



بررسی تنوع مورفولوژیکی ریشه های مویین گیاه درمنه خزری

طیبه سلیمانی^۱، مهرناز کیهانفر^{۱*}، خسرو پیری^۱، طاهره حسنلو^۲
۱- گره بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی- دانشگاه بو علی سینا همدان
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ایران

* نویسنده مسئول: مهرناز کیهانفر، keyhanfar@basu.ac.ir

چکیده

درمنه خزری گیاه با اهمیتی می باشد که در درمان مالاریا به کار می رود. ماده موثره آن ترکیب آرتیمیزینین است. القاء ریشه های مویین در این گیاه به وسیله استرین AR15834 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* انجام گرفت. تائید مولکولی لاین های بدست آمده با استفاده روش PCR انجام شد. در این آزمایش ۳ فنوتیپ مختلف ریشه مویین شامل، فنوتیپ ریشه های مویین تیپک، ریشه های شبیه کالوس و فنوتیپ کالوس های ترنسفرم بدست آمد.

واژگان کلیدی: درمنه خزری، *Agrobacterium rhizogenes*، آرتیمیزینین، ریشه مویین

مقدمه

گیاه درمنه خزری با نام علمی *Artemisia annua* L. متعلق به تیره کاسنی می باشد. خاصیت دارویی اصلی این گیاه که آن را مهم و با ارزش ساخته است، به نوعی سزکوئیترین لاکتون به نام آرتیمیزینین و مشتقاتش وابسته است. برای سالهای متمادی از این گیاه به عنوان یک ماده ضد مالاریا در چین استفاده می شد. این خاصیت به دلیل وجود آرتیمیزینین می باشد. ریشه های مویین که به وسیله باکتری *Agrobacterium rhizogenes* با ویژگی هایی چون رشد سریع، دست ورزی ژنتیکی آسان و افزایش توان سنتز متابولیت های ثانوی با ارزش و دارا بودن قابلیت طراحی بیوراکتور به عنوان یک منبع تولید مداوم برای متابولیت های با ارزش به حساب می آیند (گیری و همکاران، ۲۰۰۰). تا کنون القاء ریشه های مویین در درمنه خزری ایرانی انجام نشده است. از آنجایی که آرتیمیزینین ترکیب با اهمیتی می باشد ایجاد سیستم کشت ریشه مویین در این گیاه دارای اهمیت فراوانی می باشد.

مواد و روش ها

استریل کردن و کشت بذور درمنه خزری

بذور درمنه خزری از مرکز تحقیقات جنگل و مرتع شهرستان نوشهر جمع آوری گردید و پس از استریل شدن به وسیله اتانول ۷۰ درصد (V/V) و هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (V/V)، در محیط کشت MS کشت گردیدند.

القاء ریشه های مویین به وسیله *A. rhizogenes*

از استرین AR15834 *A. rhizogenes* باکتری استفاده شد. برگ گیاهیچه های ۲ تا ۳ هفته ای، به عنوان ریزنمونه به کار رفت.

بررسی وجود ژن ژن *rolB* در ریشه های مویین

پس از حذف باکتری، استخراج DNA به روش کای و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از CTAB و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای بررسی وجود ژن *ro/B* (۷۸۰ bp) انجام گرفت. پرایمری با رشته فرورارد-5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' و رشته ریورس-5' TTAGGCTTCTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC-3 بکار رفت.

مقایسه لاین‌های ریشه مویین درمنه خزری

۶ ماه پس از تولید ریشه‌ها، لاین‌های ریشه مویین براساس مورفولوژی (تعداد انشعابات ریشه و تولید یا عدم کالوس) مورد مقایسه قرار گرفتند.

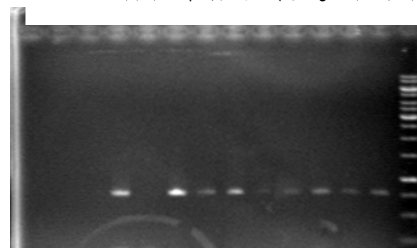
نتایج و بحث

۷ تا ۱۰ روز بعد از آلودگی ریزنمونه‌ها با باکتری، از محل‌های زخمی ریشه‌ها ظاهر شدند. در محل زخم نوعی ترکیبات فنولیکی از جمله استوسرینگون و بتاهیدروکسی استوسرینگون تولید می‌شود که برای تحریک بیماری‌زایی و انتقال T-DNA به ژنوم سلول گیاهی مناسب می‌باشد. (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

تائید مولکولی ریشه‌های مویین

مطابق انتظار تک باندهای مربوط به ریشه‌های مویین و باند تکثیر شده برای پلاسمید باکتری (کنترل مثبت) هم اندازه بوده و در ناحیه ۷۸۰ bp مارکر مولکولی قرار گرفته است (شکل ۱). چاهک مربوط به نمونه کنترل نیز بدون باند باقی مانده است.

۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز (۱) مارکر مولکولی (۱ kb، ۲-۹) ریشه‌های مویین، (۱۰) ریشه طبیعی گیاه و (۱۱) پلاسمید باکتری

مقایسه لاین‌های ریشه مویین ایجاد شده در گیاه درمنه خزری

در این مقایسه لاین‌ها به ۳ گروه زیر تقسیم شدند. لاین‌های ریشه مویین تیپیک، لاین‌های ریشه مویین تولید کننده کالوس، ریشه‌های مویین شبیه کالوس. فنوتیپ ۱ (لاین‌های با مورفولوژی ریشه‌های مویین تیپیک- ۴۲.۸۵ درصد) با ویژگی‌هایی چون، انشعابات فراوان، سرعت رشد خوب، غیر کالوس‌زا، مشخص می‌شود. این تیپ از ریشه‌های مویین در گیاهان زیادی ایجاد شد. فنوتیپ ۲ (تولید کننده کالوس - ۵۰ درصد) لاین‌های ریشه مویینی با سرعت رشد متفاوت و کالوس‌زایی فراوان. در این تیپ، حتی در برخی موارد اثری از ریشه باقی نمانده و کاملاً به شکل توده کالوس مشاهده می‌شود. فنوتیپ ۳ (لاین‌های ریشه شبیه کالوس^۱ - ۷.۱۴ درصد) این لاین‌ها ریشه‌های مشابه کالوس بودند. به عبارتی توده‌های بی‌شکل کالوسی (مانند آنچه در لاین‌های تولید کننده کالوس اتفاق می‌افتد) تولید نشد و کالوس‌ها در قالب شکلی شبیه به ساختار ریشه رشد کردند.

^۱.Callus-like Root or Rooty Callus



شکل ۲. مقایسه فنوتیپ های ریشه مویین ایجاد شده در درمنه خزری. (A) فنوتیپ ریشه مویین تیپیک، (b) ریشه شبیه کالوس، (c) فنوتیپ تولید کننده کالوس

بر اساس منابع موجود دو سری از ژن های پلاسمید Ri در پروسه القاء ریشه مویین و مورفولوژی آن در گیر می باشند، ژن های *rol* (*root loci*) در ناحیه T_L (*rolA, B, C, D*) و ژن های *aux* که در ناحیه T_R از T-DNA از پلاسمید Ri قرار گرفتند. مطالعات

اخیر نشان داده که *rolB* یکی از آنکوژن های با اهمیت است زیرا وقتی غیر فعال می شود، تراریختی با باقی ژن های آنکوژن برای ایجاد فنوتیپ ریشه مویین، باطل می شود (تزفیرا و سیتووسکی، ۲۰۰۸). ژن های *aux* از نظر تاثیر بر مورفولوژی ریشه های مویین در چندین گونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفتند. (میرجلیلی و همکاران، ۲۰۰۹). وجود تیپ های مختلف مورفولوژی در ریشه های مویین گیاه *Datura tatula* (پنگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۸) و *Withania somnifera* (باندیوپادهی^۱ و همکاران ۲۰۰۷)) گزارش کردند. همه لاین های بدست آمده دارای اهمیت بوده و بیومس و میزان متابولیت ثانویه آرتیمیزینین در آنها به منظور انتخاب بهترین لاین برای تولید آرتیمیزینین قابل اندازه گیری است.

نتیجه گیری کلی

- ۱- ایجاد ریشه های مویین در این گیاه با استرین مورد استفاده با موفقیت انجام گرفت.
- ۲- پس از گذشت حدوداً ۶ ماه تیپ های مختلف مورفولوژی شامل، ریشه های مویین تیپیک، کالوس های ترنسفرم و ریشه ی شبیه کالوس ایجاد گردید.

منابع

۱. Bandyopadhyay, M., Jha, S., Tepfer, D. (2007). "Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*". Plant cell Rep. 26: 599-609.
2. Cai, D., M. Kleine, S. Kifle, H.J. Horloff, N.N. Sandal, K.A. Marcker, R.M.K Lankhorst, E.M.J. Salentijn, W. Lange, W.J., Stiekema, V. Wyss, F.M.W. Grundler and Jung C. (1997). "Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet". Science. 275: 832-834.
3. Giri, A., and Narasu, L. (2000). "Transgenic hairy root: recent trends and applications". Biotechnology advances. 18:1-22.
4. Mirjalili, M. H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R. M., and Palazón, J. (2009). "Steroidal Lactones from *Withania somnifera*, an Ancient Plant for Novel Medicine". Molecules. 14, 2373-2393.

^۱ . Peng

3. Bandyopadhyay

Investigating morphological types of *Artemisia annua* hairy roots

Soleimani Tayebe¹, Keyhanfar Mehrnaz^{*1}, Piri Khosro¹, Hasanloo Tahere²

1- department of biotechnology, agricultural grope, bu-ali sina university

2-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

* Corresponding E-mail address keyhanfar@basu.ac.ir

Abstract (Times New Roman 12 Bold):

Artemisia annua is an important medicinal plant, used in malaria treatment. Artemisinin is an important secondary metabolites in this plant. In this study, hairy roots were induced in this plant by *Agrobacterium rhizogenes* strain AR15834. For molecular determination in the obtained lines, PCR analysis was used. Studying the morphology of the hairy roots, revealed three different phenotypes including, typical hairy roots, callus like roots and transformed callus obtained in this experiment.

Keywords: *Artemisia annua*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root and phenotype