[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

بررسی القای ریشهٔ مویین در برخی از گونه‌های سردهٔ مریم‌گلی

رضا نوروزی[۱،۲*]، مصباح بابالار[۲] و مسعود میرمعصومی[۳]

دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳/ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۹/ چاپ: ۱۳۹۶/۶/۳۱

[۱]گروه علوم‌گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکدهٔ کشاورزی مشگین‌شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲]گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
[۳]دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: reza.norouzi@uma.ac.ir

چکیده. القای ریشهٔ مویین در گیاهان از طریق ورود T-DNA از پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* به ژنوم سلول‌های گیاهی انجام می‌شود. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر نوع سویهٔ باکتری و گونهٔ گیاهی در القای ریشهٔ مویین در دو گونهٔ بوم‌ویژهٔ ایران (*Salvia eremophila* و *Salvia reuterana*) و پنج گونهٔ غیربوم‌ویژهٔ (*Salvia macrosiphon*، *Salvia multicaulis*، *Salvia nemorosa*، *Salvia verticellata* و *Salvia virigata*) سردهٔ مریم‌گلی توسط چهار سویهٔ باکتری شامل A۴، ATTC۱۵۸۳۴، ۱۷۲۴، ۲۶۵۹ به صورت آزمایش فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ریزنمونه‌های ساقه و دم‌برگ قادر به تولید ریشهٔ مویین نبودند، درحالی‌که تقریباً تمام ریزنمونه‌های برگی ریشهٔ مویین تولید کردند. ماهیت تراریخت ریشه‌های مذکور از طریق ردیابی بخشی از ژن *rol* C واردشده به ژنوم گیاهی به اثبات رسید. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* و گونه‌های مختلف مریم‌گلی اثر معنی‌داری بر تعداد و فراوانی ریشه‌های مویین دارند. بیشترین تعداد ریشهٔ مویین به‌ازای هر ریزنمونه (۵/۱۲ ریشهٔ مویین) و بالاترین فراوانی ریشه‌زایی (۸۲٪) در اثر تلقیح گونهٔ *S. macrosiphon* با باکتری سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. همچنین، بیشترین تعداد ریشهٔ مویین به ازای هر ریزنمونه در گونه‌های *S.eremophila* (۳/۳۲ ریشهٔ مویین) و *S. reuterana* (۳/۹۲ ریشهٔ مویین) توسط باکتری A۴، در گونه‌های *S. nemorosa* (۲/۶ ریشهٔ مویین)، *S. multicaulis* (۴/۳۶ ریشهٔ مویین) و *S. verticillata* (۵ ریشهٔ مویین) توسط سویهٔ ۲۶۵۹ و در گونهٔ *S.virigata* (۳ ریشهٔ مویین) توسط سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. به‌طورکلی، به‌نظر می‌رسد نوع گونهٔ گیاهی، ریزنمونه و سویهٔ باکتریایی مورد استفاده نقش به‌سزایی در میزان القای ریشهٔ مویین در سردهٔ مریم‌گلی دارد.

واژه‌های کلیدی. *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه‌های تراریخت، ریزنمونهٔ برگی

Investigation of hairy root induction in some *Salvia* L. species

Reza Norouzi[1,2*], Mesbah Babalar[2] & Masoud Mirmasoumi[3]

Received 24.07.2016/ Accepted 19.12.2016 / Published 22.09.2017

[1]Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2]University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3]Department of Botany, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran
*Correspondent author: reza.norouzi@uma.ac.ir

Abstract. Hairy root induction in plants is the result of the insertion of T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* into the plant genome. The present study was conducted to investigate the effect of bacterium strain and plant species type on hairy root induction in two endemic (*Salvia eremophila and S. reuterana*) and five non-endemic (*S. macrosiphon, S. multicaulis, S. nemorosa, S. verticellata and S. virigata*) *Salvia* by four bacteria strains including 1724, 2659, ATCC-15834 and A4. Petiole and stem explants were not capable of inducing hairy roots, while almost all leaf segments produced it. Confirmatory studies were carried out by direct detection of inserted *rol* C by the PCR. The results showed that different *Agrobacterium rhizogenes* strain and *Salvia* spices had significant effect on hairy roots number and frequency. The infection of *S. macrosiphon* via *A. rhizogenes* strain ATCC15834 showed the highest number of infected roots per explant (5.12 hairy roots) and root frequency (82%). The highest number of hairy root per explant in *S. eremophila* (3.32 hairy roots) and *S. reuterana* (3.92 hairy roots) were achieved by inoculation with strain A4. Strain 2659 produced the highest hairy roots number in *S. nemorosa* (2.6 hairy roots), *S. multicaulis* (4.36 hairy roots) and *S. verticillata* (5 hairy roots). Also hairy roots formation occurred at the highest number in *S. virigata* (3 hairy roots) with infection by strain ATCC15834.

Keywords. *Agrobacterium rhizogenes*, transformed root, leaf explant

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

مقدمه

گیاهان عالی از زمان حضور انسان در کرهٔ خاکی کلید رفاه او بوده‌اند. بشر، در طول قرن‌ها همواره از مواد دارویی موجود در پیکرهٔ گیاهان برای تأمین سلامتی و درمان بیماری‌های خود استفاده کرده است. ویژگی دارویی‌بودن گیاهان به‌واسطهٔ متابولیت‌های ثانویه‌ای است که طی واکنش‌های متابولیسمی در پیکرهٔ آنها تولید می‌شوند و تجمع می‌یابد (Hussain *et al.*, 2012). ریشهٔ برخی از خانواده‌های گیاهی محل بیوسنتز یا تجمع متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون آلکالوئیدها، پلی‌استیلن، سزکوئی‌ترپن‌ها، فنل‌ها و فلاونوئیدهاست. همچنین، این ترکیبات می‌توانند در ریشه‌های مویین این گیاهان نیز تولید شوند (Sharma *et al.*, 2013). امروزه، کشت ریشه‌های مویین، به‌دلیل رشد سریع، ثبات ژنتیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی، نداشتن زمین‌گرایی، سهولت نگهداری و قابلیت رشد در محیط‌های کشت فاقد هورمون و قابلیت تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، منبع مناسب و ارزشمندی جهت تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی، متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع و آنتی بادی‌های مونوکلونال است (Shanks & Morgan, 1999; Pawar & Maheshwari, 2004). این ریشه‌ها از تراریخت‌شدن بافت‌های گیاهی توسط باکتری گرم منفی و خاکزی *Agrobacterium rhizogenes* به‌وجود می‌آیند. این باکتری با واردکردن یک قطعه T-DNA از پلاسمید القاکنندهٔ ریشه (پلاسمید Ri)، مشتمل‌بر چهار ژن به *rol* A، *rol* B، *rol* C و *rol* D به ژنوم سلول‌های گیاهی و بیان پایدار ژن‌های *rol* در سلول‌های گیاه، به‌ظهور فنوتیپ ریشه‌های مویین منجر می‌شود (Bulgakov, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2005). فرایند تراریخت شدن بافت‌های گیاهی و القای ریشهٔ مویین در آنها تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که شامل گونه، سن و نوع بافت گیاهی و وضعیت فیزیولوژیکی آن، سویه و غلظت سوسپانسیون باکتریایی است. بنابراین، به‌منظور بهینه‌سازی تولید ریشه‌های مویین، بایستی برهم‌کنش سویه‌های مختلف باکتری و ژنوتیپ‌های گیاهی تحت بررسی قرار گیرد (Hu & Du, 2006; Kumar *et al.*, 2006).

سردهٔ *Salvia* (مریم‌گلی) متعلق به تیرهٔ نعنائیان است و بالغ بر ۹۰۰ گونه دارد که در مناطق گرمسیر و معتدل پراکنش دارند (Barrett *et al.*, 2000). گونه‌های این سرده اغلب معطر هستند و استفاده‌های متعدد دارویی و درمانی دارند و در طب سنتی به منظور درمان اگزما، سرماخوردگی، برونشیت، ناراحتی‌های گوارشی، گلودرد و سل مورد استفاده قرار می‌گیرند (Li *et al.*, 2013). همچنین، مطالعات امروزی حاکی از خواص ضد باکتری، ضد قارچی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی گونه‌های مختلف سردهٔ مریم‌گلی است (Kamatou *et al.*, 2008). این سرده در ایران ۵۸ گونه دارد که ۱۷ گونهٔ آن بوم‌ویژهٔ ایران هستند. کشور پهناور ایران که دارای اقلیم‌های متنوعی است از لحاظ تعداد گونه‌های گیاهی بسیار غنی است و در این میان گونه‌های مختلف سردهٔ مریم‌گلی از گونه‌های بارز پوشش گیاهی ناحیه ایرانو-تورانی محسوب می‌شود (Rabbani *et al.*, 2005; Rechinger, 1982). امروزه، مطالعات مربوط به انتقال ژن در گیاهان توسط *A. rhizogenes* و تولید ریشه‌های مویین با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه با میزان بالا بسیار گسترش یافته است. این درحالی‌است که علی‌رغم تنوع گونه‌ای قابل ملاحظهٔ سردهٔ مریم‌گلی در کشور ایران، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه القای ریشه‌های مویین در این گونه‌ها صورت نگرفته است. بنابراین، هدف مطالعهٔ حاضر، بررسی القای ریشهٔ مویین در برخی گونه‌های سردهٔ مریم‌گلی رویش‌یافته در ایران با استفاده از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای هفت گونهٔ مریم‌گلی شامل دو گونهٔ بوم‌ویژه ایران و پنج گونهٔ غیربوم‌ویژهٔ ایران، از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و همچنین از هرباریوم دانشکدهٔ زیست-شناسی دانشگاه شهیدبهشتی تهیه شد (جدول ۱). به‌منظور تولید گیاهچه‌های استریل بذرها پس‌از ضدعفونی سطحی توسط اتانول ۷۰ درصد و محلول پنج درصد هیپوکلریت‌سدیم (هرکدام به مدت ۱۰ دقیقه) و شست‌وشو با آب مقطر در محیط کشت‌های MS فاقد هورمون و حاوی ۳ درصد درصد ساکارز، کشت و تا زمان جوانه-زنی در اتاقک رشد تاریک با دمای ۲۵ ± ۲℃ نگه داشته شدند. به‌محض ظهور گیاهچه، ظروف کشت به دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۴۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

جدول ۱- مشخصات هرباریومی گیاهان تحت آزمایش.

Table 1. Herbarium characteristic of studied plants.

گونهٔ گیاهی	نام فارسی	محل جمع‌آوری	شماره هرباریومی	توضیحات
S.. eremophila	مریم‌گلی بیابانی	جیرفت- کرمان، ارتفاع: ۷۹۰ متر	۲۶۵۶۶*	بوم‌ویژه ایران
S. macrosiphon	مریم‌گلی لوله‌ای	روستای نعمت‌آباد، قروه- کردستان، ارتفاع: ۲۱۹۵ متر	۲۶۰۱۶*	غیربوم‌ویژه ایران
S. multicaulis	مریم‌گلی ارغوانی	سرچشمه، شهمیرزاد- سمنان، ارتفاع: ۲۰۰۰ متر	۱۶۸۷۸*	غیربوم‌ویژه ایران
S. nemorosa	مریم‌گلی مزرعه‌روی	جادهٔ چالوس، میدانک- البرز، ارتفاع: ۲۱۲۶	۸۵۰۰۹۸۵**	غیربوم‌ویژه ایران
S. reuterana	مریم‌گلی اصفهانی	جادهٔ چالوس، بیلقان- البرز، ارتفاع ۱۳۶۳ متر	۸۵۰۱۰۰۱**	بوم‌ویژه ایران
S. verticellata	مریم‌گلی بنفش	جادهٔ چالوس، بین آسارا و ماهان- البرز، ارتفاع: ۱۸۶۴	۸۵۰۰۹۹۶**	غیربوم‌ویژه ایران
S. virigata	مریم‌گلی ترکه‌ای	نجف‌آباد- اصفهان، ارتفاع: ۱۶۴۲ متر	۲۸۲۹۵*	غیربوم‌ویژه ایران

*تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ** تهیه‌شده از هرباریوم دانشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه شهیدبهشتی.

*Obtained from the Research Institute of Forests & Rangelands, **Obtained from the herbarium of the Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری

به‌منظور القای ریشهٔ مویین از چهار سویهٔ *A. rhizogenes* شامل A۴، ATTC۱۵۸۳۴، ۱۷۲۴، ۲۶۵۹ استفاده شد. یک تک‌کلون از هر سویه در ارلن‌های ۱۰۰ ml حاوی ۲۵ ml از محیط LB مایع با pH برابر ۷ کشت داده شد. سپس، ارلن‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در تاریکی روی شیکر با سرعت ۱۰۰ rpm در دمای ۲۶℃ قرار گرفتند. غلظت مناسب سوسپانسیون باکتریایی برای تلقیح، در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) بین ۰/۴ تا ۰/۸ تنظیم شد.

آماده‌سازی و تلقیح ریزنمونه‌ها

جهت تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از برگ‌ها و دمبرگ‌ها و ساقه‌های جوان گیاهچه‌های چهارهفته‌ای گونه‌های مختلف مریم-گلی استفاده شد. ریزنمونه‌ها با استفاده از اسکالپل به قطعات ۲ سانتی‌متری تقسیم شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند. آن‌گاه، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت جامد MS عاری از هورمون قرار گرفتند و به اتاق رشد با دمای ۲۵ ±۲℃ و تاریکی منتقل شدند. پس‌از گذشت ۷۲ ساعت از تلقیح و اطمینان از ورود ژن‌های ریشه‌زایی، ریزنمونه‌ها به‌منظور حذف باکتری به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ppm آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. سپس، این عمل با فواصل ۴-۲ روز، همراه با کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک محیط کشت، به‌صورت ۲۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ ppm انجام گرفت. پس‌از حذف کامل باکتری، ریزنمونه‌ها در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک قرارگرفتند.

بررسی ماهیت تراریخت ریشه‌های مویین

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه‌های طبیعی غیرتراریخت (شاهد منفی) به‌روش دویل و دویل انجام پذیرفت (Doyle & Doyle, 1987). به‌منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش سامبروک و راسل استفاده شد (Sambrook & Russell, 2001). سپس، DNA به‌دست‌آمده، به‌همراه دوجفت آغازگر اختصاصی با توالی‌های 5′-CT-CCTGACATCAAACTCGTC-3′ و 5′-TGCTTC-GAGTTATGGGTACA-3′ برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol* C (۵۸۶ bp) وارد واکنش PCR شد. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ به‌مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه (با اندازهٔ ۵۰ جفت بازتولید شرکت Fermentas) الکتروفورز شدند. ژل پس‌از رنگ‌آمیزی در حمام اتیدیوم‌برماید در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro مشاهده شد.

محاسبات آماری داده‌ها

بررسی القای ریشهٔ مویین به‌صورت آزمایش فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. ریزنمونه‌هایی که با باکتری تلقیح نشده بودند به منزلهٔ شاهد در نظر گرفته شدند. برای پی‌بردن به کیفیت القای ریشه در ریزنمونه‌های برگی گونه‌های تحت آزمایش دو شاخصِ تعداد ریشه‌های مویین تشکیل‌شده به‌ازای هر ریزنمونه و فراوانی ریشه‌زایی تحت ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ریشه‌زایی برای هر تکرار از تقسیم تعداد ریزنمونه‌هایی که ریشهٔ مویین تولید کرده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های تلقیح‌شده توسط باکتری در هر پتری برحسب درصد به‌دست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نگارش ۹/۱ انجام گرفت و میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

نتایج

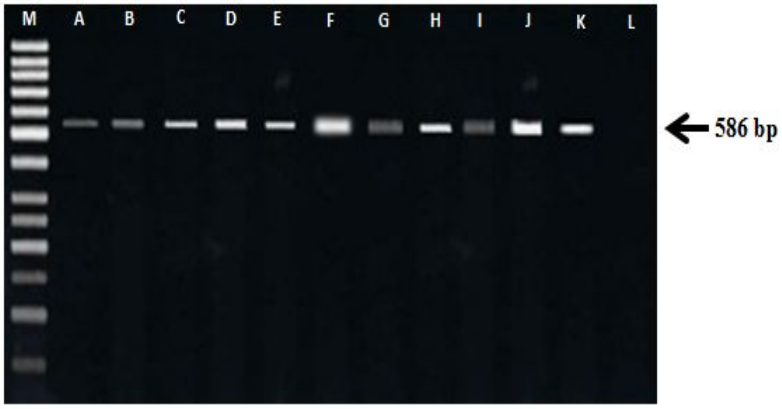
حدود ۲۲-۹ روز پس‌از تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از محل بریدگی و زخم ریزنمونه‌های برگی ریشه‌های مویین ظاهر شدند. گفتنی است که روی ریزنمونه‌های دم‌برگ و ساقه هیچ علامتی از ظهور ریشهٔ مویین دیده نشد. ازطرفی، نمونه‌هایی که از دم‌برگ یا ساقه تهیه می‌شدند به جابه‌جایی بسیار حساس بودند و زود قهوه‌ای یا سیاه می‌شدند. ازسوی دیگر، هیچ ریشه‌ای روی ریزنمونه‌های برگ‌های شاهد که با باکتری تلقیح نشده بودند مشاهده نشد. در بین تمام ریزنمونه‌های برگی تلقیح‌شده، فقط از تلقیح گونهٔ *S. reuterana* با سویهٔ ۱۷۲۴ هیچ ریشه‌ای تشکیل نشد. به‌دلیل وجود کرک فراوان در سطح برگ گونهٔ *S. nemorosa* حذف باکتری از سطح برگ ریزنمونه‌های این گونه بسیار مشکل بود. ماهیت تراریخت ریشه‌های مویین به‌دست‌آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن rol C بررسی شد. واکنش PCR با DNA استخراج‌شده از ریشه‌های مویین تراریخت‌شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۵۸۶ جفت باز شد، ولی این ژن در DNA به‌دست‌آمده از ریشهٔ طبیعی و غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد (شکل ۱). همچنین، محصولات PCR حاوی DNA استخراج-شده از پلاسمید هر چهار سویهٔ باکتری نوار یکسانی را دقیقاً در همان محل و اندازه ایجاد کردند،که حضور T-DNA پلاسمید-های باکتریایی در ژنوم ریشه‌های مویین را تأیید می‌کند. براساس نتایج تجزیهٔ واریانس، تفاوت معنی‌داری میان گونه‌های مختلف مریم‌گلی و نیز سویه‌های مختلف باکتری در تعداد و فراوانی ریشه‌های مویین تشکیل‌شده مشاهده شد (جدول ۲). تعداد ریشه-های مویین تشکیل‌شده و فراوانی ریشه‌زایی به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر اثر متقابل سویه‌های مختلف باکتری و گونه‌های مختلف گیاهی قرار گرفتند. همچنین، بیشترین تعداد ریشهٔ مویین القاشده از تلقیح گونهٔ *S. macrosiphon* با باکتری سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. میانگین ریشهٔ به‌دست‌آمده در این تیمار ۵/۱۲ عدد ریشه به‌ازای هر جداکشت برگی بود. بیشترین تعداد ریشهٔ مویین القاشده در گونه‌های *S. eremophila* (۳/۳۲ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) و *S. reuterana* (۳/۹۲ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) در نتیجهٔ تلقیح این گونه‌ها با سویهٔ A۴ به‌دست آمد. همچنین، سویهٔ ۲۶۵۹ قادر بود بیشترین تعداد ریشهٔ مویین را در گونه‌های *S. multicaulis* (۴/۳۶ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه)، *S. nemorosa* (۲/۶ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) و *S. verticillata* (۵ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) القا کند. بیشترین تعداد ریشهٔ مویین در گونهٔ *S. virigata* (۳ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) در اثر تلقیح با سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. همچنین، بیشترین فراوانی ریشه‌زایی از تلقیح گونهٔ *S. macrosiphon* با باکتری سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. فراوانی ریشه‌زایی در این تیمار ۸۲ درصد بود (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه ریزنمونه‌های تهیه‌شده از ساقه و دم‌برگ قادر به تولید ریشهٔ مویین نبودند و قهوه‌ای و سیاه شدند. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد، قهوه‌ای‌شدن برخی ریزنمونه‌های برگی *Arctium lappa* در اثر هم‌کشتی با *A. rhizogenes* سویهٔ AR۱۵۸۳۴ موجب ازدست‌رفتن شادابی و کاهش توانایی تکثیر سلولی ریزنمونه‌ها و درنهایت مرگ آن‌ها می‌شود. این پدیده مشابه پاسخ طبیعی گیاه به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده است و می‌توان آن را به سازوکار دفاعی گیاه در مقابل آلودگی توسط باکتری یا زخم شدن منسوب کرد (Soleimani *et al.*, 2012). نتایج مشابه در هم‌کشتی گیاه *Phalaenopsis violacea* با باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویهٔ EHA۱۰۱ گزارش شده است (Sreeramanan *et al.*, 2008).

در مطالعهٔ حاضر، فقط ریزنمونه‌های برگی توانستند ریشهٔ مویین تولید کنند. در بررسی القای ریشهٔ مویین در دو گیاه از تیرهٔ بادمجانیان (Solanaceae) نیز مشاهده شد که قطعات ساقه و هیپوکوتیل هیچ پاسخی به تلقیح با *A. rhizogenes* ندادند و تشکیل ریشهٔ مویین فقط در ریزنمونهٔ برگی مشاهده شد (Pawar & Maheshwari, 2004). همچنین، ریزنمونه‌های برگی گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) نسبت به ریزنمونهٔ دم‌برگ از استعداد بیشتری برای تولید ریشه‌های مویین برخوردارند (Wang *et al.*, 2006) که با نتایج مطالعهٔ حاضر در توافق‌اند. هرچند مواردی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد ریزنمونهٔ برگی نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها ریشه‌های مویین کمتری تولید می‌کند (Brijwal & Tamta, 2015; Lee *et al.*, 2007). تفاوت در وضعیت فیزیولوژیکی، سنتز DNA و تقسیم سلولی در بافت

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018



شکل ۱- تحلیل PCR با پرایمر اختصاصی ژن *rol* C، M: نشانگر اندازهٔ 1 Kb، A تا D: به‌ترتیب DNA پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A۴، ۲۶۵۹، ۱۷۲۴ و ATCC۱۵۸۳۴، E تا K: به ترتیب DNA ریشه‌های موین گونه‌های *Salvia eremophila*، *S. macrosiphon*، *S. multicaulis*، *S. nemorosa*، *S. reuterana*، *S.verticillata* و *S. virgate* و L: DNA ریشه غیرتراریخت گونهٔ *S. virgate*

Fig. 1. PCR detection of *rol* C genes, M: DNA molecular weight (1 Kb), A-D: plasmid of different *Agrobacterium rhizogenes* strain including: A4, 2659, 1724 and ATCC15834, E-F: DNA of different species hairy roots including: *Salvia eremophila*, *S. macrosiphon*, *S. multicaulis*, *S. nemorosa*, *S. verticillata* and *S. virigata* and L: non-transformed roots of *S. virigata*.

جدول ۲- تجزیهٔ واریانس اثر سویه‌های مختلف باکتری بر ریشه‌زایی گونه‌های مختلف مریم‌گلی.

Table 2. ANOVA of effect of different bacteria strain on hairy root induction in different *Salvia* species.

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	تعداد ریشه به ازای هر ریزنمونه	فراوانی ریشه‌زایی
گونهٔ گیاهی	۶	۷/۹۲ **	۱۱۷۸ **
باکتری	۳	۱۶/۲۹**	۱۶۷۶/۲*
گونهٔ گیاهی × باکتری	۱۸	۸/۷۷ **	۱۲۰۷/۳ **
خطا	۱۱۲	۴/۰۸	۴۲۰

**معنی‌دار در سطح ۱٪، *معنی‌دار در سطح ۵٪.

*: significant at $p<0.05$, **: significant at $p<0.01$.

جدول ۳- تجزیهٔ واریانس اثر سویه‌های مختلف باکتری بر القای ریشهٔ موین در ریزنمونه‌های برگ گونه‌های مختلف مریم‌گلی (*Salvia*).

Table 3. ANOVA of effect of different bacteria strain on hairy root induction in leaf explants of different *Salvia* species.

سویهٔ باکتری / گونهٔ گیاهی	تعداد ریشه تشکیل‌شده در هر ریزنمونه				فراوانی ریشه‌زایی (٪)			
	A۴	۲۶۵۹	۱۷۲۴	ATCC۱۵۸۳۴	A۴	۲۶۵۹	۱۷۲۴	**ATCC۱۵۸۳٤**
S. eremophila	۳/۳۲^{ab}	۱/۰۸^{c}	۱/۱۲^{ab}	۲/۷۲^{ab}	۸۰^{a}	۶۰^{b}	۷۶^{ab}	**٦٠^{ab}**
S. macrosiphon	۰/۸۸^{b}	۱/۴^{bc}	۱/۸۶^{ab}	۵/۱۲^{a}	۵۶^{c}	۷۲^{ab}	۶۴^{ab}	**۸۲^{a}**
S. multicaulis	۱/۴۸^{b}	۴/۳۶^{ab}	۲/۹۶^{a}	۳/۵۲^{ab}	۶۸^{b}	۷۲^{ab}	۸۰^{a}	**٦٠^{ab}**
S. nemorosa	۱/۵۲^{b}	۲/۶$^{a-c}$	۱/۱۲^{ab}	۱/۹۲^{ab}	۷۲^{ab}	۷۶^{ab}	۶۴^{ab}	**۵۲^{b}**
S. reuterana	۳/۹۷^{ab}	۳/۳۲$^{a-c}$	۰^{b}	۱/۲^{b}	۷۲^{ab}	۸۰^{a}	۰^{c}	**٤٨^{b}**
S.verticillata	۴/۵۲^{a}	۵^{a}	۱/۰۸^{ab}	۳/۵۲^{ab}	۷۶^{ab}	۷۶^{ab}	۵۲^{b}	**٧٦^{a}**
S. virgata	۱/۲^{b}	۲/۱۲$^{a-c}$	۲/۳۲^{a}	۳^{ab}	۷۶^{ab}	۷۶^{ab}	۷۲^{ab}	**۷۲^{a}**

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری ندارند.

There is no statically difference at $p<0.05$ between means with the same letter.

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

های مختلف، ممکن است دلیل توانایی متفاوت آن‌ها برای تولید ریشهٔ مویین باشد (Pirian *et al*., 2012). تاکنون تأثیر سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* بر القای ریشهٔ مویین در بسیاری از گیاهان مطالعه شده است. هر گونهٔ گیاهی دارای ساختار دیوارهٔ سلولی، وضعیت فیزیولوژیکی و مولکول‌های علامت‌دهندهٔ متفاوتی است که ممکن است موجب تفاوت در توانایی تشکیل ریشهٔ مویین در گونه‌های مختلف باشد (Kuzovkina & Schneider, 2006).

همچنین، توالی ژنوم باکتریایی و پلاسمیدی نقش به‌سزایی در القای ریشهٔ مویین در گیاهان دارد. برای مثال، ژن‌های T-DNA پلاسمید Ri سنتز موادی را که موجب تحریک سلول‌ها برای تمایزیابی به سمت تولید ریشه می‌شوند برعهده دارند. عمل تمایزیابی تحت تأثیر اکسین درونی انجام می‌گیرد. ورود قطعاتی از T-DNA به درون ژنوم گیاهی، باعث جابه‌جایی مکان ژنی مخصوص بیوسنتز اکسین می‌شود. بنابراین، سطح اکسین این سلول‌های تغییریافته فوراً افزایش می‌یابد و هم‌زمان نیازمندی آنها برای اکسین خارجی کاهش می‌یابد. گاهی اوقات T-DNAها شامل ژن‌های *tms* است که مستقیماً سبب سنتز اکسین و القای ریشه می‌شوند (Tao & Li, 2006). همچنین، مشخص شده است که انتقال و بیان پایدار انواع ژن‌های *rol* نقش به‌سزایی در تولید و سرعت رشد ریشه‌هایی مویین دارند، زیرا موجب افزایش حساسیت سلول‌ها به اکسین‌های درون‌زاد می‌شوند (Bonhomme *et al*., 2000). سویه‌های مختلف *A. rhizognes* ازنظر القای ریشهٔ مویین در یک ژنوتیپ گیاهی معین توانایی متفاوتی دارند (Christensen *et al*., 2009; Ercan *et al*., 1999; Mahesh & Jeyachandran, 2011). دلیل احتمالی این پدیده می‌تواند تفاوت در پلاسمیدهای درون هریک از سویه‌ها باشد (Nguyen *et al*., 1992; Vanhala *et al*., 1995).

در این پژوهش، اثر متقابل معنی‌داری میان گونه‌های مختلف مریم‌گلی و سویه‌های مختلف باکتری ازنظر فراوانی ریشه‌زایی وجود داشت و بیشترین فراوانی ریشه‌زایی از تلقیح گونهٔ *S. macrosiphon* با باکتری سویهٔ ATTC۱۵۸۳۴ به‌دست آمد. فرایند انتقال T-DNA از اگروباکتریوم به درون ژنوم سلول‌های گیاه میزبان مستلزم مشارکت باکتری و سلول گیاهی است. هرچند تشخیص سلول‌های گیاهی مستعد توسط باکتری با سازوکار کمو تاکسی صورت می‌پذیرد، در گام بعدی، نوع رسپتورهای دیوارهٔ سلولی گیاهی اهمیت ویژه‌ای در اتصال باکتری به سلول گیاه دارد (Tepfer, 1990). ازطرفی بیان‌شدن ژن‌های توالی مرزی راست T-DNA، ژن‌های ناحیهٔ *vir* پلاسمید و کرموزم باکتری نقش مؤثری در عمل انتقال T-DNA از پلاسمیدها دارند. *vir* A یک اپرون از ناحیهٔ *vir* پلاسمید باکتری است که یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که مسئول تشخیص و واکنش به قندها و ترکیبات فنلی رهاشده از محل سلول‌های زخمی است (Chandran & Potty, 2008)، که نشان می‌دهد پدیدهٔ ریشه‌زایی مویین در اثر انتقال T-DNA اگروباکتریوم به ژنوم گیاه، نوعی رابطهٔ دوجانبه میان باکتری و گیاه است و ازاین‌رو لازم است به‌منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه‌های باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون شوند. ازسوی دیگر، اطلاعات ژنتیکی انتقال‌یافته از پلاسمید Ri شامل ژن‌هایی است که سبب بیوسنتز اوپین‌های ویژه‌ای ازقبیل آگروپین، مانووپین و کوکوموپین می‌شود که به منزلهٔ منبع کربن و نیتروژن برای باکتری عمل می‌کنند (Petersen *et al*., 1989). در مطالعهٔ حاضر، دو سویهٔ ATCC۱۵۸۳۴ و A۴ از نوع آگروپینی (Sharafi *et al*., 2014)، سویهٔ ۲۶۵۹ از نوع کوکوموپینی (Combard & Baucher, 1988) و سویهٔ ۱۷۲۴ از نوع میکوموپینی (Tanaka *et al*., 1994) بود. برخی مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* براساس نوع اوپین ساخته‌شده در بافت تراریخت‌شده توسط آنها، توانایی‌های متفاوتی برای تلقیح بافت‌های گیاهی دارند. معمولاً، سویه‌های آگروپینی توانایی بیشتری در تلقیح بافت‌های گیاهی دارند (Dessaux *et al*., 1993; Slightom *et al*., 1986). در پژوهش حاضر نیز به‌طور میانگین بیشترین ریشهٔ القاشده در گونه‌های مختلف سردهٔ مریم‌گلی (۲/۹۳ ریشه)، با استفاده از سویهٔ ATCC۱۵۸۳۴ حاصل شد. از سوی دیگر، کمترین میانگین ریشهٔ القاشده در گونه‌های مذکور (۱/۴۶ ریشه)، در نتیجه تلقیح با سویهٔ ۱۷۲۴ به عنوان یک سویهٔ میکوموپینی به‌دست آمد. این درحالی‌است که سویهٔ A۱۳ به عنوان یک سویهٔ میکوموپینی در مقایسه با سویهٔ LBA۹۴۰ به عنوان یک سویهٔ آگروپینی، به‌طور میانگین تعداد ریشهٔ مویین بیشتری در ریزنمونه‌های برگی گیاه *Dracocephalum kotschyi* القا کرد (Sharafi *et al*., 2014). به‌

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

طورکلی، به‌نظر می‌رسد نوع گونهٔ گیاهی، ریزنمونه و سویهٔ باکتریایی مورد استفاده نقش به‌سزایی در میزان القای ریشهٔ مویین در سردهٔ مریم‌گلی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

امروزه، بهره‌گیری از کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشهٔ مویین توسط سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* متفاوت است. ازاین‌رو، نخستین گام در کشت ریشه‌های مویین یافتن مناسب‌ترین سویهٔ باکتری و بهترین نوع ریزنمونهٔ گیاهی جهت ایجاد ریشهٔ مویین در گونه‌های گیاهی است. در این مطالعه، با توجه به اهمیت دارویی گیاهان سردهٔ مریم گلی، تولید ریشه‌های مویین در هفت گونه از سردهٔ مذکور بررسی شد. سویه‌های مختلف باکتری قابلیت‌های متفاوتی در القای ریشهٔ مویین در ریزنمونه‌های برگی گونه‌های مختلف سردهٔ مریم‌گلی داشتند و بیشترین فراوانی ریشه‌زایی از تلقیح گونهٔ *S. ma-crosiphon* با باکتری سویهٔ ۱۵۸۳۴ حاصل شد. علی‌رغم مطالعات اندکی که در زمینهٔ القا و کشت ریشه‌های مویین این سرده انجام شده، پژوهش حاضر نشان می‌دهد القا و کشت ریشه-های مویین در گونه‌های مختلف سردهٔ مریم‌گلی جهت تولید متابولیت‌های ثانویهٔ ارزشمند دارویی، بسیار امیدوارکننده خواهد بود.

سپاسگزاری

از همکاران آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکدهٔ علوم دانشگاه تهران سپاسگزاری می‌نماییم.

REFERENCES

Barrett, S.C.H., Wilken, D.H. and Cole, W.W. 2000. Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. – Plant Syst. Evol. 223: 211-219.

Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. and Fliniaux, M.A. 2000. Effects of the *rol* C gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. – J. Nat. Prod. 63: 1249-1252.

Brijwal, L. and Tamta, S. 2015. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. – Springer Plus 4: 443-453.

Bulgakov, V.P. 2008. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. – Biotechnol. Adv. 26: 318-324.

Chandran, R.P. and Potty, V. 2008. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. – IJBT 7: 129-132.

Chaudhuri, K.N., Ghosh, B., Tepfer, D. and Jha, S. 2005. Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. – Plant Cell Rep. 24: 25-35.

Christensen, B., Sriskandarajah, S., Müller, R. 2009. Transformation of *Hibiscus rosa-sinensis* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. – J. Hortic. Sci. Biotechnol. 84: 204-208.

Combard, A. and Baucher, M.F. 1988. A common organization of the T-DNA genes expressed in plant hairy roots induced by different plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. – Plant Mol. Biol. 10: 499-509.

Dessaux, Y., Petit, A. And Tempe, J. 1993. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. – Phytochem. 34: 31-38.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Ercan, A.G., Taşkin, K.M., Turgut, K. and Yüce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. – Turk. J. Bot. 23: 373-378.

Hu, Z.B. and Du, M. 2006. Hairy Root and its application in plant genetic engineering. – J. Integr. Plant Biol. 48: 121-127.

Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z. and Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. – J. Pharm. Bioall. Sci. 4: 10-20.

Kamatou, G.P., Makunga, N.P., Ramogola, W.P. and Viljoen, A.M. 2008. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. – J. Ethnopharmacol. 119: 664-672.

Kumar, V., Sharma, A., Prasad. B.C.N, Gururaj, H.B. and Ravishankar, G.A. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. – Electron. J. Biotechnol. 9: 349-357.

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.173]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 0:17 IRDT on Wednesday August 15th 2018

Kuzovkina, I.N. and Schneider, B. 2006. Progress in Botany. – Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 275-314.

Lee, S.Y., Xu, H., Kim, Y.K. and Park, S.U. 2007. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. – World J. Microbiol. Biotechnol. 24: 969-972.

Li, M., Li, Q., Zhang, C., Zhang, N., Cui, Z., Huang, L. and Xiao, P. 2013. An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. – Acta Pharm. Sin. 3: 273-280.

Mahesh, A. and Jeyachandran, R. 2011. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones. – Plant Biosyst. 145: 620-626.

Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. and Guckert, A. 1992. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. – Plant Cell Rep. 11: 424-427.

Pawar, P.K. and Maheshwari, V.L. 2004. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. – IJBT 3: 414-417.

Petersen, S.G., Stummann, B.M., Olesen, P. and Henningsen, K.W. 1989. Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids. – Physiol. Plant 77: 427-435.

Pirian, K., Piri, K. and Ghiyasvand, T. 2012. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. – Int. J. Appl. Basic. Sci. 3: 642-649.

Rabban, M., Sajjadi, S.E., Jafarian, A., Vaseghi, G. 2005. Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. – J. Ethnopharmacol. 101: 100-103.

Rechinger, K.H. 1982. Labiatae Flora Iranica. – Akademische Drucku-Verlagsanstalt, Graz, 598 pp.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344 pp.

Shanks, J.V. and Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. – Curr. Opin. Chem. Biol. 10: 151-155.

Sharafi, A., Sohi, H.H., Azadi, P. and Sharafi, A.A. 2014. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. – Physiol. Mol. Biol. Plants 20: 257-262.

Sharma, P., Padh, H. and Shrivastava, N. 2013. Hairy root cultures: a suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. – Eng. Life Sci. 13: 62-75.

Slightom, J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. and Tepfer, D. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. – J. Biol. Chem. 261: 108-121.

Soleimani, T. Keyhanfar, M. Piri, K.H. Hasanloo, T. 2012. Hairy root induction in burdock (*Arctium lappa* L.). – JMP 44: 176-184.

Sreeramanan, S., Vinod, B., Sashi, S. and Xavier, R. 2008. Optimization of the transient Gusa gene transfer of *Phalaenopsis Violacea* orchid via *Agrobacterium Tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. – Adv. Nat. Appl. Sci. 2: 77-89.

Tanaka, N., Ikeda, T. and Oka, A. 1994. Nucleotide sequence of the *rol* region of the mikimopine-type root-inducing plasmid pRi1724. – Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 548-551.

Tao, J. and Li, L. 2006. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. – Afr. J. Bot. 72: 211-216.

Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. – Physiol. Plant. 79: 140-146.

Vanhala, L., Hiltunen, R. and Oksman-Caldentey, K.M. 1995. Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. – Plant Cell Rep. 14: 236-240.

Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. and Zhang, Y. 2006. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. – Colloids Surf. B Biointerfac. 53: 101-104.

*****

How to cite this article:

Norouzi, R., Babalar, M. and Mirmasoumi, M. 2017. Investigation of hairy root induction in some *Salvia* L. species. – Nova Biologica Rep. 4: 173-180.

نوروزی، ر.، بابالار، م. و میرمعصومی، م. ۱۳۹۶. بررسی القای ریشهٔ موین در برخی از گونه‌های سردهٔ مریم‌گلی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۱۸۰-۱۷۳.