بررسی کارایی روش غوطه‌وری در القای ریشه مویین هویج به منظور کشت درون شیشه‌ای قارچ میکوریز آربوسکولار

مرضیه یزدان‌پناه [۱]، ابراهیم صداقتی [۲]، پژمان خدایگان [۲]، حسین علایی [۲]، محمودرضا رقامی [۳]
۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، ۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، ۳- استادیار گروه باغبانی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

چکیده
میکوریزا نوعی رابطه همزیستی بین برخی قارچ‌ها با ریشه گیاهان است. در بین انواع مختلف میکوریزا، میکوریز آربوسکولار، رایج‌ترین نوع همزیستی بین میکروارگانیسم‌های خاکزی و گیاهان می‌باشد. در سال‌های اخیر، تلاش‌های بسیاری برای کشت درون شیشه‌ای آن‌ها انجام شده است. در این تحقیق تولید ریشه‌های مویین از ریشه و دمبرگ هویج با استفاده از روش غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتریایی برای کشت همراه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مورد بررسی قرار گرفت. بذور هویج پس از ضدعفونی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ کشت شدند. ریشه و دمبرگ چهار هفته‌ای با استرین‌های ۱۵۸۳۴ ، MSU و A۴ باکتری *Rhizobium rhizogenes* مایه‌زنی و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ کشت شدند. نتایج نشان داد هر سه استرین توانایی القا تولید ریشه مویین را دارند. استرین MSU در ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه موفقیت بیشتری نشان داد. ریشه‌های تراریخته نسبت به ریشه‌های معمولی ضخامت، انشعاب و سرعت رشد بیشتری داشتند.

واژه‌های کلیدي: ریشه مویین هویج، غوطه‌وری، قارچ میکوریز آربوسکولار، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه
خاک دارای میکروارگانیسم‌های متعددی است که نقش بعضی از آن‌ها مانند قارچ‌های میکوریزی برای زندگی گیاهان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شایع‌ترین و مرسوم‌ترین قارچ‌های خاک هستند که تقریبا با ۸۰ درصد گیاهان دنیا ارتباط همزیستی دارند (Btaszkowski, ۱۹۹۴). این قارچ‌ها منجر به افزایش جذب آب و عناصر غذایی پر مصرف و کم مصرف مانند فسفر، ازت، پتاسیم، روی و غیره، کاهش عوامل بیماریزا و محافظت گیاهان در برابر این عوامل می‌شوند (Hooker, ۱۹۹۴; Rausch et al., ۲۰۰۱). همچنین با جذب عناصر مضر و سمی موجود در خاک، باعث افزایش مقامت گیاهان به مقادیر زیاد این عناصر خاک می‌شوند (Carney and Smith, ۱۹۹۳) و قادرند با تولید هورمون‌های گیاهی بر میزان رشد گیاهان تاثیر بگذارند (Dube, ۱۹۹۰). مهم‌ترین محدودیت برای به‌کارگیری وسیع همزیستی میکوریزی در اراضی زراعی و باغی، طبیعت همزیست اجباری بودن این قارچ‌هاست که تولید صنعتی مایه تلقیح این قارچ‌ها را تاکنون با مشکل مواجه کرده است. برای حل این مشکل، روش‌های مختلفی از جمله هیدروپونیک، آئروپونیک و سیستم کشت درون شیشه‌ای[۶۲] ارائه گردیده است. اولین گزارش مبنی بر استفاده از ریشه‌های القایی حاصل از تلقیح باکتری *R. rhizogenes* به‌منظور کشت ریشه و قارچ در سال ۱۹۸۷ توسط موگنیر[۶۳] و موسه انتشار یافت. آنها توانستند ریشه‌های تراریخته پیچک (*Convolvulus sepium*) را با اسپور قارچ *Glomus mosseae* و در محیط سنتز شده کلونیزه نمایند. شاخصه‌ی ریشه‌های مویین ناشی از *R. rhizogenes*، شامل رشد سریع ریشه‌ها و شاخه‌های زیاد با تراکم بیوماس بالا روی یک محیط عاری از فیتوهورمون است (Majumdar et al., ۲۰۱۱). باکتری *R. rhizogenes* یک باکتری خاکزی است که موجب تولید ریشه مویین در محل زخم می‌شود. انتقال T-DNA[۶۴] پلاسمید Ri از این باکتری به سلول‌های گیاهی منجر به تولید ریشه‌های مویین می‌شود. در سال‌های اخیر از گیاه هویج (*Daucus carota* L.) برای آغاز کشت همراه با قارچ میکوریز آربوسکولار استفاده شده است. ترکیبی از ریشه‌های تراریخته هویج و اسپورهای ضدعفونی شده قارچ میکوریز آربوسکولار، یک روش موثر برای تولید تعداد فراوانی اسپور و میسیلیوم فراهم می‌کند. روش‌های مختلفی برای ترانسفوماسیون و تولید ریشه مویین وجود دارد که بسته به نوع استرین باکتری و گیاه مورد استفاده، یک روش استفاده می‌شود. در این مطالعه القای ریشه مویین هویج به‌منظور استفاده در کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با استفاده از روش غوطه‌وری ریزنمونه‌های مختلف در سوسپانسیون استرین‌های باکتری *R. rhizogenes* ارائه می‌گردد.

---
[۶۲] *In vitro* culture
[۶۳] Mugnier
[۶۴] Transfer DNA

مواد و روش‌ها

آماده سازی استرین‌های باکتری *R .rhizogenes*

استرین‌های ۱۵۸۳۴، MSU و A۴ باکتری *R. rhizogenes* از مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد و کلکسیون بیماری‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه شدند. هر کدام از استرین‌ها روی محیط کشت LB[۶۵] جامد کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سوسپانسونی از هر کدام از استرین‌ها با انتقال یک لوپ از باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع تهیه و به مدت یک شبانه‌روز در گرداننده با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی در لوله فالکون ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب ته نشین شده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت دو ساعت در گرداننده مشابه شرایط قبل قرار گرفتند.

تهیه ریزنمونه‌های هویج

بذور هویج در آب حاوی مایع ظرفشویی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر استریل، یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. شستشوی نهایی با آب مقطر استریل سه مرتبه به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. بذور ضدعفونی شده در محیط کشت MS[۶۶] حاوی سه درصد ساکارز و ۸/۰ درصد آگار کشت گردیدند.

هم‌کشتی و القای ریشه مویین با روش غوطه‌وری

چهار هفته بعد از کشت بذور هویج، ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه در شرایط استریل جدا و در محیط کشت MS کشت و به مدت دو روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس پیش تیمار شدند. به‌منظور تولید ریشه مویین، نقاط مختلف ریزنمونه‌ها با اسکالپل کمی زخمی شده و به مدت ۱۰ تا ۲۰ ثانیه در سوسپانسیون باکتریایی غوطه‌ور شدند. سپس هر کدام از ریزنمونه‌ها به‌صورت مجزا روی کاغذ صافی استریل خشک و روی محیط کشت MS کشت شدند. برای هر تیمار ۱۰ تکرار از ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه در نظر گرفته شد. تیمار شاهد شامل ریزنمونه‌هایی بود که توسط آب مقطر استریل تلقیح شده بودند.

حذف آلودگی از سطح ریزنمونه‌ها

برای رفع آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. بعد از سه هفته ریشه‌های مویین از ریشه و دمبرگ جدا شده و به محیط کشت MS/۲ حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. پس از رشد این ریشه‌ها، قطعاتی به طول سه سانتی‌متر از ریشه جدا و به محیط کشت MS/۲ حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. در نهایت قطعاتی از نوک ریشه جدا و به محیط کشت MSR[۶۷] فاقد آنتی بیوتیک منتقل و برای رشد و برقراری رابطه همزیستی بین قارچ و ریشه‌های مویین در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تاثیر استرین‌های باکتری *R. rhizogenes* و نوع ریزنمونه بر درصد ظهور و تولید ریشه مویین

برای تعیین بهترین استرین باکتری *R. rhizogenes* جهت القای ریشه مویین، سه استرین MSU، A۴ و ۱۵۸۳۴ مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین برای تعیین بهترین نوع ریزنمونه، از ریشه و دمبرگ گیاهچه هویج رشد کرده در شرایط استریل آزمایشگاهی، استفاده شد. تولید یا عدم تولید و نیز درصد تولید ریشه‌های مویین القایی، با شمارش تعداد تکرارهای دارای ریشه مویین تولید شده پس از گذشت سه هفته بررسی شد.

نتایج و بحث

ریشه‌های مویین ۸ تا ۱۴ روز بعد از تلقیح باکتری در ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه ظاهر شدند. درصد تشکیل ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه هویج با سه استرین باکتری *R. rhizogenes* در جدولهای ۱ و ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود استرین MSU از کارایی بالایی جهت ترانسفورماسیون در هر دو ریزنمونه ریشه و دمبرگ برخوردار بود ولی در استرین A۴ این میزان نسبت به دو استرین دیگر کمتر بود.

جدول ۱- تاثیر نوع استرین باکتری *R. rhizogenes* در تولید ریشه‌های القایی در ریزنمونه دمبرگ

نوع استرین باکتری	تعداد کل ریزنمونه	تعداد ریزنمونه ریشه‌دار شده	درصد القای ریشه مویین

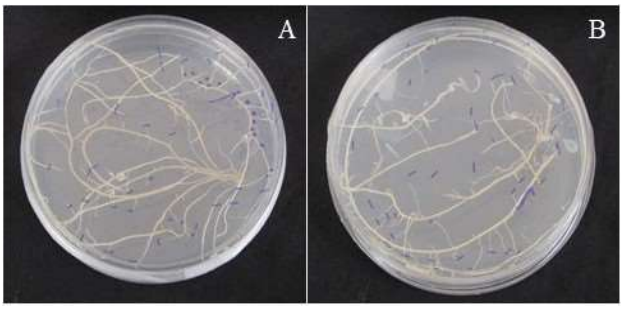
[۶۵] Luria Bertani
[۶۶] Murashige and Skoog
[۶۷] Modified Strullu-Romand

۲۰	۲	۱۰	A۴
۷۰	۷	۱۰	MSU
۵۰	۵	۱۰	۱۵۸۳۴

جدول ۲- تاثیر نوع استرین باکتری *R. rhizogenes* در تولید ریشه‌های القایی در ریزنمونه ریشه

درصد القای ریشه مویین	تعداد ریزنمونه ریشه‌دار شده	تعداد کل ریزنمونه	نوع استرین باکتری
۱۰	۱	۱۰	**A۴**
۶۰	۶	۱۰	**MSU**
۴۰	۴	۱۰	**۱۵۸۳۴**

مورفولوژی رشدی این ریشه‌ها منطبق بر خصوصیات مورد انتظار شامل رشد سریع با انشعابات زیاد بود (شکل ۱). در این بررسی دو نوع ریشه مشاهده شد که نوع اول ریشه‌های معمولی با رشد آهسته، انشعابات کم و زمین‌گرایی منفی بودند. نوع دوم ریشه‌های تاریخته بودند که در مقایسه با ریشه‌های معمولی هویج اندکی ضخیم‌تر، دارای رشد سریع با انشعابات زیاد و فاقد زمین‌گرایی بودند. نوع اول در تیمار کنترل ریشه بعد از ۱۰ روز و در تیمار کنترل دمبرگ، بعد از ۲۱ روز مشاهده شدند.



شکل ۱- ریشه‌های تاریخته حاصل از استرین‌های مختلف *R. rhizogenes* در ریزنمونه‌های دمبرگ (A) و ریشه (B)

تاکنون القای ریشه مویین هویج جهت کشت درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف قارچ میکوریز آربوسکولار با استفاده از دیسک هویج و با روش‌های مختلفی صورت گرفته است. هویج یکی از گونه‌های گیاهی بسیار حساس برای تولید ریشه مویین می‌باشد و می‌تواند درصد بالایی از ریشه‌های تاریخته از طریق تلقیح با *R. rhizogenes* تولید کند (Christey and Braun, ۲۰۰۴). رضایی‌دانش و همکاران (۲۰۰۶) برای کشت همراه گونه‌های از جنس *Glomus* و *Gigaspora* از دیسک هویج استفاده کردند. در این بررسی با استفاده از سه روش مختلف و استرین‌های Arif، AG۱، A۴v و A۴s القای ریشه‌زایی با موفقیت انجام شد. نوع ریزنمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه مویین دارد. از میان ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه، ریزنمونه دمبرگ برای القای ریشه مویین موفق‌تر بوده و به‌دلیل قابلیت تفکیک ریشه‌های مویین و ریشه‌های معمولی مناسب‌تر به نظر می‌رسد. از آن‌جا که باکتری *R. rhizogenes* از طریق زخم وارد گیاه می‌شود، زخمی کردن ریزنمونه‌ها برای القای ریشه مویین ضروری می‌باشد. باید دقت کرد که زخم ایجاد شده بسیار سطحی باشد و حداکثر سه ناحیه از ریزنمونه زخمی شود. درصورتی‌که زخم ایجاد شده عمیق باشد به‌علت تماس تمام سطح ریزنمونه با باکتری، ریزنمونه در فاصله زمانی کوتاه تخریب می‌شود.

در این پژوهش، تفاوت میزان رشد ریشه‌های مویین حاصل از یک استرین باکتری در ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ ناشی از تفاوت در تعداد رونوشت و محل ورود ژن‌های Ri به درون ژنوم گیاهی و همچنین چگونگی تاثیر ژن‌های *rol* می‌باشد (Doran, ۲۰۰۲). بیان این ژن‌ها، سطوح داخلی هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی و یا میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطوح داخلی هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهد (Shen et al., ۱۹۸۸). اکسین تاثیر ویژه‌ای بر رشد ریشه‌های مویین، ازدیاد انشعابات و توقف رشد خطی دارد. با توجه به اثرات متقابل گیاه-پاتوژن، نوع استرین باکتری، شرایط آماده سازی باکتری و استفاده از آن در غلظت مناسب و همچنین

مدت زمان غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتریایی، در القای بهتر ریشه مویین موثر می‌باشند. به‌طوری‌که غلظت بالای باکتری و افزایش زمان غوطه‌وری منجر به رشد بیش از حد باکتری و در نتیجه پوسیدگی ریزنمونه می‌شود. در روش ارائه شده به‌علت تماس تمام سطح ریزنمونه با سوسپانسیون باکتری R. rhizogenes درصد آلودگی ریزنمونه و از بین رفتن بافت گیاهی نسبتا بالا بود و استرین A۴ بسیار ضعیف عمل کرد. عملکرد پایین استرین A۴ می‌تواند به‌دلیل حضور دزهای مختلفی از T-DNA باکتری در سلول‌های گیاهی و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در آن‌ها باشد (Nguyen et al., ۱۹۹۲). نتایج نشان داد که استفاده از باکتری با غلظتی معادل ۱-۵/۰، سبب افزایش ریشه‌زایی می‌گردد. این واضح است که انتخاب یک استرین باکتریایی برای تولید کشت‌های ریشه تاریخته خیلی به گونه گیاهی وابسته است و باید به‌صورت تجربی تعیین شود. کاهش غلظت محیط کشت MS منجر به رشد بهتر ریشه‌ها گردید. در واقع ریشه‌های مویین به دلیل حساس بودن به فشار ایزوتونیک محیط، برای استقرار، رشد مناسب و حفظ ساختار به محیط کشت رقیق شده‌ای از MS نیاز دارند. در نهایت با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین بیان کرد که در این روش به علت غوطه‌وری و تماس کامل ریزنمونه‌ها با باکتری، درصد تولید ریشه مویین نسبت به روش‌های دیگر مانند تزریق با سوزن کمتر می‌باشد.

منابع

Btaszkowski J. ۱۹۹۴. Arbuscular Fungi and Mycorrhizae (Glomales) of the Hel Peninsular, Poland. Mycorrhiza, ۵: ۷۱-۸۸.

Carney J.W.G. and Smith S.E. ۱۹۹۳. The influence of monovalent cations on effluex of phosphate from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Mycological Research, ۹۷(۱۰): ۱۲۶۷-۱۲۷۱.

Christey M.C. and Braun R.H. ۲۰۰۴. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. (In: Pena, L. ed). Methods in Molecular Biology, ۲۸۶: ۴۷-۶۰.

Doran P.M. ۲۰۰۲. Properties and applications of hairy-root cultures. Plant Biotechnology and Transgenic Plants (Eds. K. M. okasman-caldenty and W. H. Barz). Mercel dekker Inc.new York, ۴: ۱۴۳-۱۶۲.

Dube H.C. ۱۹۹۰. An Introduction to Fungi. Vikas Publishing House PVTLTD, New Dehli. ۶۰۸p.

Hooker J.E. ۱۹۹۴. VAMF induced alteration in poplar root system morphology. Plant and Soil, ۱۴۵: ۲۰۷-۲۱۴.

Majumdar S., Garai S., and Jha S. ۲۰۱۱. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant cell reports, ۳۰: ۹۴۱-۹۵۴.

Mosse B. and Hepper C. ۱۹۷۵. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiological Plant Pathology, ۵: ۲۱۵-۲۲۳.

Mosse B. and Thompson J.P. ۱۹۸۴. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. Canadian Journal of Botany, ۶۲: ۱۵۲۳-۱۵۳۰.

Mugnier J. and Mosse B. ۱۹۸۷. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopathology, ۷۷: ۱۰۴۵-۱۰۵۰.

Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P. and Guckert A. ۱۹۹۲. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. Plant cell reports, ۱۱: ۴۲۴-۴۲۷.

Rausch C., Daram P., Brunner S., Jansa J., Laloi M., Leggewie G., Amrhein N. and Bucher M. ۲۰۰۱. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. Nature, ۴۱۴: ۴۶۲-۴۷۰.

Rezaee-Danesh Y., Mohammadi Goltapeh E., Alizadeh A. and Modarres Sanavy M. ۲۰۰۶. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. Biological Sciences, ۲۰: ۸۷-۹۱.

Shen W.H., Petit A., Guern J. and Tempe J. ۱۹۸۸. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. Proceeding of the National Academy of Sciences, ۸۵: ۳۴۱۷-۳۴۲۱.

Abstract

Mycorrhizal is a form of symbiotic relationship between plants root and some fungi. Among the different types of mycorrhizal, arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) is the most common type of symbiosis between plants and soil microorganisms. In recent years, there have been many attempts to in vitro culture of these fungi. This research describes the induction of carrot stem and petiole hairy roots using explants immersion in the bacterial suspension for monoxenic culture of AMF. Carrot seeds were disinfected and cultured on Murashige and Skoog medium. ۴ weeks old root and petiole were inoculated with Rhzobium rhizogenes strains MSU, ۱۵۸۳۴ and A۴ and cultured on Murashige and Skoog medium. Results showed that all three strains could initiate hairy root production. MSU

Strain had more success in the petiole and root explants compared to other strains. Transgenic roots compared to normal roots were thicker, more branching and higher growth rate.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Carrot hairy root, Immersion, In vitro culture