تولید گیاهان کامپوزیت در گیاه شیرین بیان(*Glycyrhiza glabra* L.) با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز*

Generation of Composite Plants in Licorice (*Glycyrhiza glabra* L.) Using *Agrobacterium rhizogenes*

خدیجه سپه‌وند[۱]، خسرو پیری[۲*] و اصغر میرزایی‌اصل[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۳۱

چکیده

شیرین بیان یکی از گیاهان دارویی مهم در جهان است که ریشه‌های آن حاوی متابولیت ثانویه با ارزش گلیسیریزین می‌باشد که محصولات هیدرولیز آن اهمیت زیادی در صنعت دارویی و محصولات غذایی دارند. بسیاری از گونه‌های گیاهی به *آگروباکتریوم ریزوژنز* حساس می‌باشند و تلقیح آنها با این باکتری منجر به القای ریشه‌های مویین می‌گردد که در این ریشه‌ها ممکن است میزان متابولیت-های ثانویه افزایش یابد. گیاهان کامپوزیت یک جایگزین مناسب برای کشت ریشه‌های مویین مشتق شده از کشت‌بافت برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند. در این مطالعه گیاهان کامپوزیت شیرین بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه AR15834 حامل پلاسمید PBI121 دارای ژن گزارشگر GUS به‌دست آمدند. گیاهچه‌های ۱۴ روزه کشت شده در گلدان و گیاهچه‌های ۵-۳ روزه استریل از محل میان‌گره قطع شده و با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. ۶۰-۵۰ درصد گیاهچه‌های گلدانی ۱۴روزه و۹۰-۸۰ درصد گیاهچه‌های ۵-۳ روزه تولید ریشه‌های مویین کردند. ریشه‌های مویین ۴-۳ هفته پس از تلقیح از داخل قطعات پشم سنگ ظاهر شدند. ریشه‌های مویین مورد سنجش هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند. در برخی از ریشه‌های مویین مورد سنجش، بیان ژن GUS مشاهده شد ولی در ریشه‌های مویین غیرتراریخت (ریشه‌های فاقد وکتور دوگانه) ژن GUS بیان نشد.

واژه‌های کلیدی: شیرین بیان، گیاه کامپوزیت، *آگروباکتریوم ریزوژنز*، پشم سنگ، ریشه‌های مویین تراریخت

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: khpiri@gmail.com

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع دارویی می‌باشند که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به‌صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. به‌علاوه برخی از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند *تریپاتی و تریپاتی* (Tripathi and Tripathi, 2003).

شیرین‌بیان یکی از گیاهان دارویی مهم در جهان است. ریشه شیرین‌بیان از مهمترین گیاهان دارویی حاوی ساپونین‌های تری‌ترپن فعال می‌باشد. گلیسیریزین و محصولات هیدرولیز آن دارای اهمیت زیادی در اثرات دارویی نظیر ضدآماس، ضدسرطان، آنتی‌باکتریال و ضدحساسیت است. مشتقات گلیسیریزین می‌توانند در درمان هپاتیت C استفاده شوند *هانگ‌یولو* (Hung-yu- lu *et al.*, 2008). گلیسیریزین در بیماری‌های کبدی و بیماری‌های آلرژیک به‌عنوان یک دارو تهیه شده و قابل تزریق است، این ماده در قسمت‌های چوبی ریشه‌های ضخیم قرار گرفته است *هیاشی* و همکاران (Hayashi *et al.*, 2009). ریشه شیرین‌بیان به‌عنوان یک شیرین‌کننده استفاده می‌شود که در موارد بسیاری به‌عنوان افزاینده استفاده می‌شود *کیتاگاوا* و همکاران (Kitagawa *et al.*, 2002). *آگروباکتریوم ریزوژنز* یک باکتری گرم منفی و خاک‌زی است که یک سیستم امیدوارکننده برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهد *هامیل* و همکاران (Hamill *et al.*, 1987). *آگروباکتریوم ریزوژنز* باعث ایجاد بیماری ریشه مویین در گیاهان می‌شود *گیری* و همکاران (Giri *et al.*, 2000). توانایی این باکتری به تحریک ریشه مویین توسط یک پلاسمید بیماری‌زا تعیین می‌شود *وایت و نستر* (White and Nester, 1980). وقتی باکتری گیاه را آلوده می‌کند، ناحیه T-DNA باکتری که بین ناحیه‌های TR و TL در پلاسمید Ri باکتری است، منتقل شده و در داخل ژنوم گیاه میزبان قرار می‌گیرد. فرآیند تراریختی محصول باارزشی به نام ریشه مویین تولید می‌کند که در نزدیکی محل زخم تشکیل می‌شود. علاوه‌بر این اوپین تولید می‌شود که به‌عنوان ماده غذایی مخصوص برای این باکتری است *چیلتون* و همکاران (Chilton *et al.*, 1982). توانایی باکتری *آگروباکتریوم ریزوژنز* در القای ریشه‌های مویین در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های مویین به‌عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی شده است؛ *کی* (Cai *et al.*, 1995). تراریختی مواد گیاهی با سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم ریزوژنز* در شرایط درون شیشه موجب غلبه بر برخی از دشواری‌های کشت اندام‌های گیاهی شده و منجر به دستیابی به رشد سریع اندام‌ها، شاخه‌زایی زیاد و قابلیت تولید متابولیت‌های اصلی از گیاه مادری یا حتی متابولیت‌های جدید غیرقابل تشخیص در گیاه مادری شده است. بنابراین ریشه مویین یک تکنولوژی امیدبخش برای تولید متابولیت‌های ثانویه ازجمله تروپان آلکالوئیدها و بسیاری از متابولیت‌های دیگر فراهم آورده است *نادر* و همکاران (Nader *et al.*, 2006). بسیاری از گیاهان دارویی با موفقیت توسط *آگروباکتریوم ریزوژنز* تراریخت شده‌اند و ریشه‌های مویین تولید شده، بهره‌وری نسبتاً بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهند که به‌طور بالقوه، محصولات دارویی مهم هستند. *سوون* و همکاران (Sevon *et al.*, 2002). به‌عنوان مثال در گزارش *شیرازی* و همکاران (Shirazi *et al.*, 2012) با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* میزان تولید گلیسیریزین در ریشه‌های مویین شیرین بیان افزایش یافت همچنین تولید ریشه‌های مویین در گیاه دارویی باباآدم (*Arctium lappa* L.) با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* توسط سلیمانی و همکاران (۱۳۹۱) انجام شد.

آگروباکتریوم ریزوژنز قادر به تولید ریشه‌های مویین در بافت‌های گیاهی و تولید گیاهان کامپوزیت (Composite) بعد از تراریختی می‌باشد دنگ و همکاران (Deng *et al.*, 2011). گیاهان کامپوزیت یک جایگزین مناسب برای کشت ریشه‌های مویین مشتق شده از کشت بافت برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند. گیاهان کامپوزیت، برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در گیاه یونجه زرد توسط *هانسن* و همکاران (Hansen *et al.*, 1989) شرح داده شدند. این گیاهان با استفاده از پروتوکلی مشابه برای تولید ریشه‌های مویین، تولید می‌شوند. با این تفاوت که ریشه‌های تراریخت به‌جای اینکه جداگانه کشت شوند به شاخه‌های گیاه تلقیح شده متصل هستند *کریستوفر* و همکاران (Christopher *et al.*, 2006). در این گیاهان برخی از ریشه‌های تولید شده تراریخت می‌باشند، درحالی‌که شاخه‌ها هنوز غیرتراریخت می‌باشند و در خدمت فراهم آوردن انرژی و حمایت از رشد می‌باشند. این گیاهان کامپوزیت دارای ریشه مویین نمی‌توانند تولید بذرهای تراریخت کنند. اما دارای ویژگی‌های مهمی هستند که این گیاهان کامپوزیت را برای تحقیقات گیاهی، بسیار مفید می‌سازد (*دنگ* و همکاران، 2011). این گیاهان را می‌توان در محیط‌های مختلفی مثل ماسه، شن و پرلایت کشت کرد و همانند گیاهان دیگر می‌توانند در گلخانه و یا در شرایط اتاق رشد، رشد کنند. تاکنون گیاهان کامپوزیت در گیاهانی مانند *Lotus corniculatus*، *Trifolium repens*، *Vicia hirsute* و *Arachis*

hypogaes برای مطالعه بیان ژن در طول آلودگی ریزوبیا (Rhizobia) و تثبیت نیتروژن بعدی استفاده شده است *کریستوفر* و همکاران (Christopher *et al.*, 2006). تولید ریشه‌های مویین گیاه کامپوزیت روشی سریع و آسان برای به‌دست آوردن مواد تراریخت برای بسیاری از گونه‌های دولپه‌ای می‌باشد (*دنگ* و همکاران، 2011). در این مطالعه گیاهان کامپوزیت شیرین بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه AR15834 حامل پلاسمید PBI121 دارای ژن گزارشگر *GUS* به‌دست آمدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور شیرین‌بیان (*G. glabra* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. بذور شیرین‌بیان ابتدا به مدت ۴۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ درصد) قرار گرفتند سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شده و بعد از جذب آب اضافی اطراف بذور توسط کاغذ صافی، برروی محیط‌کشت MS *موراشیگ و اسکوک* (Murashige and Skoog, 1962) و در گلدان حاوی (خاک، ماسه و کود به نسبت ۱:۱:۱)کشت شدند. در این تحقیق برای تولید گیاهان کامپوزیت، نمونه‌ها از گیاهان دو هفته‌ای (مرحله ۲-۴ برگی) کشت شده در گلدان و گیاهان دو هفته‌ای حاصل از کشت درون شیشه‌ای در محیط MS تهیه شدند. لازم به ذکر است این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا انجام شد.

مواد باکتری

برای تهیه سوسپانسیون باکتری، کشت شبانه از باکتری *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه AR15834 حامل ژن *GUS* (تهیه شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB (Luria-Bertani) مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین و ۵۰-۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در شرایط استریل انجام شد و در اتاق رشد با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۶ ساعت در تاریکی نگهداری شد و زمانی‌که غلظت باکتری به ۰/۷-۰/۵ رسید از آن برای انجام عمل تلقیح استفاده شد.

تهیه گیاهان کامپوزیت به روش کریستوفر و همکاران انجام شد. مراحل انجام کار به‌صورت زیر می‌باشد:

- گیاهچه‌های دو هفته‌ای کشت شده در گلدان از قسمت وسط میان‌گره قطع شده و با آب مقطر کاملاً شسته شدند.
- بستر کشت پشم سنگ (Rock Wool or Fibergro) به قطعات ۲-۱ سانتی‌متری تقسیم شده و اتوکلاو شدند.
- سپس با نوک پنس استریل در هر قطعه یک حفره ایجاد شد.
- در هر پلیت یا شیشه مربا ۳-۲ قطعه پشم سنگ قرار گرفت.
- مقدار ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری داخل هر حفره پشم سنگ ریخته و سپس گیاهچه در داخل حفره قرار گرفت یا ساقه‌ی بریده شده گیاهچه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفت و در هر پلیت ۲ میلی‌لیتر محیط MS ¼ مایع ریخته شد و در شرایط تاریکی قرار گرفت. برای جلوگیری از تنش رطوبتی، روی آن‌ها با نایلون شفاف پوشانده شد و به مرور زمان نایلون حذف شد.
- بعد از دو روز هم‌کشتی گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در هر پلیت یا شیشه حاوی گیاهچه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم فاقد ناقل دوگانه (تیپ وحشی) ۲-۱ میلی‌لیتر محیط MS ¼ مایع حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای گیاهچه‌های تلقیح شده با سویه GUS دار در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کانامایسین با غلظت ۵۰–۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریخته شد. تعدادی گیاهچه نیز به‌عنوان شاهد در شرایط یکسان با آب مقطر استریل (بدون باکتری) تلقیح شدند سپس به اتاق رشد منتقل شدند.
- آبیاری نمونه‌ها با محیط‌کشت ۳-۲ روز یک‌بار انجام شد. هر ۱۰ روز یک‌بار نیز غلظت سفوتاکسیم به مقدارهای-300-200 100کاهش یافت.

لازم به ذکر است که از نمونه‌های گیاهچه ۵-۳ روزه تلقیح شده با باکتری نیز برای تولید گیاهان کامپوزیت در پشم سنگ استفاده شد. به این ترتیب که ۳-۲ روز بعد از ظهور ریشه‌های مویین، گیاهچه‌ها به شیشه‌های حاوی قطعات پشم سنگ منتقل شدند و روی آن‌ها با نایلون شفاف پوشانده شد سپس به اتاقک رشد منتقل شدند (شکل ۱).

شکل ۱: کشت گیاهان کامپوزیت در پشم سنگ
Fig. 1: Culture of composite plants in rock wool

سنجش هیستوشیمیایی GUS گیاهان کامپوزیت تراریخت

تأیید تراریختی ریشه ها با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS به روش *جفرسون* و همکاران (Jefferson *et al.*, 1987) انجام شد. جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از استوک رنگ‌آمیزی 10X (۱۰۰ میلی‌لیتر استوک رنگ‌آمیزی 10X، ۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۵۰۰ میلی‌مولار و ۲ میلی‌لیتر از EDTA ۱۰ میلی‌مولار به همراه ۱۰ میکرولیتر از Triton100X در ۴۸ میلی‌لیتر آب مقطر اتوکلاو شده)، ۰/۱ میکرولیتر مرکاپتواتانول، ۲۰ میکرولیتر از محلول 5-bromo- X-Gluc (4choloro-3-indolyl-β-glucuronic acid) در ۸۸۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد سپس قطعاتی از لاین‌های ریشه تراریخت و یک ریشه غیرتراریخت به‌طور جداگانه در تیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی منتقل شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور انکوبه شدند سپس با الکل ۷۰ درصد و آب مقطر استریل شسته شدند.

نتایج

ریشه‌های مویین در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری (هم تیپ وحشی و هم باکتری حامل ناقل دوگانه) ۴-۳ هفته پس از تلقیح از داخل قطعات پشم سنگ ظاهر شدند (شکل ۲). میزان ۶۰-۵۰ درصد گیاهچه‌های گلدانی ۱۴ روزه و ۹۰-۸۰ درصد گیاهچه‌های ۵-۳ روزه تولید ریشه‌های مویین نمودند. در صورتی‌که در گیاهچه‌های شاهد (تلقیح شده با آب مقطر استریل) هیچ‌گونه ریشه‌ای مشاهده نشد. ریشه‌های مویین گیاهان کامپوزیت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین بعد از مدتی از بین رفتند. در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین ریشه‌های مویین گیاهان کامپوزیت زنده مانده اما رشد کندی در مقایسه با ریشه‌های مویین رشد کرده در محیط فاقد کانامایسین داشتند. به همین دلیل از غلظت‌های بالاتر کانامایسین جهت انتخاب ریشه‌های تراریخت استفاده نشد.

شکل ۲: تولید گیاهان کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز*. نمونه‌های تلقیح شده با باکتری در داخل پشم سنگ فرو برده و سپس در پلیت قرار گرفتند (۱)، رشد ریشه‌های مویین ۴-۳ هفته پس از تلقیح (۲)، رشد قسمت هوایی گیاه کامپوزیت ۴-۳ هفته پس از تلقیح با باکتری (۳)

Fig. 2: Production of composite plants by *Agrobacterium rhizogenesis*. Explants were inserted into rock wool plugs and placed in a Petri dish (1), Hairy roots grow out of the rock wool after3-4 weeks (2), growth of aerial parts of the Composite plant, 3-4 weeks after inoculation with bacteria (3)

ریشه‌های مویین در حضور کانامایسین رشد کمتری نسبت به محیط بدون کانامایسین از خود نشان دادند اما گیاهچه‌های شاهد (گیاهچه تلقیح شده با آب مقطر) در حضور کانامایسین بعد از یک هفته خشک شده و از بین رفتند (شکل ۳). قسمت

هوایی گیاه کامپوزیت هم در گیاهچه‌های تلقیح شده با *آگروباکتریوم ریزوژنز* دارای ناقل دوگانه و هم در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری فاقد ناقل دوگانه (تیپ وحشی)، بدون تأثیر از حضور کانامایسین در محیط به رشد خود ادامه دادند ولی ریشه‌های تراریخت رشد کندی از خود نشان دادند. رشد قسمت هوایی گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد نیز بیشتر بود. ریشه‌های گیاهان شاهد تلقیح نشده در شرایط بدون حضور آنتی‌بیوتیک بعد از مدت زمان بیشتری نسبت به گیاهان تراریخت ظاهر شدند و دارای انشعابات کمتری نسبت به ریشه‌های تراریخت بودند.

سنجش هیستوشیمیایی GUS گیاهان کامپوزیت تراریخت

قسمت نوک ریشه‌های مویین گیاهان کامپوزیت ۵-۴ هفته بعد از ظهورشان قطع شد و مورد سنجش هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در برخی از ریشه‌های مویین مورد سنجش، رنگ آبی مشاهده شد درحالی‌که ریشه‌های مویین غیرتراریخت (ریشه‌های تلقیح شده با سویه وحشی *آگروباکتریوم ریزوژنز* فاقد پلاسمید PBI121 + GUS) هیچ‌گونه رنگی از خود نشان ندادند (شکل ۴).

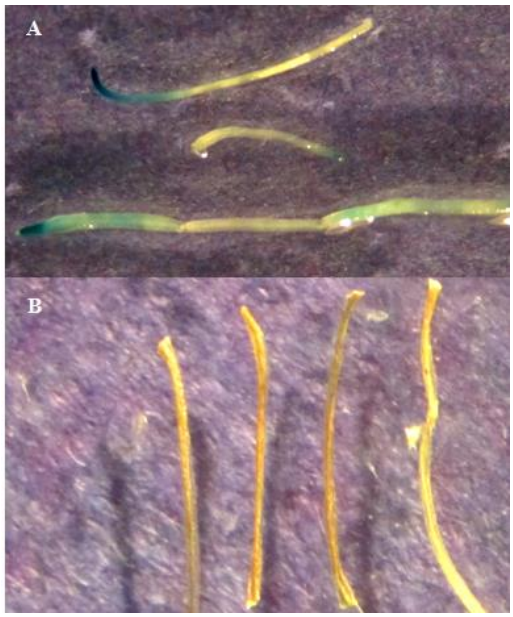
بحث

تولید ریشه‌های مویین گیاه کامپوزیت روشی سریع و آسان برای به‌دست آوردن مواد تراریخت برای بسیاری از گونه‌های دولپه‌ای می‌باشد. اگرچه این روش نمی‌تواند تولید بذر تراریخته بکند اما در مدت زمان کمی می‌تواند تولید ریشه‌های مویین تراریخت نماید (*دنگ* و همکاران، 2011). در این تحقیق برای اولین‌بار گیاه کامپوزیت در گیاه شیرین‌بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* تولید گردید. فراوانی تولید ریشه‌های مویین در گیاهچه‌های ۵-۳ روزه نسبت به گیاهچه‌های گلدانی دو هفته‌ای بیشتر بود نتیجه بهتر از گیاهچه‌های ۳-۵ روزه را می‌توان به جوان‌تر بودن سلول‌ها و توان تکثیر سلولی بالا در این گیاهچه‌ها نسبت داد. محققین زیادی گزارش کرده‌اند که سن ریزنمونه می‌تواند روی فراوانی ریشه‌های مویین تأثیر داشته باشد، زیرا سن ریزنمونه بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی سلول و در نتیجه توانایی تراریختی آن مؤثر است *ورگواو* و همکاران (Vergauwe *et al.*, 1998). *کریستوفر* و همکاران (2006) تولید گیاه کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* را در گیاه آرابیدوپسیس گزارش کردند که ریشه‌های مویین ۴-۳ هفته پس از تلقیح با باکتری ظاهر شدند. رشد قسمت هوایی در گیاهان کمپوزیت بیشتر از گیاهان شاهد تلقیح شده با آب مقطر بود و این می‌تواند به‌دلیل وجود سیستم ریشه‌های مویین در گیاه کمپوزیت و در نتیجه جذب بیشتر مواد از محیط توسط ریشه‌ها در گیاهان تراریخت باشد. در این مطالعه برای اطمینان از حضور ریشه‌های مویین در گیاهان تولیدی از ژن گزارشگر *GUS* استفاده شد.

ژن‌های بیماری‌زایی (*Vir*) موجود در پلاسمید وحشی *آگروباکتریوم ریزوژنز* نه تنها ناحیه T-DNA پلاسمید وحشی را به سلوهای گیاه شیرین‌بیان منتقل نموده بلکه ناحیه T-DNA پلاسمید PBI121 حاوی ژن *GUS* را منتقل کرده است. بیان ژن *GUS* در گیاه باعث تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز می‌شود که باعث تبدیل سوبسترای X-gluc (5-bromo-4choloro-3-indolyl-β-glucuronic acid) به رنگ آبی می‌گردد *نرمین و تیجن* (Nermin and Tijen, 1999). با توجه به اینکه آزمون GUS برای تائید انتقال و بیان ژن یک روش شناخته شده و قابل اعتماد است، بنابراین بیان ژن *GUS* تراریخته بودن ریشه-های تولید شده در این مطالعه را تایید می‌کند. در گزارشی *دنگ* و همکاران (2016) از *آگروباکتریوم ریزوژنز* حامل ژن *GFP* برای تولید گیاهان کامپوزیت در گیاه *Medicago truncatula* استفاده کردند. ریشه‌های مویین ۳-۲ هفته بعد از تلقیح با *آگروباکتریوم ریزوژنز* ظاهر شدند. نتایج فلورسنت ژن *GFP* نشان داد بیش از ۲۵ درصد ریشه‌ها تراریخت بودند.

شکل ۳: مقایسه رشد ریشه‌های مویین گیاه کامپوزیت در محیط کانامایسین و فاقد کانامایسین دو هفته پس از تلقیح با باکتری: گیاه شاهد در محیط حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیترکانامایسین (۱)، گیاه شاهد در محیط بدون کانامایسین (۲)، گیاه تراریخت در محیط بدون کانامایسین (۳)، گیاه تراریخت در محیط حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیترکانامایسین (۴)

Fig. 3: Comparison the growth of plant composite hairy roots in Kanamycin and without Kanamycin medium, two weeks after inoculation with bacteria: control plant in medium containing 25 mg/l Kanamaycin (1), control plant in without Kanamycin medium (2), transgenic plant in without kanamycin medium (3), transgenic plant in medium containing 25 mg/l Kanamaycin (4)



شکل ۴: نتایج سنجش هیستوشیمیایی GUS در ریشه‌های مویین گیاه کامپوزیت: ظهور رنگ آبی در ریشه‌های مویین گیاهان کامپوزیت تراریخت (A) و عدم ظهور رنگ آبی در ریشه‌های مویین گیاهان کامپوزیت غیرتراریخت (B)

Fig. 4: GUS histochemical analysis results in composite plant's hairy roots: The color blue in hairy roots of transgenic composite plants (A), Absence of blue color in hairy roots of composite plants (B)

کاهش رشد ریشه‌های تراریخت در محیط دارای ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین نسبت به محیط فاقد کانامایسین را می‌توان به علت حساسیت ریشه‌های مویین به کانامایسین در این گیاه نسبت داد. *بارکر* و همکاران (Barker *et al.*, 2006) برای تولید گیاهان کامپوزیت در یونجه از *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه K599 استفاده کردند. برای انتخاب گیاهان تراریخت از غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده کردند. نتایج نشان داد که ۷۵-۵۰ درصد ریزنمونه‌های تلقیح شده ۳-۲ هفته پس از تلقیح، تولید ریشه‌های مویین کردند و تحت شرایط بهینه ۴-۳ ریشه تراریخت مقاوم به کانامایسین به‌طور جداگانه از هر گیاه تلقیح شده به‌دست آمد. نتایج فلورسنت ژن *GFP* نشان داد به‌طور متوسط ۳-۲ ریشه از هر گیاه کامپوزیت و ۴۰ درصد ریشه‌های تولید شده تراریخت بودند. یکی از مزایای تولید گیاهان کامپوزیت این است که بدون استفاده از کشت بافت، امکان تولید ریشه‌های مویین با هزینه کمتر و در مدت زمان کوتاه‌تر میسر می‌شود. از دیگر مزایای گیاهان

کامپوزیت این است که برای تولید این گیاهان از بافت غیراستریل استفاده می‌شود و برای تولید ریشه از محیط پایه بـدون قند استفـاده می‌گردد. همچنین امکان کشت این گیاهان در محیط‌های مختلفی مثل ماسه، شن و پرلایت وجود دارد و همانند گیـاهان دیگـر ممکن است در گلخانه و یا در شرایط اتاق، رشد کنند. تولید گیاهان کامپوزیت و کشت آنها از طریق هیدروپونیک ممکن است مزایای بیشتری نسبت به تولید ریشه مویین در بیوراکتورها داشته باشد که نیازمند بررسی است.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۲-۱ متن انگلیسی مراجعه شود.