

اثر محیط کشت، سویه آگروباکتریوم و نور بر القاء ریشه موئین گیاه دارویی خشخاش

Effect of Medium Culture, Agrobacterium Strain and Light Condition on Hairy Roots Induction in Opium Poppy

علی قربانی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳ و سیده زهرا حسینی^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۱/۰۴

چکیده

یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، جهت تولید آلکالوئیدهای دارویی، گیاه دولپه‌ای خشخاش *Papaver somniferum* L. می‌باشد. این گیاه تاکنون تنهاترین منبع تجاری برای داروهای ضد درد مورفینان، ضدسرفه کدئین، ضد میکروب نوسکاپین و تبائین است. آگروباکتری باعث ایجاد بیماری ریشه موئین در محل زخم گیاهان می‌شود و بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه موئین می‌تواند باعث افزایش مقدار آلکالوئیدهایی شود که به‌طور طبیعی در ریشه گیاهان تولید می‌شوند. در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط با راندمان بالاتر تحریک تولید ریشه موئین، دو آزمایش فاکتوریل مجزا برای دو نوع ریزنمونه اندام هوایی و هیپوکوتیل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا گردید. در هر کدام از این آزمایش‌های فاکتوریل، سه نوع فاکتور شامل اثر سه نوع سویه آگروباکتری ریزوژنسیس، دو نوع محیط کشت پایه (محیط B5 و ۱/۲B5) و دو شرایط نوری (۴۸ ساعت تاریکی کامل و ۱۶ ساعت تاریکی / ۸ ساعت روشنائی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که سویه AR15834 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را داشت و برای صفت تعداد شاخه جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین، بیش‌ترین انشعابات فرعی در تیمار باکتری AR15834 و محیط ۱/۲B5 مشاهده شد. نتایج آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل نشان داد که مقدار تحریک تولید ریشه موئین نسبت به ریزنمونه اندام هوایی بسیار کمتر بود و سویه AR15834 با شرایط ۴۸ ساعت تاریکی کامل بهترین تیمار است. در مجموع، نتایج این دو آزمایش نشان داد که ریزنمونه اندام هوایی پاسخ بهتری نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل دارد و در این ریزنمونه محیط ۱/۲B5 و سویه AR15834 بیش‌ترین مقدار تولید ریشه موئین را داشت.

واژه‌های کلیدی: محیط B5، آلکالوئید، مورفینان، نوسکاپین، تبائین

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۴. مربی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

Email: ismaili.a@lu.ac.ir

* نویسنده مسئول

ریشه موئین این است که هر ریشه موئین تراریخته‌ای که از محل زخم خارج می‌شود به صورت یک کلون قابل تکثیر بوده و تکثیر یافته‌ها نیز شبیه ریشه موئین اولیه است، ولی با این حال تنوع سوماکلونال در کشت ریشه‌های تراریخته نیز مشاهده شده است (هاگل و فاجینی، 2013).

آگروباکتریوم یک باکتری خاکزی گرم منفی است که به خاطر داشتن توانایی انتقال T-DNA پلاسمید Ri خود به ژنوم گیاه میزبان، سبب ایجاد بیماری ریشه موئین در گیاهان می‌شود. روی پلاسمید Ri این باکتری، ژن‌هایی به نام آپین وجود دارد که تولید نوعی اسیدهای آمینه غیر متداول کرده که در تولید کربن، نیتروژن و انرژی برای انتقال پلاسمید ضروری هستند. پلاسمید Ri بسته به نوع ژن آپین به سه کلاس آگروپین، منوپین و کوکومپین تقسیم می‌شود (باترا^۸ و همکاران، 2004). ریشه‌های موئین توانایی رشد را حتی زمانی که از گیاه خارج می‌شوند را دارند. از دیگر ویژگی‌های ریشه موئین این است که در برخی گونه‌های گیاهی باززایی به این روش به آسانی صورت گرفته و به علاوه این روش باززایی از تشکیل کالوس جلوگیری کرده و تا حد قابل توجهی از ایجاد تنوع سوماکلونال جلوگیری می‌کند (الپیزار^۹ و همکاران، 2008). برای اولین بار از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه MAFF 03-01724 به منظور تراریختی ریز نمونه‌های هیپوکوتیل گیاه خشخاش در محیط MS بدون اکسین استفاده شد و در این راستا پروتکل مناسب تراریختی معرفی شد (یوشیماتسو و شیمورا^{۱۰}، 1992). توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در تراریختی و تولید ریشه موئین در گیاه خشخاش متفاوت است و بر این اساس بهتر است که سویه آگروباکتریوم خاص هرگونه گیاهی معرفی شود (پارک و فاجینی، 2000). در این راستا، در مطالعه دیگری شرفی و همکاران گزارش کردند که سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز و ریزنمونه‌های مختلف گیاهی، پاسخ متفاوتی به القاء ریشه موئین در گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*) نشان داد (شرفی^{۱۱} و همکاران، 2013). جنبه دیگر کاربرد کشت ریشه‌های موئین آن است که ریشه‌های موئین می‌توانند آلکالوئید بیشتری نسبت به ریشه‌های معمولی تولید کرده و به علاوه برخی از این آلکالوئیدهای تولید شده قادرند به درون محیط کشت انتشار پیدا کنند (لی فلم بنهوم^{۱۲} و همکاران، 2004). بررسی انجام شده حاکی از آن است که القای ریشه موئین سبب افزایش تجمع متابولیت ثانویه سیلی

استفاده از گیاهان دارویی در جهان رو به افزایش است و حدود ۸۰ درصد از مردم جهان به طور مستقیم و یا غیرمستقیم از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشاء گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد موثره گیاهان دارویی شده است (جالسینگ^۱ و همکاران، 2007). شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان کشت شده توسط بشر است. خشخاش از آغاز تمدن بشری به عنوان دارو مورد استفاده قرار گرفته است (برون/استین^۲، 1993). آلکالوئیدهای ایزوکوینولین یک گروه ساختاری متنوع از ترکیبات اختصاصی گیاه شقایق است که سابقه طولانی در تحقیقات دارد. اگرچه نقش اکوفیزیولوژیکی بیشتر بنزیل ایزوکوینولین‌ها ناشناخته است؛ اما خواص دارویی بسیاری از این ترکیبات قرن‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. بنزیل ایزوکوینولین‌های دارویی در گیاه شقایق شامل مسکن کدئین، عوامل ضد میکروبی بربرین و سانگویین‌نارین و داروی ضدسرفه و سرطان، نوسکاپین می‌باشند (هاگل و فاجینی^۳، 2013). دو نوع آلکالوئید نوسکاپین و مورفینان می‌توانند در ریشه این گیاه تجمع یابند و هرچند قسمت اعظم آن‌ها در لاتکس تجمع می‌یابد (کوتچان^۴ و همکاران، 2008).

در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین میزان تولید اقتصادی نبوده و ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است، زیرا پتانسیل این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد (هیو و دیو^۵، 2006). کشت ریشه موئین نشان‌دهنده یک سیستم آزمایشی مناسب برای پژوهش‌های علوم گیاهی و فرآیندهای زیستی امیدوارکننده برای تولید بیشتر گیاهان دارویی و مواد مؤثره آن‌ها (که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه گیاهی‌اند) می‌باشد (جی و ووه^۶، 2005). سرعت بالای تولید و رشد ریشه موئین، آن را قادر ساخته که به عنوان یک سیستم در تنظیم مولکولی مسیر آلکالوئیدی گیاه شقایق استفاده شود (پارک و فاجینی^۷، 2000). از دیگر مزایای

1. Julsing
2. Brownstein
3. Hagel and Facchini
4. Kutchan
5. Hu and Du
6. Ge and Wu
7. Park and Facchini

8. Batra
9. Alpizar
10. Yoshimatsu and Shimomura
11. Sharafi
12. Le Flem. Bonhomme

ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (NIGEB^۴) تهیه شد. از آنجا که سویه‌های باکتری ریزوژن به آنتی‌بیوتیک ریفامسین مقاوم هستند، جهت جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها، به محیط کشت آماده‌سازی باکتری مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از این آنتی‌بیوتیک اضافه شد. به منظور رسوب باکتری محلول باکتری از دستگاه سانتریفوژ با 13000rpm به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید.

تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و اندام هوایی (شامل لپه‌ها و هیپوکوتیل) گیاهچه‌های ۱۰-۸ روزه به‌طور تصادفی توسط تیغ اسکالپل زخم شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون سویه‌های AR15834، A4 و MSU شناور شدند. سپس محلول باکتری توسط سمپلر خارج گشته و نمونه‌ها به روی کاغذ صافی استریل انتقال داده شدند تا خشک شوند. بعد از عمل خشک شدن ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش ۹ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه هم کشتی B5 و ۱/۲B5 انتقال یافتند. به دلیل توانایی بالای سویه‌ها در القاء ریشه موئین از تنظیم‌کننده‌های رشد و استوسیرینگون استفاده نشد. در طول این دوره برحسب نوع تیمارها دو شرایط نوری (یکی تاریکی کامل و دیگری تناوب نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت نور) اعمال شد. دو روز بعد از زمان تلقیح به‌منظور حذف آگروباکتریوم ریزنمونه‌ها را شسته و به محیط‌های B5 و ۱/۲B5 حاوی نمک، ویتامین‌ها، ۱۵ گرم بر لیتر ساکاروز، ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۶ گرم در لیتر آگار انتقال داده شدند. هدف از استفاده آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط گزینش، حذف باکتری‌های سطحی ریزنمونه‌ها پس از تلقیح بود. بعد از آن ریزنمونه‌ها هر ۱۲-۱۰ روز به محیط جدید انتقال داده شدند.

طراحی آزمایش‌ها

در این تحقیق، دو آزمایش جداگانه به‌صورت فاکتوریل روی دو نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و اندام هوایی اجرا شد. آزمایش‌های فاکتوریل مذکور در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و هر پتری‌دیش حاوی هشت ریزنمونه معادل یک تکرار در نظر گرفته شد. فاکتورهای آزمایش شامل تیمار نوری (۴۸ ساعت تاریکی کامل و ۱۶ ساعت تاریکی / ۸ ساعت روشنایی)، سویه‌های باکتری (سویه AR15834، A4 و MSU) و

مارین در گیاه خار مریم شد (رحیمی^۱ و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین اعمال البیسیتور^۲ می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مهم جهت تولید بیشتر متابولیت‌های زیستی در ریشه موئین به‌کار رود (چانگ^۳ و همکاران، ۲۰۰۵).

با آن‌که در پژوهش‌های قبلی پروتکل‌هایی جهت تولید ریشه موئین در گیاه دارویی شقایق گزارش شده است، ولیکن در این پژوهش هدف آن بود که تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، محیط کشت پایه و تیمار نوری بر القاء و تولید ریشه موئین در گیاه دارویی شقایق جهت رسیدن به پروتکلی با راندمان بالاتر مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بذرهای خشخاش از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شد. این بذور ابتدا در زیر هود لامینار به مدت ۶۰-۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰٪ استریل سطحی شد و سپس ۳-۴ بار با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو گردید. در مرحله‌ی بعد مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر هیپوکلرید سدیم (وایتکس) اضافه گردید و به مدت ۱۰-۸ دقیقه روی شیکر گذاشته شد و در نهایت بذور ۱۰-۸ مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شد. سپس به‌طور میانگین ۳۰ بذر ضدعفونی شده در هر شیشه حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط B5 (شامل محیط آماده B5 با غلظت ۳/۱۶ گرم در لیتر، ساکارز با غلظت ۲۰ گرم در لیتر و آگار با غلظت ۸ گرم در لیتر و با $\text{pH}=5/8$) کشت شدند. بعد از آن شیشه‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت به‌منظور تحریک جوانه‌زنی در یخچال 4°C گذاشته شدند و سپس به اتاق کشت بافت با دمای 25°C و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

آماده‌سازی باکتری

برای این منظور ابتدا محیط LB مایع تهیه شد و مقداری باکتری از استوک از قبل آماده شده به محیط کشت مایع اضافه کرده و این کشت به مدت یک شب در دمای 28°C روی شیکر قرار داده شد تا به $\text{OD}_{600}=0.5$ برسد. سپس محیط B5 مایع (همان ترکیبات محیط B5 معمولی، ولی بدون آگار) را آماده کرده و باکتری‌ها را به مدت ۱۰-۸ ساعت در اتاقک رشد در دمای 28°C درجه گذاشته و به $\text{OD}_{600}=1.0$ رسیدند. تمامی سویه‌های آگروباکتریوم ریزوژن از بانک میکروب مرکز

به یک ویال جدید انتقال داده شد و به همان اندازه به آن ایزوپروپانول اضافه گردید. محلول به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۲۰- گذاشته شد و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. قسمت بالایی محلول را خارج کرده تا رسوب خشک شد و دوباره در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. برنامه واکنش PCR برای *rolC* یک چرخه واسرشتگی در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشتگی در دمای 94°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال 53°C به مدت یک دقیقه، دمای بسط 74°C به مدت یک دقیقه) و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72°C بود. محصول PCR توسط ژل آگارز الکتروفورز یک درصد تهیه شده توسط TAE بافر 1x، مارکر 100bp و UV نور مشاهده و بررسی شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که به کارگیری سویه‌های مختلف، محیط‌کشت و هم‌چنین نور در تولید ریشه موئین در سطح یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۲). در خصوص آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل فقط برای صفت درصد القاء ریشه موئین داده‌ای به دست آمد که نتایج تجزیه واریانس برای این آزمایش در جدول ۲ آمده است. نتایج مقایسه میانگین آزمایش ریزنمونه اندام هوایی نشان داد که ترکیب تیماری سویه AR15834، محیط ۱/۲B5 و شرایط نوری ۴۸ ساعت تاریکی مداوم، بیش‌ترین عملکرد را در تولید ریشه موئین داشت. هم‌چنین کم‌ترین درصد القاء ریشه موئین در سویه MSU، محیط‌کشت B5 و شرایط نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی مشاهده شد.

همان‌طور که انتظار می‌رفت نتیجه واکنش PCR تکثیر باندی به طول ۶۲۶ جفت باز بود. در این واکنش از ریشه‌های غیرتراریخت حاصل از رشد طبیعی گیاه به‌عنوان شاهد واکنش PCR (کنترل منفی) استفاده شد و همان‌گونه که انتظار می‌رفت برای محصول واکنش PCR این واکنش روی ژل الکتروفورز باندی مشاهده نشد (شکل ۱).

درصد القاء ریزنمونه اندام هوایی

در بین سویه‌های مختلف، سویه AR15834 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را داشت و بعد از آن به ترتیب دو سویه A4 و MSU قرار داشتند. محیط ۱/۲B5 نسبت به B5 عملکرد بهتری را نشان داد. ریشه موئین‌های محیط ۱/۲B5 با سرعت بیشتری رشد داشتند (شکل ۶). از بین دو تیمار نوری اعمال شده، تیمار ۴۸ ساعت نور کامل در زمان هم‌کشتی بهترین شرایط برای

محیط‌کشت پایه (محیط B5 و ۱/۲B5) بود. قابل ذکر است که در پتری‌دیش‌های شاهد تلقیحی صورت نگرفت. یادداشت‌برداری به‌صورت روزانه تا ۲۴ روز پس از تلقیح برای هر پتری‌دیش صورت گرفت. صفات درصد القاء ریزنمونه، میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریزنمونه، تعداد انشعابات فرعی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین و درصد القاء در طول دوره زمانی موردبررسی قرار گرفت. سه هفته پس از ظهور اولین ریشه‌های موئین از ریزنمونه‌های اندام هوایی و هیپوکوتیل، درصد ریزنمونه‌های که موفق به تولید ریشه موئین شدند نسبت به کل ریزنمونه‌های مورد آزمایش به‌طور جداگانه برای هر ترکیب تیماری محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه صفت سرعت ظهور ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی تلقیح شده با آگروباکتري، یادداشت‌برداری‌ها ۸ روز پس از تلقیح شروع شد و به‌صورت هر ۴ روز یک‌بار در طول یک دوره زمانی ۲۴ روزه ادامه یافت. جهت محاسبه تعداد انشعابات فرعی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین، در پایان دوره رشد یک سانتی‌متر از ریشه موئین به‌دست آمده برش داده و تعداد شاخه‌هایی که از آن خارج شده بود موردشمارش قرار گرفت. جهت تجزیه آماری داده‌ها، از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین (به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن) استفاده شد.

آنالیز PCR

ظهور ریشه‌های موئین ناشی از انتقال ژن‌های T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتري راپوزنز به سلول‌های گیاهی می‌باشد. بنابراین بررسی تراریخته بودن ریشه‌های موئین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر روی T-DNA این باکتري (که عمدتاً ژن‌های *rol* هستند) انجام داد (کرولیکا^۱ و همکاران، 2001). از این‌رو به‌منظور تأیید تراریختی ریشه‌های موئین، آزمایش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* و توسط دستگاه *eppendorf termocycler gradient* انجام شد. توالی نوکلوتیدی آغازگرها براساس منابع معتبر (دونگ هوی لیو^۲ و همکاران، 2011) طراحی شد و از شرکت فزایپژوه سفارش ساخت داده شد. جهت استخراج DNA ژنومی ۵۰ میلی‌گرم ریشه موئین استفاده گردید و در ۲۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (۲۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۱۰۰ میلی‌مولار TRIS-HCL، ۰/۵٪ SDS^۳، ۲۵ میلی‌مولار EDTA^۴ و با pH=۸) همگن شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰ دور سانتریفیوژ شده و محلول بالایی

1. Króllicka
2. Dong.Hui Liu
3. Sodium dodesyl sulfat
4. Ethylenediaminetetraacetic acid

تعداد شاخه‌های جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین ریزنمونه اندام هوایی

فرم رویشی ریشه‌های موئین دو سویه AR15834 و MSU به گونه‌ای بود که در یک سانتی‌متر از طول ریشه موئین، تعداد شاخه بیشتری را نشان داد و سویه A4 در سطح پایین‌تری قرار داشت. محیط کشت پایه تأثیر زیادی در افزایش یا کاهش تعداد شاخه جانبی سویه A4 نداشت. تیمار ۴۸ ساعت تاریکی نسبت به فتوپریود ۱۶/۸ در همه سویه‌ها بیش‌ترین شاخه جانبی را نشان داد (شکل ۴).

القاء بود. ترکیب تیماری سویه AR15834، محیط ۱/۲B5 و تاریکی ۴۸ ساعته بیش‌ترین درصد القاء را نشان داد (شکل ۲).

میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریزنمونه اندام هوایی

تعداد ریشه موئین‌هایی که از هر ریزنمونه در محیط B5 خارج شد بیشتر از محیط ۱/۲B5 بود. در بین تیمارهای نوری ریز نمونه اندام هوایی بیش‌ترین تعداد ریشه موئین را در تیمار تاریکی کامل (۴۸ ساعته) داشت. سویه AR15834 بیش‌ترین مقدار میانگین ریشه موئین در یک ریزنمونه اندام هوایی را داشت (شکل ۳).

جدول ۱: توالی آغازگرها برای واکنش PCR

Table 1: Primers sequences for PCR

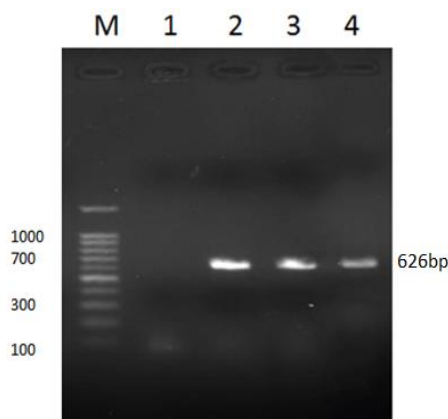
آغازگر برگشتی Reverse primer	آغازگر رفتی Forward primer	ژن Gene
5'TGCTTCGAGTTATGGGTACA3'	5'CTCCTGACATCAAACCTCGTCTC3	<i>RoIC</i>

درصد القاء در طول دوره زمانی

ریزنمونه‌های اندام هوایی تلقیح شده با آگروباکتریوم در طول یک دوره زمانی به‌منظور سرعت ظهور ریشه موئین و تولید آن مورد مطالعه قرار گرفتند. مشاهده شد که ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه AR15834 و کشت شده در محیط ۱/۲B5 هم سریع‌تر به تلقیح پاسخ دادند و هم ریشه موئین بیشتری در هر تکرار تولید کردند. در مقایسه بین دو شرایط نوری در زمان هم کشتی (۴۸ ساعته تاریکی و تناوب نوری ۱۶/۸) مشاهده شد که در ۴۸ ساعت تاریکی، ریشه‌های موئین ظهور سریع‌تر داشته و هم‌چنین مقدار بیشتری در هر تکرار تولید شد (شکل ۷ و ۸).

درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل

در این آزمایش بهترین محیط کشت پایه برای القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل محیط B5 بود. سویه AR15834 نسبت به دو سویه A4 و MSU درصد بالاتری ریشه موئین تولید نمود. هرچند در ریزنمونه هیپوکوتیل مقدار کلی ریشه موئین پایین بود ولی با این حال نیز در تیمار تاریکی کامل (۴۸ ساعته تاریکی) بهتر جواب داده‌اند (شکل ۵).



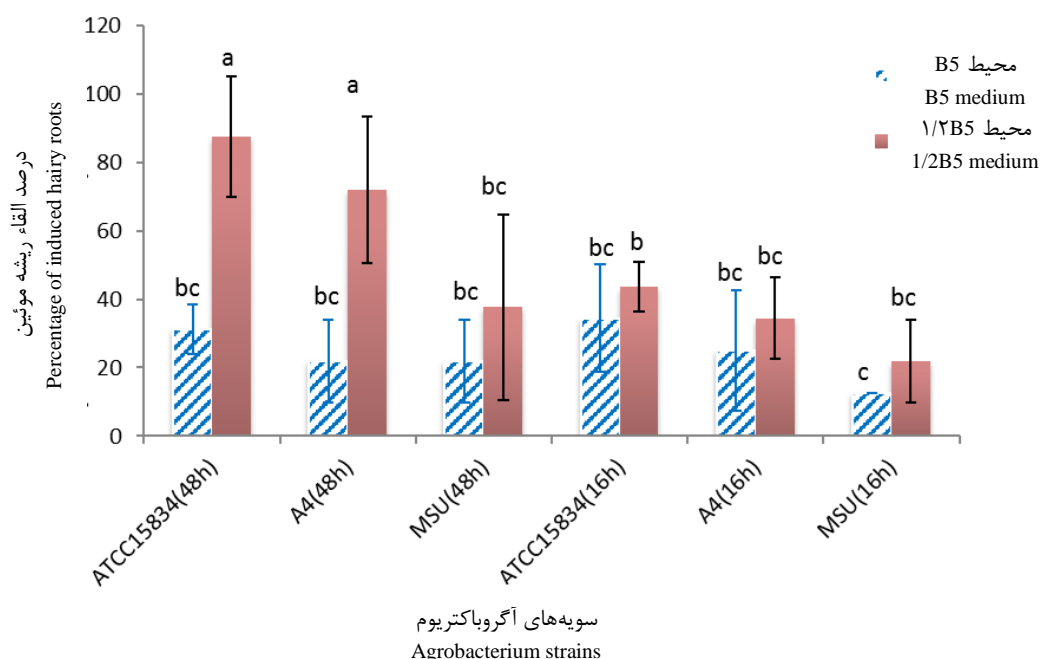
شکل ۱: الکتروفورز ژل آگاروز، M مارکر، ۱: گیاه شاهد (ترازیخت نشده)، ۲ و ۳: گیاهان ترازیخت شده با آگروباکتری ریزوژنسیس ۴: پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)

Fig. 1: Electrophoresis agarose gel, M: marker, 1: non transformed control plant, 2-3: the plants transformed whit A. rhizogenesis, 4: bacterial plasmid

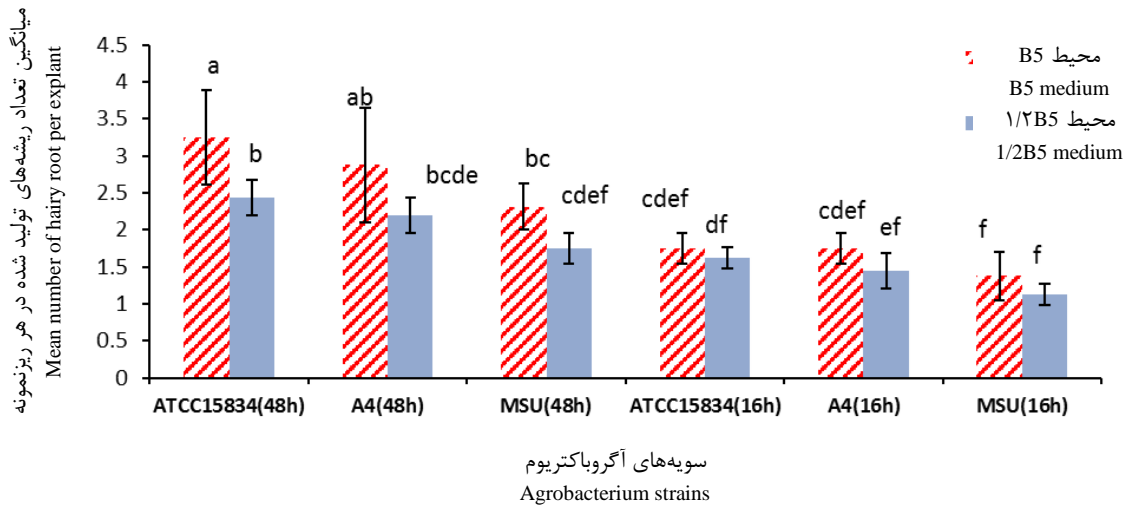
جدول ۲: تجزیه واریانس در ریزنمونه اندام هوایی و هیپوکوتیل
Table 2: Analysis of variance in excised shoot and hypocotyl explant

میانگین مربعات Mean squares				درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of Variations
درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل Hairy root Induction percent in hypocotyl	تعداد شاخه در یک سانتی متر طول ریشه موئین ریزنمونه اندام هوایی Number of branch in 1 cm of hairy root length	تعداد ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی Number of hairy root per excised shoot	درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی Hairy root induction percent in excised shoot		
52.083**	7.28**	11.02**	3350.02**	1	نور Light
325.521**	11.40**	2.52**	7525.02**	1	محیط کشت Medium
13.021*	0.02 ^{ns}	0.63*	2945.33**	1	نور × محیط کشت Light × Medium
126.953**	8.70**	1.62**	2672.922**	2	سوش Strain
3.255 ^{ns}	0.74 ^{ns}	0.14 ^{ns}	60.94 ^{ns}	2	نور × سوش Strain × Light
3.255 ^{ns}	2.50*	0.009 ^{ns}	476.56 ^{ns}	2	سوش × محیط کشت Medium × Strain
22.786 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.04 ^{ns}	476.56 ^{ns}	2	سوش × نور × محیط کشت Medium × Light × Strain
41.233	0.693	0.130	229.003	36	خطا Error
20.22	17.40	18.14	21.72		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪ می باشد
ns, * and **: Non- Significant, Significant at P < 0.05 and P < 0.01, respectively

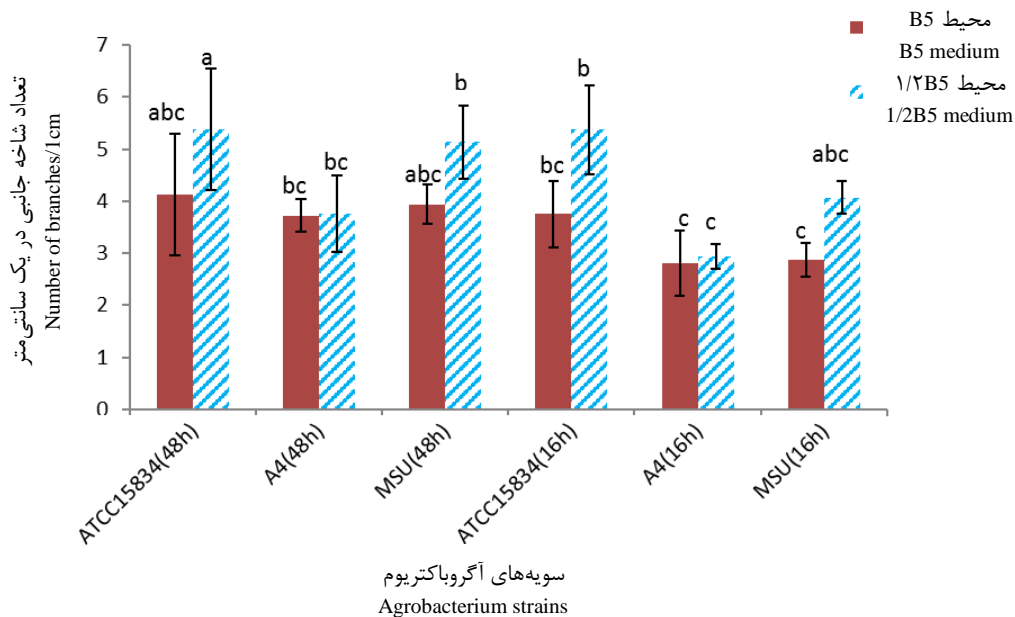


شکل ۲: درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه اندام هوایی توسط سه سویه AR15834، A4 و MSU در دو محیط B5 و 1/2B5 و شرایط نوری متفاوت. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است
Fig. 2: Induction frequency in excised shoot explant by three strain AR15834, A4, MSU in B5 and 1/2B5 medium and different light conditions. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



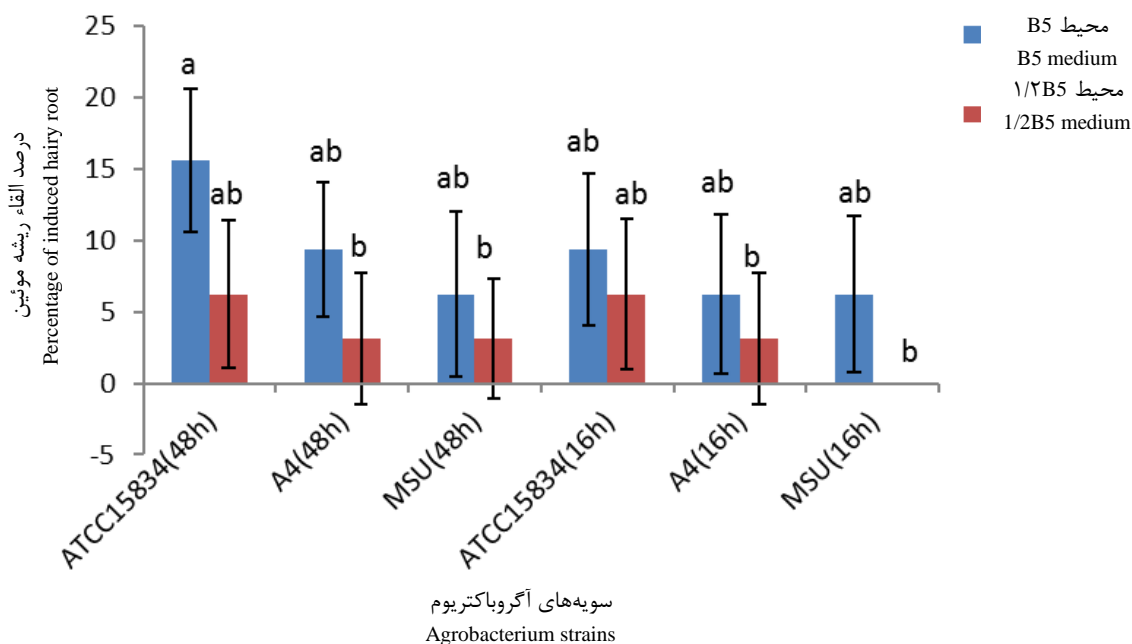
شکل ۳: میانگین تعداد ریشه‌های موئین در یک ریز نمونه برای ریز نمونه اندام هوایی. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 3: Mean of Hairy root in on excised shoot explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



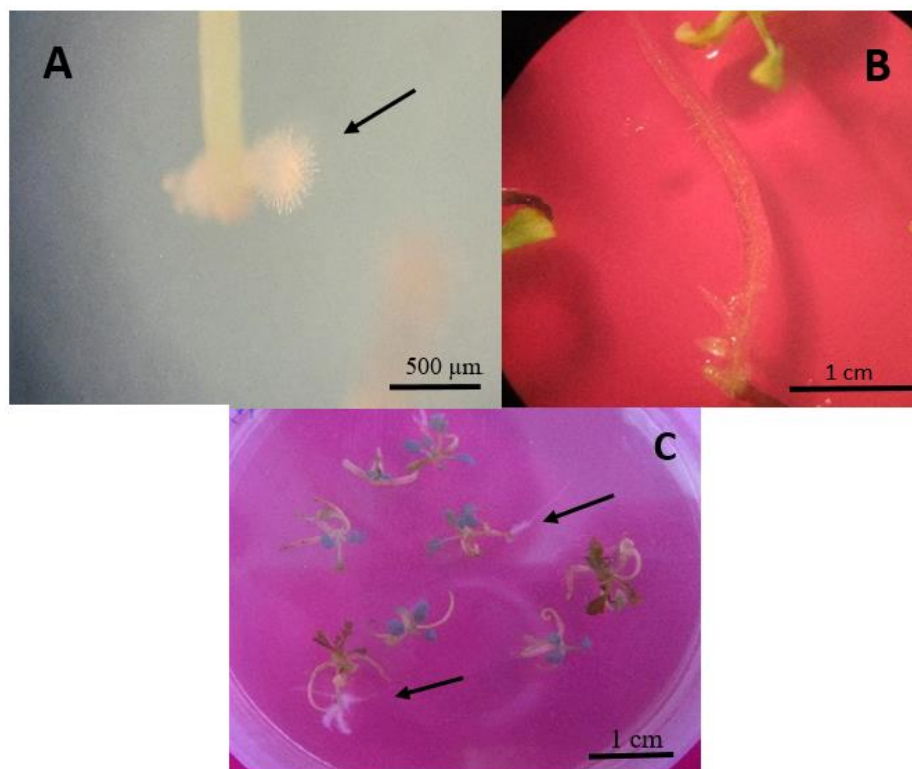
شکل ۴: تعداد شاخه‌های جانبی در یک سانتی‌متر طول ریشه موئین برای ریز نمونه اندام هوایی. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 4: The number of lateral branches per 1 centimeter length of hairy roots in excised shoot explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



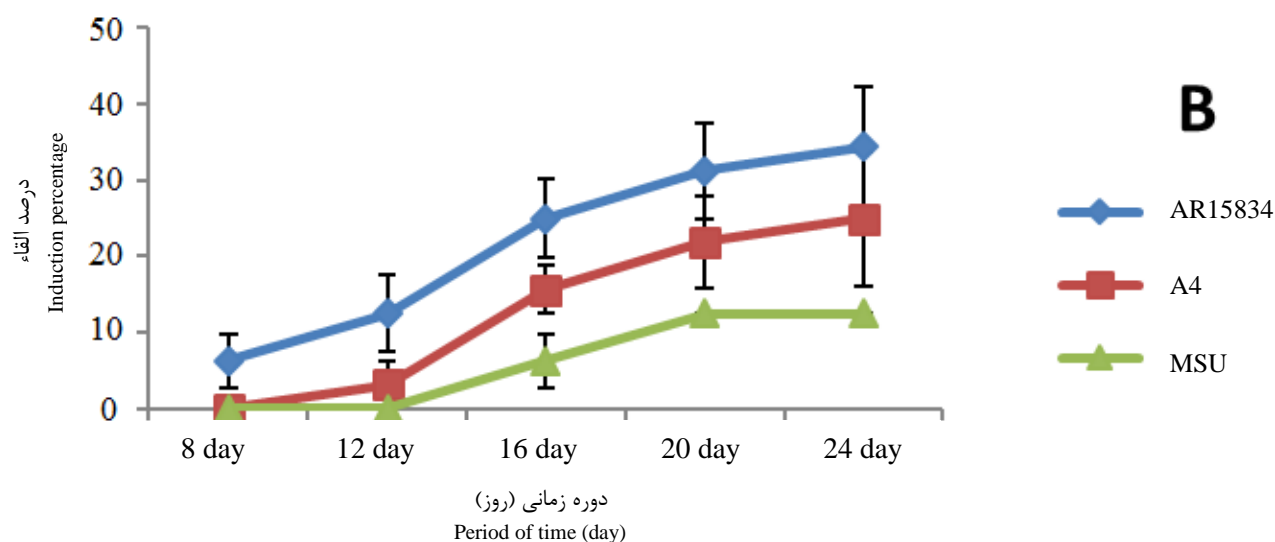
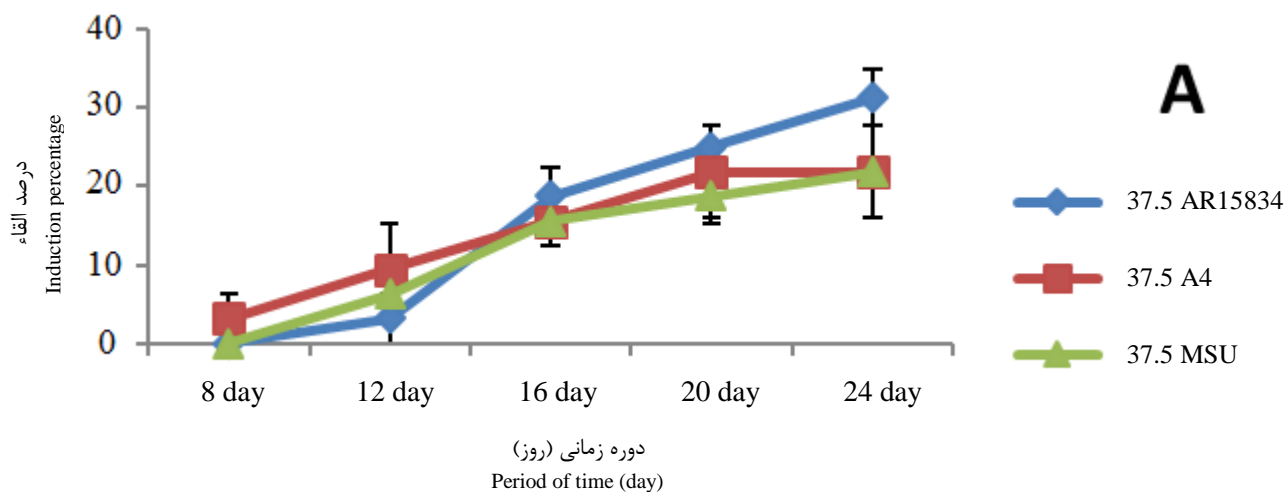
شکل ۵: درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل. خطوط روی ستون‌ها مبین خطای استاندارد است و حروف روی ستون‌ها مبین مقایسه میانگین به روش دانکن است

Fig. 5: Induction percent of hairy root in hypocotyl explant. Bars on each column indicate standard error of means and letters indicating mean comparison of Duncan Multiple Range Test



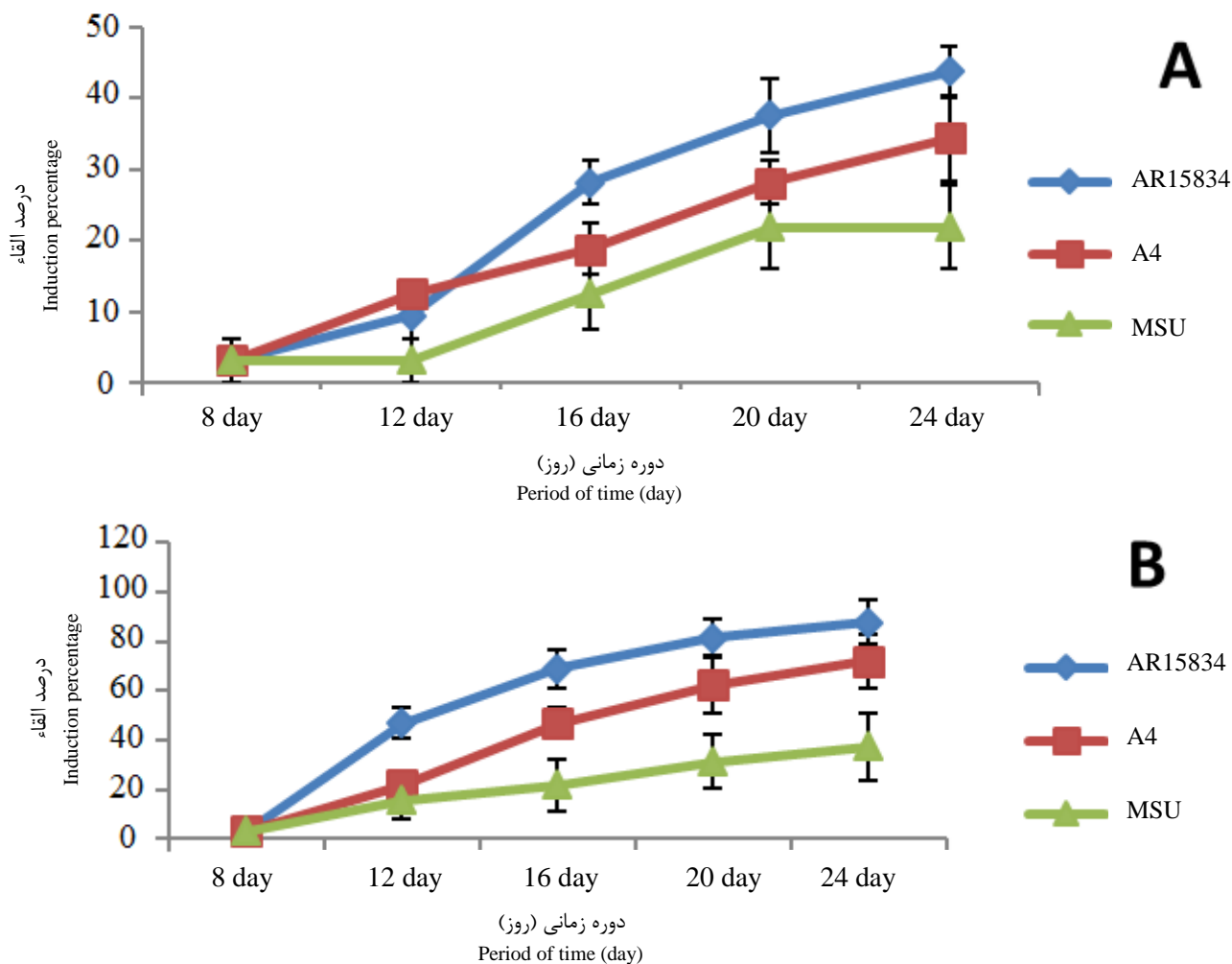
شکل ۶: ریشه موئین در گیاه شقایق: (A) ریزنمونه هیپوکوتیل، (B,C) ریزنمونه اندام هوایی به ترتیب در محیط 1/2B5 و B5، جهت فلش نشان‌دهنده ریشه موئین می‌باشد

Fig. 6: Hairy root in *Papaver somniferum* (A) Hypocotyl explant, (B, C) excised shoot explant Respectively in 1/2B5 and B5 medium, the arrows represent the hairy roots



شکل ۷: روند درصد القاء در طول دوره زمانی، (A و B)، به ترتیب محیط B5 و 1/2B5 در تناوب نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی. میل‌بار روی نقاط روند مبین خطای استاندارد می‌باشد

Fig. 7: Trend of Hairy root induction frequency in Period of time, (A, B) B5 and 1/2B5 medium and photoperiod of 16h dark/8h light respectively. Bars on points of trends indicate standard error



شکل ۸: روند درصد القاء در طول دوره زمانی، (A و B)، به ترتیب محیط B5 و 1/2B5 در ۴۸ ساعت تاریکی مداوم. میل‌بار روی نقاط روند مبین خطای استاندارد می‌باشد

Fig. 8: Trend of hairy root induction frequency in Period of time, (A, B) respectively B5 and 1/2B5 medium under 48h Continuous darkness. Bars on points of trends indicate standard error

هوایی ۸ روز بعد از تلقیح شروع به تولید ریشه موئین نمود. در تیمار شاهد ریشه موئین مشاهده نشد. در گیاهان شقایق ایرانی نیز نتایج مشابه به دست آمد (شرفی و همکاران، ۲۰۱۳). هر دو ریزنمونه استفاده شده به تولید ریشه موئین پاسخ مثبت دادند با این حال ریزنمونه اندام هوایی سرعت و توانایی بیشتری در تولید ریشه موئین داشت. نتایج مشابه در سایر مطالعات روی گیاه خشخاش مشاهده شده است (پارک و فاجینی، ۲۰۰۰؛ شرفی و همکاران، ۲۰۱۳). چندین فاکتور از جمله توانایی آلوده کردن در نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، برهم‌کنش بافت گیاهی و سویه و شدت نور می‌تواند بر مقدار تولید ریشه موئین تأثیر بگذارد، نتایج مشابه در سایر گیاهان مشاهده شده است (موهیودین^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). در پژوهشی

بحث

ریشه موئین به دست آمده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز ایزاری با ارزش برای مطالعه متابولیت‌های ثانویه و استفاده در مهندسی ژنتیک می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط آزمایشگاهی، از طریق کشت سلولی گیاه تحت شرایط کنترل شده امکان‌پذیر می‌باشد. با این حال، محدودیت‌های عمده آن شامل کشت سلولی، بی‌ثباتی آن در کشت بافت و عملکرد کم در طولانی‌مدت می‌باشد. در این پژوهش توانایی سویه‌های مختلف در دو محیط B5 و 1/2B5 و دو شرایط نوری متفاوت (یکی تاریکی کامل ۴۸ ساعته و دیگری تناوب نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی) جهت تولید ریشه موئین مورد آزمایش قرار گرفت. هر کدام از سویه‌های درصد خاصی از القاء ریشه موئین را نشان دادند. در بیشتر موارد ریزنمونه‌های اندام

شد. در پژوهش دیگری ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم در دو شرایط نور و تاریکی قرار گرفتند و نشان داده شد میانگین تولید ریشه موئین در تیمار تاریکی ۳-۱ ریشه موئین در هر ریزنمونه بود (خوار و زکان، ۲۰۰۴). تاریکی به همراه رطوبت یکی از شرایط مناسب جهت رشد باکتری می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود در تاریکی ۴۸ ساعته نسبت به حالت فتوپریود شرایط برای رشد و انتقال آگروباکتریوم به ریزنمونه مناسب‌تر باشد که نتایج این تحقیق نیز همین را نشان داد. در مطالعات مشابه نیز مشخص شد که شدت نور می‌تواند نقش مهمی در فعال‌سازی ژن‌های vir آگروباکتریوم داشته باشد (مهیودین و همکاران، ۲۰۱۱). مشاهده شده است که در گیاه *Corylus avellana* L. تیمار فتوپریود ۱۶/۸ (روشنایی/ تاریکی) نسبت به روشنایی کامل ریشه موئین بیشتری تولید کرد (سانچز اولات^۶ و همکاران، ۲۰۰۴). تیمار تناوب نور ۱۶ ساعته نسبت به شرایط کاملاً تاریکی سبب تأخیر در تولید ریشه موئین شد (نان داگوپال و رانجیتا^۷، ۲۰۰۷).

نتایج این تحقیق نشان داد ریزنمونه اندام هوایی شرایط بهتری برای تولید ریشه موئین دارد و سریع‌تر به آگروباکتریوم پاسخ می‌دهد. همچنین دیده شد که سویه AR15834، محیط B5 و ۱/۲B5 و تیمار ۴۸ ساعت تاریکی بهترین شرایط را جهت القاء و افزایش تعداد ریشه موئین در گیاه شقایق فراهم نمود.

دیگر ریزنمونه هیپوکوتیل درصد بسیار کمی (تقریباً ۲۰ درصد) تراریختی را در تلقیح با آگروباکتریوم سویه MAFF 03-01724 نشان داد (یوشیماتسو و شیمورا، ۱۹۹۲). در پژوهشی مشابه که روی ریشه موئین گیاه خشخاش صورت گرفت مشاهده شد که در ریزنمونه هیپوکوتیل بعد از پنج هفته ریشه موئین ظاهر شد (سی فلم بنهوم و همکاران، ۲۰۰۴)، که در مقایسه با ظهور ریشه موئین در اندام هوایی در آزمایش حاضر زمان طولانی‌تری است. در مطالعه دیگری به منظور القاء ریشه موئین گیاه خشخاش از محیط B5 و سویه ATCC15834 استفاده شد و ۸۵ درصد القاء ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی مشاهده گردید (فاجینی و همکاران، ۲۰۰۰).

در پژوهش حاضر سویه ATCC15834 بیش‌ترین درصد القاء را در بین سایر سویه‌ها نشان داد. برخی از سویه‌ها قدرت آلوده‌سازی بالاتر دارند و در زمان کوتاهی می‌توانند ژن ریشه‌زایی خود را به بافت زخم شده انتقال دهند. از طرفی چون زمان تلقیح یکسانی برای همه سویه‌ها در نظر گرفته شده است طبیعی است که برخی سویه‌ها درصد بالاتری القاء را در یک زمان برابر تلقیح نشان دهند (ژیبری^۱ و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعات مشابه روی ۵ گیاه مختلف و ۴ نوع سویه آگروباکتریوم نیز نتایج مشابهی به دست آمد و واکنش سویه‌های آگروباکتریوم متفاوت بود (چندران و پوتی^۲، ۲۰۰۸). در پژوهشی بر روی گیاه شقایق ایرانی نشان داده شد که سویه ATCC15834 بیش‌ترین درصد القاء را بعد از سویه LBA9402 داشت (شرفی و همکاران، ۲۰۱۳).

در القاء ریشه موئین گیاه شقایق ایرانی، باکتری ATCC15834 و محیط B5 با وجود ۴۸ ساعت تاریکی در زمان هم‌کشتی، منجر به القاء ۴۵-۵۰ درصدی ریشه موئین شد (رستم پور^۳ و همکاران، ۲۰۰۹). در پژوهشی جهت بهینه‌سازی فوق بیان ژن در ریشه‌های موئین گیاه شقایق ایرانی، از محیط MS استفاده شد و پس از سه تا چهار هفته ریشه موئین در ریزنمونه‌های اندام هوایی تولید شد (شرفی و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیقی با بررسی تأثیر ۴ محیط (MS، 1/2MS، 1/4MS، و B5) در زمان هم‌کشتی، مشاهده شد که محیط B5 بیش‌ترین درصد القاء ریشه موئین را نشان داد (بی وادی^۴ و همکاران، ۲۰۱۴).

در این تحقیق مشاهدات نشان داد که ریشه موئین بیشتری از ناحیه زخم شده ریزنمونه در تیمار تاریکی ۴۸ ساعته خارج

5. Khawar and Ozcan
6. Sánchez-Olate
7. Nandagopal and Ranjitha

1. Giri
2. Chandran and Potty
3. Rostampour
4. Bivadi

- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P. and Etienne, H. 2008. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annals of Botany*, 101: 929-940.
- Batra, J., Dutta, A., Singh, D., Kumar, S. and Sen, J. 2004. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left-and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. *Plant Cell Reports*, 23: 148-154.
- Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N. and Yazdani, B. 2014. Effects of different tissue culture conditions in Hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L., *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 8: 597-604.
- Brownstein, M. J. 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 5391.
- Chandran, R. P. and Potty, V. 2008. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 7: 122-128.
- Chong, T. M., Abdullah, M. A., Lai, O. M., Nor'Aini, F. M. and Lajis, N. H. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*, 40: 3397-3405.
- Ge, X. and Wu, J. 2005. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and elicitor. *Plant Science*, 168: 487-491.
- Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V. and Narasu, M. L. 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science*, 81: 378-382.
- Hagel, J. M. and Facchini, P. J. 2013. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54 (5): 647-72.
- Hu, Z. B. and Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48: 121-127.
- Julsing, M. K., Quax, W. J. and Kayser, O. 2007. The Engineering of Medicinal Plants: Prospects and Limitations of Medicinal Plant Biotechnology. In: *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications* (Editors: Kayser, O. and Quax, W.), John Wiley and Sons, Inc., 571 pp.
- Khawar, K. and Ozcan, S. 2004. Hairy root transformation in Turkish chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivars. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 18: 51-54.
- Królicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J. and Łojkowska, E. 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science*, 160: 259-264.
- Kutchan, T. M., Frick, S. and Weid, M. 2008. Engineering plant alkaloid biosynthetic pathways: progress and prospects. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 1: 283-310.
- Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. and Fliniaux, M. 2004. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta*, 218: 890-893.
- Liu, D. H., Ren, W. W., Cui, L. J., Zhang, L. D., Sun, X. F. and Tang, K. X. 2011. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. *African Journal of Biotechnology*, 10: 3260-3268.
- Mohiuddin, A. K., Abdullah, Z. C., Chowdhury, K., Harikrishna, K. and Napis, S. 2011. Enhanced Virulence Gene Activity of *Agrobacterium* in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) cv. 'Birdie'. *Notulae Scientia Biologicae*, 3: 71-79.
- Nandagopal, S. and Ranjitha Kumari, B. 2007. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*, 8: 73-80.
- Park, S. U. and Facchini, P. J. 2000. *Agrobacterium rhizogenes*- mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1005-1016.
- Rahimi, S., Hasanloo, T., Najafi, F. and Khavari-Nejad, R. A. 2011. Enhancement of Silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. *Plant Omics Journal*, 4 (1): 34-39.
- Rostampour, S., Sohi, H. H., Jourabchi, E. and Ansari, E. 2009. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzylisoquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lind L.): preliminary report. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1807-1814.
- Sánchez-Olate, M., Ríos, D., Rodríguez, R., Materán, M. E. and Pereira, G. 2004. Duracion del efecto revigorizante de podas severas de plantas adultas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta sobre el cultivo *in vitro*. *Agricultura Técnica*, 64: 338-346.
- Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Dehsara, B. and Khalifani, B. H. 2013. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 2125-2131.
- Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. 1992. Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. *Plant Cell Reports*, 11: 132-136.

Effect of Medium Culture, *Agrobacterium* Strain and Light Condition on Hairy Roots Induction in Opium Poppy

Ghorbani¹, A., Ismaili^{2*}, A., Nazarian Firouzabadi³, F. and Hosseini⁴, S. Z.

Abstract

One of the most important medicinal plants to produce alkaloid is the dicot Poppies plant. This plant is the only commercial source of some important drugs such as Morphinan, antitussive codeine, antimicrobial Noscapine and Thebaine until now. The *Agrobacterium rhizogenesis* causes hairy root disease in plant wounds and optimization of hairy root cultures can increase the amount of alkaloids which are produced naturally in plants roots. In this study, in order to optimization of hairy roots induction with higher efficiency, two distinct factorial experiment for excised shoot and hypocotyl explants was conducted based on completely randomized design with 4 replications. In both of these factorial experiments, 3 factors was studied included *Agrobacterium rhizogenesis* (3 strain types), basal medium (B5 and 1/2B5) and light condition (48h dark and 16h dark/8h light). Results of excised shoot explant experiment showed that AR15834 strain induced highest percentage of hairy roots and about lateral branches in 1 cm length of hairy roots, the most lateral branches were observed by AR15834 strain in 1/2B5 medium. Results of hypocotyl explant experiment showed that amount of hairy root induction by this explant very lower than excised shoot explant experiment and AR15834 strain with 48h darkness was the best treatment. Totally, results of these two experiments showed that excised shoot explants had better response than hypocotyl explant and for excised shoot explant, 1/2B5 medium and AR15834 strain had the highest induced hairy roots.

Keywords: B5 medium, Alkaloid, Morphinan, Noscapine, Thebaine

1, 2 and 3. Former MSc Student, Associate Professor and Professor, Respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran

4. Instructor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

※: Corresponding author Email: ismaili.a@lu.ac.ir