

## بهینه‌سازی القا و تثبیت ریشه‌های موین هویج به منظور کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

مرضیه یزدان‌پناه<sup>۱</sup>، ابراهیم صداقتی<sup>۲\*</sup>، پژمان خدایگان<sup>۳</sup>، حسین علایی<sup>۴</sup> و محمودرضا رقابی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، رفسنجان، ایران

۲. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، رفسنجان، ایران و استادیار موسسه تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، رفسنجان، ایران

۴. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، رفسنجان، ایران

۵. استادیار گروه باغبانی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، رفسنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۶)

### چکیده

هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط القای ریشه موین هویج با استفاده از ریشه و دمبرگ درون‌شیشه‌ای و همچنین دمبرگ و ساقه گلخانه‌ای به منظور کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های (میکوریز) آربوسکولار است. بذره‌های هویج پس از ضدعفونی، در محیط کشت MS و گلدان کشت شدند. ریشه و دمبرگ درون‌شیشه‌ای چهار هفته‌ای و دمبرگ و ساقه گلخانه‌ای سه‌ماهه با سویه (استرین)‌های MSU، ۱۵۸۳۴ و A4 باکتری *Rhizobium rhizogenes* مایه‌زنی و در محیط کشت MS کشت شدند. تأثیر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر القای ریشه موین بررسی شد. پس از حذف باکتری، میزان رشد ریشه‌های موین تولیدی از هر ریزنمونه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار اندازه‌گیری شد. تأیید مولکولی تراریختگی ریشه‌های موین و سویه‌های باکتری با استفاده از واکنش PCR برای افزودن اختصاصی ژن *rolC* به اثبات رسید. نتایج نشان داد، هر سه سویه توانایی القای تولید ریشه موین را دارند. ریشه‌های تراریخته نسبت به ریشه‌های معمولی ضخامت، انشعاب و سرعت رشد بیشتری داشتند. سویه ۱۵۸۳۴ و ریزنمونه‌های دمبرگ گلخانه‌ای و ریشه درون‌شیشه‌ای بیشترین توانایی تولید ریشه موین را نشان دادند. بالاترین میزان رشد ریشه‌های موین در ریزنمونه ساقه گلخانه‌ای با سویه MSU مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: اگروباکتريوم، هویج، افزودن میکوریز آربوسکولار، کشت بافت ریشه، همزیستی.

## Optimizing of carrot hairy root induction and stabilization for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi

Marzieh Yazdanpanah<sup>1</sup>, Ebrahim Sedaghati<sup>2</sup>, Pejman khodygan<sup>3</sup>, Hossein Alaei<sup>4</sup> and Mahmood Reza Raghmi<sup>5</sup>

1. MSc Student, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, College of Agriculture, Rafsanjan, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, College of Agriculture, Rafsanjan, Iran. Assistant Professor, pistachio safety research center, Rafsanjan University of Medical Science, Rafsanjan, Iran.

3. Associated Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, College of Agriculture, Rafsanjan, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, College of Agriculture, Rafsanjan, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Horticulture science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, College of Agriculture, Rafsanjan, Iran.

(Received: February 8, 2016 - Accepted: June 6, 2017)

### ABSTRACT

This study was conducted to optimizing of *in vitro* culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) on *in vitro* root and petiole and greenhouse petiole and stem of carrot. Carrot seeds were disinfested and cultured on MS medium and pot. Four weeks old of *in vitro* root and petiole and 3 months old of greenhouse petiole and stem were inoculated with *Rhizobium rhizogenes* MSU, 15834 and A4 strains and cultured on MS medium. The effects of bacterial strain and explants type on hairy root production were studied. After the elimination of bacteria, growth rate of hairy roots obtained from each explants were measured in factorial experiment with completely randomized design with three replications and three explants in each replicate. Molecular confirmation of hairy roots induction and bacterial strains were performed using specific amplification of *rolC* gene in PCR reactions. The results showed that all bacterial strains could initiate hairy root production. Transgenic roots were thicker, more branches and higher growth rate compared to normal roots. 15834 bacterial strain and greenhouse petiole and *in vitro* root explants demonstrate the highest ability in hairy root production. The highest growth of hairy roots were observed in greenhouse stem explant with MSU bacterial strain.

**Keywords:** *Agrobacterium*, Arbuscular mycorrhizal propagation, Carrot, Root organ culture, Symbiosis.

\* Corresponding author E-mail: sedaghatiebrahim@yahoo.com

### مقدمه

میکوریز نوعی رابطهٔ همزیستی بین برخی قارچ‌ها با ریشهٔ گیاهان است. در بین انواع مختلف رابطه‌های قارچ‌ریشه‌ای، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از مهم‌ترین عامل‌های همزیست اجباری ریشهٔ گیاهان به شمار رفته و تا حدودی با ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی رابطهٔ همزیستی برقرار می‌کند (Blazkowski, 1994; IJdo et al., 2011). مهم‌ترین و بارزترین تأثیر سودمند قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، افزایش رشد گیاه میزبان است که به‌طورمعمول به‌واسطهٔ افزایش جذب آب و عنصرهای غذایی کم‌تحرک به‌ویژه فسفر، روی و مس صورت می‌گیرد (Bolan, 1991; Schalamuk et al., 2006). در رابطه‌های میکوریز مقاومت گیاهان در برابر عامل‌های بیماری‌زای خاکزاد و تنش‌های غیر زیستی مانند شوری و خشکی افزایش می‌یابد (Shi et al., 2006). بنابراین، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار اهمیت بوم‌شناختی (اکولوژیکی) قابل‌توجهی دارند و بدون آن‌ها عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی کاهش می‌یابد (Corkidi & Rincon, 1997; IJdo et al., 2011).

به علت ماهیت همزیستی اجباری قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، افزونش آن‌ها در مجاورت ریشه‌های زنده صورت می‌گیرد که مهم‌ترین محدودیت برای به‌کارگیری این گروه مهم قارچی در زمین‌های زراعی و باغی است (Powell & Bagyaraj, 1986). تاکنون چهار روش آبکشتی (هیدروپونیک)، هواکشتی یا آئروپونیک (Mosse & Thompson, 1984)، کشت گلدانی (Klironomos & Hart, 2002) و سیستم کشت درون شیشه‌ای (Mosse & Hepper, 1975) برای افزونش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به‌کار گرفته شده است. نظام کشت درون شیشه‌ای همراه با ریشه‌های تراریخته‌شده توسط T-DNA (Transfer DNA) بیشترین موفقیت را در افزونش این قارچ‌ها در پی داشته است (Bidondo et al., 2012). کشت درون شیشه‌ای نخستین بار با استفاده از نظام کشت دوگانهٔ اسپوره‌های *Funneliformis mosseae* و ریشه‌های طبیعی شبدر با موفقیت انجام شد (Mosse

1975, Hepper &). نخستین گزارش مبنی بر استفاده از ریشه‌های القایی ناشی از تلقیح باکتری *Rhizobium rhizogenes* به‌منظور کشت ریشه و قارچ توسط Mugnier & Mosse (1987) انتشار یافت. آنان توانستند ریشه‌های تراریختهٔ پیچک (*Convolvulus sepium*) را با اسپور قارچ *F. mosseae* و در محیط ساخت (سنتز)‌شده، پرگنه (Colonization) کنند.

در روش افزونش درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با ریشه‌های تراریخته‌شده با T-DNA، به دلیل وجود ژن تولیدکنندهٔ سایتوکینین، ریشه‌ها به‌شدت منشعب شده و شمار فراوانی ریشه‌های ریز (ریشه مویی) تولید می‌کنند که برای استقرار این گروه از قارچ‌ها مناسب بوده و باعث افزونش و تولید شمار زیادی اسپور می‌شود. کارایی بالای این روش برای افزونش و تولید اسپورهای بدون آلودگی، موجب شده تا از این روش به‌صورت گسترده در تحقیقات مدرن استفاده شود (Fortin et al., 2002). نتایج یک تحقیق که به‌منظور بررسی کارایی مایهٔ تلقیح *Rhizophagus intraradices* برای پرگنه کردن ریشهٔ گیاه پیاز انجام شده بود نشان داد، بین دو نوع مایهٔ تلقیح (روش کشت درون شیشه‌ای و کشت گلدانی) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در ضمن مایهٔ تلقیح تهیه‌شده از روش کشت درون شیشه‌ای بدون هرگونه آلودگی جانبی بود درحالی‌که مایه تلقیح ناشی از کشت گلدانی حاوی برخی آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بود (Vimard et al., 1999).

اسپورزایی گونهٔ *R. intraradices* با استفاده از ریشه‌های موبین هویج در شرایط کشت درون شیشه‌ای توسط Srinivasan et al. (2014) انجام شد. در این بررسی، اسپوره‌های *R. intraradices* پس از جداسازی و ضدعفونی سطحی در مجاورت نوک ریشه‌های القایی به‌دست‌آمده از برش (دیسک) هویج روی محیط کشت MSR (Modified Strulla & Romand) قرار داده شدند. پس از سه ماه، شمار قابل‌توجهی اسپور (۹۰۰۰-۸۵۰۰) و میلیسوم در هر پتری‌دیش مشاهده شد.

در بررسی انجام شده توسط Rodrigues & (2015)

پژوهش به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد برای تولید ریشه‌های موین هویج در راستای کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه ریزنمونه‌های هویج

برای تعیین و انتخاب بهترین ریزنمونه، از دو نوع گیاهچه سترون یا استریل (درون شیشه‌ای) و گلخانه‌ای استفاده شد. به منظور تهیه گیاهچه گلخانه‌ای، بذره‌های هویج به مدت ده ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ده دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی شدند. سپس چند بار با آب مقطر سترون شسته شده و در گلدان با بستر کشت مناسب (خاک، ماسه و پرلایت با نسبت ۱:۳:۱) کشت و پس از گذشت سه ماه از رشد گیاهچه‌ها در گلخانه، دمبرگ و ساقه‌های سالم به عنوان ریزنمونه گلدانی جدا شدند. برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، در آغاز به مدت بیست دقیقه در جریان آب جاری و پس از آن چهار دقیقه در آب حاوی مایع شوینده قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد غوطه‌ور و برای حذف اثر مواد ضدعفونی‌کننده، با آب مقطر سترون سه تا چهار بار به مدت ۱۵ دقیقه زیر هود شسته شدند. برای تهیه گیاهچه سترون، بذره‌های هویج به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر سترون، ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. شستشوی نهایی با آب مقطر سترون سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه صورت گرفت. بذره‌های ضدعفونی شده در محیط کشت MS (Murashige & Skoog) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با اسیدیته معادل ۵/۶-۵/۸ کشت شدند. پتری‌دیش‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس منتقل شدند. یک ماه پس از کشت بذره‌های هویج، ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه از گیاهچه‌های سترون جدا و به منظور سازگاری ریزنمونه‌ها با شرایط همکشتی، ریز نمونه‌ها در محیط کشت MS کشت

Rodrigues گونه *F. mosseae* در شرایط درون ریشه‌ای و در مجاورت ریشه‌های موین *Linum usitatissimum* L. با موفقیت رشد و اسپورزایی کرد. آنان بیان کردند، جوانه‌زنی اسپور، رشد لوله‌تندش، شناخت میزبان و آغاز تماس ریشه تعیین‌کننده موفقیت یا ناموفقیت در همزیستی است.

باکتری *R. rhizogenes* میله‌ای شکل، گرم منفی، هوازی و خاکزی است که متعلق به خانواده Rhizobiaceae است (Giri & Narasu, 2000). این باکتری با انتقال قطعه‌ای از DNA پلاسمیدی خود به گیاهان میزبان، منجر به تغییر ژنتیکی می‌شود. قطعه‌ای از DNA که از باکتری *R. rhizogenes* به گیاه منتقل می‌شود را T-DNA و پلاسمید ناقل را که دهنده T-DNA در فرآیند انتقال ژن است، پلاسمید (Root-inducing) Ri می‌نامند. به‌دست‌آمده از این انتقال، تولید ریشه‌های موین در نزدیکی محل تماس و ورود باکتری است. در حالت عادی، کشت‌های ریشه‌ای به یک ذخیره هورمونی برون‌زا نیازمند بوده و میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها بسیار اندک است. ریشه‌های موین انشعاب‌های فراوانی تولید می‌کنند و می‌توان با انتقال بخش‌هایی از شبکه ریشه در شرایط آزمایشگاهی، کشت‌های جدیدی به دست آورد (Bais et al., 2001; Christensen & Muller, 2009). در سال‌های اخیر از گیاه هویج (*Daucus carota* L.) برای آغاز کشت همراه با قارچ قارچ‌ریشه آربوسکولار استفاده شده است (Bidondo et al., 2012). ترکیبی از ریشه‌های تراریخته هویج و اسپورهای ضدعفونی‌شده قارچ قارچ‌ریشه آربوسکولار، یک روش مؤثر برای تولید شمار فراوانی اسپور و میسلیوم فراهم می‌کند. کشت بافت ریشه امروزه برای تولید میسلیوم و اسپور در برخی گونه‌های تجاری قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و در بررسی‌های رده‌بندی (سیستماتیک) و تبارزایی (فیلوژنی) آن‌ها کاربرد دارد (Fortin et al., 2002; Voets et al., 2009). تاکنون از روش‌های مختلفی برای تراریختی (ترانسفورماسیون) استفاده شده است، انتخاب روش به نوع سویه (استرین) باکتری و گیاه مورد استفاده بستگی دارد. با توجه به اهمیت مطالب یادشده، این

درون‌شیشه‌ای هویج و تولید ریشه مویین، نقاط مختلف ریزنمونه‌ها با نوک سرنگ انسولین کمی زخمی شده و سپس میزان بسیار کمی از دروایه باکتری با غلظت بهینه  $OD = 0.7-1$  در طول موج ۶۰۰ نانومتر) روی محل‌های زخم شده، قرار داده شد. تیمار شاهد شامل ریزنمونه‌هایی بود که توسط آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. سپس ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS کشت شده و به اتاق رشد در شرایط تاریک و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. برای هر تیمار دوازده تکرار در سه پتری‌دیش از ریزنمونه‌های گلخانه‌ای و درون‌شیشه‌ای در نظر گرفته شد.

#### حذف آلودگی از سطح ریزنمونه‌ها

پس از گذشت دو روز، بسته به نوع ریزنمونه و باکتری، هاله لعابی (موسیلازی) از باکتری‌های رشد یافته در زیر ریزنمونه‌ها مشاهده شد. برای رفع آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پادزی (آنتی‌بیوتیک) سفوتاکسیم منتقل شدند. سپس پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی تا زمان ظهور ریشه‌های مویین نگهداری شدند. برای اطمینان از حذف آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌ها دو تا چهار مرتبه زیرکشت شدند و هر بار با توجه به کاهش آلودگی، غلظت کمتری از پادزی سفوتاکسیم استفاده شد. در پایان قطعه‌های ۱ سانتی‌متری از نوک ریشه جدا و به محیط کشت MS بدون پادزی منتقل شد.

#### تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین

برای تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین، از واکنش PCR برای افزودن بخشی از ژن *rolC* استفاده شد. استخراج DNA از ریشه‌های تراریخته و معمولی هویج با استفاده از روش بهینه شده (Alaei et al., 2009) و از کشت‌های ۲۴ ساعته سه سوپه باکتری *R. rhizogenes* با اندکی تغییر (Ausubel et al., 1992) صورت گرفت. ریشه‌های معمولی هویج به‌عنوان کنترل منفی و سوپه‌های باکتری *R. rhizogenes* به‌عنوان شاهد (کنترل) مثبت در واکنش PCR

داده و پتری‌دیش‌ها به اتاق رشد با شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل و پس از ۴۸ ساعت، ریزنمونه‌ها برای همکشتی آماده شدند.

#### تهیه و آماده‌سازی جدایه‌های باکتریایی

به‌منظور بررسی تأثیر سوپه‌های مختلف باکتری بر تولید ریشه مویین و میزان رشد آن‌ها، از سوپه‌های اگروپین MSU، ۱۵۸۳۴ و A4 باکتری *R. rhizogenes* که در القای ریشه مویین توان بیشتری دارند، استفاده شد. سوپه‌های یادشده از مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد و کلکسیون باکتری‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، تهیه شد. هر کدام از سوپه‌های باکتری روی محیط کشت LB (Luria Bertani) کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. دروایه‌ای (سوسپانسیون) از هر سوپه با انتقال همسانه (کلونی) خالص از کشت ۴۸ ساعته باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB تهیه و به مدت یک شبانه‌روز در گرداننده دوار با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. تأثیر سه غلظت ۰/۵، ۰/۷ و ۱ از سوپه‌های A4، MSU و ۱۵۸۳۴ بر القای ریشه مویین بررسی شد. برای هر سوپه باکتری، چهار تکرار از هر ریزنمونه تهیه شد و پس از کشت شبانه سوپه‌های باکتری در محفظه رشد لرزادار (انکوباتور شیکردار)، غلظت آن‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتری) و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس بر پایه تأثیر مجموع سوپه‌ها بر ریشه‌زایی، غلظت‌های مناسب و بهینه برای همکشتی ریزنمونه‌های هر دو نوع گیاهچه انتخاب شد. پس از تعیین غلظت بهینه ۱۰ میلی‌لیتر از دروایه باکتریایی در لوله فالكون به مدت ده دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب باقی‌مانده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و به‌منظور افزایش میزان رشد و همگن‌سازی دروایه باکتری، به مدت دو ساعت در گرداننده همسان شرایط پیش قرار گرفتند.

#### مایه‌زنی ریزنمونه‌ها با باکتری *R. rhizogenes*

برای همکشتی باکتری با ریزنمونه‌های گلخانه‌ای و

نشانه‌گذاری اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد محاسبه شد.

## نتایج و بحث

### جوانه‌زنی بذرها

بذرهای هویج کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، آلودگی کمی داشتند، بنابراین روش مورد استفاده کارایی مناسب داشت. گیاهچه گلخانه‌ای سرعت رشد پایینی داشت، بدین منظور چندین گلدان کشت شد. نوع ماده ضدعفونی‌کننده و روش استفاده از آن به منظور پاک‌سازی ریزنمونه از عامل‌های آلوده‌کننده باید به‌گونه‌ای انتخاب شود که کمترین آسیب به ریزنمونه وارد شده و از سوی دیگر عامل‌های آلوده‌کننده از بین بروند. به عبارت دیگر، ماده ضدعفونی‌کننده باید به‌اندازه‌ای با ریزنمونه در تماس باشد که تنها انواع میکروب‌های سطح ریزنمونه را از بین ببرد و یاخته‌های ریزنمونه گیاهی نابود نشوند. در بسیاری از بررسی‌های انجام شده، از برش‌های عرضی هویج به ضخامت ۲ تا ۳ میلی‌متر برای القای ریشه مویین استفاده شده است (Declerck *et al.*, 1996; Fortin *et al.*, 2002; Rezaee Danesh *et al.*, 2006). انتخاب بذر به‌عنوان ریزنمونه، به‌علت تولید بافت جوان است که در تماس با مواد ضدعفونی‌کننده نیستند. به‌طورمعمول پوشش بذر پس از ضدعفونی، آلودگی ندارد و اندام‌های درونی آن رشد و نمو می‌کنند (Leifert & Cassells, 2001). نتایج این پژوهش نیز نشان داد، با استفاده از گیاهچه‌های بذری هویج میزان آلودگی‌های جانبی محیط‌های کشت و بافت‌های گیاهی در مقایسه با برش‌های هویج کمتر است.

### بهینه‌سازی غلظت، مایه‌زنی و باکتری‌زدایی از

#### سطح ریزنمونه‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از همکشتی‌ها نشان داد، دروایه باکتری‌ای با OD برابر با یک در گیاهچه گلخانه‌ای با

استفاده شدند. آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* شامل آغازگر رفت با توالی-5' 3'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC و آغازگر برگشت با توالی-5' 3'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA استفاده شد (Moshtaghi, 2001). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش (Taq DNA Polymerase Master Mix Red, Amplicon Denmark)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت ۱۰ میکرومولار و ۵ میکرولیتر DNA استخراج و بنا بر برنامه دمایی زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه DNA با دمای ۹۸ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۴ چرخه شامل ده ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۸ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال با دمای ۶۰ درجه سلسیوس، یک دقیقه مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت هفت دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای گسترش نهایی.

محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۱ درصد با بافر TBE بارگذاری و در اختلاف پتانسیل ۹۰ ولت الکتروفورز شد.

### تأثیر نوع ریزنمونه بر درصد ظهور و تولید ریشه

#### مویین

برای تعیین بهترین ریزنمونه در القای ریشه مویین، از ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ درون‌شیشه‌ای و ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه گلخانه‌ای با چهار تکرار استفاده شد. تولید یا بدون تولید و نیز درصد تولید ریشه‌های مویین القایی، با شمارش شمار تکرارهای دارای ریشه مویین تولیدشده پس از گذشت سه هفته در هر تیمار بررسی شد.

### میزان رشد ریشه‌های مویین

پس از تولید ریشه‌های مویین و اطمینان از حذف باکتری، قطعه‌های ۱ سانتی‌متری از این ریشه‌ها انتخاب و در محیط MS کشت شدند. رشد طولی ریشه‌ها هر سه روز یک بار از پشت پتری‌دیش‌ها و با

باکتری شناسایی شده و ژن‌های مورد نیاز برای انتقال DNA فعال می‌شوند. بنابراین زخم ایجاد شده باید به‌گونه‌ای باشد که بافت گیاه را تخریب نکند و فضای مناسبی برای ورود باکتری فراهم کند ( Mishra & Ranjan, 2008).

### زمان ظهور ریشه‌های مویین

زمان ظهور ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های گلخانه‌ای و درون‌شیشه‌ای متفاوت بوده و در یک بازه زمانی به‌نسبت گسترده ظاهر شد. به‌طوری‌که نخستین ریشه‌های مویین در ریزنمونه دمبرگ و ریشه درون‌شیشه‌ای در روز هشتم و در ریزنمونه دمبرگ گلخانه‌ای در روز دهم و در ریزنمونه ساقه گلخانه‌ای در روز سیزدهم از زمان همکشتی ظاهر شد و این روند تا سه هفته بعد ادامه داشت. به‌طور کلی بیشتر ریزنمونه‌ها در هفته دوم پس از همکشتی آغاز به تولید ریشه مویین کردند. ریخت‌شناختی (مورفولوژی) ریشه‌های مویین ناشی از دو نوع گیاهچه در سویه‌های مختلف باکتری بنا بر ویژگی‌های مورد انتظار شامل رشد سریع با انشعاب‌های زیاد بود. اما ریشه‌های مویین القاشده روی ریزنمونه‌های گلخانه‌ای در مقایسه با ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای اندکی ضخیم‌تر و انشعاب‌های آن بیشتر بودند (شکل ۱).

در ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ درون‌شیشه‌ای دو نوع ریشه مشاهده شد که نوع اول ریشه‌های معمولی با رشد آهسته و انشعاب‌های کم بودند. نوع دوم ریشه‌های تراریخته بودند که در مقایسه با ریشه‌های معمولی هویج اندکی ضخیم‌تر، رشد سریع با انشعاب‌های زیاد و بدون زمین‌گرایی داشتند (شکل ۲). ریشه‌های نوع اول در تیمار کنترل ریشه پس از ده روز و در تیمار کنترل دمبرگ، پس از ۲۱ روز مشاهده شدند. ریشه‌های تراریخته در مقایسه با ریشه‌های معمولی انشعاب‌های بیشتری دارند که دلیل آن به‌احتمال زیست‌ساخت (بیوسنتز) بیشتر اکسین در این ریشه‌ها است. در تأیید این فرض گزارش شده است که وجود ژن مولد سایتوکینین در T-DNA و افزایش زیست‌ساخت آن در گیاه و همچنین ورود ژن‌های خارجی به‌ویژه ژن مولد اکسین توسط باکتری *R. rhizogenes* به گیاه،

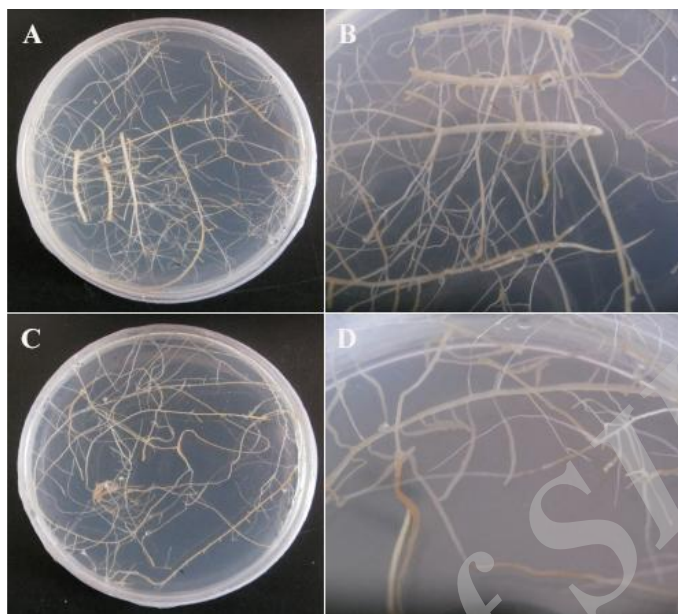
۷۵ و ۶۶ درصد موفقیت در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه و همچنین غلظت برابر ۰/۷ در گیاهچه آزمایشگاهی با ۷۵ و ۷۵ درصد موفقیت در ریزنمونه‌های ریشه و ساقه در مقایسه با غلظت‌های دیگر، توان بیماری‌زایی بیشتری داشت.

استفاده از سرنگ برای مایه‌زنی باکتری، به‌علت کنترل بهتر آلودگی، روش مناسبی است. دو روز پس از مایه‌زنی، باکتری در زیر ریزنمونه‌ها و در سطح محیط کشت رشد کرده و هاله‌ی لعابی اطراف ریزنمونه‌ها به‌وجود آورد. این مرحله (مرحله همکشتی)، مدت‌زمانی است که باکتری اجازه می‌یابد تا القای ریشه‌زایی را از راه انتقال T-DNA انجام دهد. پس از پایان مرحله همکشتی، برای حفظ بقای ریزنمونه‌ها لازم است تا باکتری از محیط حذف شود. روش انتقال مستقیم ریزنمونه‌های مایه‌زنی شده با باکتری به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، در مقایسه با روش‌های دیگر مانند حذف سطحی و اولیه باکتری با شستشوی ریزنمونه در آب یا قرار دادن آن‌ها روی کاغذ صافی سترون پیش از انتقال به محیط کشت، مناسب‌تر بود ( Yazdanpanah et al., 2015). در روش‌های یادشده به‌علت تماس همه سطح ریزنمونه با دروایه باکتری *R. rhizogenes* درصد آلودگی ریزنمونه و نیز از بین رفتن بافت گیاهی به‌نسبت بالا است. همچنین، میزان آلودگی‌های همراه کشت بافت در این روش‌ها نسبت به روش مایه‌زنی با سرنگ بالاتر است (Yazdanpanah et al., 2015).

شرایط آماده‌سازی باکتری و استفاده از آن در غلظت مناسب، در القای بهتر ریشه مویین مؤثر است (Saleh & Thuc, 2009). غلظت باکتری بیشتر از میزان بهینه آلودگی باکتریایی را افزایش می‌دهد و ریزنمونه‌ها پیش از تولید ریشه مویین از بین می‌روند. باکتری *R. rhizogenes* به‌طور معمول به گیاه میزبان خود در محل زخم حمله می‌کند. زخم دو اثرگذاری در رابطه با آلودگی *R. rhizogenes* دارد: اول اینکه محلی را ایجاد می‌کند که یاخته‌های آن برای ترمیم بافت زخم به‌شدت در حال تقسیم یاخته‌ای هستند. دوم به تأثیر زخم در آزاد شدن متابولیت‌های فنلی وابسته به القاکننده‌هایی مربوط می‌شود که توسط

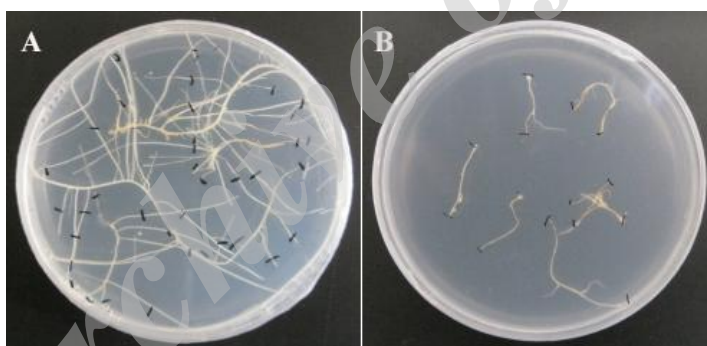
و افزایش شمار انشعابها می‌شود (Mercuri *et al.*, 2001; Taiz & Zeiger, 2002).

باعث بر هم زدن تعادل هورمون‌های گیاهی شده که خود باعث القای ریشه در گیاه، کاهش غالبیت انتهایی



شکل ۱. ریخت‌شناختی ریشه‌های تراریخته ناشی از ریزنمونه‌های گلخانه‌ای (A و B) و درون شیشه‌ای (C و D).

Figure 1. The morphology of hairy roots obtained from greenhouse (A and B) and *in vitro* (D and C) explants.



شکل ۲. (A) ریشه‌های تراریخته با شمار زیادی انشعاب‌های جانبی. (B) ریشه‌های غیر تراریخته.

Figure 2. A) Transgenic roots with many lateral branches. B) Non-transgenic roots.

درون شیشه‌ای) در پاسخ گیاه به مایه‌زنی باکتری مؤثر بود که یکی از دلایل این امر می‌تواند توان ریزنمونه باشد. گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط سترون و اتاقلک رشد، کم رشد بودند و ساقه و برگ‌های آن بسیار نازک و ظریف بود که این حالت درصد تولید ریشه موپین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای هویج در شرایط تاریکی عمر بیشتری در محیط کشت داشتند و در نتیجه تولید ریشه موپین که متأثر از جوانی و شاداب بودن ریزنمونه‌هاست، بیشتر بود. در شرایط روشنایی

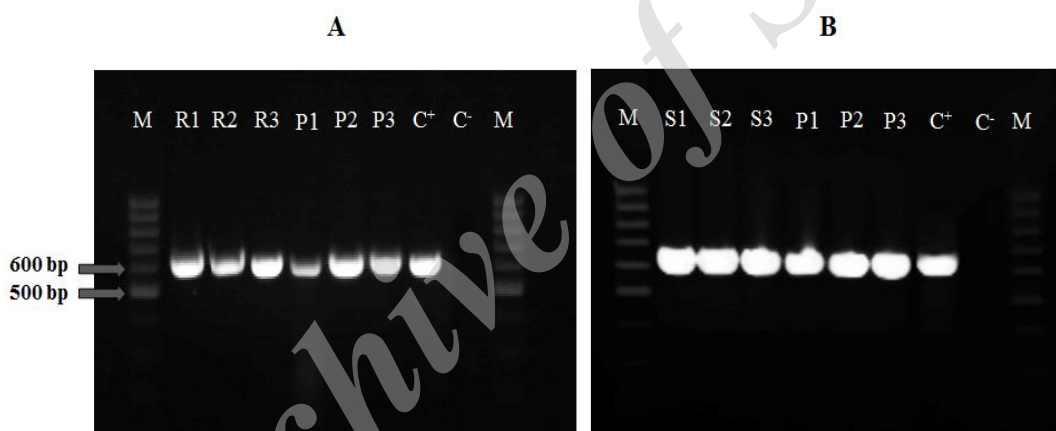
از نظر محل رویش ریشه‌های موپین در ریزنمونه‌های دمبرگ گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای، در آغاز دمبرگ (نزدیک به برگ) نسبت به قسمت پایینی آن، واکنش بهتری به مایه‌زنی باکتری نشان داد. این پدیده احتمال دارد به علت فراوانی آوندهای حاوی آب و مواد غذایی در ابتدای دمبرگ باشد که مواد غذایی لازم برای تولید و رشد ریشه‌های موپین فراهم می‌شود. در مورد ریزنمونه‌های ریشه درون شیشه‌ای و ساقه گلخانه‌ای، تفاوت قابل توجهی در محل مایه‌زنی مشاهده نشد. شرایط رشدی (گلخانه‌ای یا

نظر را تأیید کرد (Moshtaghi, 2001). در چاهک مربوط به ریشه‌های طبیعی هویج، هیچ نواری مشاهده نشد (شکل ۳). به‌منظور حذف باکتری و نبود یاخته‌های باکتریایی در ریشه‌های تراریخته، دو تا چهار مرتبه زیرکشت انجام شد. برای اطمینان از حذف کامل آلودگی باکتریایی در ریشه‌های موبین، میزانی از آن‌ها با کاردک (اسکالپل) در آب مقطر سترون خرد شد. آنگاه میزان کمی از آب حاوی ریشه با لوپ برداشته و روی محیط کشت LB کشت شد. همچنین چند قطعه ریشه تراریخته روی محیط کشت LB کشت و پتری‌دیش‌ها در شرایط تاریکی به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نبود رشد باکتری در محیط کشت نشان داد، باکتری به‌صورت کامل از ریشه‌های موبین حذف شده است.

ریزنمونه‌ها ضعیف‌تر و در مقابل آلودگی باکتریایی حساس‌تر شدند. در نتیجه بازده ریشه‌زایی در این نمونه‌ها کاهش یافته یا در صورت القای ریشه موبین به دلیل ضعیف بودن بافت نمونه، گیاه قادر به حفظ آن نبود.

### تأیید تراریختگی ریشه‌های موبین

اگرچه رشد سریع همراه با تولید انشعاب‌های فراوان در محیط کشت بدون هورمون نشان‌دهنده تراریختگی ریشه‌های موبین بود، برای بررسی ماهیت تراریختگی این ریشه‌ها و تأیید ثبات T-DNA وارد شده از باکتری *R. rhizogenes* به ریزنمونه‌ها، واکنش PCR انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از PCR، حضور قطعه ۶۱۲ جفت باز را نشان داد که ماهیت تراریخته ریشه‌های مورد



شکل ۳. تکثیر ژن *rolC* در ریشه‌های موبین ناشی از ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای (A) و گلخانه‌ای (B)

Figure 3. Amplification of *rolC* gene in hairy roots obtained from *in vitro* (A) and greenhouse (B) explants.

(M نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت باز. R) ریشه موبین القاشده روی ریشه درون‌شیشه‌ای. (P) ریشه موبین القاشده روی دمبرگ درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای. (S) ریشه موبین القاشده روی ساقه گلخانه‌ای. (C<sup>+</sup>) قطعه تکثیر شده از DNA باکتری *R. rhizogenes* سویه A4. (C<sup>-</sup>) نبود تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی

.R1, S1 و P1) قطعه تکثیر شده مربوط به DNA استخراجی از ریشه موبین ناشی از سویه A4.

.R2, S2 و P2) قطعه تکثیر شده مربوط به DNA استخراجی از ریشه موبین ناشی از سویه MSU.

.R3, S3 و P3) قطعه تکثیر شده مربوط به DNA استخراجی از ریشه موبین ناشی از سویه ۱۵۸۳۴.

باکتری برای تراریزش در رقم (واریت) گیاهی مورد نظر، ضروری است. بنابراین تأثیر سه سویه باکتری *R. rhizogenes* برای تولید ریشه موبین از گیاهچه‌های گلخانه‌ای و درون‌شیشه‌ای هویج سه هفته پس از همکشتی، بررسی شد. نتایج نشان داد، سویه‌های

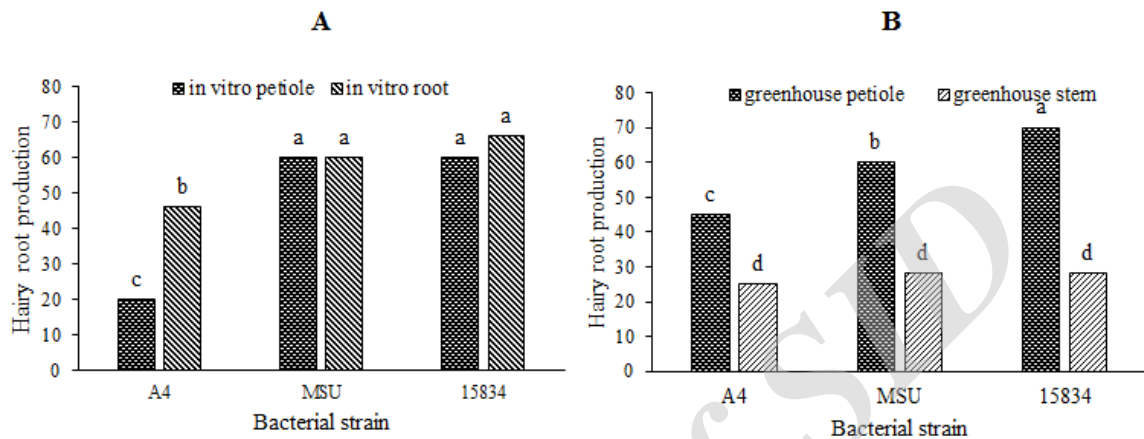
### تأثیر سویه‌های مختلف باکتری بر میزان ظهور ریشه‌های موبین

از آنجاکه میزان رشد از مهم‌ترین ملاک‌ها در انتخاب ریشه موبین برای انجام تحقیقات و همچنین کاربرد تجاری این قارچ‌ها است، گزینش مؤثرترین سویه



گیاهچه‌های گلخانه‌ای و درون‌شیشه‌ای داشتند. همچنین بین سویه MSU و ۱۵۸۳۴ در گیاهچه درون‌شیشه‌ای اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴).

باکتری در ایجاد تراخی‌تگی کارایی متفاوتی داشتند. از بین سه سویه بررسی‌شده، سویه ۱۵۸۳۴ با میانگین ۷۰ درصد در ریزنمونه دمبرگ گلخانه‌ای بیشترین و سویه A4 با میانگین ۲۰ درصد در ریزنمونه دمبرگ درون‌شیشه‌ای، کمترین میزان تولید ریشه موین را در



شکل ۴. تأثیر سویه باکتری بر ظهور ریشه موین در ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای (A) و گلخانه‌ای (B)

ستون‌های دارای حرف‌های مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

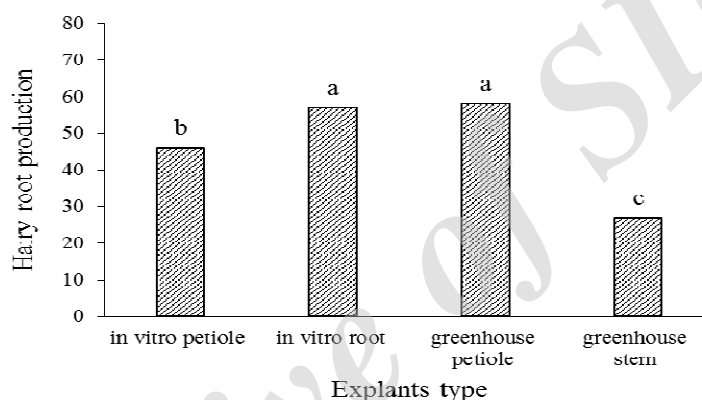
Figure 4. The effects of bacterial strain on hairy root production in *in vitro* (A) and greenhouse (B) explants. Columns with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test.

1998). در بررسی قابلیت انتقال ژن به کمک سه سویه *R. rhizogenes* به گیاه فلفل قرمز (*Capsicum frutescens*)، سویه A13 را به‌عنوان مستعدترین سویه معرفی کردند. بنابراین، بهبود بیماری‌زایی باکتری و آمادگی یاخته گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به یاخته گیاهی نقش بسزایی دارد.

سویه‌های مختلف باکتری *R. rhizogenes* بر پایه نوع اوپین به انواع مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. بنا بر مشاهده‌های به‌دست‌آمده، سویه‌های گروه اگروپین (برای مثال سویه‌های TR105، LBA9402، MSU، R1000، 15834، A4، A2-83T، HRI) در ایجاد بیماری‌زایی و القای ریشه موین توان بیشتری در مقایسه با سویه‌های گروه مانوپین (8196، TR101، TR7) و اکتوپین و غیره دارند. این امر احتمال دارد به‌علت حضور دو یا چند ناحیه T-DNA مجزا در پلاسمید Ri این باکتری باشد که منجر به افزایش شانس انتقال T-DNA به ژنگان (ژنوم) گیاه میزبان و در نتیجه افزایش توان بیماری‌زایی این سویه‌ها می‌شود (Nilsson *et al.*, 1997). عملکرد پایین سویه

برای استفاده از باکتری *R. rhizogenes* در انتقال ژن به گیاهان، موارد آزمایشی مختلفی از جمله شرایط محیط کشت باکتری و گیاه، استفاده از سویه مناسب باکتری که نژادگان (ژنوتیپ) گیاهی مورد نظر را به نحو مطلوب آلوده کند و انتقال T-DNA باکتری به گیاه با فراوانی مناسب باید بهینه‌سازی شوند. بدیهی است، اینکه نه همه سویه‌ها قابلیت انتقال ژن‌های مربوط به ریشه‌زایی را دارند و نه همه گیاهان آماده پذیرش ژن بیگانه و باززایی هستند (De Buck *et al.*, 1998). دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و تنها می‌توان گفت که چنین حالتی در قالب اثر متقابل گیاه-پاتوژن قابل بحث است که یک رقم گیاهی پاسخ‌های متفاوتی به نژادهای مختلف یک‌گونه بیماری‌زا می‌دهد. توانایی یک سویه بستگی به ساختار ژن‌های *vir* (Virulence) آن دارد که به‌طور حتم کارایی این ژن‌ها در برخی سویه‌ها بیشتر از دیگران خواهد بود (Georgiev *et al.*, 2007)؛ از سوی دیگر، درصد ریشه‌زایی به میزان تأثیرگذاری یا نفوذ باکتری روی بافت هدف بستگی دارد (Yamakawa *et al.*)

دارای ریشه موپین پس از گذشت سه هفته بررسی شد. نتایج نشان داد، از بین ریزنمونه‌ها، دمبرگ گلخانه‌ای و ریشه درون‌شیشه‌ای به ترتیب با میانگین ۵۸ و ۵۷ درصد بیشترین و ساقه گلخانه‌ای با میانگین ۲۷ درصد، کمترین درصد تولید ریشه موپین را دارند. بین دمبرگ گلخانه‌ای و ریشه درون‌شیشه‌ای اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و در مقایسه با دو ریزنمونه دیگر، مناسب‌تر بود (شکل ۵). بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای در مقایسه با ریزنمونه‌های گلخانه‌ای در القای ریشه موپین موفق‌تر بودند.



شکل ۵. تأثیر نوع ریزنمونه بر موفقیت القای ریشه موپین

ستون‌های دارای حرف‌های مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Figure 5. The effects of explants type on hairy root induction

Columns with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test.

میزان زیادی بر رشد ریشه‌های موپین و موفقیت فرآیند مایه‌زنی، تأثیر می‌گذارد (Shi & Kintzios, 2003; Milen et al., 2007). در یک بررسی به‌منظور تولید ریشه موپین در گیاه هورت بنگال (*Gmelina arborea*)، نخستین برگ (کوتیلدون)‌های گیاهی نسبت به دیگر اندام‌ها و همچنین برگ‌های اولیه پنج روزه نسبت به دیگر سنین کوتیلدونی موفق‌تر بودند (Dhakulkar et al, 2005).

اندازه‌گیری میزان رشد ریشه‌های موپین القاشده

روی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای

برای محاسبه این عامل، میزان رشد ریشه‌های موپین

می‌تواند به‌دلیل حضور دُزهای مختلفی از T-DNA باکتری در یاخته‌های گیاهی و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در آن‌ها باشد (Nguyen et al., 1992). بدیهی است که انتخاب یک سویه باکتریایی برای تولید کشت‌های ریشه ترا ریخته به گونه گیاهی وابسته است و باید به‌صورت تجربی تعیین شود.

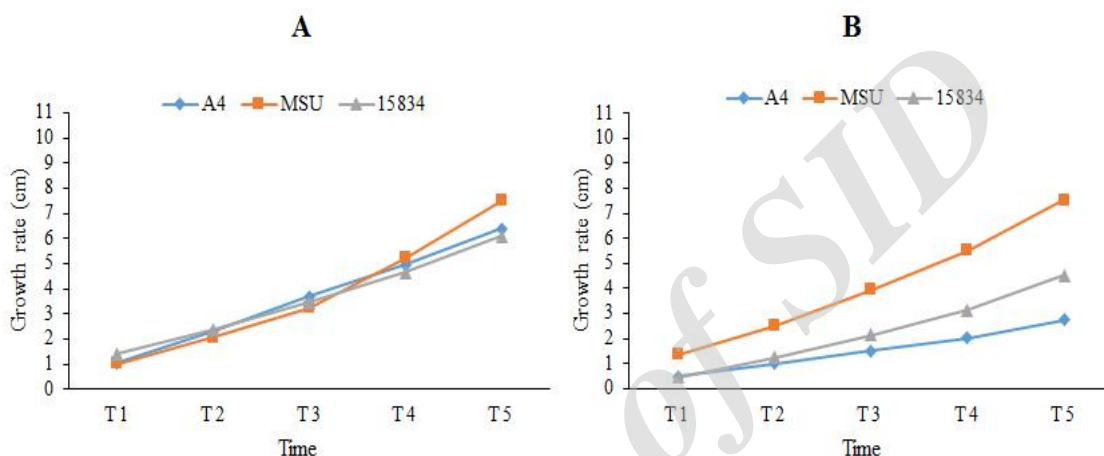
تأثیر نوع ریزنمونه (گیاهچه درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای) بر موفقیت القای ریشه موپین

درصد تولید ریشه‌های ترا ریخته ناشی از سویه‌های باکتری *R. rhizogenes*، با شمارش شمار ریزنمونه‌های

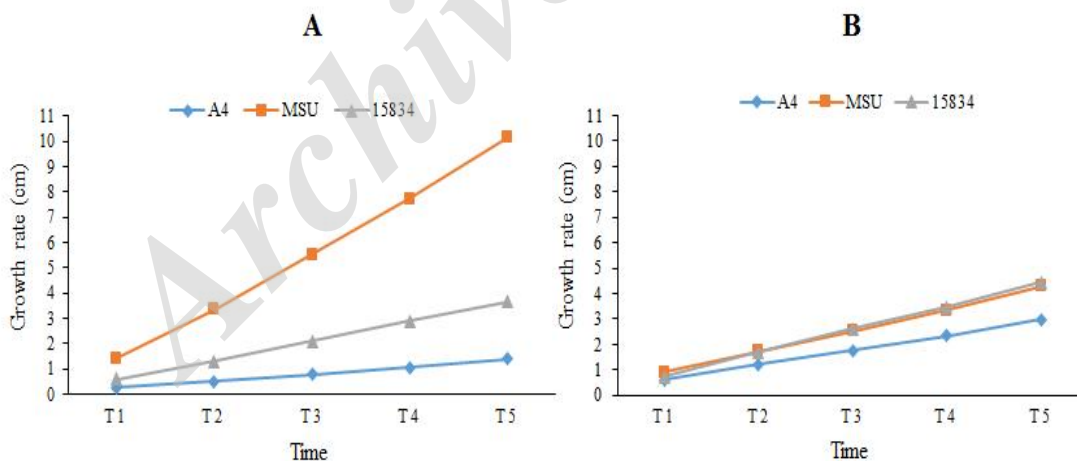
حساسیت گونه‌های گیاهی به سویه‌های باکتری *R. rhizogenes* بسیار متفاوت است و ممکن است یک‌گونه گیاهی به یک سویه باکتری حساس نباشد اما به سویه دیگر واکنش نشان دهد. هویج گیاهی دولپه و غنی از ترکیب‌های فنلی و کربنی است که این امر موجب شده تاکنون همه رقم‌های بررسی شده این گیاه، از طریق مایه‌زنی با سویه‌های مختلف *R. rhizogenes* ریشه موپین تولید کنند. البته میزان القای ریشه موپین توسط سویه‌های مختلف و حساسیت رقم‌های مختلف هویج، متفاوت بوده است (Baranski, 2008). بررسی‌های اخیر نشان داده است، نوع ریزنمونه، اندازه و سن آن‌ها در زمان مایه‌زنی به

چهارم و پنجم بیشتر از دو سویه دیگر بود. در ریزنمونه‌های دمبرگ درون‌شیشه‌ای و ساقه گلخانه‌ای میزان رشد ریشه‌های مویین ناشی از سویه MSU نسبت به سویه‌های A4 و ۱۵۸۳۴ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. روند رشدی ریشه‌های مویین ناشی از سویه MSU و ۱۵۸۳۴ در ریزنمونه دمبرگ گلخانه‌ای تا حدودی یکسان بود.

پس از اطمینان از حذف باکتری در پنج نوبت با فاصله زمانی هر سه روز اندازه‌گیری شد. در این بازه زمانی، روند رشدی ریشه‌ها افزایشی بوده اما در هر دوره برای هر سویه نوسان داشت که می‌تواند به ثبات ژنتیکی ژنگان بیماری‌زای آن‌ها مربوط باشد (شکل‌های ۶ و ۷). در ریزنمونه ریشه درون‌شیشه‌ای، عملکرد سه سویه تا حدودی همانند یکدیگر بود اما میزان رشد ریشه‌های مویین ناشی از سویه MSU در مرحله



شکل ۶. روند رشدی ریشه‌های مویین ناشی از ریزنمونه‌های ریشه (A) و دمبرگ (B) درون‌شیشه‌ای.  
Figure 6. The growth rate of hairy roots obtained from *in vitro* root (A) and petiole (B) explants.



شکل ۷. روند رشدی ریشه‌های مویین ناشی از ریزنمونه‌های ساقه (A) و دمبرگ (B) گلخانه‌ای.  
Figure 7. The growth rate of hairy roots obtained from greenhouse stem (A) and petiole (B) explants.

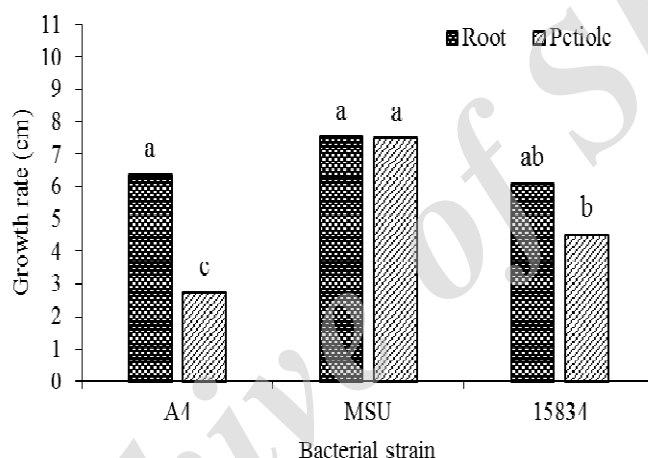
سه سویه مختلف باکتری در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. در گیاهچه درون‌شیشه‌ای، اثر متقابل سویه باکتری و ریزنمونه از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان داد، کمترین میزان

پس از پایان اندازه‌گیری، مجموع رشد ریشه‌های مویین مربوط به هر تیمار در این بازه زمانی به‌دست آمد. نتایج تجزیه واریانس مقایسه رشد ریشه‌های تراریخته ناشی از ریزنمونه‌های هر دو نوع گیاهچه با

از MSU و در ریزنمونه ساقه مشاهده شد (شکل ۹). میزان رشد ریشه‌های مویین ناشی از دو سویه ۱۵۸۳۴ و MSU در ریزنمونه دمبرگ گلخانه‌ای تفاوت معنی‌داری نداشتند.

در بررسی‌های انجام شده تفاوت رشد زیادی در بین ریشه‌های مویین ناشی از سویه‌های مختلف باکتری مشاهده شد. دلیل اصلی این تفاوت هنوز مشخص نشده است و تنها دلایلی همچون حضور غلظت‌های مختلفی از T-DNA باکتری در یاخته‌های تراریخته و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در یاخته‌های گیاهی توسط محققان بیان شده است (Akramian *et al.*, 2008).

رشد مربوط به ریشه‌های مویین ناشی از سویه A4 در ریزنمونه دمبرگ و بیشترین میزان رشد مربوط به ریشه‌های مویین ناشی از ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه با سویه MSU بود (شکل ۸). همچنین بین ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه با باکتری MSU و ریزنمونه ریشه با باکتری A4 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه رشد ریشه‌های القاشده در ریزنمونه‌های گلخانه‌ای نشان داد، اثر متقابل سویه باکتری و ریزنمونه از لحاظ آماری در سطح ۱ درصد معنی‌دار هستند. کمترین میزان رشد در ریشه‌های القاشده روی ریزنمونه ساقه توسط سویه A4 و بیشترین میزان رشد در ریشه‌های مویین ناشی



شکل ۸. مقایسه رشد ریشه مویین در ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای در سویه‌های باکتریایی

ستون‌های دارای حرف‌های مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Figure 8- The hairy roots growth compare in *in vitro* explants in bacterial strains  
Columns with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس مربوط به مقایسه رشد نهایی ریشه مویین در ریزنمونه‌های

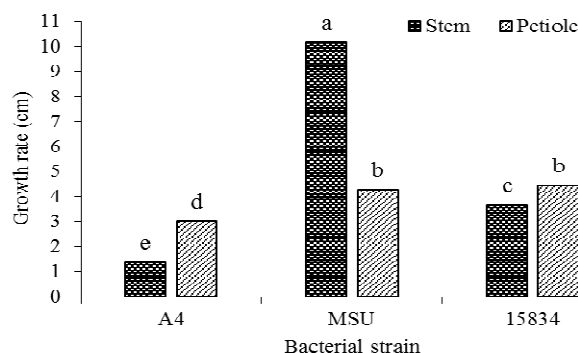
درون‌شیشه‌ای در سویه‌های باکتریایی

Table 1. ANOVA result of growth rate compare of hairy roots obtained from *in vitro* explants in bacterial strains

Growth rate (cm)	DF	Source
Final growth		
14/13**	2	Bacteria
13/67**	1	Explant
4/9*	2	Bacteria*Explant
0/8	12	Error
15/59	-	Coeff Var

\*\*\*: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

\*\*\*: Significant difference at 1 and 5 percent respectively.



شکل ۹. مقایسه رشد ریشه موپین در ریزنمونه‌های گلخانه‌ای در سویه‌های باکتریایی

ستون‌های دارای حرف‌های مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Figure 9. The hairy roots growth compare in greenhouse explants in bacterial strains. Columns with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس مربوط به مقایسه رشد نهایی ریشه موپین در ریزنمونه‌های گلخانه‌ای در سویه‌های باکتریایی

Table 2. ANOVA result of growth rate compare of hairy roots obtained from greenhouse explants in bacterial strains

Growth rate (cm)	DF	Source
Final growth		
38/91**	2	Bacteria
5/91**	1	Explant
25/36**	2	Bacteria*Explant
0/057	12	Error
5/3	-	Coeff Var

\*\*\*: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

\*\*\*: Significant difference at 1 percent.

دمبرگ گلخانه‌ای، بیشترین توانایی تولید ریشه موپین دارد. از میان ریزنمونه‌های گلخانه‌ای و درون‌شیشه‌ای، دمبرگ گلخانه‌ای و ریشه درون‌شیشه‌ای با میانگین تولید ۵۸ و ۵۷ درصد نسبت به ریزنمونه‌های دیگر در القای ریشه موپین مناسب‌تر بودند. همچنین بالاترین میزان رشد ریشه‌های موپین در ریزنمونه ساقه گلخانه‌ای با سویه MSU مشاهده شد.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد، هویج گیاه مناسبی برای القای ریشه موپین بوده و می‌تواند درصد بالایی از ریشه‌های تراریخته را از طریق مایه‌زنی با *R. rhizogenes* تولید کند. استفاده از سویه‌های مختلف باکتری *R. rhizogenes* در این بررسی نشان داد، سویه ۱۵۸۳۴ با میانگین تولید ۷۰ درصد در ریزنمونه

### REFERENCES

1. Akramian, M., Tabatabaei, S. M. F. & Mirmasoumi, M. (2008). Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3(5), 759-763.
2. Alaei, H., Baeyen, S., Maes, M., Hofte, M. & Heungens, K. (2009). Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 76(2), 136-145.
3. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene and Wiley. Brooklyn, NY.

4. Bais, H. P., Loyola-Vargas, V. M., Flores, H. E. & Vivanco, J. M. (2001). Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(6), 730-741.
5. Baranski, R. (2008). Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other *Apiaceae* species. *Transgenic Plant Journal*, 2(1), 18-38.
6. Bidondo, L. F., Pergola, M., Silvani, V., Colombo, R., Bompadre, J. & Godeas, A. (2012). Continuous and long-term monoxenic culture of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* in root organ culture. *Fungal Biology*, 116, 729-735.
7. Blaszkowski, J. (1994). Arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) of the Hel Peninsula, Poland. *Mycorrhiza*, 5(1), 71-88.
8. Bolan, N. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*, 134(2), 189-207.
9. Christensen, B. & Muller, R. (2009). The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its *rol* genes for quality improvement in ornamentals. *European Journal of Horticultural Science*, 74, 275-287.
10. Corkidi, L. & Rincon, E. (1997). Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico. *Mycorrhiza*, 7(1), 17-23.
11. De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. & Depicker, A. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(6), 449-457.
12. Declerck, S., Strullu, D. G. & Plenhet, C. (1996). *In vitro* mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycological Research*, 100, 1237-1242.
13. Dhakulkar, S., Ganapathi, T., Bhargava, S. & Bapat, V. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science*, 169(5), 812-818.
14. Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. & Piche, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 80(1), 1-20.
15. Georgiev, M. I., Pavlov, A. I. & Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1175-1185.
16. Giri, A. & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1-22.
17. IJdo, M., Cranenbrouck, S. & Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present and future. *Mycorrhiza*, 21, 1-16.
18. Klironomos, J. N. & Hart, M. M. (2002). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12(4), 181-184.
19. Leifert, C. & Cassells, A. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2), 133-138.
20. Mercuri, A., Bruna, S., De Benedetti, L., Burchi, G. & Schiva, T. (2001). Modification of plant architecture in *Limonium* spp. induced by *rol* genes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(3), 247-253.
21. Milen, I., Atanas, I. & Pavlov, B. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1175-85.
22. Mishra, B. N. & Ranjan, R. (2008). Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49(1), 1-10.
23. Moshtaghi, N. (2001). *Hairy root production by Agrobacterium rhizogenes on Datura stramonium and compare growth rate to normal roots*. M.Sc. Thesis. In Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi).
24. Mosse, B. & Hepper, C. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology*, 5(3), 215-223.
25. Mosse, B. & Thompson, J. (1984). Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Canadian Journal of Botany*, 62(7), 1523-1530.
26. Mugnier, J. & Mosse, B. (1987). Vesicular-arbuscular infections in Ri-T-DNA transformed roots grown axenically. *Phytopathology*, 77, 1045-1050.
27. Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. & Guckert, A. (1992). Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*, 11, 424-427.
28. Nilsson, O., Tuominen, H., Sundberg, B. & Olsson, O. (1997). The *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 456-462.
29. Powell, C. L. & Bagyaraj, D. J. (1984). *VA Mycorrhiza*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.

30. Rezaee Danesh, Y., Mohammadi Goltapeh, E., Alizadeh, A. & Modarres Sanavy, M. (2006). Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. *Biological Sciences*, 6(1), 87-91.
31. Rodrigues, K. M. & Rodrigues, B. F. (2015). Endomycorrhizal association of *Funneliformis mosseae* with transformed roots of *Linum usitatissimum*: germination, colonization, and sporulation studies. *Mycology*, 6, 42-49.
32. Saleh, M. & Thuc, J. (2009). Assessment of hairy roots induction in *Solenostemon scutellarioides* leaves by different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *African Journal of Biotechnology*, 8(15), 3519-3523.
33. Schalamuk, S., Velazquez, S., Chidichimo, H. & Cabello, M. (2006). Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia*, 98(1), 16-22.
34. Shi, H. P. & Kintzios, S. (2003). Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Reports*, 21(11), 1103-1107.
35. Shi, Z., Feng, G., Christie, P. & Li, X. (2006). Arbuscular mycorrhizal status of spring ephemerals in the desert ecosystem of Junggar Basin, China. *Mycorrhiza*, 16(4), 269-275.
36. Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K. & Marimuthu, P. (2014). Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. *Journal of Applied and Natural Science*, 6 (1), 290-293.
37. Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts. 423-517.
38. Vimard, B., St-Arnaud, M., Furlan, V. & Fortin, J. A. (1999). Colonization potential of *in vitro*-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores compared with a root-segment inoculum from open pot culture. *Mycorrhiza*, 8, 335-338.
39. Voets, L., De La Providencia, I. A., Fernandez, K., Iido, M., Cranenbrouck, S. & Declerck, S. (2009). Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza*, 19, 347-356.
40. Yamakawa, T., Sekiguchi, S., Kodama, T., Smith, S. M. & Yeoman, M. M. (1998). Transformation of chilli pepper (*Capsicum frutescens*) with a phenylalanine ammonia-lyase gene. *Plant Biotechnology*, 15(4), 189-193.
41. Yazdanpanah, M., Sedaghati, E., Khodygan, P., Alaei, H. & Raghani, M. R. (2015). Investigation of immersion method in induction of carrot hairy root to *in vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi. 14<sup>th</sup> Iranain Soil Science Congrees.