فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ دوم/ پاییز و زمستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2019.5619.1337

اثر محیط‌کشت، سویه آگروباکتریوم و نور بر القاء ریشه موئین گیاه دارویی خشخاش

Effect of Medium Culture, Agrobacterium Strain and Light Condition on Hairy Roots Induction in Opium Poppy

علی قربانی[۱]، احمد اسماعیلی[۲*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۳] و سیده زهرا حسینی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۰۴

چکیده

یکی از مهم‌ترین گیاهان داروئی، جهت تولید آلکالوئیدهای داروئی، گیاه دولپه‌ای خشخاش *Papaver somniferum* L. می‌باشد. این گیاه تاکنون تنهاترین منبع تجاری برای داروهای ضددرد مورفینان، ضدسرفه کدئین، ضدمیکروب نوسکاپین و تبائین است. آگروباکتری باعث ایجاد بیماری ریشه موئین در محل زخم گیاهان می‌شود و بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه موئین می‌تواند باعث افزایش مقدار آلکالوئیدهایی شود که به‌طور طبیعی در ریشه گیاهان تولید می‌شوند. در این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی شرایط با راندمان بالاتر تحریک تولید ریشه موئین، دو آزمایش فاکتوریل مجزا برای دو نوع ریزنمونه اندام هوایی و هیپوکوتیل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا گردید. در هرکدام از این آزمایش‌های فاکتوریل، سه نوع فاکتور شامل اثر سه نوع سویه آگروباکتری رایزوژنسیس، دو نوع محیط‌کشت پایه (محیطB5 و ۱/۲B5) و دو شرایط نوری (۴۸ ساعت تاریکی کامل و ۱۶ ساعت تاریکی/ ۸ ساعت روشنایی) موردبررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که سویه AR15834 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را داشت و برای صفت تعداد شاخه جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین، بیش‌ترین انشعابات فرعی در تیمار باکتری AR15834 و محیط ۱/۲B5 مشاهده شد. نتایج آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل نشان داد که مقدار تحریک تولید ریشه موئین نسبت به ریزنمونه اندام هوایی بسیار کمتر بود و سویه AR15834 با شرایط ۴۸ ساعت تاریکی کامل بهترین تیمار است. درمجموع، نتایج این دو آزمایش نشان داد که ریزنمونه اندام هوایی پاسخ بهتری نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل دارد و در این ریزنمونه محیط ۱/۲B5 و سویه AR15834 بیش‌ترین مقدار تولید ریشه موئین را داشت.

واژه‌های کلیدی: محیط B5، آلکالوئید، مورفنیان، نوسکاپین، تبائین

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۴. مربی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران
*: نویسنده مسئول Email: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در جهان رو به افزایش است و حدود ۸۰ درصد از مردم جهان به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشاء گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد موثره گیاهان دارویی شده است (*جالسینگ*[1] و همکاران، 2007). شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان کشت شده توسط بشر است. خشخاش از آغاز تمدن بشری به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار گرفته است (*برون استین*[2]، 1993). آلکالوئیدهای ایزوکوینولین یک گروه ساختاری متنوع از ترکیبات اختصاصی گیاه شقایق است که سابقه طولانی در تحقیقات دارد. اگرچه نقش اکوفیزیولوژیکی بیشتر بنزیل ایزوکوینولین‌ها ناشناخته است؛ اما خواص دارویی بسیاری از این ترکیبات قرن‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. بنزیل ایزوکوینولین‌های دارویی در گیاه شقایق شامل مسکن کدئین، عوامل ضدمیکروبی بربرین و سانگویی‌نارین و داروی ضدسرفه و سرطان، نوسکاپین می‌باشند (*هاگل و فاچینی*[3]، 2013). دو نوع آلکالوئید نوسکاپین و مورفینان می‌توانند در ریشه این گیاه تجمع یابند و هرچند قسمت اعظم آن‌ها در لاتکس تجمع می‌یابد (*کوتچان*[4] و همکاران، 2008).

در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین میزان تولید اقتصادی نبوده و ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی به‌طور بهینه استفاده شود. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است، زیرا پتانسیل این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد (*هیو و دیو*[5]، 2006). کشت ریشه موئین نشان‌دهنده یک سیستم آزمایشی مناسب برای پژوهش‌های علوم گیاهی و فرآیندهای زیستی امیدوارکننده برای تولید بیشتر گیاهان دارویی و مواد مؤثره آن‌ها (که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه گیاهی‌اند) می‌باشد (*جی و ووه*[6]، 2005). سرعت بالای تولید و رشد ریشه موئین، آن را قادر ساخته که به‌عنوان یک سیستم در تنظیم مولکولی مسیر آلکالوئیدی گیاه شقایق استفاده شود (*پارک و فاچینی*[7]، 2000). از دیگر مزایای ریشه موئین این است که هر ریشه موئین تراریخته‌ای که از محل زخم خارج می‌شود به‌صورت یک کلون قابل‌تکثیر بوده و تکثیریافته‌ها نیز شبیه ریشه موئین اولیه است، ولی با این حال تنوع سوماکلونال در کشت ریشه‌های تراریخته نیز مشاهده شده است (*هاگل و فاچینی*، 2013).

آگروباکتریوم یک باکتری خاکزی گرم منفی است که به خاطر داشتن توانایی انتقال T-DNA پلاسمید Ri خود به ژنوم گیاه میزبان، سبب ایجاد بیماری ریشه موئین در گیاهان می‌شود. روی پلاسمید Ri این باکتری، ژن‌هایی به نام اُپین وجود دارد که تولید نوعی اسیدهای آمینه غیر متداول کرده که در تولید کربن، نیتروژن و انرژی برای انتقال پلاسمید ضروری هستند. پلاسمید Ri بسته به نوع ژن اُپین به سه کلاس آگروپین، منوپین وکوکومپین تقسیم می‌شود (*باترا*[8] و همکاران، 2004). ریشه‌های موئین توانایی رشد را حتی زمانی که از گیاه خارج می‌شوند را دارند. از دیگر ویژگی‌های ریشه موئین این است که در برخی گونه‌های گیاهی باززایی به این روش به آسانی صورت گرفته و به‌علاوه این روش باززایی از تشکیل کالوس جلوگیری کرده و تا حد قابل‌توجهی از ایجاد تنوع سوماکلونال جلوگیری می‌کند (*الپیزار*[9] و همکاران، 2008). برای اولین‌بار از آگروباکتریوم رایزوژنز سویه MAFF 03-01724 به‌منظور تراریختی ریز نمونه‌های هیپوکوتیل گیاه خشخاش در محیط MS بدون اکسین استفاده شد و در این راستا پروتکل مناسب تراریختی معرفی شد (*یوشیماتسو و شیمورا*[10]، 1992). توانایی سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در تراریختی و تولید ریشه موئین در گیاه خشخاش متفاوت است و بر این اساس بهتر است که سویه آگروباکتریوم خاص هرگونه گیاهی معرفی شود (*پارک و فاچینی*، 2000). در این راستا، در مطالعه دیگری شرفی و همکاران گزارش کردند که سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز و ریزنمونه‌های مختلف گیاهی، پاسخ متفاوتی به القاء ریشه موئین در گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*) نشان داد (*شرفی*[11] و همکاران، 2013). جنبه دیگر کاربرد کشت ریشه‌های موئین آن است که ریشه‌های موئین می‌توانند آلکالوئید بیشتری نسبت به ریشه‌های معمولی تولید کرده و به‌علاوه برخی از این آلکالوئیدهای تولید شده قادرند به درون محیط‌کشت انتشار پیدا کنند (*لی فلم بنهوم*[12] و همکاران، 2004). بررسی انجام شده حاکی از آن است که القای ریشه موئین سبب افزایش تجمع متابولیت ثانویه سیلی

1. Julsing
2. Brownstein
3. Hagel and Facchini
4. Kutchan
5. Hu and Du
6. Ge and Wu
7. Park and Facchini
8. Batra
9. Alpizar
10. Yoshimatsu and Shimomura
11. Sharafi
12. Le Flem.Bonhomme

مارین در گیاه خار مریم شد (رحیمی[1] و همکاران، 2001). هم‌چنین اعمال الیسیتور[2] می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مهم جهت تولید بیشتر متابولیت‌های زیستی در ریشه موئین به‌کار رود (*چانگ*[3] و همکاران، 2005).

با آن‌که در پژوهش‌های قبلی پروتکل‌هایی جهت تولید ریشه موئین در گیاه دارویی شقایق گزارش شده است، ولیکن در این پژوهش هدف آن بود که تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، محیط‌کشت پایه و تیمار نوری بر القاء و تولید ریشه موئین در گیاه دارویی شقایق جهت رسیدن به پروتکلی با راندمان بالاتر موردبررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بذرهای خشخاش از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شد. این بذور ابتدا در زیر هود لامینار به‌مدت ۶۰-۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰٪ استریل سطحی شد و سپس ۴-۳ بار با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو گردید. در مرحله‌ی بعد مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر هیپوکلرید سدیم (وایتکس) اضافه گردید و به‌مدت ۱۰-۸ دقیقه روی شیکر گذاشته شد و در نهایت بذور۱۰-۸ مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شد. سپس به‌طور میانگین۳۰ بذر ضدعفونی شده در هر شیشه حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط B5 (شامل محیط آماده B5 با غلظت ۳/۱۶ گرم در لیتر، ساکارز با غلظت ۲۰ گرم در لیتر و آگار با غلظت ۸ گرم در لیتر و با pH=۵/۸) کشت شدند. بعد از آن شیشه‌ها به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت به‌منظور تحریک جوانه‌زنی در یخچال ۴°C گذاشته شدند و سپس به اتاق کشت بافت با دمای ۲۵°C و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

آماده‌سازی باکتری

برای این منظور ابتدا محیط LB مایع تهیه شد و مقداری باکتری از استوک از قبل آماده شده به محیط‌کشت مایع اضافه کرده و این کشت به‌مدت یک شب در دمای ۲۸°C روی شیکر قرار داده شد تا به OD_{600}=0.5 برسد. سپس محیط B5 مایع (همان ترکیبات محیط B5 معمولی، ولی بدون آگار) را آماده کرده و باکتری‌ها را به‌مدت ۱۰-۸ ساعت در اتاقک رشد در دمای دمای ۲۸°C درجه گذاشته و به OD_{600}=1.0 رسیدند. تمامی سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز از بانک میکروب مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (NIGEB[4]) تهیه شد. از آن‌جا که سویه‌های باکتری رایزوژنز به آنتی‌بیوتیک ریفامسین مقاوم هستند، جهت جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها، به محیط‌کشت آماده‌سازی باکتری مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از این آنتی‌بیوتیک اضافه شد. به‌منظور رسوب باکتری محلول باکتری از دستگاه سانتریفوژ با rpm=۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰دقیقه استفاده گردید.

تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و اندام هوایی (شامل لپه‌ها و هیپوکوتیل) گیاهچه‌های ۱۰-۸ روزه به‌طور تصادفی توسط تیغ اسکالپل زخم شدند و به‌مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون سویه‌های AR15834، A4 و MSU شناور شدند. سپس محلول باکتری توسط سمپلر خارج گشته و نمونه‌ها به روی کاغذ صافی استریل انتقال داده شدند تا خشک شوند. بعد از عمل خشک شدن ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش ۹ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت پایه هم کشتی B5 و ۱/۲B5 انتقال یافتند. به‌دلیل توانایی بالای سویه‌ها در القاء ریشه موئین از تنظیم‌کننده‌های رشد و استوسیرینگون استفاده نشد. در طول این دوره برحسب نوع تیمارها دو شرایط نوری (یکی تاریکی کامل و دیگری تناوب نوری ۱۶ساعت تاریکی و ۸ ساعت نور) اعمال شد. دو روز بعد از زمان تلقیح به‌منظور حذف آگروباکتریوم ریزنمونه‌ها را شسته و به محیط‌های B5 و ۱/۲B5حاوی نمک، ویتامین‌ها، ۱۵گرم بر لیتر ساکاروز، ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۶ گرم در لیتر آگار انتقال داده شدند. هدف از استفاده آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط گزینش، حذف باکتری‌های سطحی ریزنمونه‌ها پس از تلقیح بود. بعد از آن ریزنمونه‌ها هر ۱۲-۱۰ روز به محیط جدید انتقال داده شدند.

طراحی آزمایش‌ها

در این تحقیق، دو آزمایش جداگانه به‌صورت فاکتوریل روی دو نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و اندام هوایی اجرا شد. آزمایش‌های فاکتوریل مذکور در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و هر پتری‌دیش حاوی هشت ریزنمونه معادل یک تکرار در نظر گرفته شد. فاکتورهای آزمایش شامل تیمار نوری (۴۸ ساعت تاریکی کامل و ۱۶ ساعت تاریکی/ ۸ ساعت روشنایی)، سویه‌های باکتری (سویه AR15834، A4 و MSU) و

1. Rahimi
2. Elicitor
3. Chong
4. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

محیط‌کشت پایه (محیط B5 و ۱/۲B5) بود. قابل ذکر است که در پتری‌دیش‌های شاهد تلقیحی صورت نگرفت. یاداشت‌برداری به‌صورت روزانه تا ۲۴ روز پس از تلقیح برای هر پتری‌دیش صورت گرفت. صفات درصد القاء ریزنمونه، میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریزنمونه، تعداد انشعابات فرعی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین و درصد القاء در طول دوره زمانی موردبررسی قرار گرفت. سه هفته پس از ظهور اولین ریشه‌های موئین از ریزنمونه‌های اندام هوایی و هیپوکوتیل، درصد ریزنمونه‌های که موفق به تولید ریشه موئین شدند نسبت به کل ریزنمونه‌های مورد آزمایش به‌طور جداگانه برای هر ترکیب تیماری محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه صفت سرعت ظهور ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی تلقیح شده با آگروباکتری، یادداشت‌برداری‌ها ۸ روز پس از تلقیح شروع شد و به‌صورت هر ۴ روز یک‌بار در طول یک دوره زمانی ۲۴ روزه ادامه یافت. جهت محاسبه تعداد انشعابات فرعی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین، در پایان دوره رشد یک سانتی‌متر از ریشه موئین به‌دست آمده برش داده و تعداد شاخه‌هایی که از آن خارج شده بود موردشمارش قرار گرفت. جهت تجزیه آماری داده‌ها، از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین (به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن) استفاده شد.

آنالیز PCR

ظهور ریشه‌های موئین ناشی از انتقال ژن‌های T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتری رایزوژنز به سلول‌های گیاهی می‌باشد. بنابراین بررسی تاریخته بودن ریشه‌های موئین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر روی T-DNA این باکتری (که عمدتاً ژن‌های *rol* هستند) انجام داد (*کرولیکا*[1] و همکاران، 2001). ازاین‌رو به‌منظور تأیید تاریخته ریشه‌های موئین، آزمایش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C و توسط دستگاه eppendorf termocycler gradient انجام شد. توالی نوکلوتیدی آغازگرها براساس منابع معتبر (*دونگ هوی لیو*[2] و همکاران، 2011) طراحی شد و از شرکت فزاپژوه سفارش ساخت داده شد. جهت استخراج DNA ژنومی ۵۰ میلی‌گرم ریشه موئین استفاده گردید و در ۲۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (۲۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۱۰۰ میلی‌مولار TRIS-HCL، ۰٫۵٪ SDS[3]، ۲۵ میلی‌مولار EDTA[4] و با pH=۸) همگن شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و محلول بالایی به یک ویال جدید انتقال داده شد و به همان اندازه به آن ایزوپروپانول اضافه گردید. محلول به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۲۰- گذاشته شد و بعد از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه در۱۳۰۰۰دور سانتریفوژ گردید. قسمت بالایی محلول را خارج کرده تا رسوب خشک شد و دوباره در ۱۰۰ میکرولیتر بافرTE حل شد. برنامه واکنش PCR برای *rol*C یک چرخه واسرشتگی در دمای 94°C به‌مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشتگی در دمای 94°C به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال 53°C به‌مدت یک دقیقه، دمای بسط 74°C به‌مدت یک دقیقه) و بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72°C بود. محصول PCR توسط ژل آگارز الکتروفورز یک درصد تهیه شده توسط TAE بافر 1x، مارکر 100bp و UV نور مشاهده و بررسی شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که به‌کارگیری سویه‌های مختلف، محیط‌کشت و هم‌چنین نور در تولید ریشه موئین در سطح یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۲). در خصوص آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل فقط برای صفت درصد القا ریشه موئین داده‌ای به‌دست آمد که نتایج تجزیه واریانس برای این آزمایش در جدول ۲ آمده است. نتایج مقایسه میانگین آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که ترکیب تیماری سویه AR15834، محیط ۱/۲B5 و شرایط نوری ۴۸ ساعت تاریکی مداوم، بیش‌ترین عملکرد را در تولید ریشه موئین داشت. هم‌چنین کم‌ترین درصد القاء ریشه موئین در سویه MSU، محیط‌کشت B5 و شرایط نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی مشاهده شد.

همان‌طورکه انتظار می‌رفت نتیجه واکنش PCR تکثیر باندی به طول ۶۲۶ جفت باز بود. در این واکنش از ریشه‌های غیرتراریخت حاصل از رشد طبیعی گیاه به‌عنوان شاهد واکنش PCR (کنترل منفی) استفاده شد و همان‌گونه که انتظار می‌رفت برای محصول واکنش PCR این واکنش روی ژل الکتروفورز باندی مشاهده نشد (شکل ۱).

درصد القاء ریزنمونه اندام هوایی

در بین سویه‌های مختلف، سویه AR15834 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را داشت و بعد از آن به‌ترتیب دو سویه A4 و MSU قرار داشتند. محیط ۱/۲B5 نسبت به B5 عملکرد بهتری را نشان داد. ریشه موئین‌های محیط ۱/۲B5با سرعت بیشتری رشد داشتند (شکل ۶). از بین دو تیمار نوری اعمال شده، تیمار ۴۸ ساعت نور کامل در زمان هم‌کشتی بهترین شرایط برای

1. Królicka
2. Dong.Hui Liu
3. Sodium dodesyl sulfat
4. Ethylenediaminetetraacetic acid

القاء بود. ترکیب تیماری سویه AR15834، محیط ۱/۲B5 و تاریکی ۴۸ ساعته بیش‌ترین درصد القاء را نشان داد (شکل ۲).

میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریزنمونه اندام هوایی

تعداد ریشه موئین‌هایی که از هر ریزنمونه در محیط B5 خارج شد بیشتر از محیط ۱/۲B5 بود. در بین تیمارهای نوری ریز نمونه اندام هوایی بیش‌ترین تعداد ریشه موئین را در تیمار تاریکی کامل (۴۸ ساعته) داشت. سویه AR15834 بیش‌ترین مقدار میانگین ریشه موئین در یک ریزنمونه اندام هوایی را داشت (شکل ۳).

تعداد شاخه‌های جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین ریزنمونه اندام هوایی

فرم رویشی ریشه‌های موئین دو سویه AR15834 و MSU به گونه‌ای بود که در یک سانتی‌متر از طول ریشه موئین، تعداد شاخه بیشتری را نشان داد و سویه A4 در سطح پایین‌تری قرار داشت. محیط‌کشت پایه تأثیر زیادی در افزایش یا کاهش تعداد شاخه جانبی سویه A4 نداشت. تیمار ۴۸ ساعت تاریکی نسبت به فتوپریود ۱۶/۸ در همه سویه‌ها بیش‌ترین شاخه جانبی را نشان داد (شکل ۴).

جدول ۱: توالی آغازگرها برای واکنش PCR

Table 1: Primers sequences for PCR

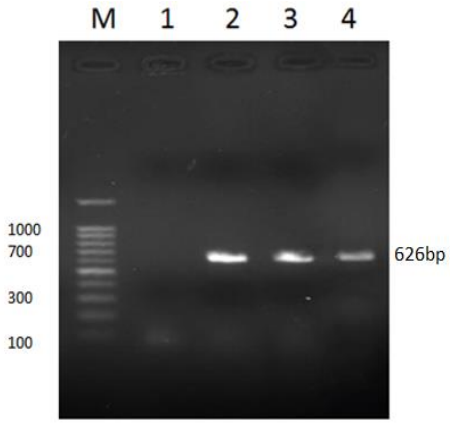
ژن Gene	آغازگر رفتی Forward primer	آغازگر برگشتی Reverse primer
*Rol*C	5′CTCCTGACATCAAACTCGTC3	5′TGCTTCGAGTTATGGGTACA3'

درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل

در این آزمایش بهترین محیط‌کشت پایه برای القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل محیط B5 بود. سویه AR15834 نسبت به دو سویه A4 و MSU درصد بالاتری ریشه موئین تولید نمود. هرچند در ریزنمونه هیپوکوتیل مقدار کلی ریشه موئین پایین بود ولی با این‌حال نیز در تیمار تاریکی کامل (۴۸ ساعته تاریکی) بهتر جواب داده‌اند (شکل ۵).

درصد القاء در طول دوره زمانی

ریزنمونه‌های اندام هوایی تلقیح شده با آگروباکتریوم در طول یک دوره زمانی به‌منظور سرعت ظهور ریشه موئین و تولید آن موردمطالعه قرار گرفتند. مشاهده شد که ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه AR15834 و کشت شده در محیط ۱/۲B5 هم سریع‌تر به تلقیح پاسخ دادند و هم ریشه موئین بیشتری در هر تکرار تولید کردند. در مقایسه بین دو شرایط نوری در زمان هم کشتی (۴۸ ساعته تاریکی و تناوب نوری ۱۶/۸) مشاهده شد که در ۴۸ ساعت تاریکی، ریشه‌های موئین ظهور سریع‌تر داشته و هم‌چنین مقدار بیشتری در هر تکرار تولید شد (شکل ۷ و ۸).



شکل۱: الکتروفورز ژل آگاروز، M مارکر، ۱: گیاه شاهد (تراریخت نشده)، ۲ و ۳: گیاهان تراریخت شده با آگروباکتری رایزوژنسیس ۴: پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)

Fig. 1: Electrophoresis agarose gel, M: marker, 1: non transformed control plant, 2-3: the plants transformed whit A. rhizogenesis, 4: bacterial plasmid

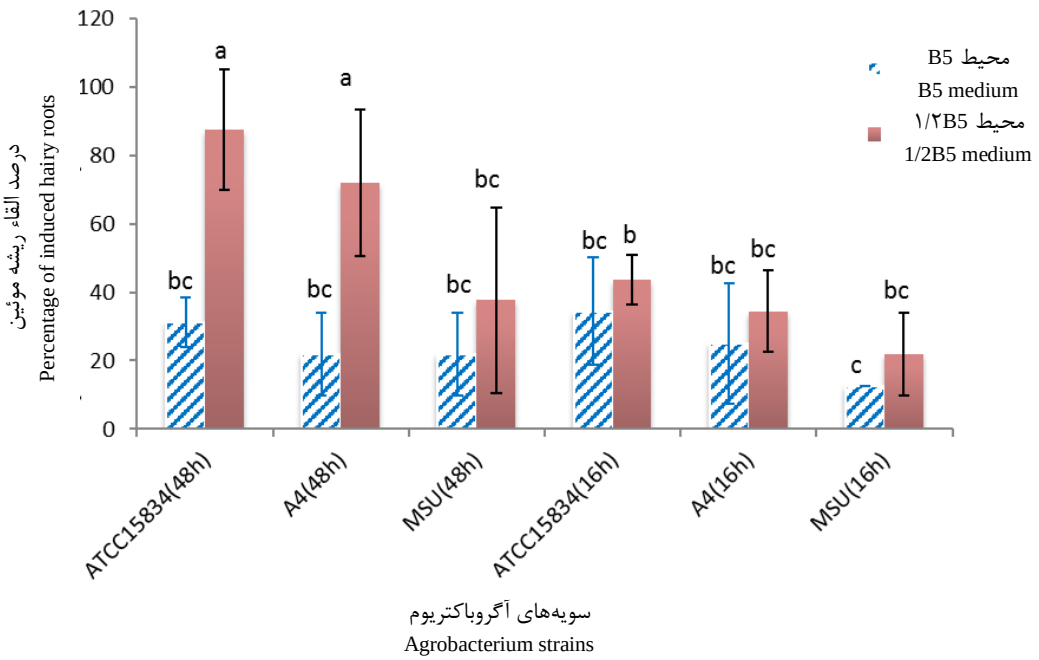
جدول ۲: تجزیه واریانس در ریزنمونه اندام هوایی و هیپوکوتیل

Table 2: Analysis of variance in excised shoot and hypocotyl explant

منبع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی Hairy root induction percent in excised shoot	تعداد ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی Number of hairy root per excised shoot	تعداد شاخه در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین ریزنمونه اندام هوایی Number of branch in 1 cm of hairy root length	درصد القا ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل Hairy root Induction percent in hypocotyl
نور Light	1	3350.02**	11.02**	7.28**	52.083**
محیط‌کشت Medium	1	7525.02**	2.52**	11.40**	325.521**
نور× محیط‌کشت Light × Medium	1	2945.33**	0.63*	0.02ns	13.021*
سوش Strain	2	2672.922**	1.62**	8.70**	126.953**
نور× سوش Strain × Light	2	60.94ns	0.14ns	0.74ns	3.255ns
سوش × محیط‌کشت Medium × Strain	2	476.56ns	0.009ns	2.50*	3.255ns
سوش × نور × محیط‌کشت Medium × Light × Strain	2	476.56ns	0.04ns	0.08ns	22.786ns
خطا Error	36	229.003	0.130	0.693	41.233
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)		21.72	18.14	17.40	20.22

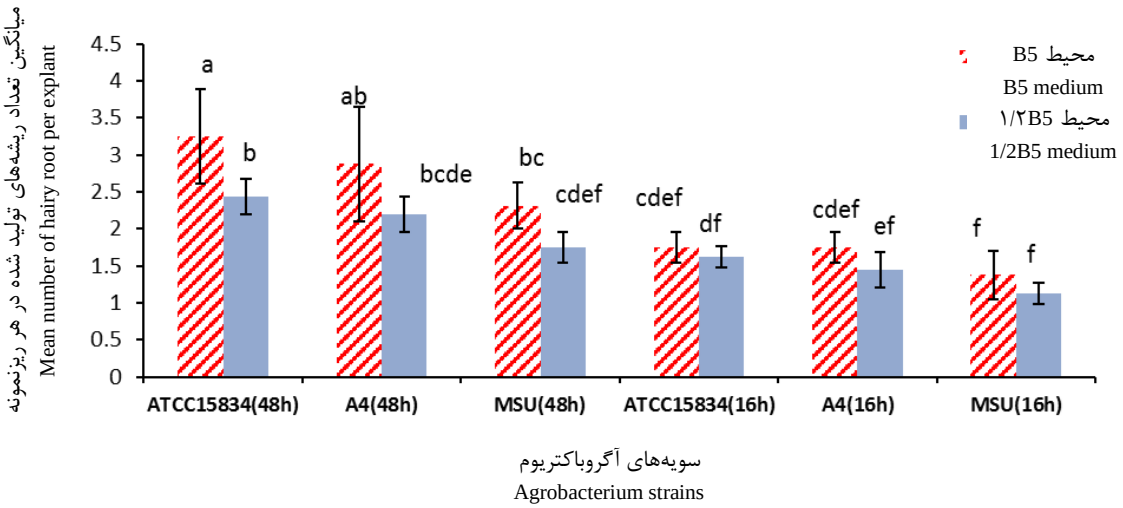
ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ می‌باشد

ns, * and **: Non- Significant, Significant at P < 0.05 and P < 0.01, respectively



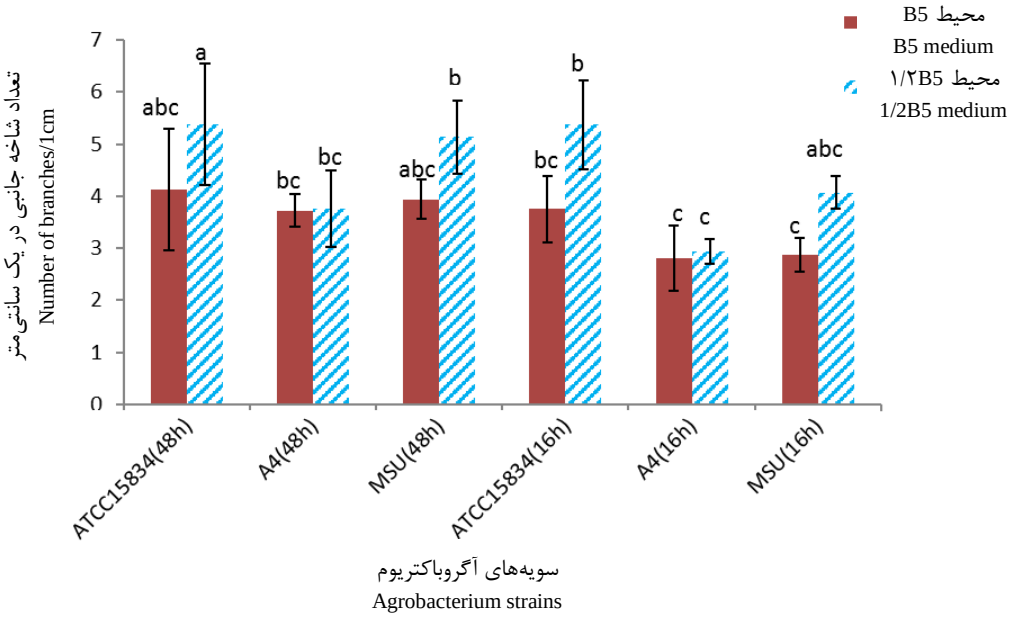
شکل ۲: درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی توسط سه سویه AR15834، A4 وMSU در دو محیط B5 و ۱/۲B5 و شرایط نوری متفاوت. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 2: Induction frequency in excised shoot explant by three strain AR15834, A4, MSU in B5 and 1/2B5 medium and different light conditions. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



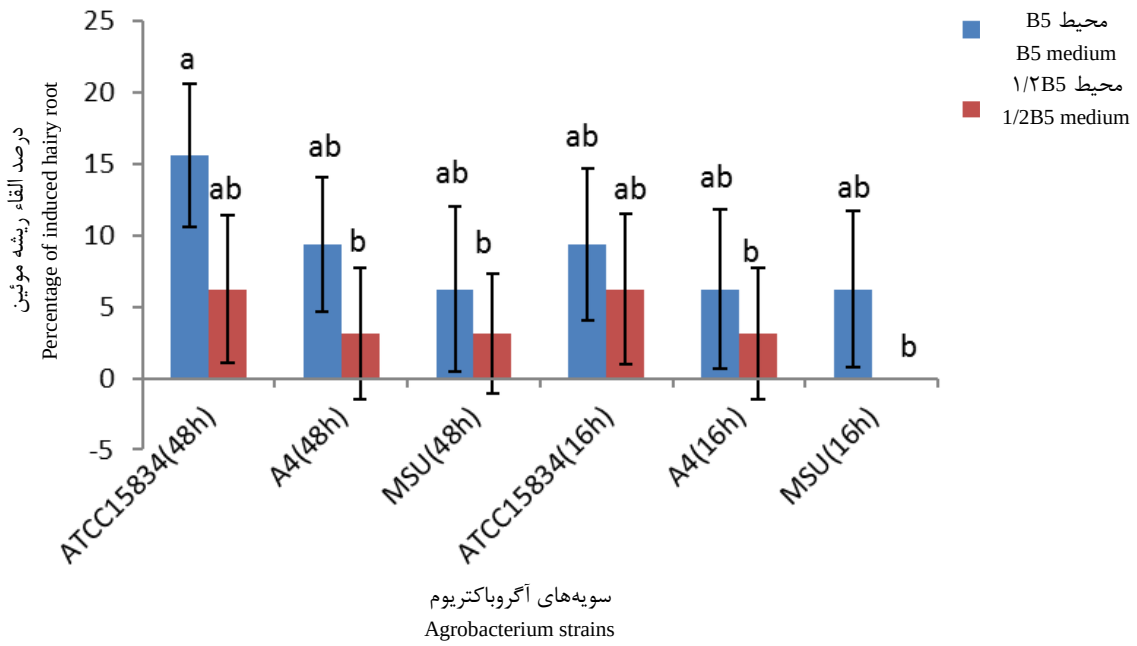
شکل ۳: میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریز نمونه برای ریزنمونه اندام هوایی. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 3: Mean of Hairy root in on excised shoot explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



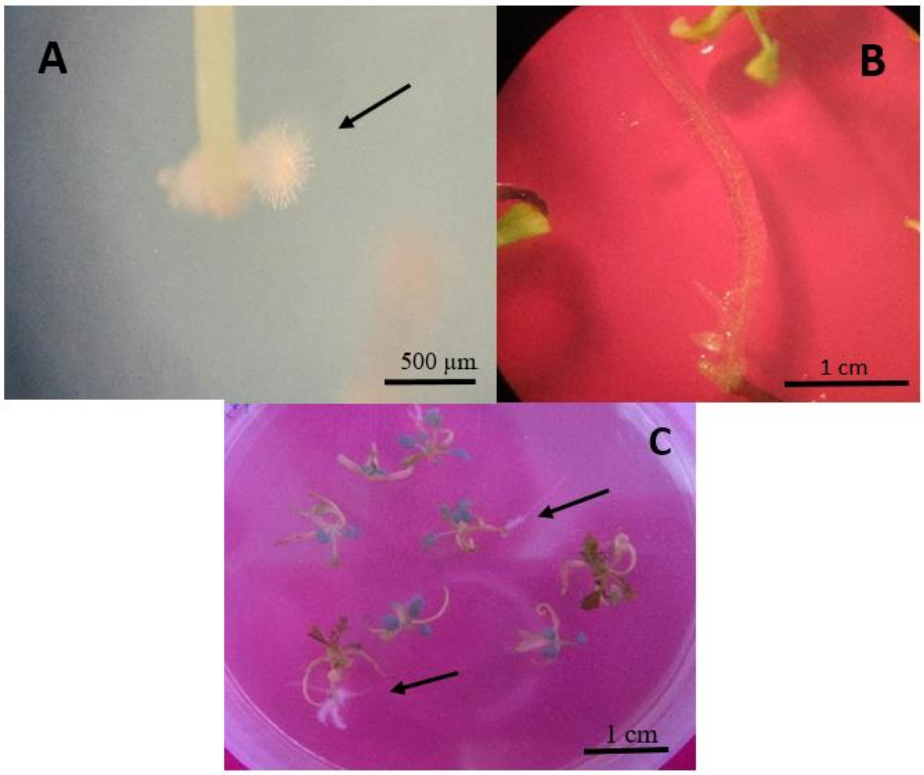
شکل ۴: تعداد شاخه‌های جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین برای ریزنمونه اندام هوایی. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 4: The number of lateral branches per 1 centimeter length of hairy roots in excised shoot explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



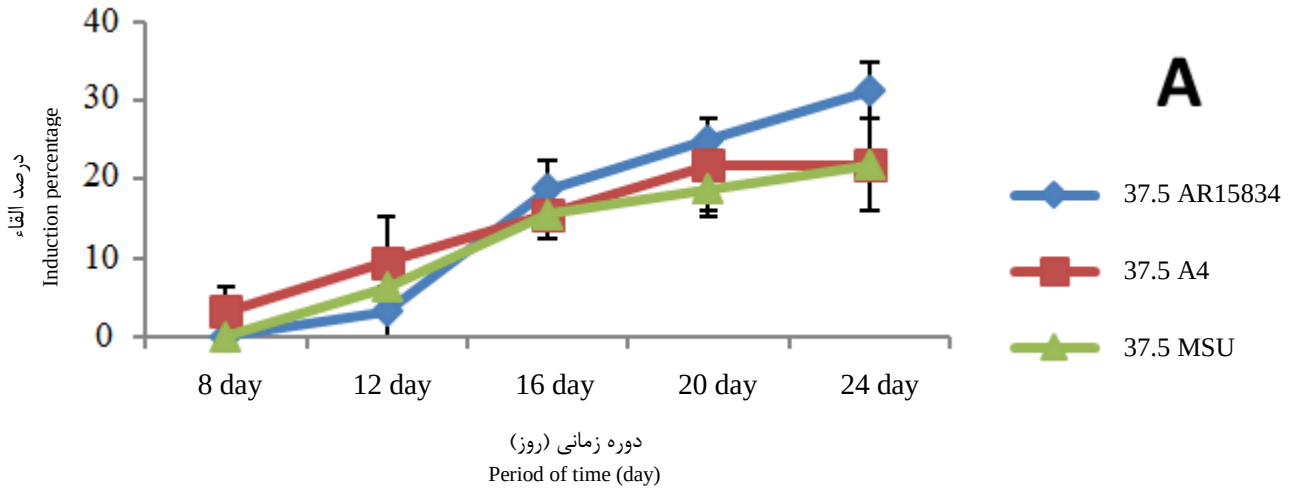
شکل ۵: درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

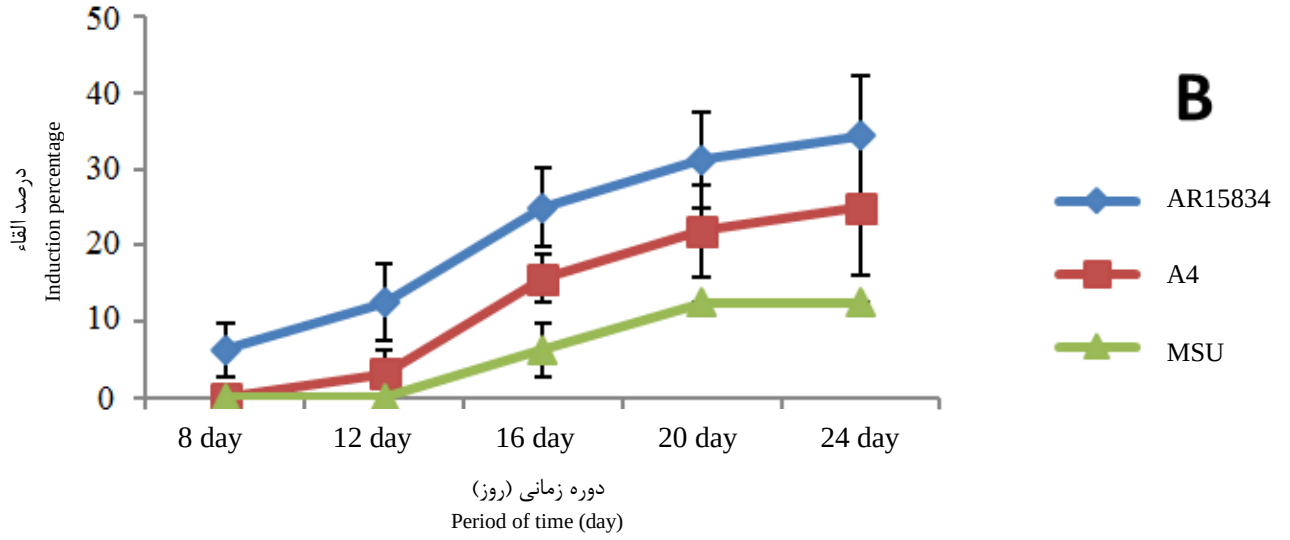
Fig. 5: Induction percent of hairy root in hypocotyl explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



شکل ۶: ریشه موئین در گیاه شقایق: (A) ریزنمونه هیپوکوتیل، (B,C) ریزنمونه اندام هوایی به‌ترتیب در محیط ۱/۲B5 و B5، جهت فلش نشان‌دهنده ریشه موئین می‌باشد

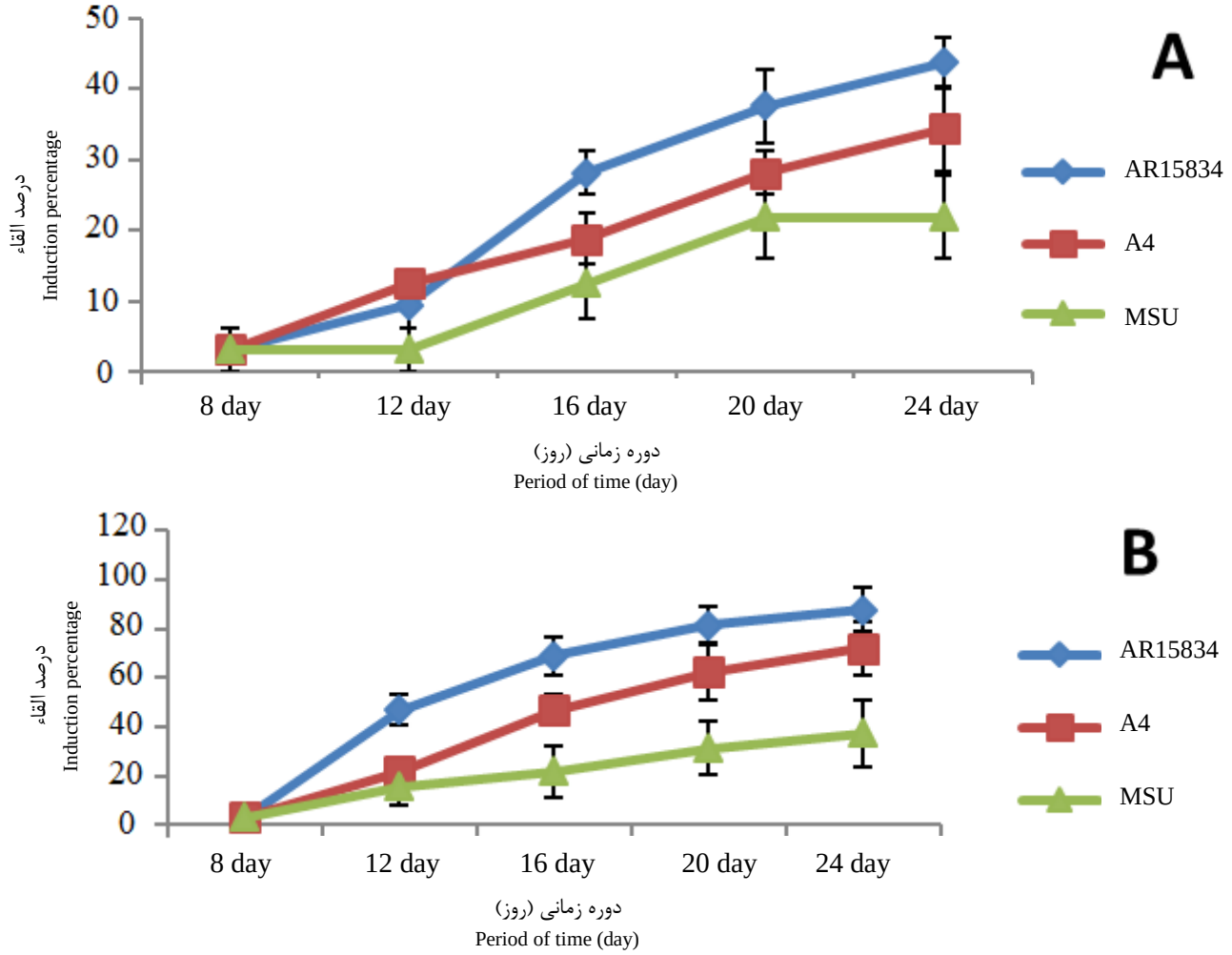
Fig. 6: Hairy root in *Papaver somniferum* (A) Hypocotyl explant, (B, C) excised shoot explant Respectively in 1/2B5 and B5 medium, the arrows represent the hairy roots





شکل ۷: روند درصد القاء در طول دوره زمانی، (A و B)، به‌ترتیب محیط B5 و ۱/۲B5 در تناوب نوری۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی. میل‌بار روی نقاط روند مبین خطای استاندارد می‌باشد

Fig. 7: Trend of Hairy root induction frequency in Period of time, (A, B) B5 and 1/2B5 medium and photoperiod of 16h dark/8h light respectively. Bars on points of trends indicate standard error



شکل ۸: روند درصد القاء در طول دوره زمانی، (A و B)، به‌ترتیب محیط B5 و ۱/۲B5 در ۴۸ ساعت تاریکی مداوم. میل‌بار روی نقاط روند مبین خطای استاندارد می‌باشد

Fig. 8: Trend of hairy root induction frequency in Period of time, (A, B) respectively B5 and 1/2B5 medium under 48h Continuous darkness. Bars on points of trends indicate standard error

بحث

ریشه موئین به‌دست آمده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز ابزاری با ارزش برای مطالعه متابولیت‌های ثانویه و استفاده در مهندسی ژنتیک می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط آزمایشگاهی، از طریق کشت سلولی گیاه تحت شرایط کنترل شده امکان‌پذیر می‌باشد. با این حال، محدودیت‌های عمده‌ی آن شامل کشت سلولی، بی‌ثباتی آن در کشت بافت و عملکرد کم در طولانی‌مدت می‌باشد. در این پژوهش توانایی سویه‌های مختلف در دو محیط ۱/۲B5 و B5 و دو شرایط نوری متفاوت (یکی تاریکی کامل ۴۸ ساعته و دیگری تناوب نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی) جهت تولید ریشه موئین مورد آزمایش قرار گرفت. هر کدام از سویه‌های درصد خاصی از القاء ریشه موئین را نشان دادند. در بیشتر موارد ریزنمونه‌های اندام هوایی ۸ روز بعد از تلقیح شروع به تولید ریشه موئین نمود. در تیمار شاهد ریشه موئین مشاهده نشد. در گیاهان شقایق ایرانی نیز نتایج مشابه به‌دست آمد (*شرفی* و همکاران، 2013).

هر دو ریزنمونه استفاده شده به تولید ریشه موئین پاسخ مثبت دادند با این حال ریزنمونه اندام هوایی سرعت و توانایی بیشتری در تولید ریشه موئین داشت. نتایج مشابه در سایر مطالعات روی گیاه خشخاش مشاهده شده است (*پارک* و *فاچینی*، 2000؛ *شرفی* و همکاران، 2013). چندین فاکتور ازجمله توانایی آلوده کردن در نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، برهم‌کنش بافت گیاهی و سویه و شدت نور می‌تواند بر مقدار تولید ریشه موئین تأثیر بگذارد، نتایج مشابه در سایر گیاهان مشاهده شده است (*موهیودین*[1] و همکاران، 2011). در پژوهشی

1. Mohiuddin

دیگر ریزنمونه هیپوکوتیل درصد بسیار کمی (تقریباً ۲۰ درصد) تراریختی را در تلقیح با آگروباکتریوم سویه MAFF 03-01724 نشان داد (*یوشیماتسو* و *شیمورا*، 1992). در پژوهشی مشابه که روی ریشه موئین گیاه خشخاش صورت گرفت مشاهده شد که در ریزنمونه هیپوکوتیل بعد از پنج هفته ریشه موئین ظاهر شد (*لی فلم بنهوم* و همکاران، 2004)، که در مقایسه با ظهور ریشه موئین در اندام هوایی در آزمایش حاضر زمان طولانی‌تری است. در مطالعه دیگری به‌منظور القاء ریشه موئین گیاه خشخاش از محیط B5 و سویه ATCC15834 استفاده شد و ۸۵ درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی مشاهده گردید (*فاچینی* و همکاران، 2000).

در پژوهش حاضر سویه ATCC15834 بیش‌ترین درصد القاء را در بین سایر سویه‌ها نشان داد. برخی از سویه‌ها قدرت آلوده‌سازی بالاتر دارند و در زمان کوتاهی می‌توانند ژن ریشه‌زایی خود را به بافت زخم شده انتقال دهند. از طرفی چون زمان تلقیح یکسانی برای همه سویه‌ها در نظر گرفته شده است طبیعی است که برخی سویه‌ها درصد بالاتری القاء را در یک زمان برابر تلقیح نشان دهند (*ژیری*[1] و همکاران، 2001). در مطالعات مشابه روی ۵ گیاه مختلف و ۴ نوع سویه آگروباکتریوم نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد و واکنش سویه‌های آگروباکتریوم متفاوت بود (*چندران* و *پوتی*[2]، 2008). در پژوهشی بر روی گیاه شقایق ایرانی نشان داده شد که سویه ATCC15834 بیش‌ترین درصد القاء را بعد از سویه LBA9402 داشت (*شرفی* و همکاران، 2013).

در القاء ریشه موئین گیاه شقایق ایرانی، باکتری ATCC15834 و محیط B5 با وجود ۴۸ ساعت تاریکی در زمان هم‌کشتی، منجر به القاء ۵۰-۴۵ درصدی ریشه موئین شد (*رستم پور*[3] و همکاران، 2009). در پژوهشی جهت بهینه‌سازی فوق بیان ژن در ریشه‌های موئین گیاه شقایق ایرانی، از محیط MS استفاده شد و پس از سه تا چهار هفته ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی تولید شد (*شرفی* و همکاران، 2013). در تحقیقی با بررسی تأثیر ۴ محیط(MS، 1/2MS، 1/4MS و B5) در زمان هم‌کشتی، مشاهده شد که محیط B5 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را نشان داد (*بی وادی*[4] و همکاران، 2014).

در این تحقیق مشاهدات نشان داد که ریشه موئین بیشتری از ناحیه زخم شده ریزنمونه در تیمار تاریکی ۴۸ ساعته خارج شد. در پژوهش دیگری ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم در دو شرایط نور و تاریکی قرار گرفتند و نشان داده شد میانگین تولید ریشه موئین در تیمار تاریکی ۳-۱ ریشه موئین در هر ریزنمونه بود (*خوار* و *ازکان*[5]، 2004). تاریکی به‌همراه رطوبت یکی از شرایط مناسب جهت رشد باکتری می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود در تاریکی ۴۸ ساعته نسبت به حالت فتوپریود شرایط برای رشد و انتقال آگروباکتریوم به ریزنمونه مناسب‌تر باشد که نتایج این تحقیق نیز همین را نشان داد. در مطالعات مشابه نیز مشخص شد که شدت نور می‌تواند نقش مهمی در فعال‌سازی ژن‌های vir آگروباکتریوم داشته باشد (*مهیودین* و همکاران، 2011). مشاهده شده است که در گیاه *Corylus avellana* L. تیمار فتوپریود ۱۶/۸(روشنایی/ تاریکی) نسبت به روشنایی کامل ریشه موئین بیشتری تولید کرد (*سانچز اولات*[6] و همکاران، 2004). تیمار تناوب نور ۱۶ ساعته نسبت به شرایط کاملاً تاریکی سبب تأخیر در تولید ریشه موئین شد (*نان داگوپال* و *رانجیتا*[7]، 2007).

نتایج این تحقیق نشان داد ریزنمونه اندام هوایی شرایط بهتری برای تولید ریشه موئین دارد و سریع‌تر به آگروباکتریوم پاسخ می‌دهد. هم‌چنین دیده شد که سویه AR15834، محیط ۱/۲B5 و تیمار ۴۸ ساعت تاریکی بهترین شرایط را جهت القاء و افزایش تعداد ریشه موئین در گیاه شقایق فراهم نمود.

1. Giri
2. Chandran and Potty
3. Rostampour
4. Bivadi
5. Khawar and Ozcan
6. Sánchez-Olate
7. Nandagopal and Ranjitha

منابع

Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P. and Etienne, H. 2008. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. Annals of Botany, 101: 929-940.

Batra, J., Dutta, A., Singh, D., Kumar, S. and Sen, J. 2004. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left-and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. Plant Cell Reports, 23: 148-154.

Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N. and Yazdani, B. 2014. Effects of different tissue culture conditions in Hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L., International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8: 597-604.

Brownstein, M. J. 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 5391.

Chandran, R. P. and Potty, V. 2008. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. Indian Journal of Biotechnology, 7: 122-128.

Chong, T. M., Abdullah, M. A., Lai, O. M., Nor'Aini, F. M. and Lajis, N. H. 2005. Effective elicitation factors in Morinda elliptica cell suspension culture. Process Biochemistry, 40: 3397-3405.

Ge, X. and Wu, J. 2005. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag^+ and elicitor. Plant Science, 168: 487-491.

Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V. and Narasu, M. L. 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. Current Science, 81: 378-382.

Hagel, J. M. and Facchini, P. J. 2013. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism–a century of discovery and a brave new world. Plant and Cell Physiology, 54 (5): 647-72.

Hu, Z. B. and Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology, 48: 121-127.

Julsing, M. K., Quax, W. J. and Kayser, O. 2007. The Engineering of Medicinal Plants: Prospects and Limitations of Medicinal Plant Biotechnology. In: Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications (Editors: Kayser, O. and Quax, W.), John Wiley and Sons, Inc., 571 pp.

Khawar, K. and Ozcan, S. 2004. Hairy root transformation in Turkish chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivars. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 18: 51-54.

Królicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J. and Łojkowska, E. 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science, 160: 259-264.

Kutchan, T. M., Frick, S. and Weid, M. 2008. Engineering plant alkaloid biosynthetic pathways: progress and prospects. Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology, 1: 283-310.

Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. and Fliniaux, M. 2004. Hairy root induction of Papaver somniferum var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. Planta, 218: 890-893.

Liu, D. H., Ren, W. W., Cui, L. J., Zhang, L. D., Sun, X. F. and Tang, K. X. 2011. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. African Journal of Biotechnology, 10: 3260-3268.

Mohiuddin, A. K., Abdullah, Z. C., Chowdhury, K., Harikrishna, K. and Napis, S. 2011. Enhanced Virulence Gene Activity of Agrobacterium in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) cv.'Birdie'. Notulae Scientia Biologicae, 3: 71-79.

Nandagopal, S. and Ranjitha Kumari, B. 2007. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. Journal of Central European Agriculture, 8: 73-80.

Park, S. U. and Facchini, P. J. 2000. *Agrobacterium rhizogenes*- mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica Cham*., root cultures. Journal of Experimental Botany, 51: 1005-1016.

Rahimi, S., Hasanloo, T., Najafi, F. and Khavari-Nejad, R. A. 2011. Enhancement of Silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. Plant Omics Journal, 4 (1): 34-39.

Rostampour, S., Sohi, H. H., Jourabchi, E. and Ansari, E. 2009. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzylisoquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lind L.): preliminary report. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 1807-1814.

Sánchez-Olate, M., Ríos, D., Rodríguez, R., Materán, M. E. and Pereira, G. 2004. Duracion del efecto revigorizante de podas severas de plantas adultas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta sobre el cultivo *in vitro*. Agricultura Técnica, 64: 338-346.

Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Dehsara, B. and Khalifani, B. H. 2013. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via Agrobacterium rhizogenes mediated transformation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29: 2125-2131.

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. 1992. Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. Plant Cell Reports, 11: 132-136.

Effect of Medium Culture, Agrobacterium Strain and Light Condition on Hairy Roots Induction in Opium Poppy

Ghorbani[1], A., Ismaili[2*], A., Nazarian Firouzabadi[3], F. and Hosseini[4], S. Z.

Abstract

One of the most important medicinal plants to produce alkaloid is the dicot Poppies plant. This plant is the only commercial source of some important drugs such as Morphinan, antitussive codeine, antimicrobial Noscapine and Thebaine until now. The *Agrobacterium rhizogenesis* causes hairy root disease in plant wounds and optimization of hairy root cultures can increase the amount of alkaloids which are produced naturally in plants roots. In this study, in order to optimization of hairy roots induction with higher efficiency, two distinct factorial experiment for excised shoot and hypocotyl explants was conducted based on completely randomized design with 4 replications. In both of these factorial experiments, 3 factors was studied included *Agrobacterium rhizogenesis* (3 strain types), basal medium (B5 and 1/2B5) and light condition (48h dark and 16h dark/8h light). Results of excised shoot explant experiment showed that AR15834 strain induced highest percentage of hairy roots and about lateral branches in 1 cm length of hairy roots, the most lateral branches were observed by AR15834 strain in 1/2B5 medium. Results of hypocotyl explant experiment showed that amount of hairy root induction by this explant very lower than excised shoot explant experiment and AR15834 strain with 48h darkness was the best treatment. Totally, results of these two experiments showed that excised shoot explants had better response than hypocotyl explant and for excised shoot explant, 1/2B5 medium and AR15834 strain had the highest induced hairy roots.

Keywords: B5 medium, Alkaloid, Morphinan, Noscapine, Thebaine

1, 2 and 3. Former MSc Student, Associate Professor and Professor, Respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran

4. Instructor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

*: Corresponding author Email: ismaili.a@lu.ac.ir