مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های مویین مریم‌گلی اصفهانی (*Salvia reuterana*)

رضا نوروزی*[1]، مصباح بابالار[2]، مسعود میرمعصومی[3]، جواد هادیان[4]

[1]دانش‌آموخته گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
[2]استاد گروه باغبانی، پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران.
[3]مربی گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران.
[4]دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۷/۱۱

چکیده

برای نخستین بار ریشه‌های مویین تراریخت گیاه *Salvia reuterana* (مریم‌گلی اصفهانی) توسط تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATTC ۱۵۸۳٤ حاصل گردید. ماهیت تراریختی ریشه‌های مذکور از طریق ردیابی بخشی از ژن‌های T-DNA وارد شده به ژنوم گیاهی به اثبات رسید. ریشه‌های مویین این گیاه توانایی تولید رزمارینیک اسید را داشتند، از این‌رو اثر شش نوع محیط کشت مایع شامل B5، B5 ½، MS، MS ½، White's و WPM بر روی میزان رشد و میزان تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین این گیاه بررسی گردید. ریشه‌های مویین در محیط کشت MS بیشترین وزن تر (٤١/٦ گرم در لیتر) و وزن خشک (۳/۷ گرم در لیتر) را داشتند. همچنین نتایج نشان داد با این‌که بیشترین میزان تولید رزمارینیک اسید (۵۲/۲ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک) در محیط کشت B5 حاصل گردید، اما بالاترین عملکرد تولید رزمارینیک اسید در محیط کشت MS (۰/۱۳ گرم در لیتر) به دست آمد. از این‌رو محیط کشت MS مناسب‌ترین محیط برای رشد و تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های مویین تراریخت مریم‌گلی اصفهانی است.

واژه‌های کلیدی: *تعناعیان، Salvia reuterana (مریم‌گلی اصفهانی) ، ریشه‌های مویین، رزمارینیک اسید.*

*نویسنده مسئول: رضا نوروزی تلفن: ۰٤٥۳۲٥٤٥٦۲۳ Email: reza.norouzi@uma.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ویژگی دارویی بودن برخی از گیاهان به علّت وجود ترکیبات متنوعی است که متابولیت-های ثانویه نامیده می‌شوند (Chaudhuri *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007). تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های رایج، از قبیل جمع-آوری از طبیعت و کشت در زمین‌های زراعی به دلایل متعددی کار ساده‌ای نیست. از طرف دیگر، متابولیت‌های ثانویه ممکن است محدود به جنس یا گونه خاصی باشند و یا فقط در مرحله رشدی خاصی، یا شرایط فصلی، تنش و تغذیه‌ای ویژه‌ای تولید گردند (Verpoorte *et al.*, 2002). از این رو در چند دهه اخیر تلاش‌های فراوانی در جهت توسعه روش‌های جایگزین تولید ترکیبات ارزشمند گیاهی صورت گرفته است که در این میان استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی به عنوان یکی از نوید بخش‌ترین راهکارها به طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Dhakulkar *et al.*, 2005; Rao & Ravishankar, 2002; Triplett *et al.*, 2008). البته از آن‌جا که بی‌ثباتی در تولید و بازدهی اندک (Hu & Du, 2006; Jung *et al.*, 2003; Rahnama *et al.*, 2008) و نیز غیر قابل پیش‌بینی بودن تشکیل متابولیت‌های ثانویه (Syklowska-Baranek *et al.*, 2009) از محدودیت‌های عمده کشت سلول‌های گیاهی است، و از طرفی برخی از متابولیت‌ها فقط در اندام‌های تمایز یافته تولید می‌شوند (Verpoorte *et al.*, 2002)، ریشه‌های مویین تراریخت شده رهیافت نوینی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ثبات بیوشیمیایی و ژنتیکی بالا می‌باشند (Zarei *et al.*, 2013; Syklowska-Baranek *et al.*, 2009). ریشه‌های مویین به دست آمده می‌توانند منبع مناسب و ارزشمندی جهت تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی[1]، متابولیت-های ثانویه در مقیاس وسیع، آنتی بادی‌های مونوکلونال و گیاه پالایی و ... به شمار آیند (Kumar *et al.*, 2006; Shi & Lindemann, 2006). رشد سریع، ثبات ژنتیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی، نداشتن زمین گرایی، سهولت نگهداری و قابلیت رشد در محیط‌های کشت فاقد هورمون و تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه از ویژگی‌های خاص ریشه‌های مویین هستند و این خصوصیات سبب شده است ریشه-های مویین به عنوان مواد گیاهی ارزشمند در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی گیاهی مورد توجه قرار گیرند (Giri & Narasu, 2000; Hu & Du, 2006; Pawar & Maheshwari, 2004; Kabirnetaj *et al.*, 2012).

جنس *Salvia* بالغ بر ۹۰۰ گونه دارد، که در مناطق گرمسیری و معتدل پراکنش دارند (Barrett *et al.*, 2000). جنس *Salvia* در ایران دارای ۵۸ گونه می‌باشد که ۱۷ گونه آن اندمیک است. یکی از گونه‌های این جنس، *S. reuterana* (مریم‌گلی اصفهانی) می‌باشد که گیاهی علفی و چند ساله اندمیک ارتفاعات مرکزی ایران است (Rabbani *et al.*, 2005). ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس اندام‌های مختلف این گیاه

[1] phytochemicals

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی شده است (Mirza & Sefidkon, 1999). همچنین اثرات ضد باکتریایی (Esmaeili *et al.*, 2008)، ضد اضطرابی و آرامبخشی (Rabbani *et al.*, 2005) این گیاه به اثبات رسیده است. در پژوهشی دیگر، عصاره متانولی این گونه بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیز بالاترین میزان مواد فنلی را در میان سه گونه اندمیک ایران به خود اختصاص داده است (Esmaeili *et al.*, 2010). از طرفی مطالعات پیشین اثبات کرده است که گیاهان خانواده نعناع شامل یک ترکیب فنلی به نام رزمارینیک اسید می‌باشند که از استر-های کافئیک اسید است (Petersen *et al.*, 2009). همچنین این ترکیب دارای خواص ضدمیکروبی، ضد ویروسی، ضدالتهابی و آنتی-اکسیدانی است (Huang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). تحقیقات فراوانی برای تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های مویین گیاهان خانواده نعناع انجام شده است (Tada *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2006) اما علی‌رغم تنوع قابل ملاحظه جنس مریم‌گلی در ایران تاکنون مطالعه مناسبی در زمینه القای ریشه‌های مویین آن‌ها صورت نگرفته است، همچنین تاکنون گزارشی از تولید رزمارینیک اسید در مریم‌گلی اصفهانی (*S. reuterana*) منتشر نشده است. از طرفی مطالعات متعددی نشان می‌دهد که نوع و غلظت محیط کشت نقش عمده‌ای در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارد (Bensaddek *et al.*, 2001; Nussbaumer *et al.*, 1998; Satdive *et al.*, 2007). بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی امکان تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین مریم‌گلی اصفهانی انجام شد. همچنین اثرات نوع محیط کشت بر روی میزان رشد و تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین مریم‌گلی اصفهانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

بذرهای مریم‌گلی اصفهانی (*S. reuterana*) از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل-ها و مراتع کشور (شماره هرباریومی: ۸۵۰۱۰۰۱) تهیه گردید. این بذرها از جاده چالوس، منطقه بیلقان، استان البرز، ارتفاع ۱۳۶۳ متری جمع‌آوری شده بودند. به منظور تولید گیاهچه‌های گلدانی بذرها پس از ضد عفونی سطحی، در گلدان‌های حاوی مخلوطی از پیت‌ماس و پرلیت به نسبت مساوی، کشت شدند و تا زمان تولید گیاهچه‌های جوان چهارهفته‌ای، در دمای اتاق با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند (Wang *et al.*, 2013).

کشت سوسپانسون باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATTC۱۵۸۳٤ (تهیه شده از آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه تهران) در محیط LB (Bertani, 2004) مایع و در ارلن‌های ml ۱۰۰ انجام گرفت. بدین منظور کشت‌های مذکور، به مدت ٤۸ ساعت در تاریکی بر روی شیکر با سرعت rpm ۱۰۰ در دمای ℃ ۲٦ قرار می‌گرفت.

جهت تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از برگ-ها و دمبرگ‌های جوان گیاهچه‌های حدود

Archive of SID

www.SID.ir

چهارهفته‌ای استفاده شد. به منظور ضدعفونی سطحی، برگ‌ها ابتدا با آب ولرم حاوی مویان شستشو گردیدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ که به هر لیتر از آن یک قطره توین ۲۰ افزوده شده بود قرار گرفتند. در طی مدت ضدعفونی ظرف حاوی برگ به آرامی تکان داده شد. سپس برگ‌ها با آب مقطر استریل ۳ بار آبکشی شدند. برگ‌ها و دمبرگ‌ها توسط اسکالپل به قطعات دو سانتی‌متری تقسیم شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور بودند. سپس تمامی ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت جامد MS عاری از هورمون قرار گرفتند. ظروف کشت به اتاق رشد با دمای ۲۵ ±۲C° و تاریکی منتقل شدند. به منظور حذف باکتری ٤٨ تا ٧٢ ساعت پس از تلقیح ریزنمونه‌ها به محیط تازه حاوی ppm ۵۰۰ آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. و این عمل تا حذف کامل باکتری چند بار با فواصل ٤-٢ روز در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ppm ۲۵۰، ppm ۱۰۰ و ppm ۵۰ سفوتاکسیم تکرار شد.

پس از ۱۱-۹ روز، ریشه‌های مویین در حاشیه قطعات برگی ظاهر شدند. ریشه‌هایی با طول ۳-۲ سانتی‌متر به طور جداگانه از ریزنمونه-ها جدا شدند و جهت کشت در ارلن ml۲۵۰ حاوی cc ۷۰ محیط کشت B5 نیم غلظت دارای ppm ۵۰ سفوتاکسیم قرار گرفتند. این ارلن‌ها با پوشش‌های تیره پوشانده شدند و روی شیکر با سرعت rpm ۹۰ قرار گرفتند. پس از یک ماه یک کلون پر رشد انتخاب و واکشت گردید. جهت بررسی اثر شش نوع محیط کشت مایع شامل B5، ½ B5، MS، ½ MS، White's و WPM (George *et al.*, 2008)، بر فاکتورهای رشد و تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های مویین مریم‌گلی اصفهانی، آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. پس از گذشت ۲۸ روز ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط کشت‌های مختلف با همدیگر مقایسه شدند.

DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه‌های طبیعی غیر تراریخت (شاهد منفی) به روش Doyle & Doyle (1987) استخراج گردید. به منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش لیز قلیایی سامبروک و راسل (Sambrook & Russell, 2001) استفاده گردید.

DNA به دست آمده، به همراه دو جفت آغازگر اختصاصی با توالی‌های ′5-CTCCTGACATCAAACTCGTC-′3 و ′5-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-′3 برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol C* (٥٨٦ bp) و توالی‌های ′5-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCGA-′3 و ′5-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-′3 برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *vir D* (٤٣٨ bp) وارد واکنش PCR گردید. جهت بررسی الگوی باندی DNA، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ به مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه[1] (50 bp) تولید شرکت فرمنتاز (Fermentas) الکتروفورز شدند. ژل پس از رنگ آمیزی در

[1] Size Marker

Archive of SID

www.SID.ir

حمام اتیدیوم برماید در دستگاه ژل داک مشـاهده گردید.

استخراج عصاره گیاهی توسط روش اولتراسونیک انجام گرفت. جداسازی و شناسایی رزمارینیک اسید با استفاده از سیستم کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (اچ‌پی‌تی-الس‌سی)[1] انجام پذیرفت (Babalar *et al.*, 2010). همچنین عملکرد تولید رزمارینیک اسید از حاصلضرب میزان رزمارینیک اسید (mg/g DW) در وزن خشک (g/L^{-1}) برای هر تیمار محاسبه شد.

برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SAS نگارش ۹/۱ استفاده گردید و میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

نتایج

تلقیح نمونه‌های برگی با اگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATTC۱۵۸۳٤ پس از ۱۱-۹ روز سبب تشکیل ریشه‌های مویین در حاشیه قطعات برگی گردید. از سوی دیگر در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های دمبرگی با سویه مورد مطالعه، هیچ ریشه‌ای تشکیل نگردید. ماهیت تراریختی ریشه-های مویین به دست آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rol* C بررسی شد. واکنش PCR با DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین تراریخت شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۵۸٦ جفت باز گردید (شکل ۱). توالی ژنی ناحیه *vir* D سبب تکثیر قطعات در DNA استخراج شده از پلاسمید باکتری شد، ولی هیچ باندی در DNA ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های غیر تراریخت تشکیل نگردید (شکل ۲)، که نشان دهنده عدم حضور بقایای ژن‌های باکتری در روی ریشه‌های مویین تراریخت می-باشد.

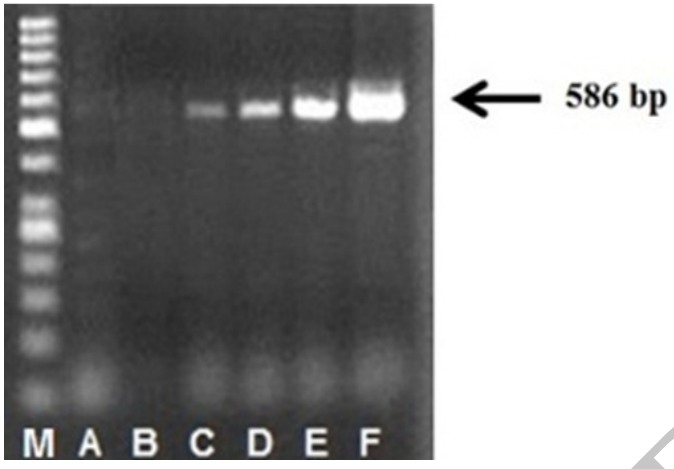
میزان وزن تر نمونه‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده نشان داد اثر نوع محیط کشت بر میزان وزن تر ریشه‌های مویین در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۱). حداکثر میزان تولید وزن تر ریشه مویین (٤۱/٦۵ گرم در لیتر) در محیط MS به دست آمد. میانگین وزن تر به دست آمده از ریشه‌های مویین که درون محیط کشت B5 رشد یافته بودند برابر ۱۸/٤ گرم در لیتر بود. وزن تر ریشه‌های مویین در این محیط تقریبا ۱/۲ برابر محیط WPM بود. از میان پنج تیمار به کار رفته در این آزمایش محیط کشت White's با میانگین وزن تر ۸/٦ گرم در لیتر کمترین تولید را به خود اختصاص داد. همچنین مشاهده شد که با افزایش غلظت از یک دوم به تمام غلظت میزان وزن ریشه‌ها در محیط کشت MS، ۱/۷ برابر و در محیط کشت B5، ۱/۵ برابر گردید (جدول ۱).

[1] High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

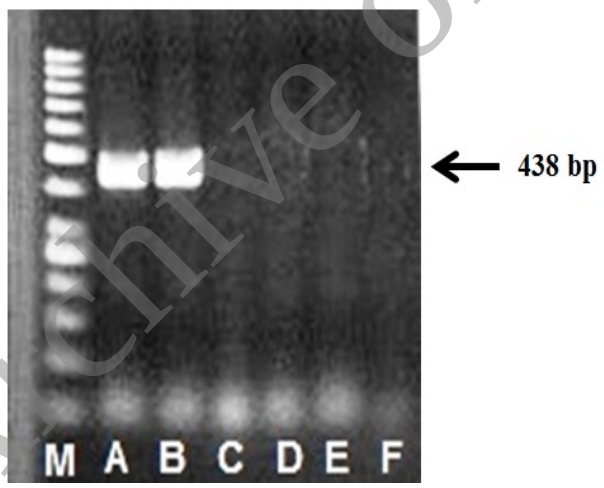
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- آنالیز PCR با پرایمراختصاصی ژن C *rol*، M: نشانگر اندازه (50 bp)، A و B: DNA ریشه طبیعی، C و D: DNA ریشه‌های تراریخت، E و F: DNA پلاسمید سویه ۱۵۸۳٤.

Figure 1- PCR detection of *rol* C genes, M: DNA ladder (50 bp), A and B: non-transformed roots DNA, C and D: hairy roots DNA, E and F: plasmid DNA of strain15834.



شکل ۲- آنالیز PCR با پرایمر اختصاصی ژن D *vir* ، M: نشانگر اندازه 50 bp، A و B: DNA پلاسمید سویه ۱۵۸۳٤، C و D: DNA ریشه‌های تراریخت، E و F: DNA ریشه طبیعی.

Figure 2- PCR detection of *vir* D genes, M: DNA ladder (50 bp), A and B: plasmid DNA of strain 15834, C and D: hairy roots DNA, E and F: non-transformed roots DNA.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تاثیر نوع محیط کشت بر رشد و تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های مویین مریم گلی اصفهانی.

Table 1- Analysis of Variance and Compare Means of the effect of medium type on hairy root growth and rosmarinic acid production of *S. reuterana* hairy root.

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی Degree of freedom	مجموع مربعات (Sums Of Squares)		
		وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	میزان رزمارینیک اسید Rosmarinic acid
محیط کشت (Medium)	5	419.97**	4.44*	881.42**
خطا (error)	12	4.29	0.031	2.1
ضریب تغییرات (CV%)	-	10.4	12.35	4.77
محیط کشت Medium		وزن تر Fresh weight (g/L^{-1})	وزن خشک Dry weight (g/L^{-1})	میزان رزمارینیک اسید Rosmarinic acid (mg/g DW)
B5		18.467 c	1.13 c	52.26 a
1/2B5		12.307 de	0.6733 de	13.53 e
MS		41.657 a	3.7467 a	33.93 c
1/2MS		23.653 b	1.7267 b	48.4 b
White's		8.64 e	0.4633 e	14.93 e
WPM		14.8 cd	0.84 cd	18.96 d

ns: Not significant, *: Significant at p>0.05, **: Significant at p>0.01
There is no statically difference between means with the same letter.

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار ،*معنی‌دار در سطح ۵٪، **معنی‌دار در سطح ۱٪،
میانگین هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند تفاوت معنی داری ندارند

میزان وزن خشک

اثر نوع محیط کشت بر روی میزان وزن خشک ریشه‌های مویین در سطح ۵٪ معنی‌دار است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که محیط کشت MS در میان محیط کشت‌های مختلف به‌کار رفته، دارای حداکثر تولید ماده خشک می‌باشد. هر چند بین محیط کشت White's و محیط کشت B5 نیم غلظت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما به هر حال کمترین میزان تولید ماده خشک مربوط به محیط کشت White's با میزان ماده خشک ۰/٤٦ گرم در لیتر می‌باشد (جدول ۱).

وزن خشک ریشه‌ها با افزایش غلظت از یک دوم به تمام غلظت در محیط کشت MS، ۲/۱ برابر و در محیط کشت B5، ۱/۸ برابر شد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

میزان تولید رزمارینیک اسید

مطابق جدول تجزیه واریانس نوع محیط کشت اثر معنی‌داری بر میزان رزمارینیک اسید تولید شده در ریشه‌های مویین مریم‌گلی اصفهانی دارد (جدول ۱). حداکثر میزان تولید رزمارینیک اسید در محیط کشت B5 حاصل گردید، به طوری‌که در این محیط ۵۲/۲ میلی‌گرم رزمارینیک اسید به ازای هر گرم وزن خشک به دست آمد. محیط کشت MS با اینکه بالاترین میزان تولید ریشه مویین را دارا بود اما با تولید ۳۳/۹ میلی-گرم رزمارینیک اسید به ازای هر گرم وزن خشک، به صورت معنی‌داری میزان کمتری را نسبت به محیط‌های کشت B5 و MS نیم‌غلظت دارا بود. کمترین میزان تولید رزمارینیک اسید نیز در محیط کشت B5 نیم غلظت مشاهده گردید، هر چند مطابق نتایج به دست آمده میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین کشت داده شده در این محیط کشت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با محیط کشت White's ندارند (جدول ۱).

میزان رزمارینیک اسید تولید شده در محیط کشت نیم‌غلظت MS تقریبا ۱/٤ برابر محیط کشت MS می‌باشد. همچنین با کاهش غلظت به نصف در محیط کشت B5، میزان تولید رزمارینیک اسید بیش از ۲/۵ برابر تقلیل یافت (جدول ۱).

بحث

در مطالعه حاضر برای نخستین بار ریشه-های مویین توسط اگروباکتریوم رایزوژنز در *S. reuterana* القا گردید و سپس اثر نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین و بیوسنتز رزمارینیک اسید در آن، مورد بررسی قرار گرفت. عملکرد کشت ریشه‌های مویین توسط برخی از شاخص‌ها نظیر میزان رشد وزنی و میزان ترکیبات تولید شده در واحد وزن خشک سنجیده می‌شود. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که نوع محیط کشت اثر قابل توجهی بر رشد و میزان تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین مریم-گلی اصفهانی دارد. مطالعات پیشین نیز نشان می-دهد که علاوه بر توانایی و قابلیت درونی ریزنمونه‌ی استفاده شده، شرایط و محیط کشت نیز به دلیل دارا بودن خاصیت تغذیه‌ای و تحریک کنندگی[1] نقش به سزایی در رشد ریشه‌های مویین و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها دارند (Xu *et al.*, 2009; Srivastava & Srivastava, 2007). همچنین پژوهش‌های مختلفی نشان می-دهد که محیط کشت‌های مختلف به دلیل تفاوت-شان در اجزا و غلظت، می‌توانند بر بیان تعداد قابل توجهی از ژن‌ها، به ویژه ژن‌های آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز و استفاده از ذخایر غذایی تاثیر بگذارند و از این طریق تولید متابولیت‌های ثانوی را تنظیم نمایند. از طرف دیگر، پتانسیل اسمزی محیط کشت می‌تواند رشد ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانوی را تحت تاثیر قرار دهد

[1] Elicitation

Archive of SID

www.SID.ir

Asghari & Salimian Rizi, 2008; Do &) Cormier, 1990). در مطالعه حاضر نیز مشاهده می‌شود که بیشترین وزن تر و خشک در محیط کشت MS که دارای بیشترین قدرت یونی (mM ۹۵/۸) در میان محیط کشت‌ها می‌باشد، حاصل گردید. همچنین کمترین میزان وزن تر و خشک در محیط کشت White's با کمترین قدرت یونی (۱۸ mM) به دست آمد (George *et al.*, 2008).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان تولید رزمارینیک اسید به ازای هر گرم ماده خشک در محیط کشت B5 به حداکثر خود رسید. در یک بررسی، از میان سه محیط کشت MS،B5 و WPM که در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Ocimum basilicum* به کار گرفته شدند، بیشترین میزان رشد در محیط کشت MS حاصل گردید (Tada *et al.*, 1996). همچنین در بررسی تاثیر چهار نوع محیط کشت مختلف شامل B5، WPM، MS و NN بر کشت ریشه‌های مویین گیاه *Coleus forskolii* ، بیشترین رشد در محیط کشت MS و بیشترین میزان تولید رزمارینیک اسید در محیط B5 حاصل گردید (Li *et al.*, 2005). نتایج فوق با مشاهدات به دست آمده از آزمایش حاضر در توافق است. این در حالی است که بیشترین میزان وزن تر، وزن خشک و رزمارینیک اسید تولید شده در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Hyssopus officinalis* در محیط کشت WPM به دست آمد (Murakami *et al.*, 1998)، که این نتیجه به همراه نتایج تعداد دیگری از مطالعات (Chen *et al.*, 1999; Satdive *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2007) با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد. این تفاوت می‌تواند به علت تفاوت ژنتیکی هر یک از گیاهان که در تولید ریشه‌های مویین به کار گرفته شده‌اند و یا به علت ماهیت ترکیب تولید شده باشد.

در مطالعه حاضر، ریشه‌های کشت شده در محیط کشت MS هرچند رشد بیشتری نسبت به ریشه‌های رشد یافته در محیط کشت B5 و MS نیم غلظت داشتند، اما میزان تولید رزمارینیک اسید کمتری نسبت به این دو محیط داشت. به نظر می‌رسد این امر نشان‌دهنده همبستگی منفی میان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین است. وجود همبستگی منفی میان رشد و تولید تروپان آلکالوئید نیز در کشت ریشه‌های مویین *Hyoscyamus alba* مشاهده شده است (Christen *et al.*, 1992)، که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد. در توجیه این پدیده می‌توان گفت، احتمالا بالا بودن غلظت اجزای تشکیل دهنده محیط کشت MS و در نتیجه بالا بودن ارزش تغذیه‌ای این محیط (George *et al.*, 2008)، سبب افزایش میزان تنفس در ریشه‌های مویین می‌گردد که این شرایط جهت تولید بیوماس مطلوب است، در حالی‌که بیوسنتز ترکیبات ثانوی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

هر چند تولید رزمارینیک اسید به ازای هر گرم ماده خشک در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت B5 و MS نیم غلظت کمتر بود، با این حال محاسبه عملکرد میزان تولید رزمارینیک

Archive of SID

www.SID.ir

اسید نشان می‌دهد میزان تولید این ماده به ازای هر لیتر محیط کشت، در محیط کشت MS بیشتر بود (۰/۱۳ گرم در لیتر در برابر ۰/۰۸ و ۰/۰۵ گرم در لیتر). از این‌رو به طور کلی محیط کشت MS مناسب‌ترین محیط برای رشد ریشه‌های مویین *S. reuterana* می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد ریشه‌های مویین *S. reuterana* (مریم گلی اصفهانی) قادر به تولید رزمارینیک اسید هستند و محیط کشت MS به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های مویین تراریخت جهت تولید رزمارینیک اسید پیشنهاد می‌گردد.

منابع

Asghari Gh, Salimian Rizi T (2008). The influence of fructose, glucose and sucrose on flavolignans formation in *Silybum marinum* Callus Culture. Journal of Medicinal Plants 7: 16-23.

Babalar M, Mumivand H, Hadian J, Fakhr Tabatabaei SM (2010). Effects of nitrogen and calcium carbonate on growth, rosmarinic acid content and yield of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural Science 2: 92-98.

Barrett SCH, Wilken DH, Cole WW (2000). Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. Plant Systematics and Evolution 223: 211-219.

Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JE, Fliniaux MA (2001). The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology 85: 35-40.

Bertani G (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. Journal of Bacteriology 186: 595-600.

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

Chen H, Chen F, Zhang YL, Song JY (1999). Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 22: 133-138.

Christen P, Aoki T, Shimomura K (1992). Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. Plant Cell Reports 11: 597-600.

Dhakulkar S, Bhargava S, Ganapathi TR, Bapat VA (2005). Induction of Hairy Roots in *Gmelina arborea* Roxb. using *Agrobacterium rhizogenes*. Founder's Day Special Issue 261: 100-106.

Do CB, Cormier F (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Reports 9: 143-146.

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Esmaeili A, Rustaiyan A, Nadimi M, Larijani K, Nadjafi F, Tabrizi L, Chalabian F, Amiri H (2008). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of *Salvia reuterana* Boiss. grown in Iran. Natural Product Research 22: 516-520.

Archive of SID

www.SID.ir

Esmaeili MA, Kanani MR, Sonboli A (2010). *Salvia reuterana* extract prevents formation of advanced glycation end products: an in vitro study. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences 6: 33-50.

Giri A, Narasu ML (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances 18: 1-22.

George EF, Hall MA, Klerk GJD (2008). Plant propagation by tissue culture, volume 1. Springer, Netherlands.

Hu Z-B, Du M (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology 48: 121-127.

Huang B, Yi B, Duan Y, Sun L, Yu X, Guo J, Chen W (2008). Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. Molecular Biology Reports 35: 601-612.

Jung H-Y, Kang S-M, Kang Y-M, Kang M-J, Yun D-J, Bahk J-D, Yang J-K, Choi M-S (2003). Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Enzyme and Microbial Technology 33: 987-990.

Kabirnetaj S, Zolala J, Nematzadeh GA, Shokri E (2012). Optimization of hairy root cultue establishment in chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by Agrobacterium rhizogenes. Journal of Agricultural Biotechnology 4: 61–75.

Kumar V, Sharma A, Narasimha Prasad BC, Bhaskar Gururaj H, Aswathanarayana Ravishankar G (2006). *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electronic Journal of Biotechnology 9: 349-357.

Lee SY, Lee CY, Eom SH, Kim YK, Park NI, Park SU (2010). Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria* L. Scientific Research and Essays 5: 1122-1126.

Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T (2005). Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 151-155.

Mirza M, Sefidkon F (1999). Essential oil composition of two *Salvia* species from Iran, *Salvia nemorosa* L. and *Salvia reuterana* Boiss. Flavour and Fragrance Journal 14: 230-232.

Murakami Y, Omoto T, Asai I, Shimomura K, Yoshihira K, Ishimaru K (1998). Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 75-78.

Nussbaumer P, Kapétanidis I, Christen P (1998). Hairy roots of *Datura candida×D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. Plant Cell Reports 17: 405-409.

Pawar PK, Maheshwari VL (2004). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. Indian Journal of Biotechnology 3: 414-417.

Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hucherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry 70: 1663-1679.

Rabbani M, Sajjadi SE, Jafarian A, Vaseghi G (2005). Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. Journal of Ethnopharmacology 101: 100-103.

Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR, Sepehrifar R (2008). Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.). Iranian Journal of Biotechnology. 6: 113–119.

Rao SR, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

Archive of SID

www.SID.ir

Satdive RK, Fulzele DP, Eapen S (2007). Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. Journal of Biotechnology 128: 281-289.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Shi HP, Lindemann P (2006). Expression of recombinant *Digitalis lanata* EHRH. cardenolide 16'-O-glucohydrolase in *Cucumis sativus* L. hairy roots. Plant Cell Reports 25: 1193-1198.

Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology 27: 29-43.

Syklowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Kokoszka A, Furmanowa M (2009). Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. Hicksii. Journal of Plant Physiology 166: 1950-1954.

Tada H, Murakami Y, Omoto T, Shimomura K, Ishimaru K (1996). Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Phytochemistry 42: 431-434.

Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. Plant Cell Reports 26: 199-210.

Triplett BA, Moss SC, Bland JM, Dowd MK, Phillips GC (2008). Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 44: 508-517.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1: 13-25.

Wang QJ, Zheng LP, Yuan HY, Wang J (2013). Propagation of *Salvia miltiorrhiza* from hairy root explants via somatic embryogenesis and tanshinone content in obtained plants. Industrial Crops and Products 50: 648-653.

Wu JY, Ng J, Shi M, Wu SJ (2007). Enhanced secondary metabolite (tanshinone) production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots in a novel root-bacteria coculture process. Applied Microbiology and Biotechnology 77: 543-550.

Xu H, Park J, Kim Y, Park N, Lee S, Park S (2009). Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. Journal of Medicinal Plants Research 3: 978-981.

Yan Q, Shi M, Ng J, Wu JY (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Science 170: 853-858.

Zarei B, Kahrizi D, Mousavi SA, Nasrollahnezhad Ghomi AA (2013) Agrobacterium rhizogense-mediated transformation of *Atropa belladonna*. Journal of Agricultural Biotechnology 5: 59–68.

Archive of SID

www.SID.ir

Production of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia reuterana*

Norouzi R.[*1], Babalar M.[2], Mirmasoumi M.[3], Hadian J.[4]

[1] Graduated from Department of Horticultural Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2] Professor, Department of Horticultural Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran.
[3] Lecturer, Department of Botany, College of Sciences, University of Tehran, Iran.
[4] Associate Professor, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran.

Abstract

It was the first time that hairy roots were initiated from *Salvia reuterana* by infection with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATTC 15834. Confirmatory studies were carried out by direct detection of inserted T-DNA by the polymerase chain reaction. These hairy root cultures had the ability to produce rosmarinic acid. The effect of six different basic media including B5 ،½ B5 ،MS ،½ MS ،White's and WPM on the root growth and rosmarinic acid production was studied. Results showed that maximum fresh weight (41.4 g/L^{-1}) and dry weight (3.7 g/L^{-1}) were found in MS medium. Despite the maximum rosmarinic acid production (52.2 mg/g DW) was achieved in B5 medium, the highest amount of rosmarinic acid yield (0.13 g/L^{-1}) was observed in MS medium. Therefore MS medium was suggested as the best culture medium for growth and rosmarinic acid production in hairy root culture of *Salvia reuterana*.

Key words: *Lamiaceae, Salvia reuterana, Hairy root, Rosmarinic acid.*

Archive of SID

[*]Corresponding Author: Norouzi R. Tel: 04532545623 Email: reza.norouzi@uma.com

www.SID.ir