Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی سلول و بافت
جلد ۱، شماره ۲، زمستان ۱۳۸۹، ۷-۱

بررسی میزان اکسین در گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت تنباکو(*Nicotiana tabacum* L.) حاوی Ri –T DNA

زهرا زمانزاده .M.Sc[۱]، علی اکبر احسانپور .Ph.D[۱*]، فریبا امینی .Ph.D[۲]

۱- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۲/۸/ ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۲۵

چکیده

هدف: این تحقیق با هدف بررسی تغییرات ایجاد شده در میزان اکسین در گیاهان بازارایی شده از ریشه های گیاه تنباکو حاوی Ri –T DNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق قطعات برگ گیاه تنباکو توسط باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز تراریخت گردید. ریشه‌های موئین تراریخت ایجاد شده توسط توانایی رشدشان بر روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب شدند. برای تائید تراریخت بودن ریشه‌ها از سوبسترای x-gluc استفاده شد. از این ریشه‌های تراریخت ابتدا کالوس و سپس گیاهان تراریخت باززائی گردید. در نهایت میزان اکسین در برگ و ریشه این گیاهان اندازه‌گیری شد.

نتایج: آبی رنگ شدن ریشه‌ها تائیدی بر انجام موفق تراریخت شدن نمونه‌ها بود. نتایج بدست آمده نشان داد مقدار اکسین در گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد حدود ۸۰ تا ۹۰ در صد افزایش یافته بودند. گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیر تراریخت فاصله میان گره‌های کوتاه‌تر و سطح برگ کوچکتری داشتند.

نتیجه گیری: گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت، میزان اکسین بیشتری نسبت به گیاهان غیر تراریخت تولید نمودند. تغییر میزان اکسین احتمالا نوعی تداخل با جیبرلیک اسید داشته و باعث کوتاهی طول گیاهان تراریخت گردیده است.

واژگان کلیدی: اکسین، باززائی، تنباکو، ریشه تراریخت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آگروباکتریوم رایزوژنز باکتری میله‌ای، گرم منفی، هوازی و متحرک خاک می‌باشد که در خانواده Rizobiaceae قرار گرفته و با انتقال ژن مولد اکسین به گیاه، ریشه موئین (hairy root) را در گیاهان تولید می‌کند(۱). این باکتری با انتقال ژنهای مولد اکسین به سلولهای گیاهی باعث افزایش میزان اکسین در سلولهای تراریخت شده و بنابراین ایجاد ریشه‌های مویین را در گیاه القاء می‌کند (۲). امروزه به طور وسیع از این باکتری جهت انجام عمل تراریختی و ایجاد ریشه تراریخت استفاده می‌شود. به عنوان مثال انتقال ژن اکسین توسط این باکتری در گیاهان *Potentila alba* L.، *Aralia elata* و *Glycyrrhiza glabra* L. باعث تولید ریشه‌های تراریخت با قابلیت متابولیت‌های ثانویه بیشتر جهت مصارف دارویی شده است (۴ ، ۳). همچنین تاکنون در گیاهان Gentiana، *Datura stramoniom* و Limonium از طریق این باکتری ریشه‌های موئین ایجاد وسپس بوسیله باززایی از این ریشه‌ها گیاهان تراریخت تولید گردیده است (۵، ۶، ۷).

اکسین‌ها اولین هورمونهای گیاهی کشف شده و ایجاد کننده سیگنالهای مهم در تکامل و رشد گیاهان هستند. اکسین در جوانه‌ها، برگها و میوه‌های در حال رشد ساخته می‌شود. ممکن است مقداری اکسین در ریشه نیز ساخته شود اما بیشترین میزان اکسین در جوانه انتهایی گیاه ساخته و به دو شکل فعال و غیر فعال به سایر قسمتهای گیاه انتقال می‌یابد(۶). در گیاهان، اکسین نقش‌های فیزیوژیکی متعدد بازی می‌کند که از آن جمله می‌توان تسریع در تشکیل ریشه‌های جانبی را نام برد. تشکیل ریشه‌های جانبی یک مرحله کلیدی برای تکثیر گونه‌های چوبی و باغی است که توسط چندین عامل تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مشخص شده که اکسین القاء کننده موثری در ایجاد ریشه‌های جانبی در گونه‌های چوبی است. اگر چه غلظت‌های بالای اکسین (بالاتر از 10^{-8} مولار) بر طویل شدن ریشه‌های اولیه اثر بازدارندگی دارد(۸) ولی تشکیل ریشه‌های فرعی و نابجا بوسیله مقادیر زیاد اکسین تحریک می‌شود. تشکیل ریشه‌های جانبی می‌تواند به سه مرحله تقسیم شود: الف- القاء ریشه: که در آن تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی قبل از هر رویداد سیتولوژیکی رخ می‌دهد. ب- شروع ایجاد ریشه: زمانی است که تغییرات آناتومیکی رخ می‌دهد. ج- مرحله بیرون زدگی ریشه: که ظهور اولیه ریشه است. ریشه‌های جانبی از سلول‌های دایره محیطیه ناشی می‌شوند. اکسین طبیعی در گیاه یعنی ایندول- ۳- استیک اسید (IAA) نقش مثبتی برای تکامل ریشه‌های جانبی ایفا می‌کند (۷). Mercuri و همکاران (۹) یک سامانه تراریختی برای گونه‌های *Limonium* بوسیله آگروباکتریوم را معرفی کردند. استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز جهت تراریخت نمودن گونه‌های گیاه *Gentiana* نیز گزارش شده است. ریشه‌های تراریخته حاصل قادر بودند به مدت طولانی بر روی محیط کشت بدون هیچ گونه هورمون رشد نمایند. از این ریشه‌ها گیاهان تراریخته‌ای باززائی شده است که در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). اکسین یک هورمون بسیار با ارزش با اثرات فیزیولوژیکی متعدد در گیاه از جمله، القاء ریشه دهی، چیرگی انتهائی، گسترش طول دیواره سلولی، تحریک تقسیم سلولی و... می‌باشد (۱۱). سئوالات مهم در این رابطه عبارتند از: آیا افزایش تولید اکسین در گیاهان باززائی شده تراریخت می‌تواند در چگونگی رشد و نمو آن تاثیر گذار باشد؟ ثانیا تولید اکسین زیادتر در اندام هوائی گیاه می‌تواند به عنوان یک منبع تولید و استخراج این هورمون تلقی شود؟ بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط نویسنده تا کنون هیچگونه گزارشی مبنی بر تولید گیاه تراریخت از ریشه‌های تراریخت حاصل از Ri-T DNA ارائه نشده است.

از آنجائی که در جریان تراریختی (انتقال ژن) قطعه Ri-T DNA حاوی ژن مولد اکسین به گیاه منتقل و در ژنوم گیاه ادغام می‌شود، بنابراین هدف از این مطالعه ایجاد ریشه‌های تراریخت و سپس باززایی گیاه از این ریشه‌ها جهت بررسی میزان اکسین تولید شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از گیاه تنباکو (*Nicotiana tobacum* L.) رقم Wisconsin استفاده شد. این گیاهان بر روی محیط MS (۱۲) کشت شده و به منظور تکثیر هر ۴۵ روز یکبار واکشت گردیدند. باکتری *Agrobacterium rhizogenes* حاوی پلاسمید pRi15834-PRT355-GUS جهت ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفت.

برای انجام تراریخت نمودن از روش هم کشتی تحت شرایط استریل استفاده شد(۸). بعد از انجام روش هم کشتی، قطعات گیاهی با سوسپانسیون باکتری ابتدا به مدت ۳ تا ۵ ساعت به محیط کشت MS منتقل و سپس به محیط MS حاوی ۷۰۰ میلی گرم در لیتر سفازولین(جهت کشتن باکتریهای اضافی) و ۳۰میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل گردید. ریشه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

تراریخت پس از ۴-۵ هفته بر لبه‌های قطعات برگ ظاهر گردید. برای تایید تراریخت بودن نمونه‌ها از رنگ آمیزی آنزیم بتا گلوکورونیداز (GUS) استفاده گردید. جهت انجام رنگ آمیزی GUS، قطعاتی از لاین‌های ریشه تراریخت و یک ریشه غیر تراریخت به طور جداگانه به لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. سپس به هر لوله مقدار ۴۵۰ میکرولیتر بافر GUS و ۵۰ میکرولیتر سوبسترایX-gluc GUS (5-bromo-4choloro-3-indolyl-β-glucuronicacid) اضافه و درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۱۳). سپس از این ریشه‌های تراریخت رنگ آمیزی شده برش عرضی تهیه و پس از بررسی ازآنها با میکروسکوپ Olympus با بزرگنمائی 100X عکس تهیه گردید. در مرحله بعد این ریشه‌ها برای تولید کالوس به محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر Kinetin (۳) انتقال یافت که بعد از گذشت ۱۴ روز کالوس ظاهر شد. قطعاتی از این کالوس‌ها جهت باززایی به محیط کشت باززایی (MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیترBAP) منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز باززایی نوساقه صورت گرفت. سپس نوساقه ها به محیط کشت MS فاقد هورمون جهت ریشه دار شدن و تولید گیاه کامل انتقال یافتند.

به منظور اندازه گیری میزان اکسین ۱ گرم بافت برگ از برگ های نزدیک به راس ساقه (برگ + ساقه) و ریشه به طور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد جوشانده شد و پس از ساییدن از روی کاغذ صافی عبور و سپس مقدار یک میلی لیتر از عصاره های بدست آمده را درون لوله آزمایش‌های جداگانه ریخته و ۲ میلی لیتر معرف سالکوفسکی به هر لوله آزمایش اضافه شد. (جهت تهیه معرف سالکوفسکی ابتدا محلول کلرید فریک ($FeCl_3$) ۰/۵ مولار تهیه گردید. سپس یک میلی لیتر از این محلول با ۵۰ میلی لیتر پرکلریک اسید ۳۵٪ مخلوط و پس از هم زدن مخلوط، معرف سالکوفسکی آماده گردید) (۱۴). سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا واکنش کامل و حضور اکسین در عصاره با رنگ صورتی آشکار گردید. در پایان میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومترتوسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل pharmacia LKB-Novaspac اندازه گیری شد. مقدار IAA موجود در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد در محدوده صفر تا ۴۰ میلی گرم در لیتر محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد از IAA خالص استفاده گردید. کلیه آزمایشات بر اساس یک طرح کامل تصادفی با حد اقل ۳ تکرار انجام گردید. میانگین داده‌های بدست آمده مورد آنالیز واریانس (ANOVA) قرار گرفت و میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن مقایسه گردیدند.

نتایج

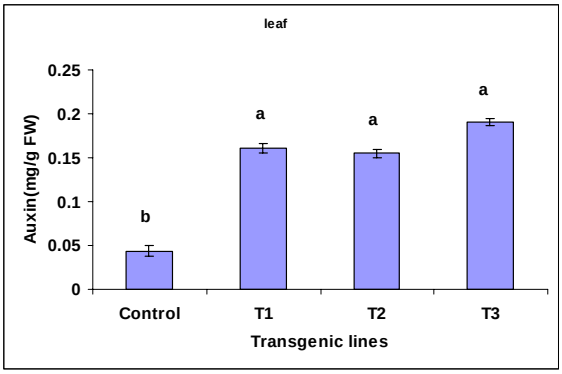
با توجه به اتصال ژن مولد اکسین به ژن GUS حضور ژن GUS که در واقع کد کننده آنزیم بتا گلوکورونیداز می‌باشد در ریشه‌های تراریخت باعث بیان این آنزیم و توانایی ریشه در مصرف سوبسترای آن شده و در نتیجه پس از افزودن سوبسترای این آنزیم به ریشه آبی رنگ شدن ریشه دلیل علمی قاطعی مبنی بر تراریخت بودن ریشه می‌باشد. همانطور که در شکل ۱ (الف و ب) مشاهده می‌شود ریشه‌های تراریخت آبی رنگ شده‌اند که نشاندهنده بیان ژن GUS و در نتیجه تائید انتقال Ri-T DNA به گیاه می‌باشد در حالیکه ریشه شاهد (غیر تراریخت) هیچ تغییر رنگی نشان نداد (شکل ۱ ج).

شکل ۱: تصویر میکروسکپی ریشه ها ۴-۵ هفته پس از تولید روی قطعات برگ پس از تیمار با سوبسترای x-gluc (بزرگنمائی ۱۰۰X). الف و ب : ریشه های تراریخت، رنگ آبی نشان دهنده بیان ژن بتا گلوکورونیداز و تراریخت بودن ریشه ها است. ج: ریشه غیر تراریخت (بدون رنگ پذیری)

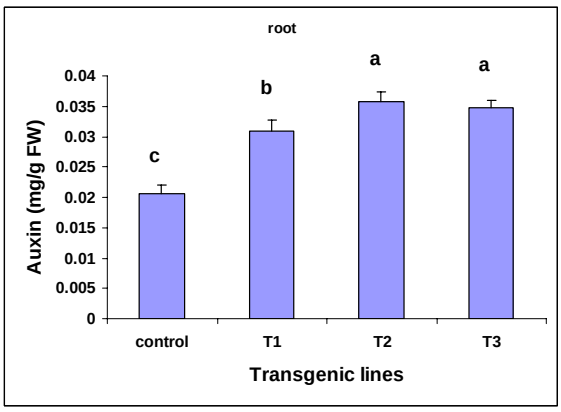
www.SID.ir

Archive of SID

پس از باززائی گیاه از ریشه‌های تراریخت، با اندازه گیری مقدار اکسین مشخص شد که تولید اکسین در گیاهان تراریخت در اندام هوایی و در ریشه نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است. شکل ۲ نمودار مربوط به میزان اکسین در بخش هوایی گیاه را نشان می‌دهد. همانطور که شکل نشان می‌دهد مقدار اکسین در سه لاین گیاه تراریخت نسبت به شاهد افزایش معنی داری یافته است. شکل ۳ نمودار مربوط به میزان اکسین در ریشه‌های گیاهان تراریخت را نشان می‌دهد. همانطور که انتظار می‌رود مقدار اکسین در ریشه‌های گیاهان باززائی شده از ۳ لاین تراریخت نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار یافته که این نتایج با ریشه زایی بیشتر و ایجاد ریشه‌های موئین مطابقت دارد.



شکل۲: میزان اکسین در برگ‌های گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت (میانگین + انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن ($p<0.05$) بر اساس تست دانکن می‌باشند. (T1, T2,T3 لاین گیاهان تراریخت). کنترل: غیر تراریخت



شکل ۳: میزان اکسین در ریشه های گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت (میانگین + انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن ($p<0.05$) بر اساس تست دانکن می‌باشند. (T1, T2,T3 گیاهان تراریخت). کنترل: غیر تراریخت

در این مطالعه مشاهده گردید که گیاهان تراریخت نسبت به غیر تراریخت از نظر شکل ظاهری تفاوت بسیار نشان دادند. به عنوان مثال پس از ۴-۵ هفته رشد گیاه در محیط کشت MS طول ساقه گیاهان تراریخت حدود ۹۰ در صد از گیاهان غیر تراریخت کوتاه‌تر شد و فاصله میان گره‌ها نیز بسیار کوتاه گردید. همچنین سطح برگ گیاهان تراریخت نسبت به غیر تراریخت دارای کرک‌های طویل‌تر و بسیار بیشتر بودند (داده‌ها نشان داد). شکل ۴ تصویر عمومی از رشد و اختلاف دو گیاه تراریخت و غیر تراریخت تنباکو ۴ هفته پس از انتقال آنها به گلدان را نشان می‌دهد.

شکل ۴: مقایسه رشد گیاه تراریخت (A) و غیر تراریخت (B) ۴ هفته پس از انتقال از کشت در شیشه به گلدان

بحث

باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز با انتقال قطعه T-DNA حاوی ژن مولد اکسین (Aux gene) به سلول‌های گیاهی آنها را تراریخت می‌نماید(۶). در این تحقیق ایجاد ریشه‌های موئین در ۹۰-۸۰ درصد از قطعات برگ پس از ۱۵ تا ۲۰ روی محیط کشت حاوی کانامایسین ریشه‌های موئین ایجاد نمود ولی قطعات برگ گیاهان غیر تراریخت نکروزه شده و از بین رفتند. رشد ریشه‌ها روی محیط کشت حاوی کانامایسین بیانگر انتقال ژن از باکتری به سلول‌های گیاهی بود. در برخی گزارشات علمی در انجام تراریختی توسط سه سویه آگروباکتریوم رایزوژنز درقطعات برگ چهار رقم *Rubia tinctorum* L. درصد ایجاد ریشه‌های موئین بسته به سویه باکتری و رقم گیاه اختلاف نشان داد. این نتایج بیانگر این موضوع است که ژنوتیپ یک فاکتور مهم برای القاء ریشه موئین توسط آگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد. حداکثر درصد ایجاد ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه *Rubia tinctorum* L. مربوط به سویه ۱۵۸۳۴ حدود ۷۵ درصد گزارش شده است (۱۵). در تحقیق حاضر با استفاده از همین سوش باکتری منتها با دو ژن اضافی مقاومت به کانامایسین و بتا گلوکورونیداز (GUS) در گیاه تنباکو در حدود

www.SID.ir

Archive of SID

۹۰-۸۰ درصد قطعات ریشه موئین ایجاد شد که بسیار شبیه گزارش سایر منابع علمی است. درصد بالای ایجاد ریشه‌های موئین در گیاه تنباکو احتمالا به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی این دو گیاه می‌باشد و به نظر می‌رسد گیاه تنباکو به عنوان یک گیاه مدل از لحاظ ژنتیکی جهت دریافت T-DNA مستعدتر از *Rubia tinctorum* L. می‌باشد. البته شرایط محیطی مانند دما، حضور موادی مانند استوسیرینگون، کلسیم و حضور بعضی آنزیم‌ها در محیط کشت نیز می‌تواند بر روی انجام موفق تراریختی اثر گذار باشد(۶). از آنجا که در مطالعه حاضر از هیچکدام از مواد ذکر شده استفاده نگردید بنابراین احتمالا ژنوتیپ در موفقیت تراریختی نقش مهم تری داشته است.

ریشه‌های تراریخت ایجاد شده در مطالعه حاضر در مقایسه با ریشه‌های شاهد انشعابات بیشتری ایجاد کرده و کوتاه‌تر بودند که دلیل آن احتمالا بیوسنتز بیشتر اکسین در ریشه‌های تراریخت است. در تایید این فرض، گزارش شده که افزایش غلظت اکسین در ریشه‌ها باعث ایجاد ریشه‌های فرعی بیشتر و کوتاه شدن طول ریشه‌ها می‌شود (۱۱). اکسین هم در مرحله شروع ریشه‌زایی و هم در طویل شدن ریشه دخالت دارد(۱۶). در برخی مطالعات نشان داده شده که ورود ژن‌های خارجی به ویژه ژن مولد اکسین توسط آگروباکتریوم رایزوژنز به گیاه باعث بر هم زدن تعادل هورمون‌های گیاهی شده که خود باعث القاء ریشه در گیاهان تراریخت، کاهش غالبیت انتهایی، افزایش شاخه‌دهی و ایجاد برگ‌های چروکیده می‌گردد(۹). گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت در مطالعات حاضر نیز از نظر شکل ظاهری کم و بیش چنین ویژگی‌هائی را نشان دادند. به عنوان مثال کوتاه شدن طول ساقه و فشرده شدن برگها قبلا نیز در گیاهان تراریخت باززائی شده تراریخت گزارش شده است. احتمالا انتقال و بیان ژن مولد اکسین در گیاهان باززائی شده تراریخت می‌تواند عامل تغییرات ریختی مشاهده شده باشد. به هر حال اظهار نظر قطعی در این خصوص نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد.

در این تحقیق آگروباکتریوم رایزوژنز جهت انتقال ژنوم به گیاه تنباکو استفاده شد. باکتری حاوی ژن GUS به عنوان ژن گزارشگر متصل به ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین مورد استفاده قرار گرفت. بیان این ژن در گیاه باعث تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز می‌شود که باعث تبدیل سوبسترای بی‌رنگ X-gluc (5-bromo-4choloro-3-indolyl-β-glucuronic acid) به رنگ آبی می‌گردد، در حالیکه در ریشه‌های غیر تراریخت هیچ تغییر رنگی ایجاد نشد. با توجه به اینکه این رنگ‌آمیزی از نظر تائید انتقال و بیان ژن یک روش شناخته شده و قابل اعتماد است، بنابراین بیان ژن GUS به خوبی تراریخته بودن ریشه‌های ایجاد شده در این مطالعه را نشان می‌دهد(۱۳). علاوه بر رنگ آمیزی GUS انجام PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی جهت تکثیر بخشی از ژن NPTII توسط Paul و همکاران (۱۷) جهت اثبات انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به گیاه *Brassica juncea* گزارش گردیده است. در مطالعه حاضر نیز نتایج PCR با استفاده از این پرایمر انتقال ژن مولد اکسین به ریشه و گیاه تراریخت تائید گردید که مشابه گزارشات قبلی توسط سایر پژوهشگران است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است میزان شدت رنگ آبی در نوک ریشه‌ها و ریشه‌های جانبی در حال تشکیل و تارهای کشنده بیشتر بود. این بخش‌ها مناطقی می‌باشند که سلول‌ها در حال تکثیر هستند. احتمالا بیان GUS و در نتیجه ژن مولد اکسین در این مناطق به دلیل فعالیت بیشتر سلول‌ها از نظر متابولیسمی بیشتر می‌باشد. با توجه به اینکه یکی از منابع مهم مولد اکسین در برگ های جوان در مریستم راسی انتهای ساقه است، بنابراین می‌توان پذیرفت که در ریشه‌های تراریخت سلولهای بخش مریستمی ریشه اکسین بیشتری تولید نمایند.

در این تحقیق میزان اکسین در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان تراریخت اندازه‌گیری شد و میزان آن نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی نشان داد که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Hashem (۱۸) و Timland و همکاران (۱۹) همخوانی نشان داد. افزایش میزان اکسین می‌تواند دلیل ایجاد ریشه‌های موئین در سلول‌های تراریخت باشد. گزارش شده که پلاسمید Ri در آگروباکتریوم رایزوژنز حامل دو ژن aux1 وaux2 می‌باشد که هر دو مسئول بیوسنتز اکسین در گیاهان تراریخت می‌باشند (۱۸). در مطالعه حاضر احتمالا بیان این دو ژن در گیاه باعث تولید ریشه‌های موئین و سپس تولید اکسین بیشتر در این ریشه‌ها شده است.

نتیجه گیری

داده‌های بدست آمده در این مطالعه افزایش میزان اکسین را در ریشه‌های تراریخت نسبت به غیر تراریخت را تائید می‌کند. از این یافته می‌توان استنباط نمود که در گیاهان باززائی شده از ریشه تراریخت نیز میزان اکسین بیشتر از گیاهان غیر تراریخت است. بنابراین می‌توان گفت ژن مولد اکسین در تمام سلول‌های گیاه بیان می‌شود ولی اکسین اضافی تولید شده در گیاه تراریخت اثرات فیزیولوژیکی خود را نشان می‌دهد. به هر حال با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

اینکه این گزارش اولین گزارش ارائه شده در ایران در این زمینه است اظهار نظر قطعی در خصوص مکانیزم عمل انتقال ژن مولد اکسین در گیاهان باززائی شده از ریشه های حاوی این ژن نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به واسطه تصویب و حمایت از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Berge DH, Holt JG, Krieg NR. Bergeys manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. 1984.

2. Barker G, Chabaud M, Dernier AB, Taylor CG et.al. Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation. Medicago truncatula handbook. 2006; 99:1-8.

3. Zamanzadeh Z. The study of salt tolerance in transgenic roots of tobacco(Nicotiana tabacum L.). MSc. Thesis. Biology Department, University of Isfahan, 1387.

4. Anbazhagan VR, Choi YE, Kang HJ, Moon HK et. al. Production of transgenic Arelia elata regenerated from Agrobacterum rhizogenes-mediated transformed roots. Plant Cell, Tiss. and Org. Culture. 2006; 85: 187-196.

5. Baiza AM, Moreno AQ, Ruiz JA,Vargas VML. Genetic stability of hairy root cultures of Datura stramonium. Plant Cell Tiss. and Org. Culture. 2000; 59: 9-17.

6. Gururaj HB, Kumar V, Prasad BCN, Ravishankar GA, Sharma A. Agrobacterium rhizogenes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electronic J. of Biotech. 2006; 9(4): 349-357.

7. Han H, Sun X, Zhang S. A review on the molecular mechanism of plant rooting modulated by auxin. African J. of Biotech. 2009; 8: 348-353.

8 .Lamine B, María LV, Marc-André F. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic J. of Integrative Biosci. 2008; 3(1):2-9.

9. Mercuri A, Bruna S, Benedetti LD, Burchi G, Schiva T. Modification of plant architecture in Limonium ssp. induced by rol genes. Plant Cell Tiss. and Org. Culture. 2001; 65: 247-253.

10. Momcilovic I, Grubisic D, Kojie M, Neskovic M. Agrobacterum rhizogenes-mediated transformation and plant regeneration of four Gentiana species. Plant Cell, Tiss. and Org. Culture. 1997; 50: 1-6.

11. Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. Sunderland, Massachusetts. 2002; 423-517.

12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962; 15(3):, 473-497.

13. Nermin G, Tijen T. Expression and inheritance of GUS in transgenic tobacco plants. Turkish J. of Botany. 1999; 23: 297-301.

14. He Y, Oyaizu H, Suzuki S. Indole-3-acetic acid production in Pseudomonas fluorescens HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. Current Microbiology. 2002; 47: 138–143.

15. Ercan AG, Taskin KM, Turgut K, Yuce S. Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root formation in some Rubia tinctorum L. population growth in Turkey. Turkish J. of Botany. 1999; 23: 373-377.

16. Leung DWM, Li M. Root induction in radiata pine using Agrobacterium rhizogenes. Electronic J. of Biotech. ISSN. 6(3): 251-258.

17. Paul S, Sikdar SR. Expression of NPTII marker and GUS reporter genes and their inheritance in subsequent generations of transgenic Brassica developed through Agrobacterium-mediated gene transfer. Plant Molecular and Cellular Genetics. 1999; 51: 700-704.

18. Hashem EA. Estimation of endogenous auxin and cytokinins in hairy roots incited on Solanum dulcamara plants by Ri plasmid of Agrobacterium rhizogenes. Australian J. of Basic and Applied Sci. 2009; 3(1): 142-147.

19. Timland B, Kares C, Herrmann A, Otten L. 35S beta glucoronidase gene blocks biological effects of transferred IAA genes. Plant Molecular Biol. 1991; 16(5): 853-864.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2011; 1(2): 1-7

The study of auxin content in regenerated plants from transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) roots carrying Ri-TDNA

Zamanzadeh Z, M.Sc.[1], Ehsanpour AA, Ph.D.[1*], Amini F, Ph.D. [2]

1- Dept of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: ehsanpou@yahoo.com

Received: 27 Feb. 2011 Accepted: 15 Mar. 2011

Abstract

Aim: The aim of this research is evaluation of auxin changes in plant regenerated from tobacco root with Ri-TDNA

Material and methods: In this research leaf segments of tobacco were transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Transformed hairy root was selected by their ability to grow on medium containing Kanamycin. For confirmation of transformation x-gluc substrate was used. From transformed roots at first callus and then plant was regenerated. Finally auxin content from roots and leaves of regenerated plants were measured.

Results: Blue color of roots confirmed the successful transformation of samples. Results showed that auxin content in transgenic plants compare to control was increased 80-90 %. Transgenic plants showed shorted internodes and smaller leaf area than non transgenic plants.

Conclusion: Regenerated plants from transgenic roots showed higher level of auxin content than non transgenic plants. Change of auxin content and its interaction with gibberellic acid possibly resulted in shorter length of transgenic plants.

Keywords: Auxin, Regeneration, Transgenic Root

www.SID.ir