بررسی توانایی ایجاد ریشه های القایی توسط دو سویه *Agrobacterium rhizogenes* در پنج نوع بافت گیاهی

فرهاد رجالی،[1]* عزیزالله علیزاده، محمدجعفر ملکوتی، ناهید صالح راستین و علیرضا شعرایی نجاتی

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **frejali@yahoo.com**

استاد گروه گیاهپزشگی دانشگاه تربیت مدرس

استاد گروه علوم خاک دانشگاه تربیت مدرس؛**malakouti@hotmail.commj**

دانشیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

کارشناس بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب

چکیده

اگروباکتریوم رایزوژنز از طریق انتقال یک قطعه DNA به نام T-DNA از پلاسمید Ri خود به درون ژنوم سلول گیاه میزبان باعث بوجود آمدن ریشه های موئی در گیاهان دو لپه ای می شود. ریشه های بوجود آمده دارای دو خصوصیت عمده یکی سرعت رشد زیاد و دیگری پایداری ژنتیکی می باشند. دیگر خصوصیت بسیار قابل توجه ریشه‌های القایی توانایی آنها در سنتز هورمونهای رشد و پایداری در محیط های کشت سنتز شده به صورت مستقل از اندام هوایی گیاه می باشد. این توانایی باعث شده است تا ریشه های القایی از طریق جایگزین شدن با ریشه های معمولی گیاه، امکان تکثیر صنعتی قارچهای میکوریز اربسکولار که از انواع میکروارگانیسم های همزیست اجباری با ریشه گیاهان می باشند را بوجود آورند هم اکنون روش کشت همزمان ریشه های القایی و اسپورهای استریل سطحی شده قارچهای میکوریز اربسکولار موفق‌ترین و مقرون به صرفه ترین روش برای تولید صنعتی قارچهای میکوریز اربسکولار در سطح جهانی شناخته شده است. این تحقیق بر مبنای ضرورت تهیه و توسعه کشت ریشه های القایی به عنوان یکی از دو جزء اصلی در روش تکثیر قارچهای میکوریز اربسکولار به طریقه درون شیشه ای به مورد اجراءگذاشته شد. برای تهیه ریشه های القایی از دو سویه اگروباکتریوم رایزوژنز به نامهای $A4_v$ و $A4_s$ و پنج نوع بافت گیاهی شامل دیسک ریشه هویج، برگ گیاهان سیب‌زمینی، لوبیا و نارنج و محور زیر لپه ای گیاهچه نخود استفاده گردید. برای مایه زنی محور زیر لپه ای نخود از کشت 48 ساعته باکتری بر روی محیط YMA و برای بقیه بافتهای گیاهی از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در میحط LB و سپس انتقال باکتری به محیط MS با غلظت 10^7 سلول در هر میلی لیتر استفاده گردید. پس از گذشت دو هفته ریشه‌های القایی بر روی برگ سیب زمینی، لوبیا و محور زیر لپه ای گیاهچه نخود ظاهر گردید. برای حذف آلودگی باکتریایی، ریشه های القاء شده در محیط کشت MS حاوی 500 میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم رشد داده شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که بافتهای گیاهی دارای حساسیت متفاوتی در برابر مایه زنی با اگروباکتریوم رایزوژنز می باشند به گونه‌ای که محور زیر لپه‌ای نخود بهترین بافت گیاهی و دیسک برگ نارنج نامناسب‌ترین بافت گیاهی برای تولید ریشه‌های القایی تشخیص داده شدند.

واژه های کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌های موئین، قارچهای میکوریز اربسکولار

1- نویسنده مسئول، آدرس: تهران، خیابان کارگر شمالی روبروی بیمارستان دکتر شریعتی، موسسه تحقیقات خاک و آب، صندوق پستی؛ 14155-6185.

* دریافت: 84/3/17 و پذیرش: 85/9/1

مقدمه

محققین برای دستیابی به ریشه‌های القایی از انواع بافتهای گیاهی مناسب و حساس به باکتری استفاده کرده‌اند. در اکثر این تحقیقات باکتری *Agrobacteriaum rhizogenes*) به کار گرفته شده از نوع A_4 بوده است. تاناکا و همکاران (Tanaka و همکاران، 1985) با تلقیح دیسک ریشه‌های غده‌ای شلغم و تربچه با *A. rhizogenes* سویه A_4 بعد از 10 روز اولین علائم ظهور ریشه‌های القایی را گزارش کرده اند، ریشه‌های بوجود آمده دارای انشعابات زیاد، رشد سریع در محیط کشت فاقد هورمونهای رشد و دارای زمین گرایی منفی بوده‌اند.

آلوده کردن ساقه استریل گیاه *Atropa belladona* با سویه 15834 باکتری *A. rhizogenes*، منجربه تشکیل ریشه‌های القایی بعد از دو الی پنج هفته از شروع آزمایش شده اند، همچنین انتقال ریشه‌ها به محیط کشت MS[1] حاوی آنتی‌بیوتیک کربانسیلن منجر به حذف باکتری شده و وزن تازه ریشه نیز پس از گذشت یک ماه، 60 برابر شده است (Kamada و همکاران، 1986). پس از گذشت دو هفته از تلقیح گیاهچه‌های چغندر و توتون با سویه LBA 9402 باکتری *A. rhizogenes* ریشه‌های القایی در محل تلقیح ظاهر شد که برای تکثیر به محیط کشت مایع B50 حاوی 30 گرم در لیتر ساکارز و 0/5 گرم در لیتر امپی‌سیلین منتقل شدند. سپس ریشه‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و با سرعت شیکر 90 دور در دقیقه تکثیر شدند (Hamill و همکاران، 1986). دیسکهای برگی به قطر 6 میلی‌متر متعلق به نوعی تربچه را با فرو بردن در سوسپانسیون سویه A_4 باکتری *A. rhizogenes* و به مدت 10 دقیقه تلقیح کرده و پس از گذشت 10 روز از زمان تلقیح ریشه‌های القایی در تاریکی بوجود آمدند. ریشه‌ها بدون حضور هورمونهای رشد، سریعاً منشعب و در محیط پراکنده شدند (Noda و همکاران، 1987). تلقیح برگ و غده گیاه سیب‌زمینی با سویه LBA9402 باکتری *A. rhizogenes* منجر به تولید دو نوع ریشه القایی شد همچنین تعدادی از ریشه‌ها با گذشت یک ماه و تعدادی دیگر با گذشت دو ماه از شروع تلقیح ظاهر شدند. ریشه‌های القایی پس از 16 بار انتقال به محیط جدید از لحاظ تعداد کروموزومها و DNA موجود در هسته ثابت بودند (Charlotte و همکاران، 1987).

در تحقیقی دیگر تلقیح محور زیر لپه‌ای گیاهچه لوبیا با سویه‌های A_4 و 1855 باکتری *A. rhizogenes* منجر به تورم ناحیه تلقیح شده پس از گذشت دو روز شده با گذشت 4 الی 5 روز در ناحیه مزبور بافت کالوس تشکیل شده و پس از 10 الی 12 روز ریشه‌های القایی در محل تلقیح شده ظاهر شدند در این تحقیق برای حذف باکتری از سفوتاکسیم به میزان 500 میلی‌گرم در لیتر و از محیط کشت MS استفاده شد (Pettenati و همکاران، 1989). همچنین در آزمایش کشت بافت ریشه سه نوع لگوم علوفه‌ای نیز با استفاده از سویه C58C1 باکتری *A. rhizogenes*، تهیه شد. ریشه‌های القایی از لحاظ شکل ظاهری و خصوصیات سلولی تا اندازه‌ای نسبت به ریشه‌های معمولی تغییر پیدا کرد، لیکن در توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی آنها نسبت به ریشه‌های معمولی تفاوتی مشاهده نشد (Webb و همکاران، 1990). تأثیر گونه‌های مختلف *Agrobacterium* بر روی گیاهچه *Echinacea purpura* و به منظور تهیه ریشه القایی نشان داده است که سویه‌های LMG 63 و LMG 150 این باکتری تنها باعث ایجاد بافت کالوس شده‌اند. لیکن سویه‌های 15834 و R1601 آن در محل تلقیح منجر به تشکیل ریشه‌های القایی شده‌اند (Trypsteen، 1991). تکه‌های برگ یا دمبرگ در گیاه کلم بهترین عضو برای تلقیح با *A. rhizogenes*، سویه A_{4T} تشخیص داده شده است. ریشه‌های القایی پس از هفت روز از تلقیح ظاهر شدند لیکن تمایز آنها از ریشه‌های معمولی باگذشت سه هفته از تلقیح و با توجه به سرعت رشد بیشتر آنها نسبت به ریشه‌های معمولی امکان‌پذیر گردید (Christy و Sinclair، 1992). دمبرگ، پهنک برگ و قلمه‌های دو تا سه برگی گیاه شمعدانی نیز با سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* با نام A_4، Hri، 8196، A_{4RSI} و A_{4RSNT} تلقیح شده است. پس از گذشت 10 روز از تلقیح، ریشه‌های القایی در محل‌های تلقیح شده ظاهر شدند. مؤثرترین سویه باکتری نوع Hri و مناسب‌ترین عضو گیاه، قلمه‌های دو تا سه برگی این گیاه گزارش شده است (Pellegrineschi و Davolio-Mariani، 1996).

با استفاده از سویه‌های 15834 و A4M70GUS باکتری *A. rhizogenes* بر روی چهار گونه مختلف از گیاه Gentiana، ریشه‌های القایی بوجود آمده است و این ریشه‌ها به مدت شش سال فعالیت خود را بر روی محیط‌های سنتز شده حفظ کرده‌اند (Momcilovic و همکاران، 1997).

انتقال ژن *rol B* به گیاه *Nicotiana debneyi* باعث بوجود آمدن ریشه‌های القایی در این گیاه شده است لیکن چنانکه *rol B* به همراه *rol C* به گیاه منتقل شود، ریشه‌های القایی سریعتر و متراکم‌تر تشکیل می‌شوند (Aoki و Syono، 2000). از سویه A_{4T} باکتری

1- MS: Murashige and Skoog. 1962 -نام نوعی محیط کشت که معمولا در کشت بافت از آن استفاده می شود.

A. rhizogenes برای تلقیح سه میلی‌متر انتهایی ریشه چه گیاه *Medicago truncatula* استفاده شده است. ریشه‌های القایی بعد از گذشت یک هفته بر روی ریشه چه ظاهر شده و هنگامی که طول آنها به یک تا دو سانتی‌متر رسیده است، از انتها قطع شده و به محیط M1 منتقل شده‌اند، ریشه‌های القایی هر دو هفته یکبار به محیط جدید منتقل شده و با استفاده از آنتی‌بیوتیک اموکسی‌سیلین با غلظت‌های 400 و 200 میلی‌گرم در لیتر آلودگی باکتریهایی آنها حذف گردید (Boisson-Dernier و همکاران، 2001).

همانگونه که ذکر گردید استفاده از کشت درون شیشه ای قارچهای میکوریز اربسکولار تاکنون موفق‌ترین روش برای تهیه مایه تلقیح این قارچهای همزیست با ریشه شناخته شده است. از طرف دیگر تحقیقاتی که پیرامون رابطه همزیستی میکوریزی هم اکنون در سطح جهان در حال اجرا می‌باشد به عنوان مثال استفاده از روشهای ژنتیکی در کنار روشهای مرفولوژیکی برای شناسایی و طبقه بندی این قارچها و یا نحوه ارتباط گیاه با قارچ همزیست و همچنین اثرات متقابل موجود بین قارچهای میکوریزی و میکروارگانیسم های ریزوسفری عمدتا با استفاده از کشت و تکثیر درون شیشه ای قارچهای میکوریز اربسکولار صورت گرفته است. ضرورت بکارگیری این تکنولوژی به عنوان ابزار علمی دقیق برای انجام تحقیقات آتی در زمینه همزیستی میکوریزی بویژه در بعد سلولی ملکولی از اهداف این تحقیق بوده است. همچنین با توجه به اینکه تاکنون بیش از 160 نوع بافت گیاهی مختلف برای دستیابی به ریشه های القایی مورد استفاده قرار گرفته است، سعی گردید در این تحقیق از بافتهای گیاهی که استعداد بهتری برای تولید ریشه های القایی دارند استفاده گردد.

مواد و روشها

تهیه سوسپانسیون *Agrobacterium rhizogenes* :

باکتری مورد استفاده از دانشگاه مک‌گیل کانادا (Dr. Philippe Seguin)، شامل دو سویه وحشی از باکتری *A. rhizogenes* به نامهای A_4v و A_4s دریافت گردید. باکتریها بر روی محیط کشت پیشنهادی (Kerr، 1992) کشت گردیده درون انکوباتور با دمای 28^{oC} قرار داده شدند. پس از گذشت دو روز تعداد زیادی تک کلنی در هر پلیت تشکیل گردید. هرتک کلنی به یک لوله شیشه‌ای در پیچ‌دار حاوی محیط کشت YMA (Yeast Mannitol Agar) و به صورت شیبدار منتقل و محیطهای کشت درون انکوباتور با دمای 28^{oC} قرار داده شدند. پس از گذشت چهار روز باکتریها در سطح محیط شیب‌دار کاملاً رشد کرده و پس از مسدود کردن درب لوله‌ها با پارافیلم باکتریها در یخچال و در دمای 4^{oC} نگهداری گردیدند (Gartland و Davey، 1995). برای تهیه سوسپانسیون باکتریها از ارلن‌های شیشه‌ای 250 میلی‌لیتری حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت LB[1] استفاده گردید. ارلن‌های تلقیح شده با باکتری به مدت 24 ساعت در دمای 28^{oC} و در تاریکی مطلق با سرعت 110 دور در دقیقه تکان داده شدند. در نهایت در سوسپانسیون تهیه شده، دانسیته نوری محیط کشت در طول موج 600 نانومتر دارای کدورت معادل 1 گردید. سپس در شرایط کاملاً استریل سوسپانسیون تهیه شده به ظروف استریل سانتریفوژ منتقل شد. محیط‌های کشت حاوی باکتری به مدت 30 دقیقه و در دمای ثابت 25^{oC} با 6000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. پس از اتمام این مرحله، محلول LB رویی از لوله‌های سانتریفوژ خارج شده و هم حجم آن محیط (Murashige و Skoog، 1962)MS به لوله‌های مذکور اضافه گردید. پس از بستن درب لوله‌ها با کمک بهم‌زن باکتری را درون محیط MS به صورت سوسپانسیون در آورده و برای تلقیح بافتهای گیاهی از آن استفاده گردید.

تهیه بافت گیاهی مناسب برای تلقیح با *A. rhizogenes*:

بذرهای نخود[2] رقم جم و لوبیا[3] سفید رقم یاس ، ابتدا چندین مرتبه با آب معمولی شسته شدند. سپس به مدت 45 ثانیه درون الکل 96° فرو برده شده، آنگاه بذرها در محلول کلرید جیوه اسیدی 0/2 درصد به مدت 4 دقیقه نگهداری و در نهایت به ظروف پتری استریل منتقل گردیدند. به منظور حذف بقایای کلرید جیوه، بذرها شش مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرهای استریل شده به محیط جامد آب ـ آگار (یک درصد) استریل منتقل شده، در انکوباتور با دمای 28^{oC} قرار داده شدند (Somasegaran و Hoben، 1994).

پس از جوانه‌زنی بذور لوبیا، هر بذر درون یک لوله آزمایش 23×2/5 سانتی‌متر حاوی محیط کشت MS جامد و مورب کشت گردید. لوله‌های کشت شده به اطاقک رشد با دمای 25^{oC}، شدت نور 6000 لوکس و 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت خاموشی منتقل شدند. (Guellec و همکاران، 1990). سه هفته بعد از رشد گیاهچه‌ها، برگهای انتهایی گیاهچه لوبیا قطع و در شرایط کاملاً استریل و با حذف حاشیه برگ، قطعات برگی مناسبی به قطر یک سانتی‌متر برای تلقیح با اگروباکتریوم تهیه گردید.

بذرهای نخود همانند روش استفاده شده برای بذرهای لوبیا استریل سطحی شدند پس از گذشت یک هفته، بذرهای نخود جوانه‌زده را به ظروف پتری 9 سانتی‌متری حاوی محیط MS منتقل کرده به گونه‌ای که در هر ظرف

1- LB: Luria- Bertani
2- Cicer arietinum
3- Phaseolus vulgaris

یک بذر جوانه‌زده قرار گرفت. برای تلقیح اگروباکتریوم از محور زیر لپه‌ای هر بذر استفاده شد (Pettenati و همکاران، 1989).

غده‌های ریشه‌ای هویج[1] رقم محلی چندین مرتبه با آب معمولی و یک مرتبه با مایع ظرفشویی بصورت کامل شسته شدند. ضدعفونی سطحی آنها به سه روش زیر انجام گرفت:

الف) مقداری از غده‌های ریشه‌ای هویج در الکل 96° فرو برده شده سپس با شعله دادن ضد عفونی گردیدند (Ryder و همکاران، 1985).

ب) تعدادی دیگر در الکل 96° فرو برده شده سپس بمدت 3 و 5 دقیقه درون کلرید جیوه اسیدی 0/2 درصد قرار داده شدند (Bhat و همکاران، 1992).

ج) تعدادی دیگر نیز در مدت زمانهای 10، 20 و 30 دقیقه در محلول 0/1 غلظت وایتکس صنعتی فرو برده شدند (Tanaka و همکاران، 1985).

پس از استریل سطحی در تمام موارد فوق، غده‌های هویج به مدت 30 دقیقه درون آب مقطر استریل قرار داده شدند و با تعویض آب مقطر استریل، حداقل 6 مرتبه به طور کامل شسته شدند. در نهایت غده‌های ریشه‌ای هویج به ظروف پتری استریل منتقل شده، دو سانتی‌متر انتهایی غده‌ها حذف گردیده با استفاده از چاقوی معمولی و در شرایط کاملاً استریل دیسکهای هویج با ضخامت 5 الی 10 میلی‌متر تهیه شد.

برگهای تازه گیاه چند ساله نارنج[2] رقم محلی ابتدا چندین مرتبه با آب معمولی شسته شده سپس به مدت 10 دقیقه درون محلول 0/1 غلظت وایتکس صنعتی فرو برده شدند. پس از ضد عفونی سطحی، برگها چندین مرتبه با آب مقطر استریل شسته شده و در نهایت دیسکهایی به قطر یک سانتی‌متر از پهنک برگ برای مایه‌زنی با اگروباکتریوم تهیه شدند.

گیاهچه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای بافت سیب‌زمینی[3] رقم اگریا از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال تهیه گردید. در شرایط کاملاً استریل برگهای گیاه به گونه‌ای از ساقه جدا گردیدکه به دمبرگ آسیبی نرسد. از این برگها برای مایه‌زنی با اگروباکتریوم استفاده شد (Ottaviani و همکاران، 1990).

مایه‌زنی بافتهای گیاهی با *A. rhizogenes* :

برای مایه‌زنی گیاهچه نخود از کشت 48 ساعته باکتریها (A_4s, A_4v) بر روی محیط YMA استفاده گردید. سوزن‌های انسولین و سوزنهای مربوط به سرنگهای 5 میلی‌لیتری را در شرایط کاملاً استریل به باکتری آلوده کرده سپس در چندین نقطه از محور زیر لپه‌ای نخود حدود 5 میلی‌متر پایین‌تر از محل لپه‌ها وارد بافت گیاهی گردید (Pettenati و همکاران، 1989؛ Trypsteen و همکاران 1991).

از هر دو نوع سویه باکتری (A_4s و A_4v)، 50 میلی‌لیتر سوسپانسیون از کشت 48 ساعته باکتری (10^7 CFU/ml) درون محیط MS تهیه و قطعات برگی لوبیا، سیب‌زمینی، نارنج و دیسکهای هویج (از هر بافت حداقل 50 قطعه) به مدت 10 دقیقه درون این سوسپانسیون قرار داده شد. قطعات برگی و دیسکهای هویج مایه‌زنی شده به ظروف پتری 9 سانتی‌متری حاوی محیط کشت MS با pH 5/1 الی 5/8 و 0/8 درصد آگار منتقل گردیدند. ظروف پتری به مدت 48 ساعت درون انکوباتور با دمای 28^{oC} و تاریکی مطلق قرار داده شدند. پس از این زمان بافتهای گیاهی مایه‌زنی شده به ظروف پتری جدید حاوی محیط MS با مشخصات ذکر شده در فوق و همچنین حاوی 500 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. پس از مسدود کردن درب ظروف با پارافیلم، ظروف پتری مذکور درون انکوباتور با دمای 28^{oC}، تاریکی و تا زمان ظاهر شدن ریشه‌های القایی نگهداری شدند.

حذف آلودگی باکتریایی از ریشه‌های القایی:

پس از ظاهر شدن ریشه‌های القایی به منظور حذف آلودگی ناشی از وجود *A. rhizogenes* ، حدود سه الی چهار سانتی‌متر انتهایی از ریشه‌های القایی را پس از گذشت یک ماه از تشکیل شدن آنها به همراه قسمتی از محیط کشت بریده و به پتری جدید حاوی محیط کشت MS با pH معادل 5/5 الی 5/7 و 0/6 الی 0/7 درصد آگار حاوی 300 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردید. پس از گذشت سه هفته، سه الی چهار سانتی‌متر انتهایی از ریشه‌های تازه تشکیل شده دو مرتبه به ظروف پتری جدید با مشخصات ذکر شده در فوق منتقل گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده نشان داد که دیسکهای هویج ضد عفونی شده با روش اول پس از یک هفته انتقال بر روی محیط MS، 100 درصد آلوده شده و پس از گذشت دو تا سه هفته تمامی دیسکهای حاصل قهوه‌ای رنگ و از درون تجزیه و متلاشی گردیدند. در مورد روش دوم بیش از 80 درصد دیسکهای هویج پس از گذشت دو الی سه هفته از انتقال بر روی محیط MS آلوده شدند. کمترین دیسکهای آلوده با استفاده از روش سوم ضد عفونی سطحی بدست آمد که در آن نیز بین زمانهای استفاده شده برای استریل، قرار گرفتن بافت گیاهی به مدت 30 دقیقه درون محلول 0/1 غلظت وایتکس صنعتی بهترین نتیجه را

1- Daucus carota
2- Citrus aurantium
3- Solanum tuberousum

در پی داشت بطوریکه پس از انتقال دیسکهای هویج به محیط MS و گذشت دو الی سه هفته تنها 10 درصد از دیسکهای هویج آلوده و تجزیه گردیدند و دیسکهای سالم پس از این مدت نیز طراوت و شادابی خود را حفظ کردند که نشان‌دهنده سالم بودن سلولهای گیاهی پس از عمل ضدعفونی سطحی بود. روش استفاده شده برای ضدعفونی سطحی دیسکهای برگ نارنج نیز نتایج قابل قبولی در پی داشت بطوریکه پس از گذشت دو هفته از قرار دادن آنها بر روی محیط MS تنها 10 درصد از کل دیسکهای تهیه شده قهوه‌ای و نکروزه گردیدند و بقیه با همان رنگ سبز اولیه و بدون آلودگی بر روی محیط کشت باقی ماندند.

ظهور ریشه‌های القایی:

پس از گذشت حدود یک هفته از زمان مایه زنی، اولین شواهد ظهور ریشه‌های القایی به شکل بافت کالوس بر روی برخی از بافتهای مایه‌زنی شده مشاهده گردید. در دمبرگ برگهای سیب‌زمینی بافت کالوسی به رنگ سفید و به ضخامت یک الی دو میلی متر، ناحیه انتهایی دمبرگ را پوشانید. در دیسکهای هویج پس از گذشت یک هفته و در مرکز دیسک بافت کالوسی با ضخامت کم تشکیل گردید. در برگهای لوبیا، علائمی از تشکیل بافت کالوس مشاهده نشد، لیکن در بعضی از قسمتها و بویژه از محل بریده شدن رگبرگها، بیرون زدگیهائی از سطح برگ مشاهده گردید.همچنین در دیسکهای برگ نارنج نیز هیچگونه پاسخی از گیاه در برابر تلقیح با باکتری مشاهده نگردید در حالیکه برگها همچنان سبز و شاداب بودند. پس از گذشت چهار روز از مایه زنی محور زیر لپه‌ای نخود، بافت گیاهی در محل‌های تلقیح شده متورم شد و شکافهایی در محور زیر لپه‌ای بوجود آمد.

دو هفته بعد از مایه زنی در برگهای سیب‌زمینی، دو الی سه ریشه از بافت کالوس بیرون زده و در سطح محیط کشت MS شروع به رشد نمودند. در قطعات برگی لوبیا نیز همین تعداد ریشه از محل بریدگی رگبرگها خارج شده و در محیط کشت گسترده شدند. در دیسکهای هویج بافت کالوس تشکیل شده گسترده‌تر شد بطوریکه مرکز دیسک را به طور کامل پوشانید. در محور زیر لپه‌ای گیاهچه نخود تعداد زیادی ریشه های کوچک (حداقل 15 الی 20 ریشه) از محل‌های تلقیح شده بیرون زده، و در محیط کشت شروع به رشد کردند. در دیسکهای برگ نارنج همانند هفته اول هیچگونه پاسخی از بافت گیاهی متعاقب عمل مایه‌زنی مشاهده نگردید.

در پایان هفته سوم ریشه‌های بوجود آمده در قطعات برگی سیب‌زمینی و لوبیا به رشد خود ادامه دادند و در محیط کشت گسترده شدند. در بعضی از قطعات برگ لوبیا یک یا دو ریشه جدید در قسمتهایی که فاقد ریشه بودند ظاهر گردید. در برگ سیب‌زمینی در هفته سوم هیچگونه ریشه جدیدی تشکیل نگردید. در دیسکهای هویج، بافت کالوس تشکیل شده بدون این‌که به شکل ریشه متمایز گردد. سطح دیسک را تقریباً به طور کامل پوشانید و در گیاهچه نخود در قسمتهای جدید چندین ریشه تازه تشکیل شده مشاهده گردید. در دیسکهای برگ نارنج نیز همانند دو هفته قبل هیچگونه پاسخی از بافت گیاهی در برابر مایه زنی با باکتری مشاهده نگردید.

در پایان هفته چهارم ریشه های تشکیل شده در برگهای لوبیا و سیب زمینی همچنان به رشد خود ادامه دادند. در دیسکهای هویج نیز تنها ضخامت بافت کالوس تشکیل شده افزایش یافت. در دیسکهای برگ نارنج نیز همانند سه هفته قبل هیچگونه پاسخی از بافت گیاهی در برابر مایه زنی مشاهده نگردید. لیکن در گیاهچه نخود در پایان هفته چهارم دو نوع ریشه مشاهده گردید. نوع اول که غالب ریشه ها را در بر می گرفت و به شکل کشیده و با انشعاباتی در محیط کشت گسترده می شدند و نوع دوم که تعداد کمتری را تشکیل می دادند طول آنها کوتاهتر و به شکل پیچ خورده مشاهده می شدند. در همین زمان تنها در 10 درصد از قطعات برگی لوبیا ریشه‌های القایی مشاهده گردید. در برگ سیب زمینی حدود 20 درصد از قطعات برگی ریشه‌های القایی را از محل دمبرگ در محیط گسترش دادند و در گیاهچه های نخود در بیش از 60 درصد آنها ریشه‌های القایی در محور زیر لپه ای تشکیل شدند. تقریبا در اکثر دیسکهای هویج مایه زنی شده با باکتری (بیش ار 70 درصد) بافت کالوس تشکیل شد که حتی پس از گذشت یک ماه از مایه زنی بدون اینکه به صورت ریشه متمایز گردد به رشد خود در سطح بافت گیاهی ادامه می داد. در دیسکهای برگ نارنج نیز حتی با گذشت بیش از یک ماه از زمان مایه زنی هیچگونه واکنشی از بافت گیاهی مشاهده نگردید. با گذشت چهار هفته از زمان مایه زنی در قطعات برگی لوبیا و سیب زمینی که ریشه های القایی تشکیل نگردیده بود. بافت گیاهی به تدریج رنگ خود را از دست داده زرد گردید. در نهایت نیز به رنگ قهوه ای در آمده و از بین رفت. در دیسکهای هویج نیز در مواردی که بافت کالوس تشکیل نگردید، مرکز دیسک به سمت داخل فرو رفته شده و جدار خارجی دیسک نیز خشک گردید و ترک و شکافهایی در آن بوجود آمد. تعدادی از دیسکهای برگ نارنج نیز در پایان هفته چهارم به رنگ قهوه ای در آمدند، لیکن اکثر آنها همچنان به رنگ سبز در سطح محیط MS باقی ماندند.

حذف آلودگی باکتریایی از ریشه های القایی:

با توجه به زیادی تعداد و همچنین رشد سریعتر ریشه‌های القایی تشکیل شده بر روی محور زیر لپه‌ای گیاهچه نخود، از این ریشه‌ها برای رسیدن به یک کلون از ریشه‌های القایی استفاده گردید. رشد اولیه سه تا چهار سانتی متر انتهایی ریشه های منتقل شده بر روی محیط MS حاوی 500 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم نتوانست آلودگی باکتریایی را به طور کامل حذف نماید. پس از دو هفته از رشد ریشه در این محیط، در بعضی قسمتهای مجاور ریشه، رشد باکتری در سطح پلیت مشاهده گردید. لذا در مرحله دوم، دو مرتبه مشابه حالت قبل ریشه به محیط MS جدید حاوی 300 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردید. پس از گذشت دو مرحله از کشت ریشه در این محیط آلودگی باکتریایی در اطراف ریشه مشاهده نگردید. ریشه‌های باکتری‌زدایی شده به خوبی در محیط کشت MS جدید و فاقد آنتی‌بیوتیک به رشد خود ادامه دادند.

نتایج این پژوهش نشان داد که حتی در سه مورد بافت گیاهی که بروی آنها ریشه‌های القایی بوجود آمده است، محور زیر لپه‌ای گیاهچه نخود بیشترین حساسیت را به باکتری نشان داده و تعداد ریشه‌های القایی تشکیل شده بر روی آن بسیار بیشتر از دو بافت دیگر (قطعات برگ لوبیا و برگ سیب‌زمینی) بوده است. تلقیح گیاهچه‌های *Lotus corniculatus*، *Trifolium repens* و *Trifolium pratense* با سویه C58C1 باکتری *Agrobacterium* نیز نشان داده است که گیاه اولی دارای حساسیت بسیار بیشتری نسبت به دو گیاه دیگر در برابر اگروباکتریوم بوده و ریشه‌های القایی با تراکم بیشتری در بافت آن تشکیل شده است (Webb و همکاران، 1990). نتایج مشابهی از تحقیقات سایر محققین در این رابطه به چاپ رسیده است (Muginer، 1988؛ Christy و Sinclair، 1992). همچنین در مورد هر نوع گیاه نیز دیده شده است که اندام مختلف گیاه حساسیت متفاوتی نسبت به اگروباکتریوم نشان می‌دهند و این حالت را بدلیل تغییر تعادل هورمونی در اندام‌های مختلف گیاهی دانسته‌اند (Katavic و همکاران، 1991). به عنوان مثال در گیاه کلم قطعات برگی و در گیاه شمعدانی قلمه‌های دو تا سه برگی بیشترین حساسیت را در برابر اگروباکتریوم از خود نشان داده اند (Pellegrineschi و davolio-Mariani، 1996؛ Christy و همکاران، 1997) . در گیاه *Verticordia grandis* حساس‌ترین عضو گیاه در برابر اگروباکتریوم دمبرگ گزارش شده است (Stummer و همکاران، 1995). بنابراین طبق توصیه محققین لازم است بهترین ترکیب بافت گیاهی و سویه مشخص از اگروباکتریوم معین و بدین صورت احتمال موفقیت در بدست آوردن ریشه‌های القایی را افزایش داد (Otani و همکاران، 1993). از سایر عوامل تأثیر گذار در تشکیل ریشه‌های القایی مدت زمانی است که بافت گیاهی مورد نظر درون سوسپانسیون باکتری قرار می‌گیرد. در این پژوهش دیسکهای نارنج هیچگونه عکس‌العملی به تلقیح نشان ندادند این امر یا به دلیل کافی نبودن زمان تلقیح و یا ممکن است به سویه باکتری مربوط باشد و این احتمال وجود دارد که در زمانهای بیش از 10 دقیقه ریشه‌های القایی در دیسکهای برگ نارنج ظاهر گردد. به عنوان مثال مناسب‌ترین زمان برای تشکیل ریشه‌های القایی در قلمه‌های سرخ چوب *Sequoia sempervirens*، 24 ساعت گزارش شده است (Mihaljevic و همکاران، 1999).

همچنین در مواردی گزارش شده است که عدم پاسخ بافت گیاهی به اگروباکتریوم و در نهایت عدم تشکیل ریشه‌های القایی به دلیل تولید برخی مواد پلی فنلی است که از بافت‌های زخم شده گیاه ترشح شده و به عنوان ممانعت کننده تشکیل ریشه‌های القایی به آن اشاره شده است، سن بافت گیاهی مورد استفاده نیز در تشکیل شدن ریشه‌های القایی موثر می‌باشد. در بیشتر موارد هر چه سن بافت گیاهی افزایش می‌یابد از حساسیت آنها در برابر اگروباکتریوم کاسته می‌شود (Muginier، 1988). همانگونه که در بخش مواد و روشها ذکر گردید برای تهیه دیسکهای برگ نارنج از برگهای تازه تشکیل شده درخت چند ساله استفاده گردید. بنابراین ممکن است عدم پاسخ بافت گیاه به تلقیح، افزایش بیش از حد سن بافت گیاه میزبان باشد. لذا چنانچه از برگهای حاصل از کشت بافت گیاه استفاده گردد، امکان ظهور ریشه‌های القایی محتمل خواهد بود. در مواردی نیز عدم ظهور ریشه‌های القایی به عدم بیان ژنهای تولید کننده اکسین نسبت داده شده است که این خود ناشی از تعدد نسخه‌های متفاوت و چگونگی وارد شدن و محل ورود قطعات T_L-DNA و T_R-DNA بداخل ژنوم گیاه میزبان باشد (Ottaviani و همکاران، 1990) در تلقیح دیسکهای هویج با اگروباکتریوم فقط بافت کالوس تشکیل گردید و بافت مذکور به صورت ریشه‌های القایی تمایز پیدا نکرد. این پدیده می‌تواند به نوع سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش مرتبط باشد. چنین استنتاجی توسط سایر محققین نیز ارائه گردیده است. در تلقیح دیسکهای هویج با 32 سویه از اگروباکتریوم، تنها تعداد معدودی از آنها توانایی ایجاد ریشه‌های القایی در دیسکهای هویج را نشان دادند (Ryder و همکاران، 1985). همچنین ممکن است با تغییر شرایط محیطی به عنوان مثال پایین آوردن

دما، بافت کالوس تشکیل شده را تحریک به ریشه‌زایی نمود. اندازه‌گیری غلظت اکسین در دیسکهای هویج نشان داده است که مقدار این هورمون در دیسکهای تلقیح نشده 12/7 نانوگرم در گرم بوده است. این مقدار در بافت کالوس و ریشه‌های القایی به ترتیب به میزان 31/5 و 81/1 نانوگرم در گرم افزایش یافته است (Epstein و همکاران، 1991). بنابراین ممکن است با وارد کردن مقادیر کمی از اکسین به محیط کشت بتوان بافت کالوس را به ریشه القایی تبدیل کرد (Biondi و همکاران، 1997).

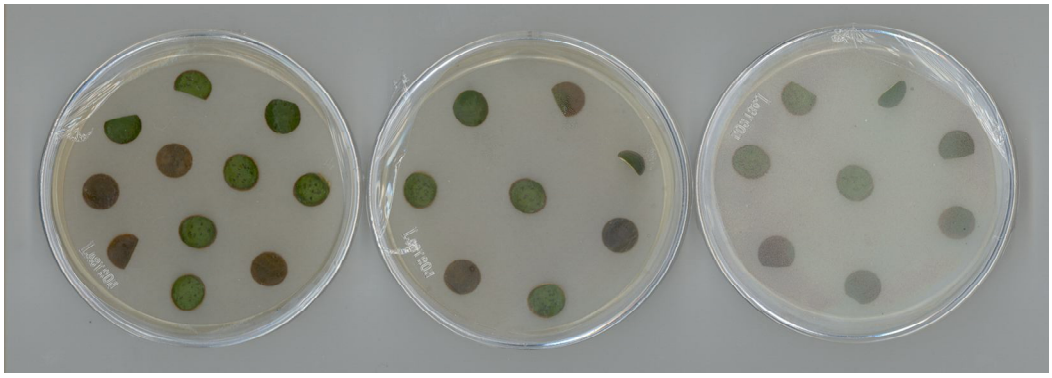
در رابطه با ریشه‌های القایی بوجود آمده بر روی غده استریل سیب‌زمینی و همچنین قطعات برگی و ساقه این گیاه چنین عنوان شده است که با توجه به اینکه منشاء ریشه‌های القایی از دستجات آوندی و یا به طور دقیق‌تر از لایه کامبیوم می‌باشد. بنابراین احتمال ظهور ریشه‌های القایی در قطعات برگی که حاوی دستجات آوندی بیشتری می‌باشند بیشتر از دیسک ریشه‌های غده‌ای است (Ottaviani و همکاران، 1990). در مورد شکل ریشه‌های القایی تشکیل شده در این پژوهش نیز مشاهده گردید که در قطعات برگ لوبیا و برگی سیب‌زمینی فقط یک نوع ریشه بر روی بافت گیاهی بوجود آمده است. لیکن در مورد گیاهچه نخود دو نوع ریشه القایی که یکی کاملاً تصادفی و کشیده و دیگری کوتاه و پیچ خورده بود بوجود آمد. نتایج ارائه شده توسط سایر محققین نیز موید این پدیده می باشد. در برخی بافتهای گیاهی تلقیح شده با اگروباکتریوم گاهاً دو الی سه فرم مختلف ریشه بوجود می‌آید (Ottaviani و همکاران، 1990؛ Amselem و Tepfer، 1992؛ Moyano و همکاران، 1999).

ریشه‌های القایی بوجود آمده در محور زیر لپه‌ای گیاهچه نخود از طریق سه مرحله کشت در محیط MS به ترتیب حاوی 500، 300 و 300 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم عاری از آلودگی باکتریایی شدند. ریشه‌های القایی بوجود آمده در گیاه خیار نیز پس از دو بار کشت در محیط حاوی سفوتاکسیم فاقد آلودگی باکتریایی شده است (Amselem و Tepfer، 1992). در مواردی نیز برای حذف اگروباکتریوم از آنتی‌بیوتیک کربانسیلن با غلظت 500 میلی گرم در لیتر (Katavic و همکاران، 1991) و یا سفکسین با همین غلظت استفاده شده است (Pettenati و همکاران، 1989). با توجه به پتانسیل مختلف بافتهای گیاهی برای تولید ریشه‌های القایی، انجام آزمایشات متعدد دیگر با بافتهای متفاوت و همچنین سویه‌های مختلفی از *A. rhizogenes* توصیه می‌گردد. همچنین با توجه به تشکیل بافت کالوس در دیسکهای هویج و تأثیر هورمون اکسین در تبدیل این بافت به ریشه پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات اتی تلقیح توام باکتریهایی تولید کننده اکسین و اگروباکتریوم و یا کارایی استفاده از مقادیر مختلف اکسین در تولید ریشه‌های القایی مورد بررسی قرار گیرد.

شکل 1- گیاهچه‌های استریل لوبیا

شکل 2- گیاهچه استریل نخود

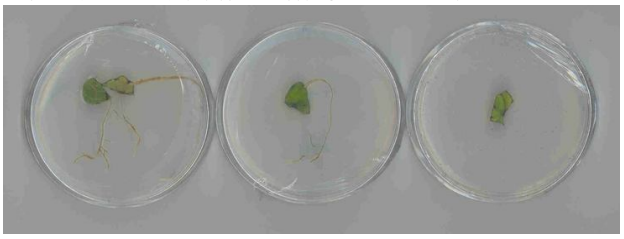
شکل 3- دیسک استریل هویج



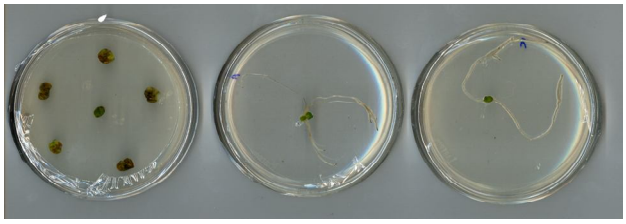
شکل 4- دیسک‌های استریل برگ نارنج

شکل 5- گیاهچه استریل حاصل از کشت بافت سیب‌زمینی

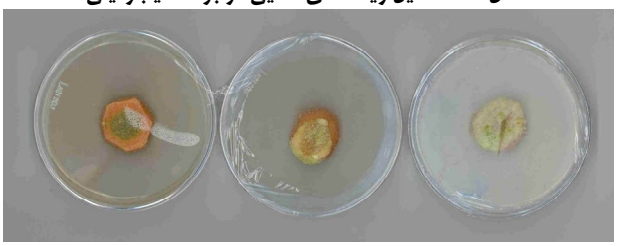
شکل 6- تشکیل ریشه‌های القایی برروی محور زیر لپه‌ای گیاهچه نخود



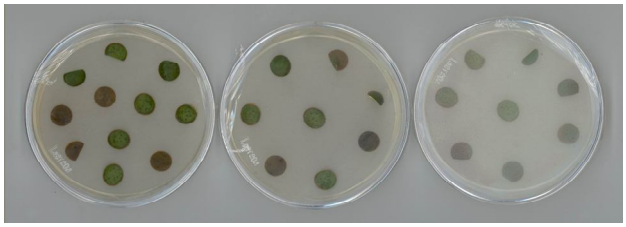
شکل 7- تشکیل ریشه‌های القایی در برگ لوبیا



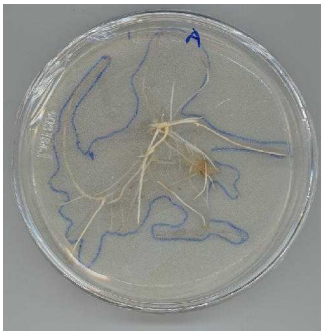
شکل 8- تشکیل ریشه‌های القایی در برگ سیب‌زمینی



شکل 9- تشکیل بافت کالوس در دیسک هویج



شکل 10- عدم تشکیل ریشه‌های القایی برروی برگ نارنج



شکل 11- ریشه‌های القایی فاقد *Agrobacterium rhizogenes*

فهرست منابع:

1. Amselem, J. and Tepfer, M. 1992. Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A_4 on cucumber. Plant Molecular Biology 19: 421-432.
2. Aoki, S. and Syono, K. 2000. The roles of Ri*rol* and Ng*rol* genes in hairy root induction in *Nicotiana debneyi*. Plant Science 159: 183-189.
3. Armitage, P., Walden, R., and Draper, J. 1988. Vectors for the transformation of plant cell using *Agrobacterium.* In: Plant genetic transformation and gene expression. J. Draper, R. Scott, P. Armitage, R. Walden. (eds). Blackwell Scientific Publications. PP. 3-67.
4. Bhat, S. R., Chitralekha, P. and Chandel, K. P. S. 1992. Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *citrus aurantifolia* (Christm.). swing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 19-25.
5. Biondi, S., Lenzi, C., Baraldi, R. and Bagni, N. 1997. Hormonal effects on growth and morphology of normal and hairy roots of *Hyoscyamus muticus.* Journal of Plant Growth Regulation 16: 159-167.
6. Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. and Barker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Molecular Plant-Microbe Interactions 14(6): 695-700.
7. Charlotte, H., Hanisch, C., Ramula, K. S., Dijkhuis, P. and Groot, B. 1987. Genetic stability of cultured hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tuber disc of potato CV. Bintje. Plant Science 49: 217-222.
8. Christy, M. C. and Sinclair, B. K. 1992. Regeneration of transgenic kale *B.* (*Campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Plant Science 87: 161-169.

9. Christy, M. C. and Sinclair, B. K. 1992. Regeneration of transgenic kale *B.* (*Campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Plant Science 87: 161-169.
10. Christy, M. C., Sinclair, B. K., Braun, R. H. and Wyke, L. 1997. Regeneration of transgenic vegetable brassicas *(Brassica oleracea and B. Campestris)* via Ri-mediated transformation. Plant Cell Report 16: 587-593.
11. Epstein, E., Nissen, S. J. and Sutter, E. G. 1999. Indol-3-acetic acid and indol-3-butyric acid in tissues of carrot inoculated with *Agrobacterium rhizogenese.* Journal of Plant Growth Regulation 10: 97-100.
12. Gartland, K. M. A. and Davey, M. R. (eds.). 1995. Agrobacterium Protocols (methods in molecular biology. 44) Human Press. New Jersey P. 417.
13. Guellec, V., David, C., Branchard, M. and Tempe, J. 1990. *Agrobacterium rhizogenese* mediated transformation of grapevine *(Vitis vinfera L.).* Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 20: 211-215.
14. Hamill, J. D., Parr, A. J., Robins, R. J. and Rhodes, M. J. C. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 5: 111-114.
15. Kamada, H. Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladona.* Plant Cell Report 5: 239-249.
16. Katavic, V., Jelaska, S., Bakran-Petricioli, T. and David. C. 1991. Host-tissue differences in transformation of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) by *Agrobacterium rhizogenese.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: 35-42.
17. Kerr, A. 1992. The genus Agrobacterium. In: the prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology. isolation, identification, application. Edited by A, Balows, H. Truper, M, Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. Second edition, Volume III. Springer Verlag Press Pp. 2214-2235.
18. Mihaljevic, S. Katavic, V. and Jelaska, S. 1999. Root formation in micropropagated shoots of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium.* Plant Science 141: 73-80.
19. Momcilovic, I., Grubisic, D., Kojic, M. and Neskovic, M. 1997. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 1-6.
20. Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bonfill, M., Morales, C. and Pinol, M. T. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenese* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* Plants. Phytochemistry 52: 1287-1992.
21. Mugnier, J. 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenese.* Plant Cell Report 7: 9-12.
22. Mukundan, U., Dawda, H. G., and Ratnaparkhi, S. 1997. Hairy root culture and secondary metabolic production (*Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root culture). Agro Botanica Publication, New Delhi PP: 119.
23. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-479.
24. Noda, T., Tanaka, N., Mano, Y., Nabeshima, S., Okawa, H. and Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 6: 283-286.
25. Otani, M. Mii, M. Hand, T., Kamada, H. and Shimada, T. 1993. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam.) Plants by *Agrobacterium rhizogenese.* Plant Science 94: 151-159.
26. Ottaviani, M. P., Schel, J. H. N. and Hanishch ten Cate, Ch. H. 1990. Variation in structure and plant regeneration of *Agrobacterium rhizogenese* transformed and

control roots of the potato CV. Bintje. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 25-34.

27. Pellegrineschi, A., and Davolio-Mariani, O. 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of scented geranium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 79-86.
28. Pettenati, J., Chriqui, D., Sarni-Manchapo, P., and Prinsen, E. 1989. Stimulation of lignification in neoformed calli induced by *Agrobacterium rhizogenese* on bean hypocotyls. Plant Science 61: 179-188.
29. Ryder, M. H., Tate, M. E. and Kerr, A. 1985. Virulence properties of strains of Agrobacterium on the apical and basal surfaces of carrot root discs. Plant Physiology 77: 215-221.
30. Somasegaran, P., and Hoben, H. J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York.
31. Stummer, B. E., Smith, S. E. and Langridge, P. 1995. Genetic transformation of *Verticordia grandis* (Myrtaceae) using wild-type *Agrobacterium rhizogenes* and binary *Agrobacterium* vectors. Plant Science 111: 51-62.
32. Tanaka, N., Hayakawa, M., Mano, Y., Phkawa, H. and Matsui, C. 1985. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 4: 74-77.
33. Trypsteen, M., Lijsebettens, M. V., Severen, R. V. and Montagu, M. V. 1991. Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of Echinacea purpura. Plant Cell Report 10: 85-89.
34. Webb, K. J., Jones, S. S., Robbins, M. P. and Minchin, F. R. 1990. Characterization of transgenic plants of *Lotus corniculatus.* Plant Science 70: 243-256.