تولید گیاهان بذرالبنج تراریخت (*Hyoscyamus muticus*) بوسیله آگروباکتریوم رایزوژنز

محسن محمودنیا میمند - محمد فارسی- حسن مرعشی- فرج ا... شهریاری- جعفر ذوالعلی[1]

تاریخ دریافت ۸۵/۸/۱۷

چکیده

گیاهان بذرالبنج منبع مهمی از آلکالوئیدهای تروپانی هستند. این مواد در ریشه گیاه تولید شده و سپس به قسمتهای هوایی گیاه منتقل می شوند. ریشه های مویین حاصل از تلقیح قطعات برگی گیاه بذرالبنج با باکتری *Agrobacterium rhizogenes*، قادر به باززایی به گیاه کامل هستند. این تحقیق با هدف بررسی ثبات ژنتیکی در گیاهان باززایی شده و نتاج آنها و مقایسه میزان رشد ریشه در گیاهان تراریخت با گیاهان معمولی صورت گرفت. قطعات برگی و گره ای از گیاهان بذرالبنج، با باکتری *A.rhizogenes* نژاد LBA9402 مایه زنی گردید. ریشه های مویین پس از ظهور در محیط کشت مایع B5 تثبیت شدند. سپس کشت های ریشه موئین جهت باززایی به محیط کشت های جامد MS و B5 با ترکیبات مختلف هورمون های اکسینی و سیتوکنینی منتقل گردیدند گیاهان تراریخت باززایی شده از لحاظ ظاهری تفاوت قابل ملاحظه ای با یکدیگر و با گیاهان شاهد نشان دادند. از لحاظ شکل، اندازه برگها و همچنین تولید گل و بذر تفاوت زیادی در بین آنها وجود داشت. نتایج حاصل از آزمایشات PCR برای ژن *rolB* از T-DNA باکتری، ماهیت تراریختی گیاهان باززایی شده را تایید نمود.

واژه های کلیدی: *Hyoscyamus muticus*، *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه مویین، آلکالوئیدهای تروپانی.

مقدمه

بذرالبنج مصری یکی از گیاهان دارویی مهم از خانواده سولاناسه و جنس هیوسیاموس می باشد. وجود آن در ایران در نواحی مرکزی، جنوبی و جنوب شرقی گزارش شده است. آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین، متابولیت های ثانویه گیاهی از گروه آلکالوئید های تروپانی هستند که در این گونه گیاهی تولید می شوند. این مواد آنتی کلینرژیک هستند و سیستم عصبی پاراسمپاتیک را تحت تاثیر قرار داده و در پزشکی برای آرام نمودن علائم بیماری پارکینسون، گشاد کردن مردمک چشم و افزایش ضربان قلب، خنثی کردن سستی ماهیچه های صاف ناشی از ترکیبات فسفره آلی، و کاهش ترشح عرق و اسید معده مورد استفاده قرار می گیرند (۸). این مواد در ریشه گیاه سنتز شده و سپس به قسمت های دیگر گیاه منتقل می شوند میزان تولید آنها به صورت طبیعی کم می باشد و سنتز شیمیایی و مصنوعی این ترکیبات پیچیده و گران است، بنابراین استفاده از روش هایی برای افزایش میزان تولید این ترکیبات و همچنین کاهش هزینه های تولید آنها ضروری به نظر می رسد.

اوکسمان - کالدنتی و همکاران (۵) امکان افزایش مقدار اسکوپولامین را در *H.muticus* با گزینش گیاهان اینبرد در طی چهار نسل مورد بررسی قرار دادند و به گیاهان حاوی مقادیر زیاد اسکوپولامین دست یافتند. حداکثر مقدار اسکوپولامین در برگها از ۴٪ تجاوز نمود که از میزان آن در لاین های والدینی ۲۰ برابر بیشتر بود. کشت بافتها و سلولهای گیاهی نیز به نحو گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته اند. کشتهای تمایزنیافته همچون کشتهای کالوس و سوسپانسیون سلولی، مقادیر بسیار کمی آلکالوئید تولید می نمایند و همچنین عدم ثبات در تولید از خود نشان می دهند. کشت بافتهای تمایز یافته در شرایط این ویترو از ثبات بیشتری برخوردار بوده و تولید آلکالوئید آنها بیشتر است. آلکالوئیدهای تروپانی که به مقدار بسیار کم در سلولهای تمایزنیافته سنتز می شوند، در مقادیر نسبتا زیادی در ریشه های کشت شده تولید

۱- نفر اول و پنجم دانشجویان دکتری، نفر دوم دانشیار، نفر سوم و چهارم استادیاران گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

می گردند. همچنین تولید آلکالوئیدها در گیاهان تراریخت بذرالبنج توسط چندین محقق مورد بررسی قرار گرفته است (۶، ۷، ۸ و ۹). در تحقیقاتی ژن *h6h* ستفاده از دو نژاد آگروباکتریوم رایزوژنز LBA9402 و 15834 به ریشه های موئین *H.muticus* انتقال یافت و کلون های ریشه موئین تراریخت جدید بدست آمد. مقدار اسکوپولامین در بهترین کلون ها، ۱۰۰ برابر مقدار آن در ریشه های موئین تیپ وحشی بود (۲ و ۳). ذوالعلی وهمکاران (۱۱) افزایش میزان رشد ریشه های موئین تراریخت بذرالبنج حاصل از تلقیح با *A.rhizogenes* را تا چهار برابر ریشه های معمولی گزارش کردند در حالیکه میزان تولید آلکالوئید در واحد وزن خشک در ریشه های تراریخت با ریشه های معمولی از لحاظ آماری تفاوتی نشان نداد.

آگروباکتریوم، باکتری خاکزی گرم منفی و مولد بیماری ریشه موئین در گیاهان میزبان می باشد که با انتقال قسمتی از پلاسمید Ri (القاءکننده ریشه) خود، به نام T-DNA، به ژنوم گیاه میزبان، باعث ایجاد بیماری ریشه موئین در گیاه می شود (۱). با استفاده از کشت بافت و تغییر در ترکیبات هورمونی امکان باززایی گیاه تراریخت کامل از این ریشه های موئین وجود دارد (۴). با توجه به این که آلکالوئیدهای گیاه بذرالبنج در ریشه آن تولید می شوند، در صورت تولید گیاهان تراریخت با میزان تولید ریشه موئین زیاد، انتظار می رود که میزان تولید آلکالوئیدها در گیاه افزایش یابد. این تحقیق با هدف بررسی ثبات ژنهای منتقل شده از باکتری به گیاه و مقایسه اثر این ژنها بر خصوصیات گیاه تراریخت انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه گیاهچه استریل

ابتدا پوسته بذور *H.muticus* با کاغذ سمباده خراش داده شدند. سپس در زیر هود لامینارایر فلو با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و در درون ظروف پتری و روی کاغذ صافی استریل مرطوب به مدت ۲۴ ساعت برای جذب آب قرار داده شدند. سپس ظروف پتری به مدت ۴۸ ساعت در یخچال گذاشته و بعداً به دمای محیط برگردانده شدند. بذور جوانه زده برای تهیه گیاهچه استریل به داخل لوله های آزمایش بر روی محیط کشت جامد MS محتوی ۱٪ ساکارز منتقل گردیدند (۱۱).

کشت باکتری

در این تحقیق از باکتری طبیعی *A.rhizogenes* نژاد LBA9404 استفاده گردید. جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی مناسب جهت تلقیح، از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط کشت مایع YMB+Rif استفاده شد. برای تهیه محیط کشت ابتدا تمامی اجزاء مورد نظر را به آب مقطر اضافه کرده و بعد از به حجم رساندن محلول، pH به ۷ رسانده شد. پس از اینکه محیط اتوکلاو گردید و تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد سرد شد، آنتی بیوتیک ریفامپین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر به محیط اضافه شد. این آنتی بیوتیک به علت ناپایداری در دمای بالا، باید درون متانول حل شود و سپس به درون محیط اتوکلاو شده فیلتر شود. این کشت ها برای رسیدن به غلظت مناسب جهت تلقیح ریزنمونه های گیاهی، در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند (۱۱).

تلقیح قطعات برگی و گره ای و حذف باکتری

جهت تلقیح ریزنمونه های برگی و گره ای گیاهچه استریل، بعد از ایجاد زخم در محل رگبرگ میانی سطح زیرین ریزنمونه های برگی و همچنین در محل گره ریزنمونه های گره ای، مقداری از سوسپانسیون باکتریایی (کشت ۴۸ ساعته) با استفاده از یک سرنگ هامیلتون در محل زخمها تلقیح گردید. سپس ریزنمونه های برگی به صورتی که سطح زیرین آنها به طرف بالا قرار گیرد و ریزنمونه های گره ای بصورت خوابیده از بغل و با حفظ قطبیت بر روی محیط کشت جامد B5 محتوی ۲درصد ساکاروز قرار داده شدند و در دمای ۲۵±۲°C و فتوپریود ۸ : ۱۶ (تاریکی : روشنایی) اینکوبه شدند (۱۱).

پس از گذشت دو روز از زمان تلقیح، بدلیل رشد سریع باکتری در اطراف ریزنمونه ها، عمل انتقال ریزنمونه ها به سطح محیط کشت جامد B5 تازه محتوی ۵۰۰ mg/L آنتی بیوتیک سفوتاکسیم صورت گرفت. این عمل هر چهار روز یکبار تا حذف کامل باکتریها تکرار گردید. این کشتها در دمای ۲۵±۲°C و فتوپریود ۸ : ۱۶ (تاریکی : روشنایی) قرار داده شدند (۱۱).

تولید کلون های ریشه موئین

پس از ظهور ریشه های مویین از محل تلقیح با باکتری و رشد تقریبی آنها بطول ۳ cm، این ریشه ها قطع گردیده و برای تولید

کلونهای انفرادی در محیط کشت مایع B5 فاقد هورمون کشت داده شدند. انکوباسیون کشتها در شرایط تاریکی و دمای ۲°C±۵ بر روی شیکر با سرعت ۹۰ rpm صورت گرفت و عمل واکشت در فواصل زمانی ۳۰ روزه انجام شد.

انتقال کالوس ها و ساقه های خودالقا به محیط های جدید

واکشت ریشه های موئین در محیط کشت مایع B5 باعث تولید کالوس و ساقه های خود القا در بعضی از کلون های ریشه موئین شد. ساقه های خودالقا به محیط کشت MS و B5 بدون هورمون منتقل گردیدند و کالوس ها نیز به منظور بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر رشد آنها، در آزمایش فاکتوریل با چهار سطح 2,4-D (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و سه سطح NAA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در محیط کشت جامد MS حاوی ۳۰ g/L ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار واکشت گردیدند. بعد از گذشت یک ماه از کشت، میزان وزن تر و وزن خشک کالوس ها (بدین منظور کالوس ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند) اندازه گیری و با یکدیگر مقایسه گردید. همچنین به منظور بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر اندام زایی کالوس ها، آزمایشی فاکتوریل با سه سطح BAP (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و سه سطح NAA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با دو تکرار در محیط کشت جامد MS حاوی ۳۰ g/L ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار انجام شد. و در پایان درصد ساقه های باززایی شده از فرمول زیر محاسبه شد و با یکدیگر مقایسه گردید.

$$\text{درصد باززایی کالوس ها} = \left(\frac{\text{تعداد کالوس های باززایی شده}}{\text{تعداد کل کالوس ها}}\right) \times ۱۰۰$$

مقاوم سازی گیاهچه های باززایی شده

گیاهچه های باززایی شده برای سازگار شدن به شرایط محیطی، به مدت دو هفته در شرایط هیدروپونیک و با محلول غذایی هوگلند کشت گردیدند. در چند روز اول جهت حفظ رطوبت و سازگاری تدریجی گیاهچه ها روی هر یک از آنها یک لیوان یکبار مصرف شفاف قرار داده شد. گیاهچه ها سپس به گلدان های پلاستیکی با ترکیب ۱:۱:۱ ورمیکولیت، خاک و شن منتقل و در شرایط نوری ۸: ۱۶ و دمایی ۲°C±۲۵ قرار داده شدند(۴).

به منظور بررسی و مقایسه اثر ژنهای منتقل شده از آگروباکتریوم بر سرعت رشد ریشه در بذر های بدست آمده از گیاهان تراریخت و گیاهان معمولی، پس از جوانه زنی این بذرها، هر هفته یکبار طول ریشه آنها اندازه گیری شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

بررسی ماهیت تراریختی

ظهور ریشه های موئین، به دلیل انتقال T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوژنز به سلول های گیاهی می باشد. بنابراین برای تایید تراریختی گیاهان باززایی شده از ریشه های موئین و ثبات ژن های منتقل شده از آگروباکتریوم به ژنوم گیاه در گیاهان نسل T_0 و T_1 از آزمایش PCR اختصاصی برای ژن *rolB* پلاسمید Ri باکتری استفاده شد.

طراحی آغازگر PCR

طراحی آغازگر اختصاصی برای تکثیر ژن *rolB* با استفاده از نرم افزار primer premier 5 و پس از تهیه توالی ژن *rolB* پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوژنز از سایت NCBI صورت گرفت. سپس توالی پرایمر طراحی شده، با استفاده از نرم افزار BLAST، برای مشخص شدن همولوژی آن با DNAی باکتری مورد نظر، بررسی شد که همولوژی آن با بخشی از توالی ژنی متناظر در نژاد LBA9402 آگروباکتریوم رایزوژنز، تایید شد.

توالی پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده برای تکثیر قطعه ای (به طول ۱۹bp) از ژن rolB به صورت زیر بود:

پرایمر رفت: 5´CCTCCTCGCCTTCCTGAT-3´،

پرایمر برگشت 5´ATTCCTTCCACGATTTCAACC-3´.

استخراج DNA و تعیین خلوص و غلظت DNA

DNA گیاهان باززایی شده (نسل T_0)، نسل T_1 و گیاهان معمولی (شاهد) به روش دلاپورتا تغییر یافته استخراج گردید. DNA استخراج شده در ۱۵۰ µl از بافر TE بطور کامل حل شد و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep انجام شد. خلوص و

غلظت DNA استخراج شده از باکتری و گیاه بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتری و جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای نمونه DNA خالص ۱/۸ می باشد) و همچنین انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ تایید و تعیین گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای ژن *rolB*

تکثیر ژن *rolB* با استفاده از واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl برای هر مخلوط واکنش انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ مایکرولیتر بافر PCR(۱۰x)، ۰/۵ مایکرولیتر dNTPs (10mM)، ۱/۲ مایکرولیتر MgCl2 (50mM)، یک مایکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول در مایکرولیتر، ۰/۲ مایکرولیتر DNA پلیمراز تک (۵ واحد در مایکرولیتر)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و بقیه تا حجم ۲۵ مایکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل (۱۸/۶ مایکرولیتر) اضافه گردید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت مدل Biometra و با برنامه چرخه ای زیر انجام شد (جدول ۱).

جدید حاوی ۵۰۰ mg/L آنتی بیوتیک سفوتاکسیم منتقل گردیدند. بعد از چهار بار واکشت ریزنمونه ها در محیط های حاوی آنتی بیوتیک رشد باکتری بطور کامل متوقف شد.

اولین ریشه ها پس از گذشت دو هفته از زمان تلقیح ظاهر شدند و این فرایند تا ۴۰ روز پس از تلقیح ادامه داشت. ریشه های موئینی که از مکان تلقیح بر روی ریزنمونه ظاهر شدند، فاقد زمین گرایی بوده و از رشد بسیار سریع، همراه با تولید انشعابات جانبی فراوان برخوردار بودند. کلونهای مختلف، از سرعت رشد مختلف برخوردار بوده و تنوع قابل ملاحظه ای در رشد آنها مشاهده گردید. این ریشه ها در محیط کشت فاقد هورمون، براحتی رشد نموده و انشعابات فراوان تولید نمودند.

بعد از سه تا چهار واکشت ریشه های موئین، بعضی از کلون های ریشه موئین، کالوس تولید کردند و بعضی دیگر از کلون ها، ساقه های خودالقا تولید نمودند. علاوه بر این بعضی از کلون ها، هم تولید کالوس و هم تولید ساقه خودالقا کردند. کلون هایی که تولید کالوس کردند از کلون هایی که ساقه خودالقا تولید کردند، رشد بیشتری داشتند.

جدول(۱) برنامه چرخه ای واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قسمتی از ژن *rolB*

مرحله واکنش	واسرشت سازی	اتصال	بسط
سیکل اول (۱)	۹۴°c، ۵ دقیقه	۵۷°c، ۱ دقیقه	۷۲°c، ۱ دقیقه
سیکل ۲ تا ۳۴	۹۴°c، ۱ دقیقه	۵۷°c، ۱ دقیقه	۷۲°c، ۱ دقیقه
سیکل آخر (۳۵)	۹۴°c، ۱ دقیقه	۵۷°c، ۱ دقیقه	۷۲°c، ۶ دقیقه

نتایج و بحث

از خراش سطح بذور توسط کاغذ سمباده و شوک سرمایی استفاده شد که به جذب آب و از بین بردن دوره خواب بذور کمک زیادی کرد، بطوریکه بذوری که این تیمارها بر روی آنها انجام نشد بسختی جوانه زدند.

میزان تراکم نوری (OD) مناسب برای آگروباکتریوم جهت تلقیح (کشت همجوار) ۰/۸ - ۰/۵ می باشد که کشت ۴۸ ساعته باکتری غلظت مناسبی (۰/۶ = OD) جهت تلقیح ریزنمونه ها را فراهم کرد. چند روز بعد از تلقیح هاله ای ناشی از رشد باکتری سطح محیط کشت را پوشاند که جهت نجات ریزنمونه ها از رشد باکتری به محض مشاهده هاله باکتریایی ریزنمونه ها به محیط های

نتایج تجزیه واریانس اثر هورمون های 2,4-D و NAA بر میزان رشد کالوس ها، نشان داد که اثر هورمون های 2.4-D و NAA در سطح ۵٪ = α و اثر متقابل این دو هورمون در سطح ۱٪ = α معنی دار است (جدول۳). بیشترین میزان رشد کالوس ها در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۱ mg/L و NAA با غلظت ۰/۵ mg/L بدست آمد. غلظت های بالای 2,4-D و NAA بعد از مدتی مانع انجام عمل فتوسنتز گردیده و کالوس هایی به رنگ زرد تا سفید تولید کردند. کمترین رشد کالوس در محیط های فاقد 2,4-D صورت گرفت. با اینکه بیشترین رشد در محیط حاوی 2,4-D با غلظت ۱mg/L و NAA با غلظت ۰/۵ mg/L انجام شد ولی چون خصوصیات کالوس

تولید شده برای باززایی مناسب نبود، عملاً برای باززایی این سطح هورمونی پیشنهاد نمی شود. محیط کشت های با رشد کمتر ولی حالت تمایز یافتگی بیشتر، مثل محیط کشت های حاوی ۱-۲mg/L، برای باززایی مناسب تر هستند. شکل(۱) اثر سطوح مختلف هورمون های 2,4-D و NAA بر روی میزان وزن خشک کالوس ها را نشان می دهد.

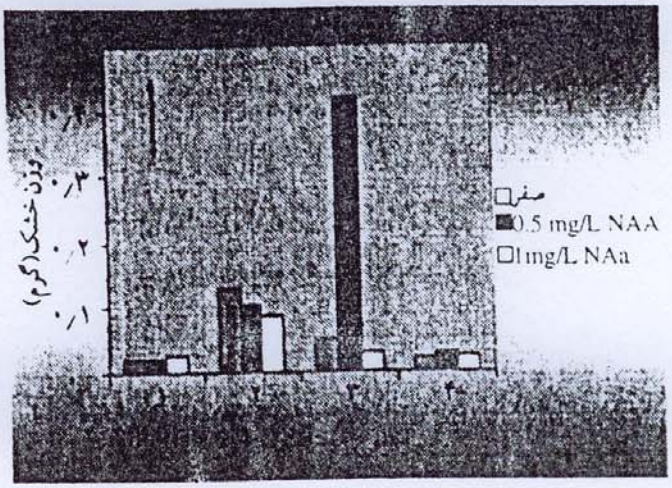
ژنهای *aux* در منطقه TR از T-DNA و ژنهای *rol(root loci)* در ناحیه TL از T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوژنز مسئول القای ریشه موئین در گیاه می باشند. تولید کالوس به علت وجود یک منبع داخلی از هورمون اکسین در نتیجه ورود ژنهای مسئول تولید اکسین از آگروباکتریوم به گیاه می باشد (۱۰). از جمله ژنهایی که در تولید ترکیبات اکسینی دخالت دارند ژنهای *rolA*, *rolB* و *rolC* می باشند که ترکیبات مشابه اکسین تولید می نمایند. علاوه بر این ژنها، در بخش TR-DNA پلاسمید آگروباکتریوم، ژنهای *tms-1* و *tms-2* نیز حضور دارند که مسیر بیوسنتزی دیگری برای اکسین فراهم می نمایند.

نتایج تجزیه واریانس اثر هورمون های BAP و NAA بر اندام زایی کالوس ها نشان داد که از نظر آماری استفاده از این هورمون ها تاثیر معنی داری در اندام زایی کالوس ها ندارد ($\alpha = ٪۵$). بعبارت دیگر کالوس ها بدون نیاز به هورمون قادر به باززایی به گیاه کامل می باشند (شکل ۳و۴) و استفاده از تنظیم کننده های رشد اثری در افزایش میزان باززایی ندارد (شکل۲). علت این امر را می توان به تولید داخلی هورمون ها اکسینی و سایتوکنینی در کالوس های تراریخت در اثر حضور و بیان ژنهای مسئول تولید این هورمون ها از اگروباکتریوم رایزوژنز و همچنین افزایش حساسیت بافت های تراریخت به سطح هورمونی نسبت داد. حضور این ژنها در گیاهان تراریخت باززایی شده باعث شد که در مرحله تولید ریشه، این گیاهچه ها در محیط های فاقد هورمون خارجی به خوبی ریشه دار شوند. این ریشه ها فاقد خاصیت زمین گرایی بودند و از رشد سریعی برخوردار بودند. این یافته با نتایج تحقیق اوکسمان-کالدنتی(۴) هماهنگی دارد.

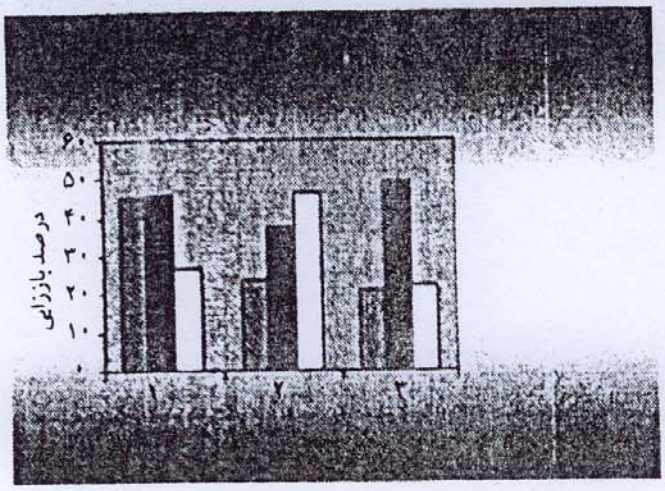
گیاهان (نسل T_0) بعد از شش ماه که در شرایط دمایی ۲۵±۲ °C و شرایط نوری ۸ : ۱۶ (تاریکی : روشنایی) قرار گرفتند، تولید گل کردند. حدود نیمی از گیاهان گلی تولید نکردند و از آن تعدادی که گل تولید کردند نیز تعدادی گلهای ناقص و تغییر یافته تولید کردند که بذری تولید نشد. طول مرحله گلدهی

جدول(۲) اثر سطوح مختلف هورمون های 2,4-D و NAA بر خصوصیات کالوس ها

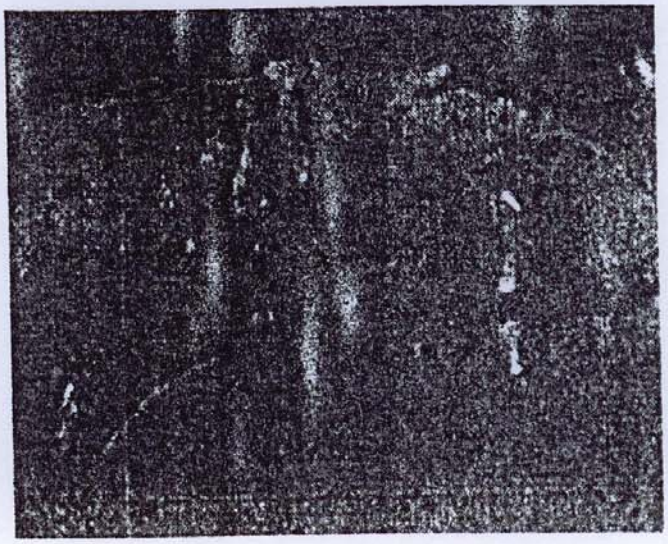
شماره محیط	میزان 2,4-D (mg/L)	میزان NAA (mg/L)	میزان رشد	رنگ کالوس	فنوتیپ کالوس
یک	۰/۵	صفر	متوسط	سبز کم رنگ	نسبتا" نرم
دو	۱	صفر	متوسط	سبز کم رنگ	نسبتا" نرم
سه	۲	صفر	متوسط	سبز کم رنگ	نسبتا" نرم
چهار	صفر	۰/۵	کم	سبز پر رنگ	توده‌های کروی، سلولها چسبیده به هم(در حال تمایز)
پنج	صفر	۱	کم	سبز پر رنگ	توده‌های کروی، سلولها چسبیده به هم(در حال تمایز)
شش	۰/۵	۰/۵	زیاد	سفید	ترد، نرم و آبدار
هفت	۰/۵	۱	زیاد	سفید	ترد، نرم و آبدار
هشت	۱	۰/۵	زیاد	سفید	ترد، نرم و آبدار
نه	۱	۱	زیاد	سفید	ترد، نرم و آبدار
ده	۲	۰/۵	متوسط	سبز کم رنگ	نسبتا" نرم
یازده	۲	۱	متوسط	سبز کم رنگ	نسبتا" نرم
دوازده	صفر	صفر	متوسط	سبز پر رنگ	توده‌های کروی، سلولها چسبیده به هم



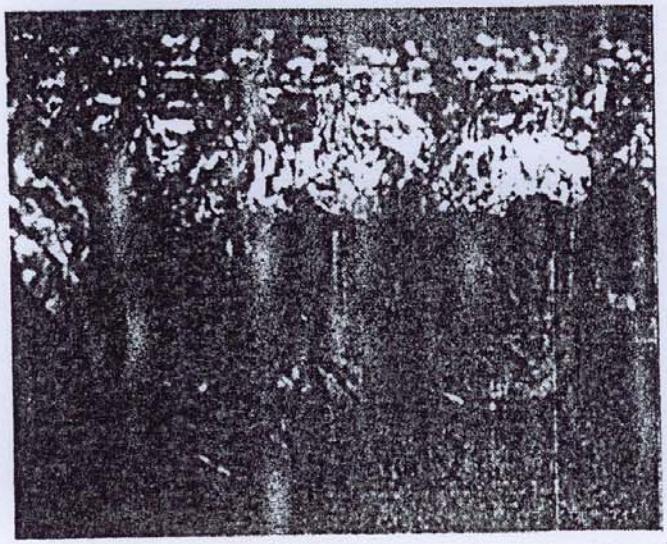
شکل(۱) میزان وزن خشک در سطوح مختلف هورمونی



شکل(۲) میزان باززایی در سطوح مختلف هورمونی



شکل(۳) تولید شاخساره در محیط فاقد هورمون



شکل(۴) تولید ریشه در محیط کشت B5 . در گیاهان باززایی شده

در گیاهانی که گلهای کامل و بذر تولید کردند دو ماه بود که در اواخر مرحله گلدهی، در گلهایی که در اوایل این دوره تولید شده بودند، بذر تولید گردید. مرحله رسیدگی بذرها نیز حدود ۴۵ روز بطول انجامید. گیاهان باززایی شده از نظر ظاهری تفاوت های قابل ملاحظه ای با گیاهان معمولی داشتند. همچنین این گیاهان در بین خودشان نیز تفاوت های آشکاری نشان دادند. غالبیت انتهایی در بعضی از گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان معمولی کاهش شدیدی نشان داد بطوریکه گیاهان تراریخت شاخه های جانبی بیشتری تولید کردند و از ارتفاع کمتری نسبت به گیاهان معمولی برخوردار بودند. در بین گیاهان تراریخت از نظر شکل، اندازه، رنگ و میزان کرك تفاوت زیادی دیده شد، به طوری که بعضی از گیاهان برگهای سبز پر رنگ، پهن، کرکی و چین خورده تولید کردند و بعضی دیگر برگهای باریک به رنگ سبز روشن و بدون چین خوردگی تولید کردند.

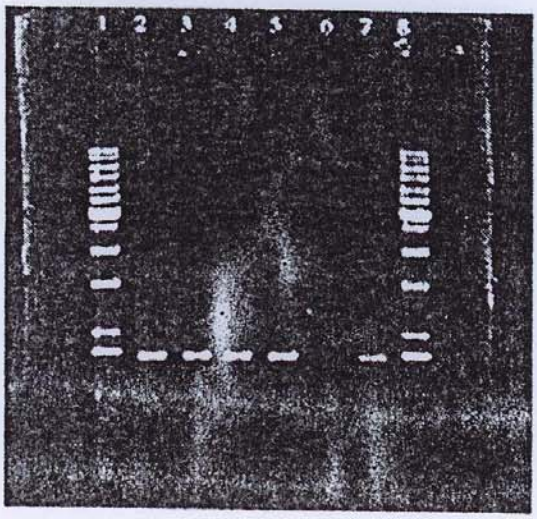
به نظر می رسد عدم تولید گل (گلهای کامل با گامت های جنسی) در اثر تغییرات سوماکلونال و تغییر در توازن کروموزوم ها و در نتیجه تشکیل گامت ها با تعداد کروموزوم غیر معمول و غیر فعال شدن گامت ها باشد. همچنین در مطالعاتی تاثیر ورود بعضی از ژن های rol از باکتری به گیاه و اثر آنها بر گلدهی اثبات شده است. در تحقیق حاضر برای کاهش اثر تغییرات سوماکلونال بر خصوصیات ظاهری و تولید بذر از گیاهان باززایی شده، از محیط های فاقد هورمون نیز استفاده شد (هورمون ها یکی از منابع اصلی در ایجاد تغییرات سوماکلونال در کشت بافت می باشند) که شاید این یکی از دلایل موفقیت در گرفتن بذر از گیاهان باززایی شده بود، در حالیکه محققان دیگر موفق به گرفتن بذر از گیاهان بذرالبنج تراریخت، نشدند. اوکسمان-کالدنتی و همکاران(۴)، هفت گیاه باززایی شده از ریشه های موئین بذرالبنج تولید کردند که فقط دو تا از این گیاهان تولید گل (گلهای غیر نرمال) کردند که

جدول(۳) نتایج تجزیه واریانس اثر هورمون های 2,4-D و NAA بر میزان رشد کالوس ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	نسبت F	F < احتمال
2,4-D	۳	۴/۱۷۸۵	۰/۰۱۲۵
NAA	۲	۳/۵۴۹۹	۰/۰۳۹۵
2,4-D × NAA	۶	۳/۵۵۵۹	۰/۰۰۷۴

جدول(۴) نتایج تجزیه واریانس اثر هورمون های BAP و NAA بر میزان رشد باززایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	نسبت F	F < احتمال
BAP	۲	۱/۱۶۲۷	۰/۳۵۵۵
NAA	۲	۰/۳۴۷۱	۰/۷۱۵۸
BAP × NAA	۴	۱/۰۰۰۵	۰/۴۵۵۶



شکل(۵) PCR ژن *rolB*. چاهک شماره ۱و۸: سایز مارکر، چاهک شماره ۲و۳: گیاهان باززایی شده، چاهک شماره ۴و۵: نسل T_1، چاهک شماره۶: گیاه معمولی و چاهک شماره۷: آگروباکتریوم رایزوژنز

این دو گیاه نیز موفق به تولید بذر نشدند و همچنین سون و همکاران(۹)، ۳۴ گیاه بذرالبنج از ریشه های موئین باززایی کردند که هیچکدام از این گیاهان بذری تولید نکردند.

آزمون t میزان رشد طولی ریشه بذور تراریخت و معمولی نشان داد که میزان رشد ریشه های تراریخت از ریشه های معمولی بیشتر می باشد ($\alpha = ٪۵$). افزایش سرعت و میزان رشد ریشه در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان معمولی را می توان به افزایش تولید داخلی هورمون های اکسینی و تعادل هورمونی بوجود آمده تحت اثر بیان ژنهای منتقل شده از باکتری که مسئول تولید این هورمون ها می باشند از جمله ژنهای *rolA*, *rolB*، *rolC* و ژنهای *tms-1* و *tms-2*، نسبت داد (۱۰). از آنجا که میزان متابولیت های ثانویه در گیاه تحت اثر دو عامل بیومس و غلظت متابولیت در واحد بیومس می باشد، بنابراین افزایش در سرعت و میزان رشد ریشه که محل سنتز متابولیت های ثانویه گیاه بذرالبنج می باشد در صورتی که همراه با کاهش در غلظت متابولیت در واحد بیومس نباشد می تواند نقش موثری در افزایش تولید این مواد در این گیاه داشته باشد.

با بررسی اسپکتروفتومتری نمونه های DNA استخراج شده مشخص شد که جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای نمونه DNA گیاهی از ۱/۷۵ تا ۱/۸۵ متغیر بود که نشان از خلوص DNA استخراج شده داشت. این نسبت برای DNA باکتری برابر با ۱/۵ بود. همچنین غلظت DNA استخراج شده از ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر مایکرولیتر برای نمونه های گیاهی متغیر بود. این نتایج با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و مقایسه با شاهد استاندارد نیز تایید گردید.

آزمایشات PCR برای تایید حضور و ثبات قسمتی از ژن rolB به طول ۷۱۹ bp بیانگر وجود تکثیر اختصاصی مربوط به این ژن در گیاهان تراریخت و نسل T_1 و عدم تکثیر در گیاهان معمولی بود (شکل۵).

منابع

1. Chilton, M.D., Tepfer, D., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and J. Tempe. 1982 . Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Nature, 295: 432-434.
2. Hashimoto, T., Yun, D.-J. and Y. Yamada. 1993 . Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry. 42: 713-718.
3. Jouhikainen, K., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, HT. and K.-M. Oksman-Caldentey. 1999 . Enhanced scopolamine production in Hyoscyamine hairy root cultures by genetic engineering. Planta. 208: 545-551.
4. Oksman-Caldentey. K.-M., Kivela, O. and R. Hiltunen. 1991 . Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of Hyoscyamus muticus. Plant Science. 78: 129-136.
5. Oksman-Caldentey, K.-M., Vuorela, H., Issenegger, M., Strauss, A. and R. Hiltunen. 1987 . Selection for high tropane alkaloid content in Hyoscyamus muticus plants. Plant Breed. 99: 318-326.
6. Oksman-Caldentey, K.-M., Strauss, A. and R. Hiltunen. 1987 . Optimization of some parameters in cultivating scopolamine-producing cells of Hyoscyamus muticus. Acta. Pharm. Fenn. 96(2): 91-99.
7. Oksman-caldentey, K.-M., and A. Strauss. 1986 . Somaclonal variation of scopolamine content in protoplast-derived cell culture clones of Hyoscyamus muticus. Planta Med. 52(1): 6-12.
8. Sevon, N., Biondi, S., Bagni, N. and K.-M. Oksman-Caldentey. 2001 . Transgenic Hyoscyamus muticus. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 48 (Ed. by Y.P.S. Bajaj). pp. 171-200. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
9. Sevon, N., Dragar, B., Hiltunen, R. and K.-M. Oksman-Caldentey. 1997 . Chracterization of transgenic plants derived from hairy roots of Hyoscyamus muticus. Plant Cell Rep. 16: 605-611.
10. Spena, A., Estruch, J. J., Prinsen, E., Nacken, W., Van onckelen, H. and H. Sommer. 1992 . Anther specific expression of the rol B gene of Agrobacterium rhizogenes increases IAA content in antchers and alters antder development and whole flower growth. Theor. Appl. Genet. 84: 520-527.
11. Zolala, J., Farsi, M., Gordan, H.-R. and M. Mahmoodnia. 2006 . Producing a high scopolamine hairy root clone in Hyoscyamus muticus through transformation by Agrobacterium rhizogenes. Article in press.

Production of transgenic *Hyoscyamus muticus* via transformation by *Agrobacterium rhizogenes*

M. Mahmoodnia Meimand– M. Farsi– H. Marashi – F. Shahriari– J. Zolala[1]

Abstract

Hyoscyamus plants are important sources of tropane alkaloids which are produced in roots and transferred to aerial parts of the plants. *Agrobacterium rhizogenes* causes hairy root disease in host plants such as solanaceae. Hairy roots which are induced on inoculated explants by *A. rhizogenes*, grow faster than normal roots and they are genetically stable. Furtheremore they can regenerate whole transgenic plants. Therefore, there is a possibility that transgenic *H. muticus* plants produce more alkaloid compared with normal ones. This research was conducted with the aim of studying genetic stability in transgenic plants and their progenies and compairing morphological traits in transgenic plants with normal counterparts. Leaf and nodal segments of Hyoscyamus plants were inoculated by *A. rhizogenes* strain LBA9402. When hairy roots symptoms appeared, liquid cultures were established in B5 medium without growth regulators. For plant regeneration, calli derived from hairy roots were transferred to free hormone MS and B5 medium and also to MS medium contaning different levels of auxins and cytokinins. Considerable differences in morphological traits were observed among regenerated plants as well as between transgenic plants with control ones. Transgenic plants were considerably diverse in leaf size, leaf shape, flower shape and seed capability to produce flower and seed. Transgenic nature of regenerated plants and their progenies were confirmed through PCR by amplifying a specific fragment for *rolAB* genes of bacterial T-DNA.

key words: *Hyoscyamus muticus*, *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy roots, Tropane alkaloids

1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad