استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* برای ایجاد ریشه‌های القایی در چند گیاه دولپه‌ای

مژگان شاه‌محمدی، شیرین قربانی، احمد اصغرزاده، فرهاد رجالی و علیرضا شعرای نجاتی[1*]

چکیده

سه سویه باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (A4S و A4V و یک سویه منصوب به این باکتری) برای مایه‌زنی هفت نوع بافت گیاهی شامل دیسکهای استریل هویج، برگچه‌ها و لپه‌های دانه رست لوبیا، ساقه گیاه کامل لوبیا، ساقه‌های میان گرهی حاصل از کشت بافت سیب‌زمینی، ریشه چه دانه رست استریل یونجه و ساقه‌های میان گرهی کامل یونجه به کار برده شد. در دیسکهای هویج، برگچه و ساقه لوبیا و ساقه‌های سیب‌زمینی در محل مایه‌زنی ریشه‌های ظریف و انبوه مشاهده گردید. درصد تشکیل ریشه‌های القایی در گیاهان مختلف توسط سه سویه باکتری متفاوت بود. به نظر می‌رسد تشکیل ریشه‌های القایی تحت تأثیر گونه گیاهی و سویه باکتری *A. rhizogenes* قرار دارد.

واژه های کلیدی: *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه‌های القایی، سیب‌زمینی، لوبیا، هویج، یونجه.

1ـ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه الزهرا، دانشگاه علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه الزهرا، دانشگاه علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، بخش تحقیقات بیولوژی خاک، کارشناس آزمایشگاه بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب

* وصول: 84/3/17 و تصویب: 85/6/28

مقدمه

Agrobacterium rhizogenes *(Rhizobium rhizogenes)* یک باکتری بیماریزای خاکزی است که باعث بیماری موئی شدن ریشه یا ریشه انبوهی (Hairy root) در گیاهان دو لپه‌ای می‌شود. بیماریزایی A. rhizogenes به حضور یک پلاسمید بزرگ القاء کننده ریشه (Ri) در باکتری بستگی دارد(Mukundan، 1997). بیماری موئی شدن ریشه با انتقال قطعه‌ای از پلاسمید بنام T-DNA به درون سلول گیاهی، ادغام پایدار این قطعه درون ژنوم گیاه و بیان ژنهای این قطعه ایجاد می‌شود (Giri and Narasu، 2000؛ Gelvin، 2003؛ Mukundan، 1997). T-DNA حاوی چند کاست ژن می‌باشد؛ یک کاست از این ژنها سرطانزا(Oncogenic) هستند، اما دیگر این ژنها در بیوسنتز اوپین‌ها(Opines) دخیل‌اند. (Riva، 1998؛ Mukundan، 1997؛ Zhu، 2000؛ Zupan ، 2000).

ژنهای سرطانزایی با دو مکانیسم متفاوت باعث ایجاد ریشه‌های موئی در گیاهان می‌شوند. در یکی از این مکانیسم‌ها، ژنهای سرطانزایی آنزیمهای تولیدکننده اکسین را کد می‌کنند و به این ترتیب منجر به رشد نئوپلاستیک بافت می‌شوند. در مکانیسم دوم به نظر می‌رسد دسته دیگری از ژنهای سرطانزا مسیر تبادل علائم (Signal transduction) را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش حساسیت سلولهای گیاهی نسبت به اکسین می‌شوند. این ژنها تحت عنوان ژنهای rol نامیده می‌شوند (Aoky and Syono، 2000؛ Christy، 2001؛ Zambrysky، 1989). اوپین‌ها متشکل از یک اسید آمینه و یک اسید آلی یا کربوهیدرات می‌باشند که بوسیله سلول گیاهی القاء شده با اگروباکتریوم، سنتز می‌شوند.

این مواد، از بافتهای القاء شده گیاهان خارج شده و بوسیله باکتریهای القاء کننده غده (Tumour) یا ریشه انبوهی به عنوان منبع کربن و نیتروژن مصرف می‌شوند.

اوپین‌ها به عنوان یک مبنا برای تقسیم‌بندی پلاسمیدهای Ri استفاده می‌شوند و در نتیجه بر این اساس سه دسته عمده پلاسمید Ri تعریف شده که شامل پلاسمیدهای Ri نوع اگروپین(Agropine)، مانوپین (Mannopine) و کوکوموپین (Cucumopine) است (Mukundan، 1997؛ Ottanavi، 1990).

در پلاسمید Ri علاوه بر منطقه T-DNA ، حضور منطقه ویرولانس (*vir*) هم برای القاء کردن سلولهای گیاهی ضروری می‌باشد. ژنهای این منطقه اکثر محصولات trans-acting لازم برای انتقال T-DNA را فراهم می‌کنند. این منطقه به 6 اپرون تقسیم می‌شود که این اپرونها یا برای انتقال T-DNA ضروری هستند (*VirA* , *VirD* , *VirB* , *VirG* و *VirE*) یا در افزایش راندمان القاء شدن سلول گیاهی نقش دارند (VirC) (Gelvin، 2003؛ Paul،1992؛ Zambrysky، 1989).

پروسه انتقال T-DNA به سلول گیاهی دارای مراحل اساسی: 1) ایجاد زخم در گیاه 2) کلونیزه شدن باکتری 3) القاء سیستم ویرولانس باکتری 4) بریدن یک رشته از T-DNA 5) تشکیل T-complex 6) حرکت T-complex از طریق غشاهای باکتریایی 7) مسیریابی T-complex به درون سلول گیاهی 8) مسیریابی T-complex به هسته سلول 9) و ادغام T-complex به DNA سلول گیاهی‌است(Mukundan، 1997؛ Riva، 1998).

A.rhizogenes باعث بیماری ریشه انبوهی در دامنه وسیعی از گیاهان دو لپه‌ای می‌شود. این ریشه‌ها دارای انشعابات جانبی فراوان هستند و در محیطهای کشت آزمایشگاهی دارای زمین‌گرایی منفی می‌باشند. ریشه‌های القایی نسبت به ریشه‌های معمولی سرعت رشد به مراتب بیشتری به دلیل سنتز هورمونهای رشد دارند که به صورت مستقل و بدون نیاز به اندام هوایی گیاه می‌توانند به رشد خود ادامه دهند (Giri and Narasu، 2000؛ Mukundan، 1997). در آزمایشگاه، کشتهای استریل ریشه موئی از طریق مایه‌زنی بافتهای مختلف گیاهان دولپه‌ای با *A.rhizogenes* ایجاد می‌گردند و در زمینه‌های متفاوتی ازجمله در موارد زیر کاربرد دارند:

ریشه‌های القایی قادر به سنتز متابولیتهای ثانویه مورد استفاده در زمینه‌های مختلف پزشکی و داروسازی و همچنین ترکیبات شیمیایی خاصی می‌باشند که از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت هستند. مقدار متابولیتهای فوق نیز معادل و یا بیشتر از گیاهان سالم مربوطه می‌باشد. با برقراری شرایط آزمایشگاهی مناسب ریشه‌های القایی قادر به تولید گیاهان کامل بوده و گیاهان تولید شده از این ریشه‌ها از نظر ژنتیکی پایدار هستند (Giri and Narasu، 2000). با جایگزین شدن ریشه‌های القایی به جای ریشه‌های معمولی امکان تهیه صنعتی مایه مایه‌زنی قارچهای میکوریز آربسکولار فراهم گردیده است. قارچهای میکوریز آربسکولار که از میکروارگانیسمهای مفید خاکزی می‌باشند، باعث افزایش مقاومت گیاه میزبان به تنشهای مختلف و نیز افزایش عملکرد گیاهان در خاکهایی با حاصلخیزی پائین مثل دیمزارها می‌گردند (Boisson-Dernier، 2001). با توجه به اینکه قارچها همزیست اجباری ریشه آنها تحت شرایط سترون تا مدتها برای دانشمندان به یک مشغله ذهنی تبدل شده بود.

ریشه‌های القایی بدلیل تواناییشان برای رشد در محیط‌های سنتز شده آزمایشگاهی (بدون نیاز به اندام هوایی گیاه) به عنوان وسیله مناسبی برای تکثیر قارچهای میکوریز آربسکولار مورد استفاده قرار گرفت. ریشه‌های القایی در دامنه وسیعی از تحقیقات همانند بررسی پاسخ ریشه‌ها به مواد یا مطالعه ارتباط ریشه‌ها با سایر ارگانیسمها مثل نماتودها، پاتوژنهای ریشه‌ای و قارچهای همزیست کاربرد دارند (Christy، 2001).

Tanaka و همکاران (1985) ده روز پس از مایه‌زنی دیسک ریشه‌های شلغم و تربچه‌ها با سویه A4 *A.rhizogenes* اولین علائم ظهور ریشه‌های القایی را مشاهده کردند، در این آزمایش که در محیط کشت فاقد هورمون‌های رشد انجام شد، ریشه‌های بوجود آمده دارای انشعابات زیاد، زمین‌گرایی منفی و رشد سریع بودند.

در آزمایش دیگر، Pettenati (1989) نشان داد که مایه‌زنی محور زیر لپه‌ای در گیاهچه لوبیا با سویه‌های A4 و 1855 *A.rhizogenes*، پس از گذشت 4 الی 5 روز منجر به تشکیل بافت کالوس در ناحیه مایه‌زنی گردید و پس از گذشت 10 الی 12 روز ریشه‌های القایی در محل مایه‌زنی ظاهر گشتند. در این آزمایش ضمن استفاده از محیط کشت MS، برای حذف باکتری از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cofotaxime) (500 میلی‌گرم در لیتر) استفاده شده بود.

همچنین Pellegrineschi and Davolio-Mariana (1996) نشان دادند که پس از گذشت ده روز از زمان مایه‌زنی دمبرگ، پهنک برگ و قلمه‌های دو تا سه برگی گیاه شمعدانی با سویه‌های مختلف *A.rhizogenes* (سویه‌های A4، Hri، 8196، A4RS1 و A4RSNT) در محلهای مایه‌زنی شده ریشه‌های موئی ظاهر گردیدند. در این آزمایش مؤثرترین سویه باکتری نوع Hri و مناسبترین عضو گیاه، قلمه‌های دو تا سه برگی این گیاه گزارش شد.

در این تحقیق سعی گردیده است تا با مایه‌زنی سویه‌های مختلف *A.rhizogenes* به اندامها یا بخشهای مختلف چند گیاه ریشه‌های القایی در آزمایشگاه تولید گردد. نتایج بررسی حاضر می‌تواند مورد استفاده دیگر محققین در جهت آزمایش‌ها یا فعالیت‌های یاد شده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت سویه‌های باکتریایی

سه سویه باکتری *A.rhizogenes* شامل سویه‌های A4V, A4S ارسالی از دانشگاه مک گیل کانادا و یک سویه منصوب به این باکتری تهیه شده از پژوهشگاه تحقیقات ملی ژنتیک و علوم زیستی، برای مایه‌زنی گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. باکتریها بر روی محیط YMA کشت شده و در یخچال نگهداری شدند. برای آماده کردن باکتریها جهت مایه‌زنی به گیاهان، باکتریها از کشت قبلی به پتری دیش‌های حاوی محیطYMA، (Van Asma، 1995) منتقل و در دمای 25 ± 2°C در تاریکی نگهداری شدند. از کشت‌های 48 ساعته سویه‌های روی محیط ذکر شده برای مایه‌زنی استفاده گردید.

تهیه بافتهای گیاهی مورد نیاز برای مایه‌زنی و روش مایه‌زنی

از ریشه ذخیره‌ای هویج، قسمتهای مختلف گیاهچه‌های لوبیای قرمز (رقم نامشخص)، سیب‌زمینی (رقم نامشخص) و یونجه (رقم همدانی) برای ایجاد ریشه‌های القایی استفاده گردید که روش آماده‌سازی هر یک از این بافت‌ها و چگونگی مایه‌زنی آنها به شرح زیر بود:

●مایه‌زنی دیسک ریشه‌ای هویج با باکتری:

ریشه‌های ذخیره‌ای هویج تازه خریداری شده از بازار بعد از شستشو با آب و مایع ظرفشویی به مدت 45-30 ثانیه، درون الکل 96 درجه فرو برده شدند. هویج‌ها در محلول وایتکس صنعتی 20% به مدت 20-15 دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. هویج‌ها 4-3 مرتبه با آب استریل آبکشی شدند. سپس 2 سانتی‌متر انتهای ریشه هابریده شده و پوست آن بوسیله چاقوی استریل جدا شد. ریشه‌های پوست کنده شده بصورت برش‌هایی با ضخامت 10 - 5 میلی‌متر بریده شد و سپس سطح رو به نوک ریشه دیسکها (apical) در ناحیه کامبیوم با باکتری برداشته شده از روی محیط جامد مایه‌زنی شدند. دیسکهای مایه‌زنی روی محیط آب- آگار (0/8%) قرار گرفته و تحت نور ضعیف 350 لوکس در دمای 25 ± 2°C قرار داده شدند. تعدادی از دیسکهای هویج مایه‌زنی نشده به عنوان شاهد تحت همان شرایط نگهداری شدند (Ryder، 1985).

مایه‌زنی قسمتهای مختلف گیاهچه لوبیا

برای تولید ریشه‌های القایی در لوبیا، از قسمتهای مختلف گیاهچه استریل این گیاه استفاده گردید که شامل برگچه و لپه‌های دانه رست لوبیا و ساقه گیاهچه کامل لوبیا بودند. برای تهیه برگچه و لپه‌های دانه رست، بذرهای لوبیا با مایع ظرفشویی و آب شسشته شده و سپس درون اتانول 96° به مدت 60 ثانیه فرو برده شدند. سپس بذرها در محلول 0/1% کلرید جیوه II اسیدی به مدت 5 دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد از این مرحله 7 - 6 مرتبه با آب استریل، کاملاً شستشو شدند. بذرها بر روی محیط MS بدون هورمون (Van Asma، 1995) در دمای 25 ± 2°C و تاریکی قرار داده شدند. بعد از 4 - 3 روز، با جدا شدن پوست بذرهای جوانه زده، دو لپه از هم جدا گردید و

لپه‌ها بصورت منفرد روی محیط MS بدون هورمون قرار گرفتند. سپس با استفاده از سوزن استریل آغشته با کتری برداشته شده از روی محیط جامد، قسمت پشت لپه‌ها مایه‌زنی شد، در هر لپه 10-8 شکاف مورب سوزن آغشته به باکتری ایجاد گردید. لپه‌های مایه‌زنی شده در تاریکی و در دمای 2±25 ̊C نگهداری شدند.

از برگچه‌های وسط دو لپه گیاهک 4-3 روزه نیز برای مایه‌زنی استفاده شد. بر روی شبکه آوندی موجود در قسمت زیرین برگ توسط سوزن آغشته به باکتری در چندین نقطه شکافهای ظریفی ایجاد گردید. سپس برگهای مایه‌زنی شده روی محیط MS بدون هورمون کشت و تحت نور مداوم با شدت 1000 لوکس، نگهداری شدند.

تولید ریشه‌های القایی از گیاهچه کامل لوبیا: بذرهای لوبیا به همان ترتیب که در بالا گفته شد ضدعفونی و بر روی محیط MS بدون هورمون قرار داده شدند. بذرهای سالم جوانه زده به درون دابل جارهای استریل منتقل و در دمای 2±25 ̊C و دوره نوری تاریکی: 16 ساعت روشنایی با شدت نور 4500-3000 لوکس و 8 ساعت خاموشی نگهداری شدند. بعد از 4 تا 5 روز جوانه‌ها بصورت گیاهچه درآمد. مایه‌زنی گیاهچه لوبیا با استفاده از سوزن آغشته به باکتری در چند جای مختلف در محور ساقه در زیر یا بالای لپه ساقه انجام شد. کلیه این مراحل درون جار و با رعایت شرایط بهداشتی انجام گردید. در چند لوبیای کامل، سوزن استریل بدون باکتری در چند جای مختلف ساقه فرو برده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تمام نمونه‌های مایه‌زنی شده و شاهد تحت همان شرایط قبلی نگهداری شدند.

تولید ریشه‌های القایی از سیب‌زمینی

گیاهچه‌های سیب‌زمینی حاصل از کشت بافت درون محیط کشت MS جامد بدون هورمون نگهداری گردید. برای مایه‌زنی از قسمت میان گرهی ساقه‌ها بطول 1-0/5 سانتی‌متر استفاده شد. قسمت راس 68 تکه ساقه با باکتری رشد داده شده بر روی محیط جامد YMA مایه‌زنی شدد و سپس نمونه‌ها روی محیط MS جامد بدون هورمون حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (500mg/l) دمای 2±25 ̊C و تحت نور مداوم 5000-4000 لوکس قرار گرفت. چهل نمونه مایه‌زنی نشده نیز به عنوان شاهد در همان محیط و تحت همان شرایط قرار گرفت (Dobigny، 1995).

- **تولید ریشه‌های القایی از یونجه (رقم همدانی)**

اندام‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه دانه رست یونجه به صورت جداگانه مایه‌زنی شدند. تولید ریشه‌های القایی از ریشه چه یونجه: بذر یونجه ابتدا بوسیله آب و مایع ظرفشویی شسته شد و سپس به مدت 45-30 ثانیه در اتانول 96 درجه قرار گرفت. بعد از این مرحله بذرها و در محلول 0/1% کلرید جیوه II اسیدی به مدت 4 دقیقه ضدعفونی و سپس 7 - 6 مرتبه با آب استریل آبکشی شدند. بذرهای استریل شده به محیط MS بدون هورمون حاوی 1% آگار منتقل و در دمای 2±25 ̊C نگهداری گردیدند. پس از اینکه طول ریشه‌چه‌های دانه رست حدود 10 میلی‌متر شد، 3 میلی‌متر از انتهای ریشه‌چه بریده شده و انتهای برش خورده ریشه چه باقیمانده روی گیاهچه با باکتری شد کرده روی محیط YMA مایه‌زنی شد. چند دانه رست هم با انتهای بریده شده ریشه چه مایه‌زنی نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. دانه رست‌های مایه‌زنی شده و شاهد در محیط محلول غذایی نیمه جامد پیشنهادی تولار و همکاران (2001) (0/45% آگار) قرار گرفته و در دمای 2±25 ̊C و با دوره نوری تاریکی: 16 ساعت روشنایی با شدت نور 4500-3000 لوکس و8 ساعت خاموشی نگهداری شدند(Boisson-Dernier، 2001).

تولید ریشه‌های القایی از تکه‌های ساقه یونجه: بذرها مثل روش بالا ضدعفونی و کشت داده شدند، سپس بذرهای جوانه زده درون دابل جارهای استریل حاوی محلول غذایی پیشنهادی تولار و همکاران (2001) قرار گرفته و به مدت 2-1 ماه در دمای 2±25 ̊C و دوره نوری تاریکی: 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت خاموشی و با شدت نور مشابه حالت قبل نگهداری شدند.

بعد از رشد کامل گیاهان یونجه قسمت ساقه میان گرهی گیاه کامل به طول 2-1 سانتی‌متر بریده شده و نوک (رأس) آنها با باکتری مایه‌زنی شد. ساقه‌های مایه‌زنی شده به طور عمودی روی محیط MS بدون هورمون حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (500mg/l) فرو برده شدند بطوری که قسمت مایه‌زنی شده به سمت بالا قرار گرفت. ساقه‌های مایه‌زنی شده تحت شدت نور مداوم 4000 لوکس نگهداری شدند (Golds، 1991).

آلودگی‌زدایی و پایداری ریشه‌های القایی

بعد از ظهور ریشه‌های القایی بر روی بافتهای مایه‌زنی شده، این ریشه‌ها جدا شده و به محیط MS بدون هورمون با فیتاژل (Phytagel) که حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (500mg/l) بود، منتقل گردیدند. بعد از 3 - 2 مرحله انتقال بر روی این محیط و اطمینان از حذف آلودگی باکتریایی ریشه‌ها، آنتی بیوتیک از محیط حذف گردید و پایداری و سرعت ریشه‌های القایی ارزیابی شد (Dobigny، 1995؛ Golds، 1991).

نتایج و بحث

بر روی دیسکهای هویج مایه‌زنی شده 1 تا 6 هفته بعد از نگهداری در محیط آب- آگار، بافت کالوس تشکیل گردید و 5-4 روز بعد، از محل بافت کالوس بوجود آمده، ریشه‌های موئی ظاهر شدند (شکل 1). درصد تشکیل ریشه‌های القایی در دیسکهای هویج مایه‌زنی شده با سه سویه باکتری در جدول 1 آورده شده است. رشد ریشه‌های القایی به طور میانگین 4/1 میلی‌متر در روز اندازه‌گیری گردید. در نمونه‌های شاهد بعد از یک هفته، کالوسهایی غیر مشابه با کالوسهای دیسکهای مایه‌زنی شده، ایجاد شد، اما از آن کالوسها حتی از بعد از گذشت 2 ماه نیز ریشه‌ای ظاهر نشد (شکل 1).

در لپه‌های لوبیای مایه‌زنی شده، ریشه‌های موئی ایجاد نشد و تنها واکنش قابل مشاهده بر روی آنها بعد از سه هفته، نکروز قسمتهای مایه‌زنی شده بود. در برگچه‌های لوبیا بعد از یک هفته کالوسهایی در نواحی مایه‌زنی شده مشاهده شد و بعد از 3-2 روز ریشه‌های نازک بسیاری در نواحی مایه‌زنی شده ایجاد گردید (شکل 2). در این حالت بین سه سویه تفاوتهایی در درصد تشکیل ریشه‌های القایی وجود داشت (جدول 2). در این مورد میانگین رشد ریشه‌های ترانسفرم شده (Transformed) 4/2 میلی‌متر در روز بود.

در لوبیای کامل حدود 5 روز بعد از مایه‌زنی در سرتاسر ساقه ریشه‌های موئی مشاهده گردید. ریشه‌ها بصورت مستقیم و عمود بر ساقه بودند (شکل 3). در گیاهان شاهد محل زخمهای سوزن ترمیم شده و هیچ اثری از ریشه‌زدایی دیده نشد. نتایج اثر سویه‌ها در ریشه‌زایی در جدول 3 خلاصه شده است. میانگین رشد ریشه‌های القایی لوبیا 4/4 میلی‌متر در روز بود.

در ساقه‌های سیب‌زمینی 10-7 روز بعد از مایه‌زنی در قسمت بالای ساقه‌ها ریشه‌هایی مشاهده شد، در صورتیکه در نمونه‌های شاهد اثری از ریشه دیده نشد (شکل 4). درصد القاء ریشه‌های موئی سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در ساقه‌های میان گرهی سیب‌زمینی در جدول 4 آورده شده است. میانگین رشد ریشه‌ها در این مورد 1/75 میلی‌متر در روز بود.

در نمونه‌های مایه‌زنی شده دانه رست‌های یونجه ریشه‌ای از انتهای بریده شده ریشه چه دیده نشد، البته در این نمونه‌ها به دلیل حذف مریستم انتهایی در بالای قسمت بریده شده، ریشه‌های فرعی ایجاد گردید، اما با مقایسه نمونه‌های مایه‌زنی شده و نمونه‌های شاهد مشخص شد که ریشه‌های حاصله، ریشه‌هائی القائی نبود، چون ریشه‌های القائی درست باید از انتهای قسمت بریده شده که مایه‌زنی انجام گرفته بود خارج می‌شدند.

در ساقه‌های یونجه نیز در نمونه‌های مایه‌زنی شده با A4V در 20% نمونه‌ها بعد از 10 روز کالوسهای متورمی مشاهده شد، اما در سایر نمونه‌های مایه‌زنی شده و همینطور نمونه‌های شاهد کالوس مشاهده نشد. کالوس‌های ایجاد شده در نمونه‌های مایه‌زنی شده با A4V به همان صورت باقی‌مانده و هیچ تغییر و یا اثری از تولید ریشه در آنها مشاهده نگردید.

با توجه به اینکه در تمام گیاهان مایه‌زنی نشده که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، هیچ ریشه‌ای مشاهده نشد، می‌توان نتیجه گرفت که ریشه‌های ایجاد شده در نمونه‌های مایه‌زنی شده با *A . rhizogenes* سویه‌های A4V , A4S و سویه منصوب به این باکتری ریشه‌های القائی هستند. در ضمن همه ریشه‌های ظاهر شده خصوصیات مورفولوژیکی ریشه‌های القائی که شامل سرعت رشد بالا، انشعابات زیاد و زمین‌گرایی منفی است را نشان دادند.

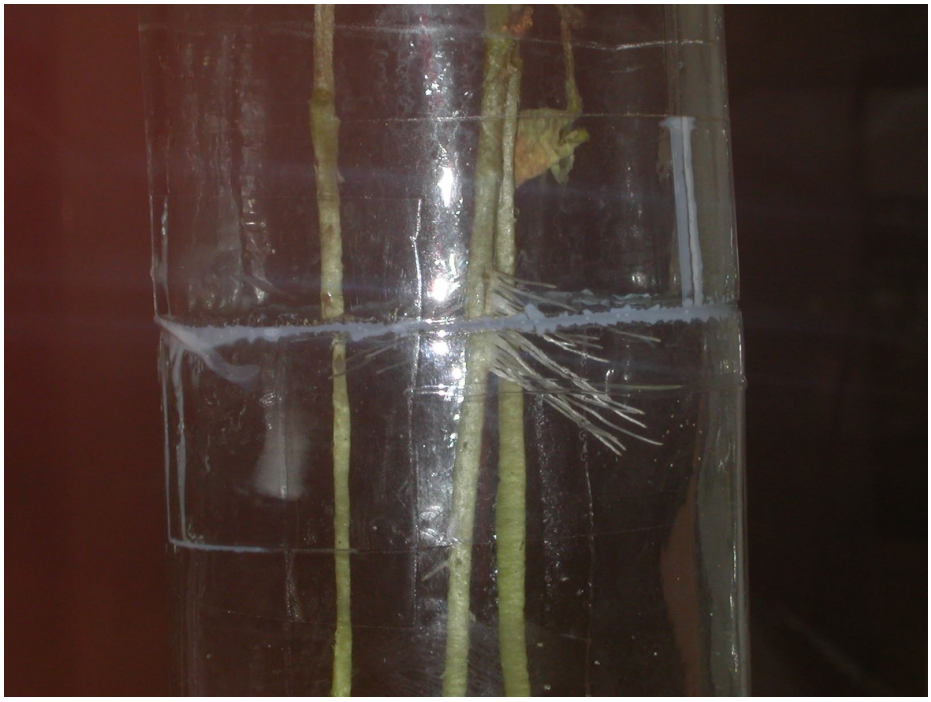
کالوس‌های ایجاد شده روی دیسک‌های شاهد هویج، نتیجه تقسیم سلولی در کامبیوم و به شکل غیرسازمان یافته می‌باشند (Ryder، 1985). این بافت کالوس شبیه به بافتهای کالوس ایجاد شده بر روی دیسکهای مایه‌زنی شده با *A . rhizogenes* نیستند و اساساً در سطح رو به نوک ریشه (apical) متکامل می‌شوند و در واقع نشان‌دهنده قطبیت دیسکهای هویج می‌باشند Ryder و همکاران (1985) هم دیسکهای هویج را سویه‌های مختلف تیمار کردند و نتایج آنها نشان داد که سویه‌های القاء کننده ریشه به دو گروه تقسیم می‌شوند. یک دسته از آنها بر روی هر دو سطح دیسکهای هویج (سطح رو به بخش هوایی و سطح رو به نوک ریشه) توانایی القاء ریشه را دارند و دسته دیگر تنها بر روی سطح رو به نوک ریشه این قابلیت را دارا هستند. دسته اول سویه‌ها به سویه‌های غیر قطبی معروف هستند و دسته دوم سویه‌های قطبی نامیده می‌شوند. در واقع دسته اول خود قادر به سنتز هورمون اکسن بوده و قطعه T-DNA آنها حاوی ژنهای کد کننده اکسین است و بنابراین باعث تولید و تکثیر مریستم در دو طرف دیسکهای هویج رخ می‌دهد. اما سویه‌های دسته دوم دارای ژن کدکننده اکسین در T-DNA خود نبوده و بنابراین سلولهای القاء شده تنها به اکسین طبیعی گیاه وابسته هستند و با توجه به اینکه در قسمت رو به نوک ریشه دیسکهای هویج غلظت اکسین بیشتر است، در نتیجه القاء ریشه در این قطب رخ می‌دهد (Kerr، 1990). در این تحقیق، مشاهده گردید که هر سه سویه باکتری

A. rhizogenes قادر به القاء ریشه در دو طرف دیسکهای هویج بوده و لذا این سویه‌ها غیرقطبی هستند.

بر اساس نتایج بدست آمده در این بررسی، هر سه سویه باکتری قادر به القاء ریشه‌های موئی در ساقه‌های میان گرهی سیب‌زمینی بودند، اما بر خلاف ساقه‌های سیب‌زمینی، روی ساقه‌های میان گرهی یونجه مایه‌زنی شده با این باکتریهای، ریشه موئی ایجاد نشد. روی ریشه چه دانه رستهای یونجه هم تشکیل ریشه موئی در نمونه‌های مایه‌زنی شده با باکتری *A. rhizogenes* مشاهده نشد. به عبارت دیگر سویه‌های *A. rhizogenes* استفاده شده در این تحقیق در القاء ریشه‌های موئی در ساقه میان گرهی و ریشه چه یونجه (رقم همدانی) ناتوان هستند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان مختلف نسبت به باکتری *A. rhizogenes* پاسخ متفاوتی را ارائه می‌دهند. به علاوه، نه تنها گیاهان مختلف بلکه بافتهای مختلف یک گیاه که همگی دارای ژنوتیپ یکسانی هستند نیز، در ایجاد ریشه‌های القائی توسط باکتری *A. rhizogenes* تفاوتهای قابل توجهی را نشان می‌دهند. نتایج بدست آمده از مایه‌زنی لپه‌ها، برگچه‌ها و ساقه‌های لوبیا می‌تواند مؤید این نتیجه‌گیری باشد. در لپه‌های لوبیا مایه‌زنی شده با سویه‌های A4S , A4V و سویه منصوب به این باکتری، ریشه‌های موئی ایجاد نشد، اما بر خلاف آن، در برگچه‌های و ساقه‌های مایه‌زنی شده لوبیا با همین سویه‌های *A. rhizogenes*، ریشه‌های موئی در نواحی مایه‌زنی شده مشاهده شد، البته درصد تشکیل ریشه‌های موئی در این دو نوع بافت گیاهی نیز متفاوت بود. اختلاف در درصد تشکیل ریشه‌های موئی توسط گیاهان متفاوت و سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes* می‌تواند به دلایل متعددی باشد. یکی از این دلایل ترکیب یا ساختار ژنتیکی باکتری و گیاه مایه‌زنی شده است، یعنی زمینه کروموزومی در هر دوی اینها می‌تواند در درصد القاء ریشه‌های موئی اثر داشته باشد. دلیل دیگر می‌تواند تفاوت در محل ادغام شدن T-DNA در ژنوم میزبان باشد. با توجه به اینکه ادغام T-DNA درون سلول گیاهی در هر کروموزوم ژنوم گیاهی می‌تواند رخ دهد و ادغام هم اساساً تصادفی انجام می‌شود، محلی که T-DNA درون ژنوم ادغام می‌شود، در بیان ژنهای T-DNA اثر دارد. T-DNA می‌تواند در نزدیک یا دور از عناصر فعال‌کننده ادغام شود و در نتیجه منجر به فعال شدن یا غیرفعال شدن ژنهای T-DNA گردد. علت دیگر تفاوت در درصد القاء ریشه‌های موئی بین گیاهان مختلف و سویه‌های متفاوت تعداد نسخه‌های T-DNA می‌باشد. با وجود اینکه در طی آلودگی، اکثریت سلولهای گیاهی بوسیله یک باکتری واحد آلوده می‌شوند، اما خیلی از این سلولها حاوی بیشتر از یک نسخه T-DNA ادغام شده در هسته هستند. احتمالاً همانند سازی T-DNA یا درون باکتری یا درون سلولی گیاهی قبل از ادغام در ژنوم گیاه رخ می‌دهد (Gelvin، 2003؛ Zambrysky، 1989؛ Giri and Narasu، 2000). در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان اظهار داشت که اثر متقابل سویه باکتری با نوع گیاه وجود دارد و تولید ریشه‌های القائی هم به گونه گیاهی و هم به سویه باکتری *A. rhizogenes* مرتبط است. بر اساس نتایج این تحقیق ساقه‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با سویه A4V بیشتر درصد تشکیل ریشه‌های القایی را نشان می‌دهند.

شکل 1ـ تولید ریشه‌های انبوه هویج مایه‌زنی شده به *Agrobacterium rhizogenes* (سمت چپ)، 6-1 هفته پس از مایه‌زنی و نگهداری روی محیط آب- آگار، همراه با دیسک مایه‌زنی نشده (سمت راست، شاهد)

شکل 2ـ ریشه‌های القایی ایجاد شده بر روی برگچه‌های لوبیای مایه‌زنی شده با باکتری *Agrobactrium rhizogenes* بعد از گذشت 12-10 روز از زمان مایه‌زنی



شکل 3ـ ریشه‌های القائی ایجاد شده روی ساقه لوبیای کامل 5 روز بعد از مایه‌زنی با باکتری *Agrobacterium rhizogenes*

شکل 4ـ تولید ریشه‌های القائی روی ساقه‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (سمت چپ)، 7-10 روز بعد از مایه‌زنی، همراه با ساقه‌های سیب‌زمینی بدون مایه‌زنی با باکتری (سمت راست، شاهد)

جدول 1ـ اثر سویه‌های مختلف باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در تولید ریشه‌های القائی در دیسکهای هویج

نوع سویه	تعداد دیسک مایه‌زنی شده	تعداد دیسک ریشه‌دار شده	درصد تشکیل ریشه‌های القایی
A4V	25	9	36
A4S	25	13	48
منصوب به این باکتری	25	11	44

جدول 2ـ اثر سویه‌های مختلف باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در تولید ریشه‌های القائی در برگچه‌های لوبیا

نوع سویه	تعداد دیسک مایه‌زنی شده	تعداد دیسک ریشه‌دار شده	درصد تشکیل ریشه‌های القایی
A4V	16	5	31/25
A4S	16	3	18/75
منصوب به این باکتری	16	6	37/5

جدول 3ـ اثر سویه‌های مختلف باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در تولید ریشه‌های القائی در ساقه لوبیای کامل

نوع سویه	تعداد دیسک مایه‌زنی شده	تعداد دیسک ریشه‌دار شده	درصد تشکیل ریشه‌های القایی
A4V	10	3	30
A4S	10	4	40
منصوب به این باکتری	10	3	30

جدول 4ـ اثر سویه‌های مختلف باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در تولید ریشه‌های القائی در ساقه سیب‌زمینی

نوع سویه	تعداد دیسک مایه‌زنی شده	تعداد دیسک ریشه‌دار شده	درصد تشکیل ریشه‌های القایی
A4V	19	10	52/63
A4S	24	11	45/83
منصوب به این باکتری	25	7	28

فهرست منابع:

1. Aoky, S., K. Syono. 2000. The roles of Ri*rol* and N*grol* genes in hairy root induction in *Nicotiana debneyi*. Plant Science, 159: 183-189.
2. Boisson-Dernier, A., MoChabaud, G. Becard, C. Rosenberg, G. Barker. 2001. *Agrobacterium rhizogenes* transformed root of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic association. Molecular Plant-Microbe Interaction 14: 695-700
3. Christy, M. 2001. Use of Ri- mediated transformation for production of transgenic plants. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant, 37: 687-700.
4. Dobigny, A., A. Ambroise, R. Haicour, C. David, L. Rossignol, D. Rihachaker. 1995. Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell. Tissue and Organ Culture,40:225-230.
5. Gelvin, S.B. 2003. *Agrobactrium*-Mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 16-37.
6. Giri, A., M.L. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotecnology Advances, 18: 1-22.
7. Golds, T.J., J.Y. Lee, T. Husnain, T.K. ghose, M.R. Davey. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. Journal of Experimental Bofany, 42: 1147-1157.
8. Kerr, A. 1990. The genus *Agrobactrium.* In: prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications (Eds: A.Balows., H.Truper., M.Dworkin., W. Harder., K-H.Schleifer). volume III. Pp 2214-2235. Springer-Verlag.
9. Mukundan, U., H.G. Dawada, S. Ratnaparki. 1997. Hairy root culture and secondry metabolite production. pp 1-22. Agro Botanica, New Dehli.
10. Ottaviana, M.P., J.H.N. Schel, Ch.H. Hanisch ten Cate. 1990. Variation in structure and plant regeneration of *Agrobactrium rhizogenes* transformed and control roots of the potato cv. Bintje. Plant call, Tissue and organ culture, 20:25-34.
11. Paul,J., J. Hooykoas, R.A. Schiperort. 1992. *Agrobactrium* and plant genetic. Plant Molecular Biology, 19: 15-38.
12. Pellegrineschi, A., O. Davolio-Maiani.1996.*Agrobactrium rhizogenes*-mediated transformation of scented germanium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 79-86.
13. Pettenati, J.S., D. Chriqui., P. Sarni-Manchado., E. Prinsen. 1989. Stimulation of lignification in neoformed calli induced by *Agrobacterium rhizogenes* on Bean hypocotyls. Plant Science, 61: 179-188.
14. Riva, G.A., J. Gozolez-Cabrera, R. Vazquez-Padron, C. Ayra-Pardo. 1988. *Agrobactrium Tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. Electonic Journal of Biotecnology, 1:118-133
15. Ryder, M.H., M.E. Tate, Akerr. 1985. Virulance proportion of strains of *Agrobactrium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. Plant Physiol, 77:215-221.
16. Tanaka, N., M. Hayakawa, Y. Mano, H. Ohkawa, C. Matsui. 1985. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobactrium rhizogenes.* Plant Call Reports, 5:74-77.
17. Tolay, I., B. Erenoglu, V. Romheld, H.J. Braun, I. Cakmak. 2001. Phytosiderophore release in Aegilopsis and Triticum Species under zinc and iron deficiencies. Journal of Exprimental Botany, 52: 1093-1099.

18. Van Asma, F.M. 1995. Growth and Storage of *Agrobactrium*. In: *Agrobactrium* Protocol (Eds: Gartland, K.M.A. and M.R.Davy). pp 1-7. Humana press. Totowa, New Jersey.
19. Zambrysky, P., J. Tempe, J. Schell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobactrium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell, 56: 193-201.
20. Zhu, J., P.M. Ogar, B. Schrammeijer, P.J. Hooykas, S.K. Farrand. 2000. Minireview the basis of crown gall tumorgenesis. Journal pf Bacteeriology, 182: 3885-3895.
21. Zupan, J., T.R. Muth, O. Draper, P. Zambryski. 2000. The transfer of DNA from *Agrobactrium tumefaciens* into plants, a feast of fundamental insights. Plant Journal, 23: 11-28.