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های برگی هر چهار گونه گیاهی آلوده شده با استرینهای مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* انجام گرفت و درصد قهوه‌ای شدن در این ریزنمونه‌ها محاسبه گردید. تمامی آزمایشات همراه با سه تکرار بود و آنالیز آماری داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) انجام گرفت. مقایسه میانگینهای سه تکرار به روش Duncan's با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

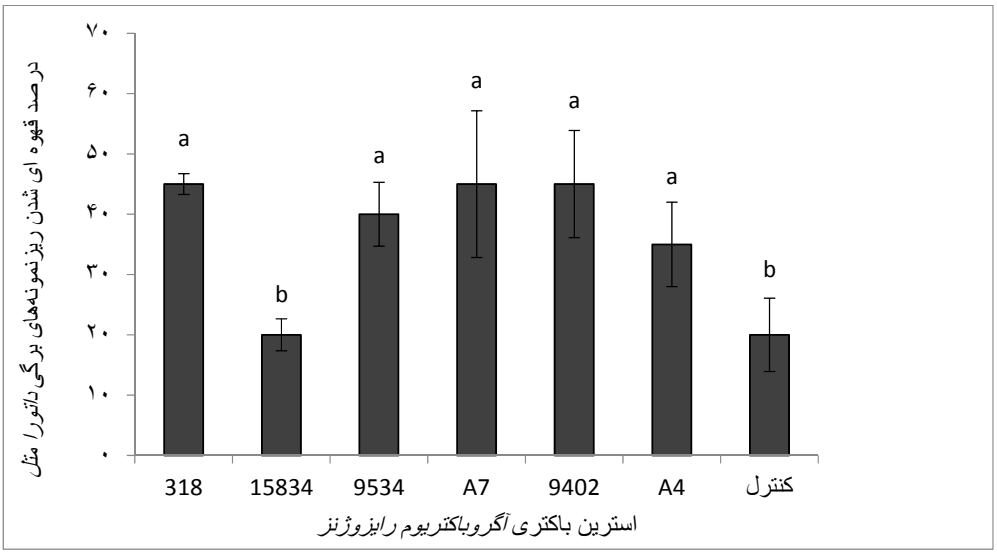
بررسی تأیید مولکولی تشکیل ریشه‌های مویین: DNA ژنومی ریشه‌های طبیعی گیاهان مورد بررسی (به عنوان کنترل منفی) و ریشه‌های مویین احتمالی، با اجرای روش CTAB استخراج گردید (۸). همچنین DNA پلاسمید باکتریایی *A. rhizogenes* (به عنوان کنترل مثبت) به وسیله روش سمبوروک حاصل شد و مورد استفاده قرار گرفت (۲۶). حضور T-DNA وارد شده به ژنوم در نمونه‌های تراریخته احتمالی با اجرای روش PCR مورد تأیید واقع شد. پرایمرهای رفت و برگشت PCR جهت چرخه تکثیر ژن *rolB* به کار گرفته شد. توالی این پرامرها بصورت: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' و 5'-TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' بود. PCR در شرایط بهینه شامل: ۲ نانوگرم DNA ژنومی با حجم ۲ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (۵Units/µl) ، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) ، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) ، ۲ میکرولیتر بافر Taq ۱۰x، ۱ میکرولیتر هر پرایمر (۱ میلی‌مولار) ، ۱۱/۱ میکرولیتر ddH_2O استریل بوده و با حجم کلی برابر با ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. PCR با ۳۵ چرخه دمایی اجرا گردید و هر چرخه به ترتیب شامل: ۹۴ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) ، ۵۸ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) بود.

نتایج

مقایسه میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی پس از آلوده سازی آنها به وسیله سویه‌های باکتریایی *آگروباکتریوم رایزوژنز*: برخی از ریزنمونه‌های برگی پس از آلوده شدن با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* قبل از رسیدن به فاز تولید ریشه‌های مویین قهوه‌ای شدند و بدین وسیله از دسترس خارج گردیدند. ریزنمونه‌های برگی حاصل از گیاه *هیوسیاموس نایجر*، پس از آلوده شدن با این باکتری به طور کامل قهوه‌ای شدند و بنابراین ریشه مویین از این نمونه‌ها به دست نیامد اما سه گونه گیاهی دیگر شامل *آتروپا بلادونا*، *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل* درصد متفاوتی از قهوه‌ای شدن را نشان دادند. نمودارهای مربوط به درصد قهوه‌ای شدن این ریزنمونه‌ها در هر سه گونه ترسیم گردید (شکلهای۱، ۳ و ۵) که به ترتیب مربوط به گونه‌های گیاهی *آتروپا بلادونا*، *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل* است.

مقایسه‌ی میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی در گیاه *آتروپا بلادونا*: همان طورکه در شکل ۱ نشان داده شده، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی که مورد آلوده‌سازی سویه‌های باکتریایی AR318, A7, AR9402 واقع شده‌اند با فراوانی ۴۵ درصد دارای بیشترین میزان قهوه‌ای شدن هستند همچنین سویه‌های AR9402 و A4 به ترتیب با فراوانی ۴۰ و ۳۵ درصد پس از سویه‌های ذکر شده قرار می‌گیرند، و کمترین میزان قهوه‌ای شدن برای سویه AR15834 با فراوانی۲۰ درصد دیده می‌شود که با میزان قهوه‌ای شدن نمونه شاهد برابر است. در شکل ۲،

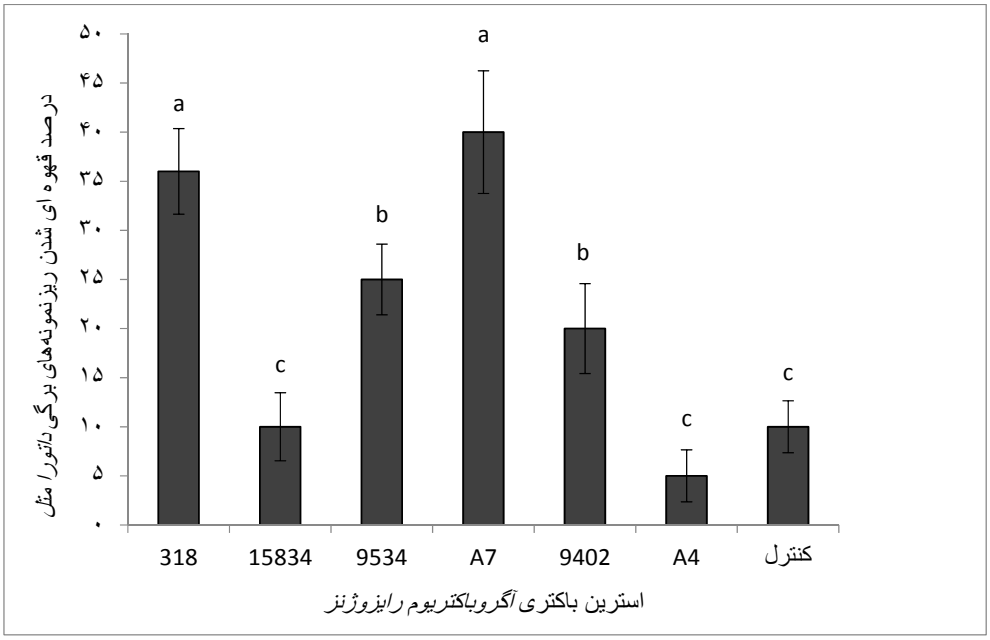
قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه A7 و ریزنمونه‌های گیاه شاهد مشاهده می‌گردد.



شکل ۱- نمودار درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی گیاه *آتروپا بلادونا* پس از آلوده شدن با سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*. مقادیر، میانگینهای سه تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

شکل ۲- الف- قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های برگی *آتروپا بلادونا* پس از آلودگی با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*، سویه A7. ب. قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی شاهد.

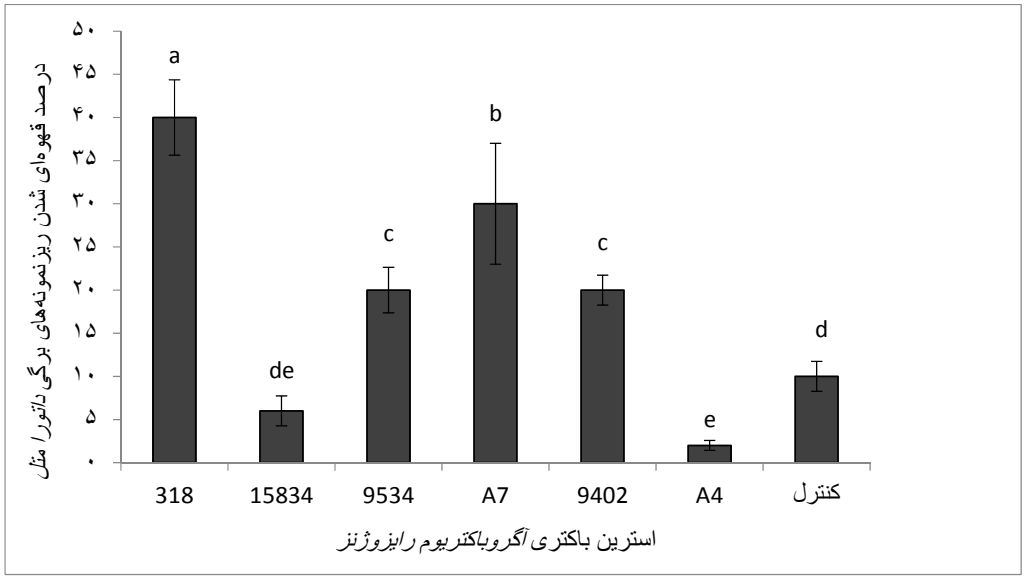
مقایسه میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی در گیاه *داتورا استرامونیوم*: همان طورکه در شکل ۳ نشان داده شده، ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه‌های باکتریایی AR318 و A7 به ترتیب با درصد فراوانی ۳۶ و ۴۰ درصد دارای بیشترین میزان قهوه‌ای شدن هستند. ریزنمونه‌های آلوده شده با سویه‌های باکتریایی A4 و AR15834 دارای کمترین میزان قهوه‌ای شدن می باشند، به ترتیب با درصد فراوانی ۱۰ و ۵ درصد، می‌باشند و برای انتقال ژن مناسب‌ترهستند. میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های شاهد نیز ۱۰ درصد است و بنابراین ربزنمونه‌های آلوده شده با سویه A4، حتی از ریزنمونه‌های شاهد نیز درصد قهوه‌ای شدن پایین‌تری را نشان می‌دهند. در شکل ۴، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه A7 و ریزنمونه‌های گیاه شاهد مشاهده می‌گردد.



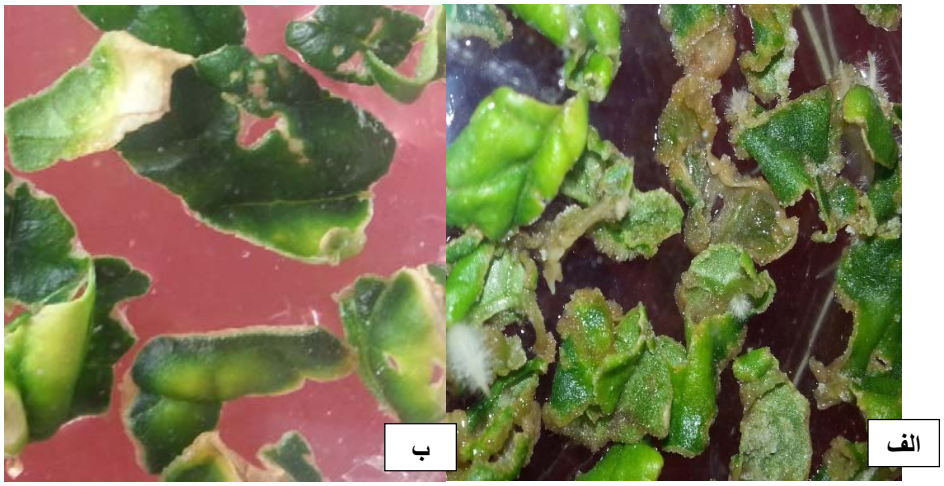
شکل ۳- نمودار درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی گیاه *داتورا استرامونیوم* پس از آلوده شدن با سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*. مقادیر، میانگینهای سه تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

شکل ۴- الف- قهوه ای شدن برخی از ریزنمونه‌های برگی *داتورا استرامونیوم* در کنار تولید ریشه‌های مویین پس از آلوده شدن با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*، سویه A7.. ب- قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی شاهد.

مقایسه‌ی میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی در گیاه *داتورا متل*: همان طورکه در شکل ۵ نشان داده شده، ریزنمونه‌های برگی حاصل از آلوده شدن با سویه‌های AR318 و A7 به ترتیب با فراوانی ۴۰ و ۳۰ درصد دارای بیشترین میزان قهوه‌ای شدن هستند. اما ریزنمونه‌های برگی حاصل از آلوده‌سازی با سویه‌های AR15834 و A4 دارای کمترین میزان قهوه‌ای شدن می‌باشند که به ترتیب دارای فراوانی ۲ و ۶ درصد هستند. با توجه به این نتایج دو سویه AR15834 و A4 برای انتقال ژن مناسب‌ترهستند. در ریزنمونه‌های آلوده شده با سویه A4 درصد فراوانی قهوه‌ای شدن آن ۲ درصد بود، که با توجه به درصد قهوه‌ای شدن نمونه‌های کنترل (۱۰ درصد) میزان قهوه‌ای شدن در این نمونه‌ها قابل چشم پوشی است. در شکل ۶، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه A7 و ریزنمونه‌های گیاه شاهد مشاهده می‌گردد.



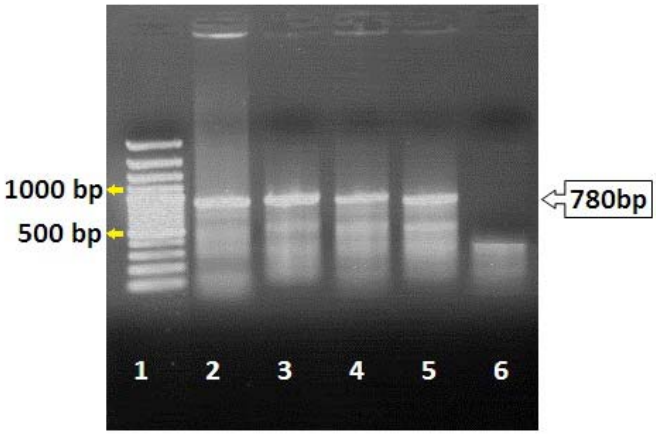
شکل ۵- نمودار درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی گیاه *داتورا متل* پس از آلوده شدن با سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*. مقادیر، میانگینهای سه تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۶- الف- قهوه ای شدن برخی از ریزنمونه‌های برگی *داتورا متل* در مجاورت ریزنمونه‌های برگی تولید کننده ریشه‌های مویین در این گیاه پس از آلوده شدن با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*، سویه A7. ب- قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگی شاهد.

نتایج تأیید تشکیل ریشه‌های مویین به روش PCR:

روش PCR حضور ژن *rolB* را در نمونه‌های ریشه‌ای تراریخته احتمالی در ناحیه ۷۸۰bp تأیید نمود. DNA پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* (به عنوان کنترل مثبت) جهت تأیید حضور ژنهای *rolB* بر روی قطعات DNA (۷۸۰bp)، مورد استفاده قرار گرفت. در حالی که DNA ژنومی ریشه‌های طبیعی به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شد که هیچ محصول تکثیر یافته‌ای از ژن *rolB* در ناحیه ۷۸۰bp را بر روی ژل الکتروفورز ظاهر نمی‌نماید (۲۴). به عنوان نمونه DNA ژنومی ریشه‌های مویین گیاه *D. metel* که به وسیله سویه‌های باکتریایی ۱۵۸۳۴ ، A7 و A4 القاء شده بودند و همچنین DNA ژنومی ریشه‌های طبیعی این گیاه به عنوان کنترل منفی و DNA پلاسمید Ri سویه ۱۵۸۳۴ به عنوان کنترل مثبت بر روی ژل الکتروفورز قرار داده شد و نتایج آن در شکل ۷ مشاهده می‌شود.



شکل ۷. بررسی مولکولی به روش PCR جهت تکثیر ژن *rolB* و ظهور باند مرتبط با نمونه‌های تراریخته و کنترل مثبت در ناحیه ۷۸۰ bp بر روی ژل الکتروفورز. باند ۱: DNA مارکر؛ باند ۲، ۳و ۴: ژن *rolB* در DNA ریشه‌های مویین گیاه *D. metel* (به ترتیب، القا شده توسط سویه‌های باکتریایی ۱۵۸۳۴ ، A7 وA4)؛ باند ۵: کنترل مثبت (DNA پلاسمیدی سویه ۱۵۸۳۴)؛ ناحیه ۶: کنترل منفی مربوط به ریشه‌های طبیعی گیاه *D. metel*.

بحث

برخی از ریزنمونه‌های برگی سه گونه گیاهی *آتروپا بلادونا*، *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل* و همه ریزنمونه‌های برگی گونه *هیوسیاموس نایجر* پس از آلودگی با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز (, AR15834 A4, AR9402 , A7 , AR9543 و AR318) قهوه‌ای شدند و توانایی تولید ریشه‌های مویین را از دست دادند. کمترین میزان قهوه‌ای شدن در بین کل ریزنمونه‌های برگی مربوط به ریزنمونه‌های *داتورا متل* پس از آلوده شدن با سویه‌های A4 و AR15834 اتفاق افتاد، که میزان آن به ترتیب ۲ و ۶ درصد هستند. در ریزنمونه‌های برگی گیاه *داتورا استرامونیوم* هم پس از آلوده شدن با دو سویه‌ی A4 و AR15834 کمترین میزان قهوه‌ای شدن مشاهده شد که به ترتیب برابر با ۵ و ۱۰ درصد هستند. ریزنمونه‌های برگی گیاه *آتروپا بلادونا* پس از اجرای عملیات القایی با سویه AR15834 دارای کمترین میزان قهوه‌ای شدن (۲۰ درصد) در مقایسه با اثر سایر سویه‌ها هستند. همین امر نشان‌دهنده یکی از شاخصهای برتری سویه‌های A4 و AR15834 در القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگی است (شکلهای۱، ۳ و ۵).

آلوده شدن بافتهای گیاهی به وسیله سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم* در موارد متعدد سبب نکروزه و قهوه‌ای شدن بافتهای گیاهی می‌شود. یکی از دلایل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها پس از آلوده شدن توسط باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* وجود ترکیبات فنولی و اکسید شدن آن توسط آنزیم پلی‌فنول اکسیداز ذکر شده است. این آنزیم در بافتهای گیاهی مسئول قهوه‌ای شدن آنها می باشد و نقش با اهمیتی در کنترل فرآیندهای اکسیداتیو دارد. این واکنشها در تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر درگیر هستند که خود منجر به فعال شدن مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Programmed cell death (PCD)) و تولید سدی از سلولهای مرده در جایگاه‌های آلوده می‌شوند و باعث عدم تولید ریشه‌های مویین در این نواحی است. فعالیت پلی‌فنول اکسیداز تحت شرایط تنش‌زا مانند آسیب مکانیکی و تغییر موقعیت بیوشیمیایی و به عنوان پاسخهای دفاعی گیاه به استرسهایی نظیر حضور باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* افزایش می‌یابد. همچنین پاسخهای آپوپتوتیک (Apoptotic Response) شامل نکروزه شدن سریع بافتها و شکسته شدن DNA هسته‌ای و تولید قطعات با اندازه‌ای در حدود الیگونوکلئوزوم‌هاست که توسط اندونوکلئازها و طی آبشار کاسپاز- پروتئاز ایجاد می‌شوند. بیان دو ژن سرکوب

کننده مرگ سلولی شامل p35 و iap به طور چشمگیری سبب مهار نکروز بافتی و شکستهای اندوژنی DNA می‌گردد (۶، ۱۲، ۱۴، ۲۲، ۲۸ و ۲۹).

واکنشهای افزایش حساسیت (Hypersensitive Reaction (HR))، به عنوان یکی از پاسخهای دفاعی گیاه مورد بحث قرار می‌گیرد و به طورکلی با خصوصیاتی نظیر مرگ سلولی موضعی و سریع اطراف محل آلوده شده و تجمع عوامل ضد میکروبی در محل شناخته می‌شود (۲۵). این حالت به صورت مجموعه‌ای از وقایع متوالی سبب نکروزه شدن و تخریب سلولها می‌گردد. نکروزه و مرگ سلولی ممکن است در لایه سلولی که در آن T-DNA وارد شده است اتفاق افتد و یا ممکن است از باززایی سلولهای تراریخته که از یک چنین بافتهای نکروزه شده‌ای جدا شده‌اند ممانعت شود، بنابراین حصول کلون‌هایی با سلولهای تراریخته کاهش می‌یابد. همچنین بافتهای نکروزه شده، محلی برای تجمع عوامل ضد میکروبی می‌شود که ممکن است پتانسیل انتقال T-DNA را به سلولها کاهش دهد. سیگنالهای شیمیایی فعالی که آزاد شده و سبب القای ژنهای *Vir* در *آگروباکتریوم* می‌شوند، تنها از سلولهای زنده رها می‌گردند و سلولهای نکروزه شده مرده یک چنین توانایی را ندارند. به‌علاوه، سلولهای نکروزه شده مرده ممکن است در شرایط آزمایشگاهی توسط میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب مورد حمله قرار گیرند و سبب آلودگیهای جدی و درنتیجه مهار باززایی گیاه شوند. بنابراین نکروز در بافتهای گیاه میزبان در طول انتقال T-DNA با واسطه *آگروباکتریوم* بطور چشمگیری سبب کاهش کارآمدی فرآیند انتقال ژن می‌شود (۱۵، ۱۶).

در برخی از مطالعات انواع ریزنمونه‌های مربوط به گیاهان مختلف پس از آلوده شدن با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* درصدهای متفاوتی از قهوه‌ای شدن را نشان دادند (۲۳، ۲۴، ۳۲) و این خود دلیلی بر تأثیر ژنوتیپ گیاه و سویه باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* استفاده شده در میزان قهوه‌ای شدن دارد.

در مورد چهار گونه گیاهی مربوط به خانواده سولاناسه در مطالعه حاضر، ریزنمونه های برگی گونه *هیوسیاموس نایجر* پس از مجاورت با سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم رایزوژنز* به طور کامل قهوه‌ای شده و از دسترس خارج گردیدند. ریزنمونه‌های برگی *آتروپا بلادونا*، پس از آلوده شدن با تمامی سویه‌ها به جز سویه ۱۵۸۳۴، نسبت به نمونه شاهد، درصد قهوه‌ای شدن آنها افزایش یافت. همچنین در ریزنمونه های برگی دو گونه گیاهی *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل* بعد از مجاورت با سویه‌های مختلف این باکتری، به جز دو سویه ۱۵۸۳۴ و A4، افزایش قهوه‌ای شدن مشاهده می‌گردد. کاهش قهوه‌ای شدن توسط سویه A4 در ریزنمونه‌های برگی *داتورا متل* نسبت به نمونه شاهد به صورت معنی‌داری، محسوس است.

در مطالعه‌ای که توسط Kabirnataj و همکاران در سال ۲۰۱۳ اجرا گردید، از سویه‌های مختلف باکتری *آگروباکتریوم* برای القای ریشه‌های مویین در گیاه *سیکوریوم اینتیبوس* (*Cichorium intybus L.*) استفاده شد و مشخص گردید که میزان قهوه‌ای شدن به وسیله سویه AR15834 کاهش یافته و در بقیه سویه‌ها افزایش قهوه‌ای شدن دیده شد. این گروه دلیل تفاوت را حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلولهای تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژنهای T-DNA باکتری در سلولهای گیاهی بیان کرده است (۱۳).

بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن به واسطه *آگروباکتریوم* ممکن است نیازمند شناخت مکانیسمهای تنظیم کننده واکنش نکروزه شدن القا شده توسط *آگروباکتریوم* در گیاهان باشد. بنابراین شناسایی سیگنالهای شیمیایی موجود بین آگروباکتریوم و سلول گیاهی دارای اهمیت می‌باشد (۴) ، که این سیگنالها در بین سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم* متفاوت است و به صورت کاملاً اختصاصی برای هر سویه

عمل می‌نماید و توسط ژنوتیپهای اختصاصی گیاهی نیز شناسایی می‌شوند. هر سلول گیاهی مستعد برای پذیرش *آگروباکتریوم* (سلول شایسته) حاوی مکانهای اتصالی پلی‌ساکارید – پلی‌ساکاریدی قابل شناسایی توسط آگروباکتریوم است (۱۱، ۱۶).

در پژوهشی که توسط شیرازی و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، مشخص گردید که تیمار ریشه‌های مویین گیاه *شیرین‌بیان* به وسیله اسید سالیسیلیک با غلظت ۵۰۰ میکرومولار، سبب قهوه‌ای شدن این ریشه‌ها و کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه در اثر افزایش میزان ورود فلاونوئیدها به محیط کشت می‌شود (۲۷).

در مطالعات مختلفی، به‌منظور جلوگیری و یا کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها پس از آلوده شدن توسط باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* استفاده از ترکیباتی نظیر اسید آسکوربیک و اسید سیتریک (۲۱)، PVP (۳، ۱۰، ۱۷، ۱۸) و انواعی از آنتی‌اکسیدانها (۱۴) پیشنهاد شده است. همچنین تبدیل سلولهای غیرمستعد گیاهی به سلولهای مستعد پذیرش *آگروباکتریوم* به وسیله زخمی نمودن بافتهای گیاهی و افزودن استوسیرینگون و بهینه‌سازی شرایط پیش از کشت از روشهای ممکن جهت افزایش کارآمدی انتقال ژن با واسطه *آگروباکتریوم* و کاهش بافتهای نکروزه شده است (۱۶).

در پژوهش حاضر مشابه سایر تحقیقات، کمترین میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های القاء شده با سویه‌های A4 و AR15834 دیده می‌شود و این دو سویه باکتریایی می‌توانند به عنوان بهترین انتخاب جهت القای ریشه‌های مویین در گیاهان خانواده سولاناسه مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، برخی از ریزنمونه‌های برگی سه گونه گیاهی از خانواده سولاناسه شامل *آتروپا بلادونا*، *داتورا استرامونیوم* و *داتورا متل* و همه ریزنمونه‌های برگی گونه *هیوسیاموس نایجر* پس از آلوده شدن با سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم رایزوژنز* (, AR9543 , AR15834, AR318 A4, AR9402 , A7)، قهوه‌ای شده و توانایی تولید ریشه‌های مویین را از دست دادند. تفاوت در میزان قهوه‌ای شدن به وسیله استرینهای مختلف باکتری، می‌تواند به علت حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلولهای تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژنهای T-DNA باکتری در سلولهای گیاهی می‌باشد (۱۳). براین اساس در پژوهش حاضر کمترین میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های برگی آلوده شده با سویه‌های A4 و AR15834 مشاهده گردید. بنابراین به نظر می رسد استفاده از این دو سویه برای القای ریشه‌های مویین در گونه‌های مربوط به خانواده سولاناسه مناسب‌تر است.

منابع

1. Amdoun. R, Khelifi, L, Khelifi-Slaoui, M, Amroune, S, Benyoussef, E.H, Thi, D.V, Assaf-Ducrocq, C. Gontier, E. 2009, Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium L.* tropane alkaloid production: Modelization of the in vitro biochemical response. Plant Science. 117:81–87.
2. Asghari, Gh. 2006, Biotechnology of medicinal plants and herbal medicines production. ACECR- Isfahan Branch Publication, Iran (In Persian).
3. Bhatt, ID, Dhar, U. 2004, Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology. 3(10): 534 - 540.
4. Chilton, MD. 1993. *Agrobacterium* gene transfer: progress on a “poor man’s vector” for maize. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90: 3119-3120.
5. Chilton, MD, Saiki, RK, Yadav, N, Gordon, MP, Quetier, F. 1980, T-DNA from Agrobacterium Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 77:4060-4064.
6. Deng, W, Pu, XA, Goodman, RN, Gordon, MP, Nester, EW. 1995. T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines.

Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 538-548.

7. Ditt, R, Nester, EW, Comai, L. 2001. The plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98: 10954–10954.
8. Doyle, JJ, Doyle, JLA. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.
9. Guilon, S, Guiller, J, Ganter, P. 2006, Hairy root research: recent scenario and exeting prospects. Current opinion in plant boil. 9: 341-347.
10. Gupta, PK, Nadgir, AL, Mascarenhas, AF, Jagannathan, V. 1980, Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of *Tectona grandis L.* (Teak) by tissue culture. Plant Science Letter. 17: 259 – 268.
11. Habibi, S, Niknam, V, Ebrahimzadeh, H, Mirmasoumi, M. 2015, Comparison of hairy root induction by various strains of Agrobacterium rhizogenes in Astragalus compactus. Journal of plant researches. 27(5): 804 - 810.
12. Hansen, G. 2000. Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13: 649-657.
13. Kabirnataj, S, Ghotbiravandi, E, Rezanezhad, F, Shahin-kaleybar, B. 2013, The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Production of Chlorogenic Acid and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Cichorium intybus L.* Crop Biotechnology. 4: 69-76.
14. Krishna, H, Sairam, R.K, Singh, S.K, Patel, V.B, Sharma, R.R, Grover, M, Nain, L, Sachdev, A. 2008. Mngo explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae - Amsterdam Journal. 118: 132 - 138.
15. Kumria, R, Waie, B, Rajam, MV. 2001. Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite Indica rice via *Agrobacterium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 67: 63-71.
16. Kuta, D, Tripathi, L. 2005. Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. African Journal of Biotechnology. 4(8): 752-757.
17. Quraishi, A, Mishra, SK. 1998, Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. Plant Cell Report. 17: 430 - 433.
18. Ozyigit, I, Gozukirmizi, N. 2008, High efficiency shoot and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum L.*). Pakistan Journal of Botany. 40 (4): 1665 - 1672.
19. Palazón, J, Navarro-Ocaña, A, Hernandez-Vazquez, L. Mirjalili, M.H. 2008. Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. Molecules. 13, 1722-1742.
20. Petit, A, David, C, Dahl, GA, Ellis, JG, Guyon, P, Casse Delbert, F, Tempe, J. 1983, Further extension of the opine concept: plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* for opine degradation. Molecular and General Genetics. 190: 204-214.
21. Puchoo, D. 2004. *In vitro* regeneration of *lychee* (*Litchi chinensis Sonn*). African Journal of Biotechnology. 3(11): 576 – 584.
22. Pu, XA, Goodman, RN. 1992. Induction of necrosis by *Agrobacterium tumefaciens* on grape explants. Physiol. Molecular Plant Pathology.41: 245-254.
23. Putalun, W, Luealon, W, De-Eknamkul, W, Tanaka, H, Shoyama, Y. 2007. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua L.* Biotechnology Letters. 29: 1143 - 1146.
24. Rahnama, H, Hasanloo, T, Shams, M.R, Sepehrifar, R. 2008. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum (L.)* Gaertn. International Journal of Biomathematics. 6: 113 - 118.
25. Richter, TE, Ronald, PC. 2000. The evolution of disease resistance genes. Plant Molecular Biology. 42: 195-204.
26. Sambrook, J, Fritrsch, EF, MAniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manua manual. Cold spring laboratory press. Cold spring harbor, NY, 2028 pages.
27. Shirazi, Z, Piri, Kh, Mirzaie Asl, A, Hasanloo, T, Ghiasvand, T. 2014. The effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on production amount of Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin in hairy roots of Licorice (Glycyrrhiza glabra L.). Journal of plant researches. 27(3): 440 - 449.
28. Soleimani, T, Keyhanfar, M, Piri, KH, Hasanloo, T. 2012. Hairt root induction in Burdock (*Artium Lappa L.*). Journal of medicinal plants. 11(44): 176-184.
29. Sreeramanan, S, Vinod, B, Sashi, S, Xavier, R. 2008. Optimization of the transient Gusa gene transfer of *Phalaenopsis Violacea* Orchid via *Agrobacterium Tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. Advances in Natural and *Applied* Sciences. 2: 77 - 88.
30. Vogel, AM, Das, A. 1992. Mutational analysis of *Agrobacterium Tumefaciens* VirD2: tyrosine 29 is essential for endonuclease activity. Journal of Bacteriology. 174: 303-308.

31. Weisburg. W, Woese. C, Dobson, M, Weiss, E. 1985, A common origin of ricketssiae and certain plant pathogens. Science. 230: 556-558.
32. Zolala, J, Farsi, M, Girdan, HR, Mahmoodnia, M. 2007. Producing a high scopolamine hairy root union *Hyoscyamus Muticus* transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Agriculture Sciences in China. 9: 327- 339.

Leaf Explant Browning of Four Species of *Solanaceae* Family after Induction by *Agrobacterium Rhizogenes Species*

Shakeran Z. and Keyhanfar M.

Biotechnology Dept., Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The hairy root formation is performed by transferring of special genes of *Agrobacterium rhizogenes* plasmid's to the explants. These roots are used to increase of valuable pharmaceutical secondary metabolites. One of the most important factors that inhibits the hairy root formation after induction of explants by *A. rhizogenes* is browning. The cause of browning in leaf explants is probably release of phenolic compounds from the wound site or defense mechanisms performed in plant cells against infection by *A. rhizogenes*. In this study, the root explants of four species of *solanaceae* family including *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium* and *Datura metel* were induced by different strains of *A. rhizogenes* (AR318, AR15834, AR9543, A7, AR9402, and A4) and the percent of browning evaluated in these explants. For the results, the minimum percent (2% and 6%) of browning observed in leaf explants that induced by strains of A4 and AR15834 respectively. Hence, the use of these strains is appropriate for induction of hairy roots in the *solanaceae* family.

Keyword: Leaf explant, *Agrobacterium rhizogenes*, browning, hairy root, *solanaceae*.