

## بررسی القای ریشه موین در برخی از گونه های سرده مریم گلی

رضا نوروزی<sup>۱\*</sup>، مصباح بابالار<sup>۲</sup> و مسعود میرمعصومی<sup>۳</sup>

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

<sup>۱</sup>گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup>گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

<sup>۳</sup>دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: reza.norouzi@uma.ac.ir

**چکیده.** القای ریشه موین در گیاهان از طریق ورود T-DNA از پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* به ژنوم سلول های گیاهی انجام می شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نوع سویه باکتری و گونه گیاهی در القای ریشه موین در دو گونه بومی ایران (*Salvia eremophila* و *Salvia reuterana*) و پنج گونه غیربومی (*Salvia macrosiphon*، *Salvia multicaulis*، *Salvia nemorosa*، *Salvia verticellata* و *Salvia virigata*) سرده مریم گلی توسط چهار سویه باکتری شامل A4، ATCC15834، 1724، 2659، در صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ریزنمونه های ساقه و دم برگ قادر به تولید ریشه موین نبودند، در حالی که تقریباً تمام ریزنمونه های برگ ریشه موین تولید کردند. ماهیت تراخت ریشه های مذکور از طریق ردیابی بخشی از ژن *rol C* وارد شده به ژنوم گیاهی به اثبات رسید. نتایج نشان داد که سویه های مختلف *A. rhizogenes* و گونه های مختلف مریم گلی اثر معنی داری بر تعداد و فراوانی ریشه های موین دارند. بیشترین تعداد ریشه موین به ازای هر ریزنمونه (۵/۱۲ ریشه موین) و بالاترین فراوانی ریشه زایی (۸۲٪) در اثر تلقیح گونه *S. macrosiphon* با باکتری سویه ATCC15834 به دست آمد. همچنین، بیشترین تعداد ریشه موین به ازای هر ریزنمونه در گونه های *S. eremophila* (۳/۳۲ ریشه موین) و *S. reuterana* (۳/۹۲ ریشه موین) توسط باکتری A4 در گونه های *S. nemorosa* (۲/۶ ریشه موین)، *S. multicaulis* (۴/۳۶ ریشه موین) و *S. verticillata* (۵ ریشه موین) توسط سویه 2659 و در گونه *S. virigata* (۳ ریشه موین) توسط سویه ATCC15834 به دست آمد. به طور کلی، به نظر می رسد نوع گونه گیاهی، ریزنمونه و سویه باکتریایی مورد استفاده نقش به سزایی در میزان القای ریشه موین در سرده مریم گلی دارد. **واژه های کلیدی.** *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه های تراخت، ریزنمونه برگ

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

Reza Norouzi<sup>1,2\*</sup>, Mesbah Babalar<sup>2</sup> & Masoud Mirmasoumi<sup>3</sup>

Received 24.07.2016/ Accepted 19.12.2016 / Published 22.09.2017

<sup>1</sup>Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

<sup>2</sup>University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

<sup>3</sup>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* species 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

## مقدمه

و استفاده‌های متعدد دارویی و درمانی دارند و در طب سنتی به منظور درمان آگزما، 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 سرده مریم گلی است (Kamatou et al., 2008). این سرده در ایران ۵۸ گونه دارد که ۱۷ گونه آن بوم‌ویژه ایران هستند. کشور پهناور ایران که دارای اقلیم‌های متنوعی است از لحاظ تعداد گونه‌های گیاهی بسیار غنی است و در این میان گونه‌های مختلف سرده مریم گلی از گونه‌های بارز پوشش گیاهی ناحیه ایران-تورانی محسوب می‌شود (Rabbani et al., 2005; Rechinger, 1982). این گیاهان توسط *A. rhizogenes* و تولید ریشه‌های موئین با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه با میزان بالا بسیار گسترش یافته است. این درحالی‌است که علی‌رغم تنوع گونه‌ای قابل ملاحظه سرده مریم گلی در کشور ایران، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه القای ریشه‌های موئین در این گونه‌ها صورت نگرفته است. بنابراین، هدف مطالعه حاضر، بررسی القای ریشه موئین در برخی گونه‌های سرده مریم گلی رویش‌یافته در ایران با استفاده از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* است.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

بذرهای هفت گونه مریم گلی شامل دو گونه بوم‌ویژه ایران و پنج گونه غیربوم‌ویژه ایران، از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و همچنین از هرباریوم دانشکده زیست-شناسی دانشگاه شهیدبهشتی تهیه شد (جدول ۱). به منظور تولید گیاهچه‌های استریل بذرها پس از ضدعفونی سطحی توسط اتانول ۷۰ درصد و محلول پنج درصد هیپوکلریت سدیم (هر کدام 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 جوانه‌زنی در اتاقک رشد تاریک با دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  نگه داشته شدند. به محض ظهور گیاهچه، ظروف کشت به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۴۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

گیاهان عالی از زمان حضور انسان در کره خاکی کلید رفاه او بوده‌اند. بشر، در طول قرن‌ها همواره از مواد دارویی موجود در پیکره گیاهان برای تأمین سلامتی و درمان بیماری‌های خود استفاده کرده است. ویژگی دارویی بودن گیاهان به واسطه متابولیت‌های ثانویه‌ای است که طی واکنش‌های متابولیسمی در پیکره آنها تولید می‌شوند و تجمع می‌یابد (Hussain et al., 2012). ریشه برخی از خانواده‌های گیاهی محل بیوسنتز یا تجمع متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون آلکالوئیدها، پلی‌استیلن، سزکوئی‌ترین‌ها، فنل‌ها و فلاونوئیدهاست. همچنین، این ترکیبات می‌توانند در ریشه‌های موئین این گیاهان نیز تولید شوند (Sharma et al., 2013). امروزه، کشت ریشه‌های موئین، به دلیل رشد سریع، ثابت 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 آنتی‌بادی‌های مونوکلونال است (Shanks & Morgan, 2004; Pawar & Maheshwari, 1999). این ریشه‌ها از تراریخت شدن بافت‌های گیاهی توسط باکتری گرم منفی و خاکزی *Agrobacterium rhizogenes* به وجود می‌آیند. این باکتری با وارد کردن یک قطعه T-DNA از پلاسمید القاکننده ریشه (پلاسمید Ri)، مشتمل بر چهار ژن به *rol C rol B rol A* و *rol D* به ژنوم سلول‌های گیاهی و بیان پایدار ژن‌های *rol* در سلول‌های گیاه، به ظهور فنوتیپ ریشه‌های موئین منجر می‌شود (Bulgakov, 2008; Chaudhuri et al., 2005). فرایند تراریخت شدن بافت‌های گیاهی و القای ریشه موئین 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، به منظور بهینه‌سازی تولید ریشه‌های موئین، بایستی برهم کنش سویه‌های مختلف باکتری و ژنوتیپ‌های گیاهی تحت بررسی قرار گیرد (Hu & Du, 2006; Kumar et al., 2006).

سرده *Salvia* (مریم گلی) متعلق به تیره 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

## جدول ۱- مشخصات هرباریومی گیاهان تحت آزمایش.

Table 1. Herbarium characteristic of studied plants.

توضیحات	شماره هرباریومی	محل جمع آوری	نام فارسی	گونه گیاهی
بوم ویژه ایران	۲۶۵۶۶*	جیرفت- کرمان، ارتفاع: ۷۹۰ متر	مریم گلی بیابانی	<i>S. eremophila</i>
غیربوم ویژه ایران	۲۶۰۱۶*	روستای نعمت آباد، قروه- کردستان، ارتفاع: ۲۱۹۵ متر	مریم گلی لوله‌ای	<i>S. macrosiphon</i>
غیربوم ویژه ایران	۱۶۸۷۸*	سرچشمه، شهمیرزاد- سمنان، ارتفاع: ۲۰۰۰ متر	مریم گلی ارغوانی	<i>S. multicaulis</i>
غیربوم ویژه ایران	۸۵۰۹۸۵**	جاده چالوس، میدانک- البرز، ارتفاع: ۲۱۲۶	مریم گلی مزرعه‌روی	<i>S. nemorosa</i>
بوم ویژه ایران	۸۵۰۱۰۰۱**	جاده چالوس، بیلقان- البرز، ارتفاع: ۱۳۶۳ متر	مریم گلی اصفهانی	<i>S. reuterana</i>
غیربوم ویژه ایران	۸۵۰۰۹۹۶**	جاده چالوس، بین آسارا و ماهان- البرز، ارتفاع: ۱۸۶۴	مریم گلی بنفش	<i>S. verticellata</i>
غیربوم ویژه ایران	۲۸۲۹۵*	نجف آباد- اصفهان، ارتفاع: ۱۶۴۲ متر	مریم گلی ترکه‌ای	<i>S. virigata</i>

\*تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، \*\* تهیه شده از هرباریوم دانشکده 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

به منظور القای ریشه موئین از چهار سویه *A. rhizogenes* شامل ATCC ۱۵۸۳۴، ۱۷۲۴، ۲۶۵۹ استفاده شد. یک تک کلون از هر سویه در ارلن‌های ۱۰۰ ml حاوی ۲۵ ml از محیط LB مایع با pH برابر ۷ کشت داده شد. سپس، ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی روی شیکر با سرعت ۱۰۰ rpm در دمای ۲۶°C قرار گرفتند. غلظت مناسب سوسپانسیون باکتریایی برای تلقیح، در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر (OD<sub>600</sub>) 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 چهار هفته‌ای گونه‌های مختلف مریم-گلی استفاده شد. ریزنمونه‌ها با استفاده از اسکالپل به قطعات ۲ سانتی‌متری تقسیم شده و به مدت 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°C و تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تلقیح و اطمینان از ورود ژن‌های ریشه‌زایی، ریزنمونه‌ها به منظور حذف باکتری به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ ppm آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. سپس، این عمل با فواصل ۲-۴ روز، همراه با کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک محیط کشت، به صورت ۲۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ ppm انجام گرفت. پس از حذف کامل باکتری، ریزنمونه‌ها در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند.

## بررسی ماهیت تراویخت ریشه‌های موئین

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های موئین و ریشه‌های طبیعی غیرتراویخت (شاهد منفی) به روش دوپل و دوپل انجام پذیرفت

(Doyle & Doyle, 1987). به منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش سامبروک و راسل استفاده شد (Sambrook & Russell, 2001). سپس، DNA به دست آمده، به همراه دوجفت آغازگر اختصاصی با توالی‌های 5'-CT-3' و 5'-TGCTTC-3' و CCTGACATCAAACCTCGTC-3' برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol C* (۵۸۶ bp) وارد واکنش PCR شد. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ به مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه (با اندازه ۵۰ جفت باز تولید شرکت Fermentas) الکتروفورز شدند. ژل پس از رنگ آمیزی در حمام اتیدیوم برمایید در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro مشاهده شد.

## محاسبات آماری داده‌ها

بررسی القای ریشه موئین به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. ریزنمونه‌هایی که با باکتری تلقیح نشده بودند به منزله شاهد در نظر گرفته شدند. برای پی‌بردن به کیفیت القای ریشه در ریزنمونه‌های برگی گونه‌های تحت آزمایش دو شاخص تعداد ریشه‌های موئین تشکیل شده به- ازای هر ریزنمونه و فراوانی ریشه‌زایی تحت ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ریشه‌زایی برای هر تکرار از تقسیم تعداد ریزنمونه‌هایی که ریشه موئین تولید کرده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های تلقیح شده توسط باکتری در هر پتری برحسب درصد به دست 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.

## نتایج

حدود ۲۲-۹ روز پس از تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از محل بریدگی و زخم ریزنمونه‌های برگ‌ریزه‌های موثین ظاهر شدند. گفتنی است که روی ریزنمونه‌های دم‌برگ و ساقه هیچ علامتی از ظهور ریشه موثین دیده نشد. از طرفی، نمونه‌هایی که از دم‌برگ یا ساقه تهیه می‌شدند به جابه‌جایی بسیار حساس بودند و زود قهوه‌ای یا سیاه می‌شدند. از سوی دیگر، هیچ ریشه‌ای روی ریزنمونه‌های برگ‌های شاهد که با باکتری تلقیح نشده بودند مشاهده نشد. در بین تمام ریزنمونه‌های برگ‌ریزه‌ها، فقط از تلقیح گونه *S. reuterana* با سویه ۱۷۲۴ هیچ ریشه‌ای تشکیل نشد. به دلیل وجود کرک فراوان در سطح برگ گونه *S. nemorosa* حذف باکتری از سطح برگ ریزنمونه‌های این گونه بسیار مشکل بود. ماهیت تراریخت ریشه‌های موثین به دست آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن rol C بررسی شد. واکنش PCR با DNA استخراج شده از ریشه‌های موثین تراریخت شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۵۸۶ جفت باز شد، ولی این ژن در DNA به دست آمده از ریشه طبیعی و غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد (شکل ۱). همچنین، محصولات PCR حاوی DNA استخراج شده از پلاسמיד هر چهار سویه باکتری نوار یکسانی را دقیقاً در همان محل و اندازه ایجاد کردند، که حضور T-DNA پلاسמיד-های باکتریایی در ژنوم ریشه‌های موثین را تأیید می‌کند. براساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری میان گونه‌های مختلف مریم‌گلی و نیز سویه‌های مختلف باکتری در تعداد و فراوانی ریشه‌های موثین تشکیل شده مشاهده شد (جدول ۲). تعداد ریشه‌های موثین تشکیل شده و فراوانی ریشه‌زایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل سویه‌های مختلف باکتری و گونه‌های مختلف گیاهی قرار گرفتند. همچنین، بیشترین تعداد ریشه موثین القاشده از تلقیح گونه *S. macrosiphon* با باکتری سویه ATTC۱۵۸۳۴ به دست آمد. میانگین ریشه به دست آمده در این تیمار ۵/۱۲ عدد ریشه به‌ازای هر جداگشت برگ‌ریزه بود. بیشترین تعداد ریشه موثین القاشده در گونه‌های *S. eremophila* (۳/۳۲) ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) و *S. reuterana* (۳/۹۲) ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) در نتیجه تلقیح این گونه‌ها با سویه A۴ به دست آمد. همچنین، سویه ۲۶۵۹ قادر بود بیشترین تعداد ریشه موثین 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 ریشه موثین در گونه *S. virigata* (۳) ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) در اثر تلقیح با سویه ATTC۱۵۸۳۴ به دست آمد. همچنین، بیشترین فراوانی ریشه‌زایی از تلقیح گونه *S. macrosiphon* با باکتری سویه ATTC۱۵۸۳۴ به دست آمد. فراوانی ریشه‌زایی در این تیمار ۸۲ درصد بود (جدول ۳).

## بحث

در این مطالعه ریزنمونه‌های تهیه شده از ساقه و دم‌برگ قادر به تولید ریشه موثین نبودند و قهوه‌ای و سیاه شدند. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد، قهوه‌ای شدن برخی ریزنمونه‌های برگ‌ریزه *Arctium lappa* در اثر هم‌کشتی با *A. rhizogenes* سویه AR۱۵۸۳۴ موجب ازدست‌رفتن شادابی و کاهش توانایی تکثیر سلولی ریزنمونه‌ها و در نهایت 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-*Agr. obacterium tumefaciens* سویه EHA۱۰۱ گزارش شده است (Sreeramanan et al., 2008).

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



**شکل ۱-** تحلیل PCR با پرایمر اختصاصی ژن *rol C* M: نشانگر اندازه 1 Kb، A تا D: به ترتیب DNA پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* سویه های A4، 2659، 1724 و ATCC15834، E تا K: به ترتیب DNA ریشه های موین گونه های *Salvia eremophila*، *S. macrosiphon*، *S. multicaulis*، *S. nemorosa*، *S. verticillata* و *S. virgata* و L: DNA ریشه غیرتراریخت گونه *S. virgata*.

**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. virgata* and L: non-transformed roots of *S. virgata*.

### جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سویه های مختلف باکتری بر ریشه زایی گونه های مختلف مریم گلی.

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

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

\*\* معنی دار در سطح ۱٪، \* معنی دار در سطح ۵٪.

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

### جدول ۳- تجزیه واریانس اثر سویه های مختلف باکتری بر القای ریشه موین در ریزنمونه های برگ گونه های مختلف مریم گلی (*Salvia*).

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

فراوانی ریشه زایی (%)				تعداد ریشه تشکیل شده در هر ریزنمونه				سویه باکتری گونه گیاهی
ATCC15834	۱۷۲۴	۲۶۵۹	A4	ATCC15834	۱۷۲۴	۲۶۵۹	A4	
۶۰.ab	۷۶.ab	۶۰.b	۸۰.a	۲/۷۲.ab	۱/۱۲.ab	۱/۰۸.c	۳/۳۲.ab	<i>S. eremophila</i>
۸۲.a	۶۴.ab	۷۲.ab	۵۶.c	۵/۱۲.a	۱/۸۶.ab	۱/۴.bc	۰/۸۸.b	<i>S. macrosiphon</i>
۶۰.ab	۸۰.a	۷۲.ab	۶۸.b	۳/۵۲.ab	۲/۹۶.a	۴/۳۶.ab	۱/۴۸.b	<i>S. multicaulis</i>
۵۲.b	۶۴.ab	۷۶.ab	۷۲.ab	۱/۹۲.ab	۱/۱۲.ab	۲/۶۰.a-c	۱/۵۲.b	<i>S. nemorosa</i>
۴۸.b	.c	۸۰.a	۷۲.ab	۱/۲.b	.b	۳/۳۲.a-c	۳/۹۲.ab	<i>S. reuterana</i>
۷۶.a	۵۲.b	۷۶.ab	۷۶.ab	۳/۵۲.ab	۱/۰۸.ab	۵.a	۴/۵۲.a	<i>S. verticillata</i>
۷۲.a	۷۲.ab	۷۶.ab	۷۶.ab	۳.ab	۲/۳۲.a	۲/۱۲.a-c	۱/۲.b	<i>S. virgata</i>

میانگین هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند تفاوت معنی داری ندارند.

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

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

همچنین، توالی ژنوم باکتریایی و پلاسمیدی نقش به‌سزایی در القای ریشه موین در گیاهان دارد. برای مثال، ژن‌های T-DNA پلاسمید Ri سنتز موادی را که موجب تحریک سلول‌ها برای تمایزایی به سمت تولید ریشه می‌شوند برعهده دارند. عمل تمایزایی 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 تغییر یافته 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 موین دارند، زیرا موجب افزایش حساسیت سلول‌ها به اکسین‌های درون‌زاد می‌شوند (Bonhomme et al., 2000). سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* از نظر القای ریشه موین 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 هر یک از سویه‌ها باشد (Nguyen et al., 1992; Vanhala et al., 1995).

در این پژوهش، اثر متقابل معنی‌داری میان گونه‌های مختلف مریم گلی و سویه‌های مختلف باکتری از نظر فراوانی ریشه‌زایی وجود داشت و بیشترین فراوانی ریشه‌زایی از تلقیح گونه *S. macrosiphon* با باکتری سویه ATCC15834 به‌دست آمد. فرایند انتقال T-DNA از آگروباکتریوم 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 رستپورهای دیواره سلولی گیاهی اهمیت ویژه‌ای در اتصال باکتری به سلول گیاه دارد (Tepfer, 1990). از طرفی بیان‌شدن ژن‌های توالی مرزی راست T-DNA، ژن‌های ناحیه *vir* پلاسمید و کروموزم باکتری نقش مؤثری در عمل انتقال T-DNA از پلاسمیدها دارند. *vir A* یک اپرون از ناحیه *vir* پلاسمید باکتری است که یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که مسئول تشخیص و واکنش به قندها و ترکیبات فنلی رها شده از محل سلول‌های زخمی است (Chandran & Potty, 2008)، که نشان می‌دهد پدیده ریشه‌زایی موین در اثر انتقال T-DNA آگروباکتریوم به ژنوم گیاه، نوعی رابطه دوجانبه میان باکتری و گیاه است و از این رو لازم است به‌منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه‌های باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون شوند. از سوی دیگر، اطلاعات ژنتیکی انتقال یافته از پلاسمید Ri شامل ژن‌هایی است که سبب بیوسنتز اوپین‌های ویژه‌ای از قبیل آگروپین، مانووپین و کوکوموپین می‌شود که به منزله منبع کربن و نیتروژن برای باکتری عمل می‌کنند (Petersen et al., 1989). در مطالعه حاضر، دو سویه ATCC15834 و A4 از نوع آگروپینی (Sharafi et al., 2014)، سویه ۲۶۵۹ از نوع کوکوموپینی (Combard & Baucher, 1988) و سویه ۱۷۲۴ از نوع میکوموپینی (Tanaka et al., 1994) بود. برخی مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* بر اساس نوع اوپین ساخته شده در بافت تراریخت شده 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 ریشه‌افشاده در گونه‌های مختلف سرده مریم گلی (۲/۹۳ ریشه)، با استفاده از سویه ATCC15834 حاصل شد. از سوی دیگر، کمترین میانگین ریشه‌افشاده در گونه‌های مذکور (۱/۴۶ ریشه)، در نتیجه تلقیح با سویه ۱۷۲۴ به عنوان یک سویه میکوموپینی به‌دست آمد. این در حالی است که سویه A۱۳ به عنوان یک سویه میکوموپینی در مقایسه با سویه LBA۹۴۰ به عنوان یک سویه آگروپینی، به‌طور میانگین تعداد ریشه موین بیشتری در ریزنمونه‌های برگ گیاه *Drac- ocephalum kotschy* القا کرد (Sharafi et al., 2014). به-

## 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. Hort. 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.

طورکلی، به نظر می رسد نوع گونه گیاهی، ریزنمونه و سویه باکتریایی مورد استفاده نقش به سزایی در میزان القای ریشه موین در سرده مریم گلی دارد.

## نتیجه گیری نهایی

امروزه، بهره گیری از کشت ریشه های موین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشه موین توسط سویه های مختلف *A. rhizogenes* متفاوت است. از این رو، نخستین گام در کشت ریشه های موین یافتن مناسب ترین سویه باکتری و بهترین نوع ریزنمونه گیاهی جهت ایجاد ریشه موین در گونه های گیاهی است. در این مطالعه، با توجه به اهمیت دارویی گیاهان سرده مریم گلی، تولید ریشه های موین در هفت گونه از سرده مذکور بررسی شد. سویه های مختلف باکتری قابلیت های متفاوتی در القای ریشه موین در ریزنمونه های برگ گیاه های مختلف سرده مریم گلی داشتند و بیشترین فراوانی ریشه زایی از تلقیح گونه *S. ma-crosiphon* با باکتری سویه ۱۵۸۳۴ حاصل شد. علی رغم مطالعات اندکی که در زمینه القا و کشت ریشه های موین این سرده انجام شده، پژوهش حاضر نشان می دهد القا و کشت ریشه های موین در گونه های مختلف سرده مریم گلی جهت تولید متابولیت های ثانویه ارزشمند دارویی، بسیار امیدوارکننده خواهد بود.

## سپاسگزاری

از همکاران آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه تهران سپاسگزاری می نمایم.

- 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 Druck-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 ریشه موئین در برخی از گونه‌های سرده مریم گلی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۱۸۰-۱۷۳

۱۷۳