مطالعه واکنش ریشه زایی برخی از گیاهان باغبانی در تلقیح با *Agrobacterium rhizogenes*

مجید عزیزی* - مصطفی آقابزرگی- محمد فارسی - علی تهرانی فر- جعفر ذوالعلی- مهدی قبولی[1]

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۱۰

چکیده

سخت ریشه زایی هنوز یکی از موانع عمده جهت تکثیر گیاهان می باشد. استفاده از باکتری خاکزی *A.rhizogenes* در بعضی از گیاهان، این مشکل را مرتفع نموده است. این آزمایش به منظور تحریک ریشه زایی و تولید ریشه های تراریخته با استفاده از دو استرین A4 و GMI9534 آگروباکتریوم رایزوژنز و روی سه نوع شاخه (سرشاخه های فصل جاری، شاخه های ۱ تا ۲ ساله و شاخه های ۵ تا ۶ ساله) برخی گیاهان باغی صورت گرفت. آزمایشات بصورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملا تصادفی، با ۳ تکرار و در هر تکرار با ۱۵ نمونه و در دو بخش انجام شدند. در بخش اول آزمایشات (*in vitro*)، ریزقلمه های زرشک بیدانه و گیاهچه های استریل اسطوخودوس تحت تلقیح باکتریایی قرار گرفتند. بخش دوم آزمایشات در گلخانه (*in vivo*) و با دو نوع تلقیح: اول تلقیح قلمه ها (زرشک بیدانه و فیکوس بنجامین) و دوم القاء باکتریایی به روش خوابانیدن هوایی (زرشک بیدانه، رز، رزماری و فیکوس بنجامین) صورت گرفت. ریشه زایی گیاهچه های استریل اسطوخودوس در تلقیح با استرین GMI9534 نسبت به استرین A4 و شاهد، افزایش معنی داری را در سطح ۱٪ نشان داد. در ساقه های خشبی (۱ تا ۲ ساله) رزماری تلقیح شده به روش خوابانیدن هوایی با استرین GMI9534 نسبت به استرین A4 و شاهد افزایش ریشه زایی بطور معنی داری در سطح ۵٪ مشاهده شد. ریشه زایی قلمه های جوان (۱ تا ۲ ساله) بنجامین و نیز ساقه های جوان (۱ تا ۲ ساله) بنجامین و ساقه های خشبی (۱ تا ۲ ساله) رز که به روش خوابانیدن هوایی با استرین GMI9534 تلقیح شدند، نسبت به استرین A4 و شاهد افزایش معنی داری را در سطح ۱٪ نشان دادند. ماهیت تراریختی ریشه های موئین با استفاده از تکنیک PCR و با تکثیر اختصاصی ژن *rolC* آگروباکتریوم رایزوژنز روی DNAی استخراج شده از ریشه های موئین به اثبات رسید.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه زایی، زرشک بیدانه، رز، رزماری، بنجامین، اسطوخودوس

مقدمه

تکثیر غیر جنسی یکی از روشهای مهم در تولید گیاهان یکنواخت و کلون نمودن آنها می باشد. در بسیاری موارد با استفاده از تاریکی دهی، کاربرد هورمون و یا پلی آمینها می توان این روند را بهبود بخشید. با این وجود سخت ریشه زایی هنوز یکی از موانع عمده بر سر راه ازدیاد موفق گیاهان می باشد. بتازگی تلاشهای فراوانی جهت رفع این مشکل و القاء ریشه زایی با کاربرد آگروباکتریوم رایزوژنز در برخی گیاهان انجام شده است (۲۸، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۰). آگروباکتریوم رایزوژنز یک باکتری خاکزی گرم منفی است که از طریق منافذ طبیعی یا زخم وارد گیاه شده و سبب شکل گیری ریشه های نابجا می شود (۳). این پدیده ناشی از انتقال قسمتی از T-DNA پلاسمید Ri (پلاسمید القاء کننده ریشه) باکتری به ژنوم هسته ای گیاه می باشد (۳ و ۴). روی T-DNA، ژنهایی قرار دارند که آنزیمهای سنتز هورمونهای گیاهی و یا پروتئین های موثر بر حساسیت سلولهای گیاهی برای هورمونهای گیاهی را کد می نماید (۶، ۱۳). T_L-DNA دارای ۴ ژن *rol* (root loci) است، که شامل *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* می باشد. این ۴ ژن جزئی از ۱۸ چارچوب منطقه قرائت (ORF_s) می باشند. ژن *rolB* یک ژن تعیین کننده در القاء ریشه زایی شناخته شده است. زیرا در بین تمام ژنهای Ri و (ORF_s) تنها این ژن قابلیت انحصاری در القاء ریشه نابجا را دارد. ژنهای *rolA* و *rolC* نیز بطور جداگانه اما با محدوده کمتری

۱- به ترتیب استادیار گروه باغبانی، کارشناس ارشد باغبانی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، استادیار گروه باغبانی، دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد
نویسنده مسئول Email: azizi@ferdowsi.um.ac.ir

در القاء ریشه زایی فعالیت می کنند. بیشترین ریشه زایی زمانی اتفاق می افتد که ژن *rolB* با هر دو *rolA* و *rolC* ترکیب شده باشد و ثابت شده است که این ۳ ژن بطور سینرژیستی ریشه زایی را کنترل می کنند (۲۵).

محققین متعدد با کاربرد آگروباکتریوم رایزوژنز به ریشه زایی موفقی در بادام[1] (۹، ۱۰)، سیب[2] (۱۱، ۳۰)، کیوی[3] (۲۷)، گردو[4] (۵)، گونه هایی از کاج[5] (۲۵، ۲۲، ۲۴)، کاج اروپایی[6] (۲۳) و اکالیپتوس[7] (۲۱) دست یافته اند.

بنظر می رسد انتقال ژن توسط آگروباکتریوم رایزوژنز به بافت گیاهی روشی مطلوب برای بهبود ریشه زایی گیاهان است(۱۹). هدف این تحقیق القاء ریشه نابجا، تولید ریشه های تراریخته و ارائه روشی جدید، آسان و کاربردی در استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز در القاء ریشه و انتقال ژن در برخی گیاهان باغبانی می باشد (۱۸).

مواد و روش ها

کشت باکتری و استرین های مورد استفاده

در این آزمایش از آگروباکتریوم رایزوژنز استرین های GMI9534 و A4 استفاده شد. استرینهای باکتری توسط دکتر اوسکمان کالندی[8] (مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی فنلاند) به گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد اهدا شده بود. از محیط کشت انتخابی LB حاوی ۵۰ mg/l آنتی بیوتیک ریفامپسین و ۵۰ mg/l آنتی بیوتیک کانامایسین برای کشت باکتری استفاده شد. یک کلنی باکتری رشد یافته در سطح محیط کشت جامد پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، به ۱۰ ml حیط کشت مایع منتقل گردیده و بمدت ۳۶-۲۴ ساعت بر روی شیکر چرخشی با دور ۲۰۰-۱۸۰ rpm انکوبه شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی تازه به ۵۰ ml محیط کشت مایع فاقد آنتی بیوتیک کانامایسین منتقل گردیده و در شرایط مشابه انکوبه شد. پس از آنکه OD۶۰۰ کشت باکتریایی به ۱-۰/۸ رسید، باکتری ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ rpm بمدت ۶ دقیقه رسوب داده شدند. پلت باکتری ها در ۲۰ ml محیط کشت مایع مخلوط ۳ به ۱ از محیط کشت LB و محیط کشت بافت گیاهی MS سوسپانسیون شد. از سوسپانسیون باکتریایی حاصل، برای تلقیح نمونه ها استفاده شد(۱۸).

تلقیح در *in vitro*

این آزمایش ها در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۵ نمونه، برای بررسی اثر باکتری بر ریشه زایی ریزقلمه های جدا شده از گیاه زرشک بی دانه[9] و گیاهچه های لاواند[10] در شرایط کشت استریل انجام شد. برای تلقیح باکتری به ریزقلمه های زرشک بی دانه از روش فروبری در سوسپانسیون باکتریایی و در گیاهچه های استریل لاواند از روش تزریق سوسپانسیون روی ساقه ها استفاده شد.

ریزقلمه های جداسازی شده از سرشاخه های جوان زرشک بی دانه و بذرهای لاواند بصورت سطحی استریل شدند. استریلیزاسیون سطحی با ضدعفونی نمونه ها توسط الکل ۷۰٪ بمدت ۵۰ ثانیه، شستشو با آب مقطر استریل و سپس ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل جمعا بمدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

ناحیه انتهایی ریزقلمه های استریل زرشک بی دانه بمدت ۱ تا ۲ ساعت در سوسپانسیون باکتری فرو برده شد و سپس نمونه های تلقیح شده بصورت عمودی در محیط کشت جامد MS حاوی ۳۰ گرم درلیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار فاقد آنتی بیوتیک قرار داده شدند. بمنظور دستیابی به گیاهچه های استریل گیاه لاواند نیز بذرهای استریل گیاه در سطح محیط کشت مشابه کشت داده شدند. بعد از گذشت دو ماه ریزنمونه های لاواند آماده تلقیح باکتری بودند. تلقیح روی گیاهچه های استریل لاواند با یک سرنگ تزریق انسولین و در انتهای ساقه (نزدیک به طوقه) انجام شد. بطوریکه بعد از ایجاد زخم توسط سوزن، یک قطره کوچک از سوسپانسیون باکتری روی محل زخم قرار داده شد.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت، باکتری در سطح محیط کشت رشد نموده و یک هاله موسیلاژی را اطراف نمونه ها بوجود آورد. این مرحله (مرحله هم کشتی)، مدت زمانی است که باکتری اجازه می یابد تا القاء ریشه زایی را از طریق انتقال DNA-T انجام دهد.

1) Prunus amygdalus L.
2) Malus pumla Mill
3) Actinidia deliciosa A.
4) Juglans regia L.
5) Pinus spp
6) Larix sp
7) Eucalyptus spp
8) Oskman Calendy
9) Berberis vulgar Var. asperma
10) Lavandula spica

اما بعد از اتمام مرحله همکشتی، جهت حفظ بقاء ریزنمونه ها، باید باکتری از محیط حذف گردد. لذا نمونه ها از محیط کشت خارج شده و ابتدا در محلول سفوتاکسیم به غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و بمدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس به محیط MS حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. ریزنمونه ها هر ماه یکبار به محیط کشت تازه منتقل شدند.

تلقیح در *in vivo*

این آزمایشات برای بررسی اثر باکتری بر ریشه زایی قلمه های گیاهان مورد آزمایش در شرایط محیط کنترل شده گلخانه و شرایط محیط معمولی رشد انجام شد. از دو روش برای تلقیح باکتری استفاده شد. قلمه های دو گیاه زرشک بی دانه و فیکوس بنجامین[1] به روش فروبری قلمه در سوسپانسیون باکتری و شاخه های زرشک بی دانه، گل رز[2]، رزماری[3]، و فیکوس بنجامین به روش خوابانیدن هوایی تلقیح شدند. این آزمایشات بصورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۵ نمونه، انجام شد.

قلمه های زرشکبیدانه و فیکوس بنجامین از دو نوع ساقه با سن ۱ تا ۲ ساله و ۵ تا ۶ ساله، بطول۷/۵ سانتیمتر تهیه شدند. ۱/۵ سانتیمتر انتهایی قلمه ها با اسکالپل زخم زنی گردید. برشها و سوراخهای ایجاد شده از پوست ساقه گذشته و به بخش آوندی رسید. قلمه های زرشکبیدانه بمدت ۵ دقیقه در محلول هورمون IBA با غلظتهای صفر، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر فروبری سریع گردیدند. سپس به قلمه ها اجازه داده شد در هوای آزاد خشک شوند. در مرحله بعد قلمه ها بمدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی فروبرده شدند. بعد از تیمار، قلمه ها جهت ریشه زایی در پرلایت استریل (استریلیزاسیون در اتوکلاو بمدت یک ساعت)، قرار گرفتند (۱۳).

در تلقیح به روش خوابانیدن هوایی، ابتدا ساقه های مورد نظر با اسکالپل یا سوزن طبی زخمزنی شده، سپس قطعهای پنبه مرطوب استریل (استریلیزاسیون با جوشاندن در آب) روی محل زخم قرار داده و توسط پارافیلم و لایه ای از فویل آلومینیوم پوشانده شد. سوسپانسیون باکتریایی در توده های پنبه مرطوب که محل خراش را پوشیده بودند تزریق گردید. سه تا چهار روز پس از تلقیح باکتری، توده های پنبه آغشته به باکتری با توده های پنبه مرطوب جدید تعویض شدند. این روش تلقیح با اعمال تغییراتی در روش بکار رفته توسط سلمون و همکاران انجام شد (۲۸).

تعیین ماهیت تراریختی ریشه های موئین

همانگونه که قبلاً ذکر گردید، ظهور ریشه های موئین حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز، حاصل انتقال DNA-T پلاسید Ri این باکتری به سلول های گیاهی می باشد. بنابراین بررسی ماهیت تراریختی ریشه های موئین را می توان با ردیابی ژن های موجود بر روی DNA-T این باکتری که مهمترین آنها ژن های rolA، rolB و rolC هستند انجام داد. از روشهای مختلفی بدین منظور استفاده می شود که موثرترین آنها استفاده از تکنیک PCR است. در این تحقیق برای بررسی ماهیت تراریختی ریشه های موئین، از تکنیک PCR بر روی DNA ژنومی ریشه های موئین برای تکثیر بخشی از ژن rolC بطور اختصاصی استفاده شد. براساس روش کرولیکا[4] وهمکاران الیگونوکلئوتید۲۰مری با توالی ۵´-CTCCTGACATCAAACTCGTC-۳´ بعنوان آغازگررفت و ۵´-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-۳´ بعنوان آغازگر برگشت برای تکثیر قطعه ای از ژن rolC طراحی شدند. توالی آغازگرهای انتخاب شده با استفاده از برنامه جستجوگر BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI برای یافتن همولوژی، جستجو گردید و همولوژی آنها با بخشی از توالی های ژنی متناظر در استرین A4 آگروباکتریوم رایزوژنز تائید شد(۱۸).

DNAی ژنومی ریشه های موئین با استفاده از روش دلاپورتا و همکاران استخراج شد(۱۲). همچنین نمونه های DNA ی ژنومی و پلاسمیدی باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز از کشتهای ۲۴ ساعته استرین های مورد آزمایش با استفاده از کیت استخراج DNA از باکتری، DIAtom™ DNA Prep Kit، استخراج شد. واکنش های PCR در ۴۰ سیکل با ترکیب ۴۰ میکروگرم نمونه DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش، ۱/۳ میکرولیتر MgCl، ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام

1) Ficus benjamine
2) Rosa spp
3) Rosmarinus officinalis
4) Krolicka

جدول(۱) نتایج حاصل از تأثیر استرین های مختلف *A.rhizogenes* بر درصد ریشه زایی گیاهان مورد بررسی در تحقیق

نژاد	لاواند(اسطوخودوس)		رزماری		رز		فیکوس بنجامین			
باکتری	روز	روز	ساقه	ساقه	ساقه		قلمه		خوابانیدن هوایی	
	هفتم	چهاردهم	علفی	خشبی	علفی	خشبی	جوان	مسن	جوان	مسن
GMI	۳۵ a	۵۰ a	صفر d	۱۰۰ a	صفر c	۶۳/۳۳a	۸۲/۲۲a	صفر b	۱۰۰a	۸۴/۴۴b
A4	۱۵ b	۲۵ b	صفر d	۸۰ b	صفر c	۳۶/۶۷b	۷۵/۵۵a	صفر b	۷۳/۳۳c	۴۰ d
شاهد	صفر c	صفر c	صفر d	۶۶/۶۷c	صفر c	صفر c	صفر b	صفر b	صفر e	صفر e

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است

فولادی نیز در آزمایشی تیمار هورمونی را روی قلمه های زرشکبیدانه اعمال نمود، اما نتوانست ریشه ایی بدست آورد. وی مشکلات این گیاه را در نقص ژنهای وابسته به ریشه زایی و یا عدم مقاومت بافت این گیاه در برابر رطوبت میست عنوان نمود (۱).

نکته قابل توجه در این آزمایش این بود که در تلقیح به روش خوابانیدن هوایی روی ساقه های فصل پیشین، بعد از گذشت ۱۵ تا ۲۰ روز، کالوسزایی کمی در محل تلقیح مشاهده شد. اما این واکنش گیاه به ریشه زایی منجر نگردید.

ریشه زایی رزماری

شاخه های علفی رزماری همانند زرشک، پس از تلقیح با باکتری سرشاخه سوزی شدیدی را نشان دادند. بطوریکه کلیه ساقه های علفی دچار نوك سوزی گردیدند و هیچگونه ریشهای حاصل نشد. اما تمام ساقه های خشبی تلقیح شده با هر دو استرین باکتری، تولید ریشه نمودند (شکل۲).

در تلقیح ساقه های خشبی با استرین GMI به میزان ۱۰۰ ٪ ریشه زایی بدست آمد ولی استرین A4 حداکثر ۸۰ ٪ ریشه زایی را القاء نمود. این در حالی بود که نمونه های شاهد۶۶/۶۷ ٪ ریشه زایی داشته اند. برداشت داده های آماری ۳۰ روز پس از تلقیح صورت گرفت.

سن ساقه در سطح ۱٪ اثر معنیداری بر درصد ریشه زایی داشت و اثر استرین باکتری بر ریشه زایی در سطح ۵٪ معنی دار بود. بین سن ساقه و استرین باکتری عکس العمل متقابلی در سطح ۵٪ وجود داشت. همانطور که از جدول۱ مشخص می شود ساقه های علفی هیچ گونه عکس العملی نسبت به باکتری نشان نداده و در آنها هیچ گونه ریشه زایی مشاهده نشده است. بالاترین درصد ریشه زایی (۱۰۰ ٪) در تیمار با استرین GMI ایجاد شد. اما بین تیمار استرین A4 و نمونه های شاهد اختلاف معنیداری وجود نداشت(جدول ۱).

ریشه زایی رز

در گیاه رز نیز همانند رزماری، ساقه های علفی فصل جاری پس از تلقیح دچار سرسوزی شدیدی گردیدند. اما تلقیح روی ساقه های ۲ تا ۳ ساله نتایج مثبتی بدنبال داشت. نمونه های شاهد هیچگونه ریشهای تولید نکردند (شکل۲).

تلقیح ساقه های خشبی توسط استرین GMI بیشترین درصد ریشه زایی (۶۳/۳۳ درصد) را داشت و تیمار با استرین A4 نیز به میزان ۳۶/۶۷درصد ریشه زایی را القاء نمود اما نمونه های شاهد هیچ ریشهای تولید ننمودند. برداشت دادههای آماری ۳۰ روز پس از تلقیح صورت گرفت (جدول ۱).

اثر سن ساقه و اثر استرین باکتری در رز در سطح ۱٪ معنی دار بود و بین سن ساقه و نوع باکتری نیز در سطح ۱٪ اثر متقابل معنی داری وجود داشت. تئو و همکاران نیز با تلقیح ریز قلمه های هیبریدهای پایه رز توانستند ریشه های تراریخته را ایجاد نمایند و بعد از باززایی و انتقال گیاهان تراریخته به گلخانه، قلمه این گیاهان نیز براحتی ریشه دادند. آزمایشات PCR حضور ژنهای rol را در تمام این ریشه ها به اثبات رساند(۳۱).

ریشه زایی قلمه بنجامین

قلمه های مسن بنجامین با تیمار باکتریایی ریشه های تولید

نکردند، اما در قلمه های جوان (۱ تا ۲ ساله) اولین سرآغازه های ریشه، ۷ روز بعد از تلقیح ظاهر شدند. این در حالی بود که ظهور ریشه در نمونه های شاهد خیلی دیرتر (پس از ۳ هفته) اتفاق افتاد.

تلقیح قلمه های جوان توسط استرین GMI بیشترین درصد ریشه زایی (۸۲/۲) را نتیجه داد. تیمار با استرین A4 نیز به میزان ۷۵/۵درصد ریشه زایی را القاء نمود. نمونه های شاهد تا روز سی ام ریشه ای تولید نکردند.

تعداد ریشه در قلمه های شاهد (۳/۵ عدد ریشه به ازاء هر قلمه) نسبت به قلمه های تیمار شده توسط استرین A4 (۳۰ عدد ریشه به ازاء هر قلمه) کمتر بود. این در حالی است که ریشه های تولید شده توسط استرین GMI بسیار فراوان بوده و همانطور که در شکل (۳) مشهود است به راحتی قابل شمارش نیستند. در گزارش ویسوکاین و همکاران، تعداد ریشه های تراریخت ۳ برابر بیشتر از تعداد ریشه های گیاهان شاهد بوده (۳۲). همچنین برطبق گزارش چن و همکاران، تعداد ریشه در قلمه های تاگزوس تیمار شده با آگروباکتریوم رایزوژنز ۲ تا ۳ برابر بیشتر از گیاهان شاهد و ۱/۵ تا ۱/۱۱ برابر بیشتر از گیاهان تیمار شده با IBA بوده است (۷).

از طرف دیگر در قلمه های شاهد، ریشه ها عمدتا از یک طرف قلمه خارج شدند. در حالیکه ریشه های بدست آمده توسط القاء باکتریایی در همه جهات سطح برش قلمه و بطور یکنواختی مشاهده شد(شکل ۳). این مشاهدات با نتایجی ژو و همکاران در ریشه زایی ریزقلمه های پایه BP10030 گلابی (*Pyrus communis*) بدست آورد مطابقت دارد (۳۳). انشعابات سیستم ریشه های بدست آمده از تلقیح باکتری، بسیار فراوانتر و گستردهتر از انشعاب ریشه ها در قلمه های شاهد بود. تاثیر سن قلمه و نوع استرین باکتری و اثرات متقابل آنها بر درصد ریشه زایی قلمه های بنجامین در سطح ۱٪ معنی دار بود. برداشت داده های آماری ۲۰ روز پس از تلقیح صورت گرفت.

ریشه زایی بنجامین در تلقیح باکتریایی به روش خوابانیدن هوایی

تولید کالوس ۷ روز بعد از تلقیح باکتریایی آغاز شد و بعد از ایجاد حجم زیادی از کالوس در محل زخمها، سرآغازه های ریشه از تمام سطح کالوس نمایان شدند(شکل ۳).

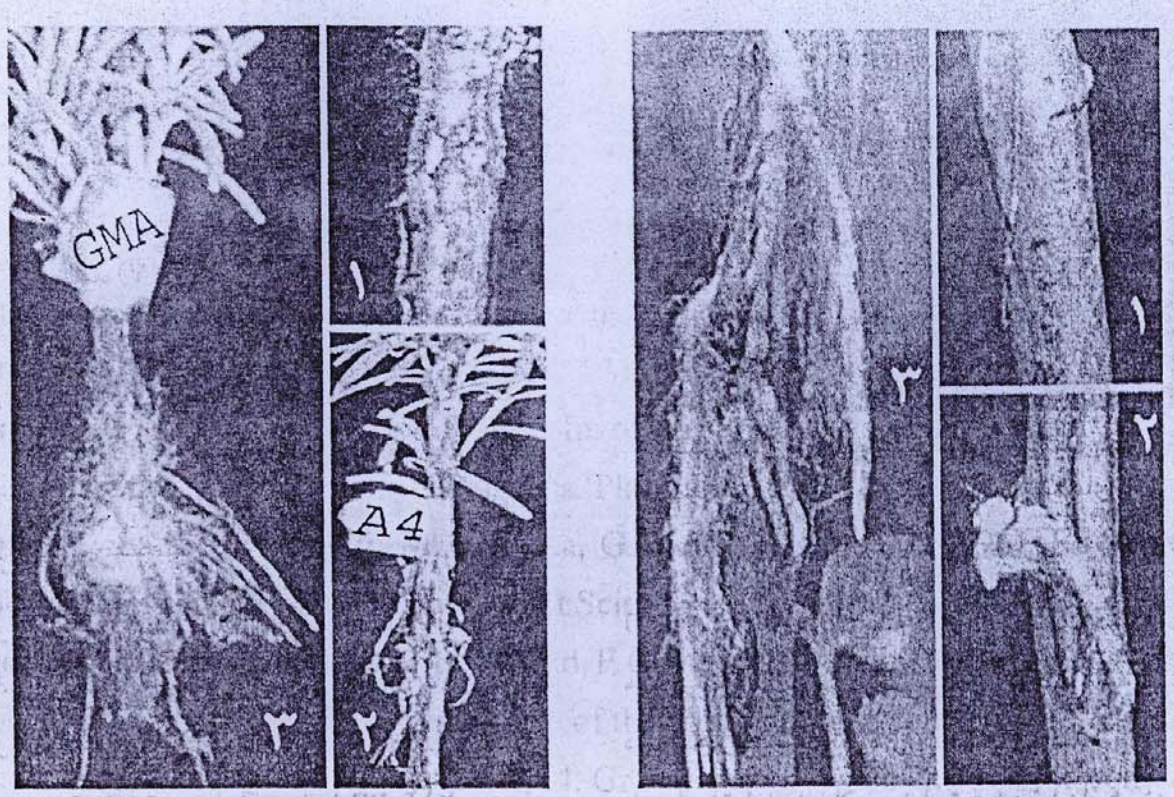
سن بافت قلمه ها به وضوح اختلاف آشکاری در ریشه زایی ایجاد کرد و بافتهای جوانتر (۱ تا ۲ ساله) نسبت به ساقه های مسن تر (۵ تا ۶ ساله) ریشه زایی بسیار بهتری از خود نشان دادند. تلقیح ساقه های جوان توسط استرین GMI بیشترین درصد ریشه زایی (۱۰۰٪) را داشت. اما همین استرین بر ساقه های مسن ۸۴/۴۴٪ ریشه زایی را القاء نمود. تیمار استرین A4 نیز بر ساقه های جوان ۷۳/۳۳٪ و بر ساقه های مسن ۴۰٪ ریشه زایی را القاء نمود. در نمونه های شاهد هیچگونه ریشه ای مشاهده نگردید(شکل ۳). اثر سن ساقه و نوع استرین باکتری و نیز اثر متقابل سن ساقه و نوع باکتری در سطح ۱٪ بر ریشه زایی ساقه های بنجامین تلقیح شده به روش خوابانیدن هوایی معنی دار بود (جدول ۱).

بطور کلی بررسی تاثیر سن ساقه در گیاهان تلقیح شده نشان داد که تمام سرشاخه های فصل جاری قهوه ای شده و محل تلقیح دچار سوختگی گردید (زرشک بیدانه، رز، رزماری) و حتی این سوختگی از محل تلقیح تا نوک شاخه را نیز در برگرفت. اما در دو نوع شاخه دیگر (شاخه های ۲-۱ ساله و ۵-۴ ساله) ریشه زایی اتفاق افتاد و همانطور که پیش بینی میشد بیشترین ریشه زایی در شاخه های جوانتر ۱ تا ۲ ساله نسبت به ساقه های مسن بوقوع پیوست. از نظر آماری نیز اثرات این دو نوع سن ساقه، در سطح ۱٪ معنی دار بود. این موضوع در دیگر آزمایشات نیز به اثبات رسیده است برای مثال سلمون و برادشاو نیز سرشاخه های فصل جاری را جهت تلقیح مناسب ندانسته و زمانی که بافت ساقه شروع به سخت شدن نمود، تلقیح باکتریایی را انجام دادند (۲۹). از طرفی فلکرا و همکاران بیان می کنند که یکی از عوامل مهم بازدارنده ریشه زایی، سن گیاه مادری می باشد و باید برای برطرف نمودن آن، گیاهان مسن را روی پایه های جوان پیوند زد تا بازجوان سازی صورت گیرد (۱۵). هاتا و همکاران بیان کردند که قلمه های گرفته شده از گیاهان جوان، درصد ریشه زایی بهتر، تعداد ریشه و طول ریشه بیشتری نسبت به قلمه گیاهان مسن داشتند (۱۷). چریکو و آدام با تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز تمام بافتهای گیاه جوان تنباکو را ریشه دار کردند. در حالیکه گیاهان پیر توانایی پاسخگویی به القاء باکتریایی را نداشتند. در گیاهان پیر ناتوانی در تمایز یافتن کامل بافتها، با عدم ریشه زایی رابطه مستقیم داشت (۸).

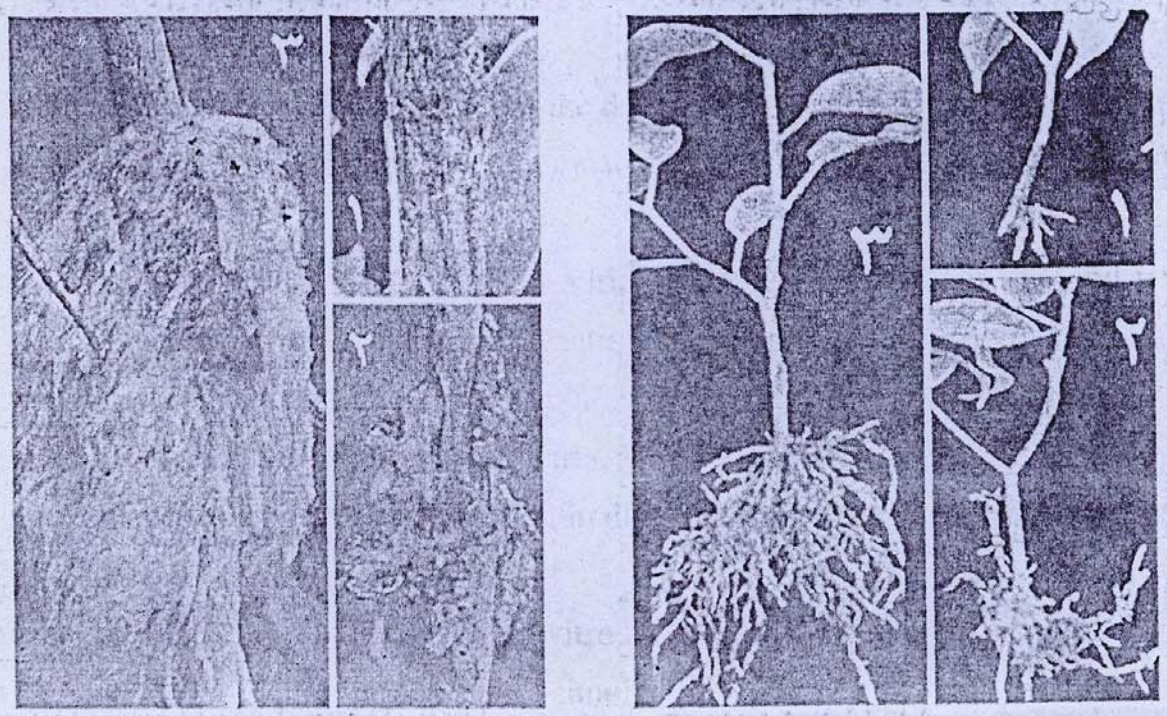
درصد ریشه زایی به میزان قدرت تاثیر گذاری یا نفوذ باکتری روی بافت هدف بستگی دارد. توانایی یک استرین، وابسته به

ساختار ژنهای *vir* آن می باشد. بطور حتم کارآیی این ژنها در برخی استرین ها بیشتر از دیگران خواهد بود. در این آزمایش اختلافات قابل ملاحظه ای بین تاثیر استرین GMI9534 با A4 مشاهده گردید. بطوریکه در تمام آزمایشات استرین GMI9534 بیشتر از استرین A4 تاثیر گذار بود و تعداد، حجم و طول ریشه های القاء شده توسط این استرین بسیار بیشتر از نتایج حاصل از استرین A4 بود (شکل ۲ و ۳).

در تمام آزمایشات اثرات این دو استرین در سطح ۱٪ بطور معنی داری با هم اختلاف داشتند. اما در تلقیح قلمه های بنجامین این اختلاف در سطح ۵٪ معنی داری گردید این در حالی بود که هر دو استرین با شاهد دارای اختلاف معنی داری بودند (جدول ۱). شاید همسانی تاثیر استرین ها در این روش تلقیحی بدلیل بهتر



شکل(۲) سمت راست رز، سمت چپ رزماری. ۱) شاهد ۲) تیمار با استرین A4 ۳) تیمار با استرین GMI



شکل(۲) سمت راست، قلمه فیکوس بنجامین. سمت چپ، القاء به روش خوابانیدن هوایی در فیکوس بنجامین.
۱)شاهد ۲) تیمار با استرین A4 ۳) تیمار با استرین GMI

در دسترس بودن بافت هدف یا شرایط مناسبتر، جهت القاء ریشه باشد.

در آزمایشات محققان دیگر نیز استرین A4 نسبت به دیگر استرین های آگروباکتریوم رایزوژنز کمترین تاثیر را در القاء ریشه زایی داشته است. بطور مثال: در نتایج آزمایشات گری و همکاران با استرین های A4, 15834, K599, LBA 9402, 9365 و 9340 آگروباکتریوم رایزوژنز روی ریشه زایی آرتمیزیا (درمنه) نیز استرین A4 کمترین ریشه زایی را نتیجه داد (۱۶).

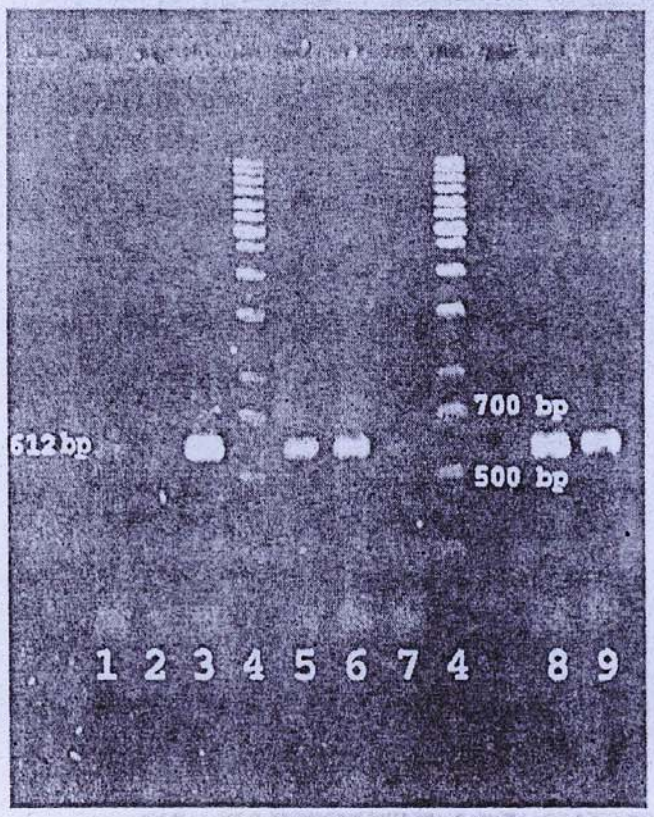
در تلقیح قلمه های عناب با دو استرین آگروباکتریوم رایزوژنز، درصد ریشه زایی و تعداد ریشه بیشتری با استرین TRI105 نسبت به استرین A4 بدست آمد (۱۷). در بررسی ریشه زایی کاج رادیاتا با تلقیح استرین های LBA9402 و A4 توسط لی و لونگ نیز استرین A4 درصد ریشه زایی و تعداد ریشه کمتری را القاء نمود (۲۰).

اثبات ماهیت تراریختی

بدلیل دسترس بودن پرایمر rolC، آزمایش PCR بوسیله این پرایمر روی DNA استخراج شده از استرین های A4 و GMI آگروباکتریوم رایزوژنز و DNA ریشه های موئین بدست آمده، بطور جداگانه صورت گرفت و قطعاتی بطول bp ۶۱۲ روی ژل الکترفورز مشاهده گردید. مشاهدات انجام شده نتایج زیر را نشان داد:

پلاسمیدهای استخراج شده از هر دو باکتری (شماره ۸ و ۹ روی ژل) در مقایسه با سایز مارکر (شماره۴) باندی واضح در اندازه bp ۶۱۲ ایجاد نمودند. اما DNA ریشه گیاهان شاهد بنجامین (شماره۲) روی ژل هیچ باندی ایجاد ننمودند.

از طرفی DNA ریشه های بدست آمده با القاء استرین GMI در خوابانیدن هوایی شاخه های بنجامین (شماره۱) و همچنین DNA ریشه های تراریخته توسط استرین A4 روی قلمه های بنجامین (شماره۷) باند ضعیفی را نشان دادند. اما در مقایسه این باندها با باند شاهد مشخص شد که القاء ژن صورت گرفته است. این در حالی است که DNA ریشه های تراریخته اسطوخودوس که توسط استرین GMI القاء شده بودند (شماره۳)، DNA ریشه قلمه های بنجامین که توسط استرین GMI تلقیح شده بودند



شکل(۴) نتایج آنالیز PCR ژن rolc آگروباکتریوم رایزوژنز در استرین های مورد بررسی و ریشه های باززایی شده

(شماره۵) و DNA ریشه های ایجاد شده در روش خوابانیدن هوایی بنجامین توسط استرین A4 (شماره۶)، بیشترین وضوح را در باندهای بدست آمده از خود نشان دادند. این وضوح همانند باند بدست آمده از پلاسمید استخراج شده از هر دو استرین باکتری بود و نشان دهنده انتقال ژن و تولید ریشه های تراریخت در اثر القاء باکتریایی می باشد (شکل۴).

نتایج محققین دیگر نیز نشان داده است که ژن rolC و rolB در بافتهای صنوبر تراریخته بیان می گردند (۲۶). سلمن و برادشا در مورد چگونگی عمل ژنها چنین بیان می کنند که بعد از انتقال ژنهای rol با آگروباکتریوم به هیبریدهای رز، حساسیت سلولها به اکسین آنقدر بالا میرود که حتی به اکسین درونی موجود در شاخه ها و برگها نیز پاسخ می دهند(۲۹). تشکیل ریشه در قلمه گیاهان تراریخته منتقل شده به گلخانه، ثابت کرده است که ریشه زایی بدلیل حضور ژنهای rol افزایش یافته است (۲۹). ارکیسلی و همکاران ثابت کردند که باکتری به تنهایی تولید IAA ندارد، بلکه حساسیت به این هورمون یا هورمون خارجی مشابه آن را در بافت تلقیح شده بالا می برد (۱۴).

با توجه به جمیع نتایج بدست آمده می توان اظهار کرد که تلقیح

ساقه ها بر روی گیاه مادری و به روش خوابانیدن هوایی ، روشی آسان و کاربردی است که نسبت به شرایط *in vitro* با هزینه کمتری صورت میگیرد و از طرفی کاربرد این روش در گیاهان سخت ریشه زا نیز قابل توجه است .

سپاسگزاری

در پایان لازم می دانیم از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت همکاری بیدریغشان در انجام این پژوهش قدردانی نمایم .

منابع

۱. کرونی فولادی، ح . ۱۳۸۳ بررسی تاثیر برخی از تیمارهای تسهیل کنندگی ریشه زایی بر ریشه دار شدن قلمه تعدادی از گونه های سخت ریشه زا . پایان نامه دوره کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد .

۲. وظیفه شناس، م . ر . ۱۳۸۰ . ریشه دار کردن قلمه های زرشک بیدانه با استفاده از تیمارهای تنظیم کننده رشد، پاگرما و مه افشان . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شیراز .

3. Elliot, C., & Waltham, MA.1951. Manual of Bacterial Plant Pathogens, 2nd edn., Chronica Botanica.
4. Moore, L., G. Warren and Strobel G. 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by Agrobacterium rhizogenes. Plasmid. 2: 617-626.
5. Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, M., Falasca, G. and Damiano, C. (1996). Root induction by Agrobacterium rhizogenes in walnut. Plant Science 118:203-208.
6. Chilton, M. D., D. a. Tepfer, A. petit, C. david, F. Casse-Delbart & J. Tempe. 1982. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Nature. 295: 432-434.
7. Chen, K. P., S. R. Kuo, and C. K. Ho. 2004. Growth performance and Taxane content of Taxus mairei cuttings with roots induced by Agrobacterium rhizogenes. Taiwan J. For Science. 19(2):133-142.
8. Chriqui, D., and S. Adam. 1988. Effect of the differentiated or dedifferentiated state of tobacco pith tissue on its behaviour after inoculation with Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Rep. (Historical Archive). 7: 111 - 114.
9. Damiano, C., Archilletti, T., Caboni, E., Lauri, P., Falasca, G., Mariotti, D. and Ferraiolo, G. (1995). Agrobacterium-mediated transformation of almond: in vitro rooting through localised infection of A. rhizogenes w.t.. Acta Horticulturae 392:161-169.
10. Damiano, C., Chiariotti, A., Caboni, E., Quarta, R. and Boumis, G. (1991). Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruit species in vitro. Acta Horticulturae 300:211-224.
11. Damiano, C., and S. Monticelli . 1998. In vitro fruit trees rooting by Agrobacterium rhizogenes type wild infection . Electronic J. of Biotechnology. Vol.1 No.2.
12. Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation Ver. II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.