دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، صفحه ۲۸۰-۲۶۴ (۱۳۹۵)

# بهینه‌سازی القاء و تثبیت کشت ریشه‌های مویین *Teucrium chamaedrys* L.

**ایرج برنوسی[۱]، مراد جعفری[۲*] و جواد احمدی دیزجی[۳]**

۱- دانشیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

پست الکترونیک: m.jafari@urmia.ac.ir

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

## چکیده

در این مطالعه، اثر دو روش تلقیح (شناورسازی و اسپری) و دو سویه *Agrobacterium rhizogenes* (A13 و GMI9534) برای القاء ریشه‌های مویین روی ریزنمونه‌های مختلف (هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و گره ساقه *Teucrium chamaedrys* L. بررسی شد. سویه GMI9534 نتوانست در هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها ریشه مویین القاء کند، در حالیکه سویه A13 فقط قادر به القاء ریشه‌های مویین روی ریزنمونه های برگ و گره ساقه بود. البته روش تلقیح شناورسازی، با فراوانی بالای القای ریشه مویین (بیش از ۷۳/۳٪)، بسیار موفقیت‌آمیز بود و ریزنمونه‌های برگ بالاترین فراوانی القاء (۸۳/۳٪) را نشان دادند. لاین‌های ریشه مویین تراریخته به‌وسیله آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*A و *rol*B تأیید شدند. ۲۰ لاین ریشه مویین مستقل از هم، کشت شده روی محیط کشت MS جامد عاری از تنظیم‌کننده رشد، تفاوت معنی‌داری از نظر طول کلی و انشعاب‌دهی ریشه داشتند. این متغیرها در تمام واکشت‌ها پایدار بودند، از این‌رو ۷ لاین ریشه مویین براساس این خصوصیات رشدی انتخاب شدند. متعاقباً، کشت‌هایی از لاین‌های انتخاب شده در محیط کشت MS مایع نصف غلظت برای پیگیری میزان تولید زیست‌توده در یک دوره کشت ۹۰ روزه فراهم شد. بین لاین ها تنوع قابل توجهی از نظر ظرفیت رشدی مشاهده شد. لاین TC-HR-16 بیشترین مقدار زیست‌توده تر (۹۱۰۰ میلی‌گرم در هر ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت) را با ۴۵۵ برابر افزایش نسبت به مایع تلقیح اولیه در طی دوره کشت ۱۰ هفته‌ای تولید کرد. لاین های ریشه مویین با خصوصیات عالی حاصل از این مطالعه می توانند برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش دارویی *Teucrium chamaedrys* L. استفاده شوند.

**واژه‌های کلیدی:** *Teucrium chamaedrys* L. ، آگروباکتریوم رایزوژنز، سویه باکتری، ریزنمونه، زیست‌توده.

## مقدمه

مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys* L.) از خانواده Lamiaceae، گیاهیست علفی پایا، بوته‌ای به ارتفاع ۱۰ تا ۲۵ سانتی‌متر با ساقه کرکپوش، برگ‌های بیضوی، بی‌کرک و کنگره‌ای و گل‌های ارغوانی که در جنگل‌های نواحی مرکزی و جنوبی اروپا و شمال‌غربی آسیا ازجمله ایران در ارتفاعات خراسان شمالی، گلستان، مازندران و آذربایجان توزیع جغرافیایی دارد

Archive of SID

www.SID.ir

(Rechinger, 1982). قسمت دارویی مورد استفاده گیاه، سرشاخه گلدار گیاه است و زمان جمع‌آوری آن به تناسب شرایط محیط زندگی بین ماه‌های خرداد و مرداد است. گزارش‌های محدودی در مورد ترکیب های شیمیایی تشکیل‌دهنده این گونه گیاهی وجود دارد. به طور کلی بررسی‌ها نشان داده‌اند که جرماکرن دی، بتا-کاریوفیلن، آلفا-پینن، آلفا-هومولن و دلتا-کادنین از عمده ترین ترکیب های شیمیایی این گونه گیاهی هستند (Morteza-Semnani *et al.*, 2005؛ Muselli *et al.*, 2009؛ Bagci *et al.*, 2010). در مورد محتوای ترکیب شیمیایی جمعیت گیاهی بررسی شده در این تحقیق فقط یک گزارش وجود دارد و عمده‌ترین ترکیب های شیمیایی گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه مارمیشو آذربایجان‌غربی، بتا-کاریوفیلن، آلفا-مورولن، آلفا-پینن و بتا-فارنزن گزارش شده‌است (Kazemizadeh & Heidari Rikan, 2009). چنین تنوعی در محتوای شیمیایی و میزان آنها در یک گونه گیاهی از رویشگاه‌های مختلف علاوه‌بر تنوع ژنتیکی به عوامل مختلفی مانند اکولوژیکی، جغرافیایی، خاکی و اقلیمی نیز نسبت داده می‌شود (Sadeghi *et al.*, 2014). از مهمترین اثرات دارویی مریم نخودی طناز می توان به خاصیت لاغرکنندگی، ضددیابت، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن اشاره کرد (Bagci *et al.*, 2010). اخیراً در مطالعه‌ای، عصاره متانولی این گیاه اثرات سیتوتوکسیتی بالایی نسبت به سلول های سرطانی کولون انسانی نشان داده‌است (Stankovic *et al.*, 2011).

با توجه به برداشت‌های بی‌رویه گیاهان دارویی ازجمله مریم نخودی طناز از محیط‌های طبیعی، عدم امکان فراهم کردن مواد گیاهی یکنواخت در مقیاس وسیع از طریق رویشگاه‌های طبیعی و تأثیر نامطلوب عوامل محیطی مختلف بر کیفیت و میزان ترکیب های شیمیایی گیاه، کشت دورن شیشه‌ای (*in vitro*) این گیاهان به‌منظور حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی و امکان استفاده در مقیاس صنعتی برای تولید انبوه ترکیب های مؤثره دارویی آنها حائز اهمیت است. کشت های سازمان یافته می توانند سهم مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشند. برخی مزیت‌های تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سلول و بافت شامل کنترل بهینه شرایط کشت، افزودن پیش‌سازهای مورد نیاز برای افزایش بازده و تولید متابولیت‌های ثانویه خاص و تولید محصول با کیفیت و بدون آلودگی‌های عوامل بیماری‌زا می‌باشد. در میان تکنیک‌های مختلف کشت بافت، کشت ریشه های مویین (hairy roots) حاصل از تلقیح باکتری *Agrobacterium rhizogenes* قابلیت بالایی برای تولید متابولیت‌های ثانویه برخوردار هستند. باکتری *A. rhizogenes* یک باکتری خاکزی است که از طریق انتقال بخش T-DNA پلاسمید Ri خود باعث تولید ریشه های مویین می‌شود. علاوه‌بر این، از ریشه های مویین به‌عنوان یک سیستم مدل ارزشمند برای توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان استفاده می‌شود (Hu & Du, 2006). این بافت‌های تمایزیافته به‌دلیل رشد سریع، پایداری بیوشیمیایی و قابلیت باززایی گیاهان تراریخته به عنوان بهترین مدل سیستم‌های کشت بافتی معرفی شده‌است (Nader *et al.*, 2006). این ریشه‌ها بستر باارزشی برای متابولیت‌های ثانویه می‌باشند، به طوری که ریشه های مویین یک گیاه دارویی می توانند متابولیت‌های ثانویه متنوعی را تولید کنند (Hasanloo *et al.*, 2008). کشت ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده شده است و نتایج بیشتر مطالعات بیانگر تولید مؤثر و چند برابری ترکیب‌های باارزش دارویی در این کشت‌ها در مقایسه با گیاهان مادری است (Bensaddek *et al.*, 2008؛ Park *et al.*, 2010؛ Gupta *et al.*, 2011؛ Ahmadi moghadam *et al.*, 2013؛ Torkamani *et al.*, 2014). با توجه به منابع علمی قابل دسترس، تاکنون هیچ مطالعه بیوتکنولوژیک ازجمله تولید ریشه مویین در گیاه مریم نخودی طناز انجام نشده است. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه مویین که بتواند امکان کشت در مقیاس وسیع در یک

Archive of SID

www.SID.ir

سیستم بیوراکتور و تولید صنعتی متابولیت‌های مهم آن را فراهم کند، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق برای اولین بار تولید ریشه مویین در گیاه مریم نخودی طناز گزارش شد. اثر سویه باکتری، روش تلقیح و نوع ریزنمونه در میزان القای ریشه مویین و همچنین میزان تولید زیست‌توده در لاین های مختلف ریشه مویین مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این تحقیق بذرهای مریم‌نخودی طناز توسط آقای مهندس احمدی (مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی) از منطقه‌ای با طول و عرض جغرافیایی به‌ترتیب ″۱۰ ′۳۳ °۳۷ N و ″۳۳ ′۰۴ °۴۵ E و ارتفاع ۱۶۵۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری و درستی آن در هرباریوم گیاهی این مرکز توسط ایشان تأیید و نمونه هرباریومی آن با شماره PBB-WAZ-78 نگهداری شد.

### ضدعفونی بذر و تهیه ریزنمونه

بذرهای مریم‌نخودی ابتدا توسط اسیدسولفوریک ۹۸٪ به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند. پس از شستشوی اولیه با آب معمولی برای حذف اثر اسید، در شرایط استریل با استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم (حاوی ۵٪ کلر فعال) ۱/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و بعد سه بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه، با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط MS پایه که حاوی ۷ گرم در لیتر آگار گیاهی، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با pH=۵/۸ بودند کشت شد و تمام کشت‌ها در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور Lux ۲۰۰۰ و دمای ۲۴±۲°C نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، گیاهچه‌های استریل ۲ هفته‌ای برای تهیه ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای برای ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه استفاده شدند.

### تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium rhizogenes*

دو سویه *A. rhizogenes*، A13 و GMI9534 (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، NIGEB) برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور کشت تک کلونی از باکتری‌ها در ۵ml محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (۵۰mg/l) انجام شد. پس از رسیدن $OD_{600}$≅۰/۵-۰/۴، سوسپانسیون با استفاده از محیط LB مایع به همراه آنتی‌بیوتیک مناسب به حجم ۴۰ml رسانده شد و سوسپانسیون باکتری در دستگاه شیکر انکوباتور با ۲۰۰rpm و دمای ۲۸°C به مدت ۵ ساعت قرار گرفت. پس از آن، سوسپانسیون باکتری در دستگاه سانتریفیوژ با ۵۰۰۰rpm و مدت زمان ۵ دقیقه رسوب داده شد. رسوب باکتری را در ۴۰ml محیط القاء، شامل محیط پایه MS حاوی آنتی بیوتیک مناسب، استوسیرینگان (۵۰µM) و گلوکز (۵۰mg/l)، حل و سوسپانسیون باکتری در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰rpm دمای ۲۸°C و به مدت ۵ ساعت نگهداری شد. پس از آن، سوسپانسیون باکتری تهیه شده برای تلقیح استفاده شد.

برای القاء ریشه مویین، از ریزنمونه های هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و گره ساقه جدا شده از گیاهچه‌های بذری دورن شیشه‌ای استفاده شد. تلقیح ریزنمونه‌ها به دو روش شناورسازی و اسپری به‌شرح زیر انجام شد: در تلقیح به روش اسپری، ۲۰۰ ریزنمونه از هر یک از ریزنمونه‌های جدا شده، که با تیغ اسکالپل به‌طور سطحی زخمی شده بودند، به‌وسیله سرنگ شیشه ای با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده پس از قرار گرفتن بر روی کاغذ صافی استریل برای حذف باکتری‌های اضافی، در محیط هم کشتی (co-culture) شامل محیط پایه MS حاوی استوسیرینگان (۵۰µM) کشت شدند. برای روش شناورسازی، ریزنمونه‌های جدا شده در سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه شناور شدند و بعد ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل برای حذف باکتری‌های اضافه قرار داده شدند. در نهایت ریزنمونه های تلقیح شده در محیط هم‌کشتی شامل محیط پایه MS حاوی استوسیرینگان (۵۰µM) کشت گردیدند. تعدادی ریزنمونه با محیط کشت MS بدون باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

به صورت اسپری یا شناورسازی تلقیح شدند و به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

در هر دو روش، نمونه ها در اتاقک رشد در شرایط کم‌نور (Dim) با دمای ۲۵±۲°C به مدت ۴ شبانه‌روز نگهداری شدند. پس از اتمام دوره هم‌کشتی، ریزنمونه های تلقیح شده در محیط شستشو، شامل محیط کشت نصف غلظت (½)MS مایع حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰mg/l)، به مدت ۲ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۱۰۰rpm و دمای اتاق (۲۵°C) شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه ها در محیط کشت MS جامد حاوی ساکارز (۳۰mg/l)، سفوتاکسیم (۲۵۰mg/l) و بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی (plant growth regulators, PGRs) کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۲°C و شرایط تاریکی نگهداری شدند. آزمایش فاکتوریل دو عاملی (ریزنمونه و روش تلقیح) براساس طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با ۳ تکرار برای بررسی کارآیی القاء ریشه مویین (کارآیی تراریختی) به‌واسطه آگروباکتریوم رایزوژنز پیاده شد و آزمایش سه بار تکرار شد. کارایی القای ریشه (٪) به صورت فرمول زیر محاسبه گردید. داده‌های حاصل در نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین داده ها براساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر (FLSD) در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

$$\text{کارایی تراریختی (٪)} = \frac{\text{تعداد ریزنمونه های حاوی ریشه مویین القا شده}}{\text{تعداد ریزنمونه های تلقیح شده با باکتری}} \times 100$$

پس از ظهور و رشد نسبی (۴cm–۳) ریشه های مویین احتمالی، آنها از سطح ریزنمونه‌ها در محل القاء قطع شدند و در میحط کشت MS جامد حاوی ساکارز (۳۰mg/l)، سفوتاکسیم (۲۵۰mg/l) و بدون PGRs کشت شدند. کشت ها به اتاقک رشد منتقل و با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۰۰۰Lux و دمای ۲۴±۲°C نگهداری شدند و هر دو هفته یک‌بار واکشت ریشه ها انجام شد و میزان سفوتاکسیم طی واکشت های متوالی کاهش داده شد تا پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی آگروباکتری، کاملاً از محیط کشت حذف شد.

**آنالیز PCR**

برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین احتمالی، استخراج DNA ژنومی از ریشه‌ها طبق روش CTAB (Doyle & Doyle, 1990) انجام شد. آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن های *rol*A و *rol*B انجام گردید. طراحی آغازگر به گونه ای بود که با یک جفت پرایمر برای تکثیر قطعه ۱۱۵۰bp از توالی هر دو ژن در ریشه های تراریخته احتمالی انجام گیرد. همچنین برای تأیید درج ژن‌های *rol* در ژنوم ریشه‌ها و عدم هر گونه آلودگی آگروباکتری در فضاهای بین سلولی، PCR برای تکثیر ژن *vir*$D_2$ (واقع در بخش خارج از بخش T-DNA روی پلاسمید Ri باکتری) به اندازه ۳۳۸bp انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol* عبارت بودند از: 5'-TTAGCTTCCAAGTTACTGCAGC-3' (مستقیم) و 5'-GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3' (معکوس) و توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *vir*$D_2$ عبارت بودند از: 5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3' (مستقیم) و 5'-CCTGACAACATCTCGGCTGCCCA-3' (معکوس). برای آماده‌سازی واکنش های PCR به حجم نهایی ۲۰µl، برای هر واکنش، ۰/۵µl از هر آغازگر (مستقیم و معکوس) با غلظت ۱۰pmol، ۱۰µl Prime Taq DNA Premix (GenetBio، کره)، ۱µl DNA الگو با غلظت ۵۰ng، ۸µl آب استریل استفاده شد. PCR در دستگاه ترموسایکلر Eppendrof مدل Mastercycler 5331 طبق برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۳°C به مدت ۸۰ ثانیه و بسط آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت ۸۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز روی

Archive of SID
www.SID.ir

ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط دستگاه Gel-Doc مورد مشاهده قرار گرفتند.

**ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین**

برای ارزیابی لاین های مویین از نظر میزان رشد دو آزمایش مستقل اجرا شد. در آزمایش اول، تعداد ۲۰ لاین مختلف ریشه مویین انتخاب شد. لازم به ذکر است که لاین‌های تراریخته مستقل از هم ( independent transgenic events) انتخاب شدند و منبای انتخاب، استفاده از لاین‌های ریشه مویین با محل القاء متفاوت بر روی ریزنمونه‌ها بود. به‌طور طبیعی چنین لاین‌هایی با احتمال بسیار بالا از نظر تعداد نسخه‌های تراژن‌ها و محل درج آنها از هم متفاوت بوده، از این‌رو لاین‌های تراریخته مستقل از هم به حساب می آیند. ریشه های مویین انتخاب شده در محیط جامد MS بدون PGRs کشت شدند. طی دو فاصله زمانی ۲۱ روزه، متغیرهای طول ریشه اصلی، تعداد انشعاب دهی هر لاین، با سه تکرار برای هر لاین اندازه‌گیری شد و داده ها با آزمون t-test تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین رفتار رشدی لاین ها طی دوره‌های واکشت، همبستگی بین متغیرها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS v. 18 محاسبه شد.

در آزمایش دوم، قطعات ریشه (۴-۳cm) دارای نوک ریشه از ۷ لاین انتخاب شده از آزمایش اول، به ارلن‌های ۱۰۰ml حاوی ۲۰ml محیط کشت ½ MS مایع و بدون هر گونه آنتی‌بیوتیک و PGRs منتقل و در اتاقک رشد روی دستگاه شیکر با ۹۰rpm و دمای ۲۴±۲°C قرار داده شدند و در طی سه ماه و به‌طور هر سه هفته میزان تجمع زیست‌توده تر اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر لاین پیاده شد. داده‌های حاصل در نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون FLSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

## نتایج

**تأثیر نوع سویه باکتری و روش تلقیح میزان القای ریشه مویین**

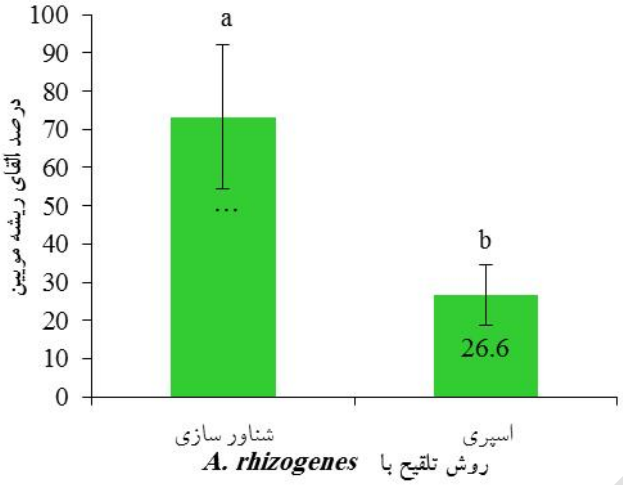
تعداد ۲۴۰۰ ریزنمونه در مجموع سه بار تکرار آزمایش، به‌وسیله هریک از سویه‌های *A. rhizogenes* مورد استفاده تلقیح شد. براساس نتایج حاصل، بدون در نظر گرفتن نوع ریزنمونه، بین سویه‌ها از نظر القاء ریشه مویین تفاوت آماری بسیار معنی دار وجود داشت، به طوری که سویه GMI9534 در هیچ یک از ریزنمونه‌های مورد مطالعه منجر به القاء ریشه‌مویین نشد ولی سویه A13 بدون در نظر گرفتن روش تلقیح بیش از ۹۰٪ کارایی القاء ریشه مویین نشان داد. با این حال بین دو روش تلقیح، از نظر کارآیی القای ریشه مویین تفاوت معنی‌دار آماری ($P<۰/۰۱$) مشاهد شد، به‌طوری که روش تلقیح شناورسازی ۷۳/۳۰٪ کارآیی القای ریشه نشان داد که این میزان تقریباً سه برابر روش اسپری بود (شکل ۱).

**تأثیر نوع ریزنمونه بر میزان القای ریشه مویین**

بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر پاسخ به روش تلقیح با آگروباکتری A13، اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) وجود داشت. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون هیچ ریشه مویینی القاء نشد، ولی در ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه از نظر میزان القای ریشه اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) وجود داشت، به‌طوری که در ریزنمونه‌های برگی بیشترین میزان القای ریشه (۷۵٪) مشاهده شد (شکل ۲). در هر دو ریزنمونه از طریق روش تلقیح اسپری میزان ریشه القایی نسبتاً پایین (۳۰-۲۳ ٪) بود و تفاوت معنی‌دار بین ریزنمونه‌ها در استفاده از این روش مشاهده نشد. در هر دو ریزنمونه، ریشه‌های مویین یک هفته پس از تلقیح ظاهر شدند (شکل ۳-A و D) و تا سه هفته پس از تلقیح القای ریشه ادامه داشت (شکل ۳-C و F)، باوجود این از نظر تعداد ریشه القایی، بین دو ریزنمونه تفاوت معنی‌دار آماری ($P<۰/۰۱$) وجود داشت و در ریزنمونه برگ، میانگین تعداد ریشه القاء شده (۱۱/۴ ریشه در هر ریزنمونه) بیشتر از ریزنمونه گره ساقه (۸/۱۶ ریشه در هر ریزنمونه) بود (شکل ۴). در ریزنمونه‌های تلقیح‌نشده با آگروباکتری (شاهد) هیچ ریشه‌ای القاء نشد (شکل ۳-G-I).

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۱- اثر روش تلقیح ریزنمونه با *A. rhizogenes* سویه A13 بر میزان القای ریشه مویین در گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*)**

میله‌های نمودار "SE± میانگین درصد ریشه القاء شده در سه آزمایش مستقل" را نشان می‌دهد.

حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) براساس آزمون FLSD است.

**شکل ۲- اثر نوع ریزنمونه بر کارآیی القای ریشه مویین به‌واسطه *A. rhizogenes* سویه A13 در گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*)**

میله‌های نمودار "SE± میانگین درصد ریشه القاء شده در سه آزمایش مستقل" را نشان می‌دهد.

در هر روش مقایسه میانگین جداگانه انجام شده است.

حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) براساس آزمون FLSD است.

Archive of SID

www.SID.ir

**شکل ۳- القای ریشه مویین بواسطه *A. rhizogenes* سویه A13 در ریزنمونه‌های برگ (A-C) و گره ساقه (D-F) گیاه مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys*)**

A: ظهور ریشه مویین در ریزنمونه برگ بعد از یک هفته پس از تلقیح، B: افزایش تعداد ریشه های القایی دو هفته پس از تلقیح، C: القای تعداد زیادی ریشه و رشد سریع آنها پس از سه هفته پس از تلقیح، D: القای ریشه مویین از محل گره ساقه یک هفته پس از تلقیح، E: افزایش تعداد ریشه های القایی دو هفته پس از تلقیح، F: القای تعداد زیادی ریشه و رشد سریع آنها پس از سه هفته پس از تلقیح، G و H: ریزنمونه برگ (به‌ترتیب سطح رویی و پشتی برگ) بدون تلقیح با آگروباکتری به‌عنوان شاهد و فاقد ریشه القایی، I: ریزنمونه گره ساقه بدون تلقیح با اگروباکتری به‌عنوان شاهد و فاقد ریشه القایی و رشد جوانه‌های جانبی در طول زمان

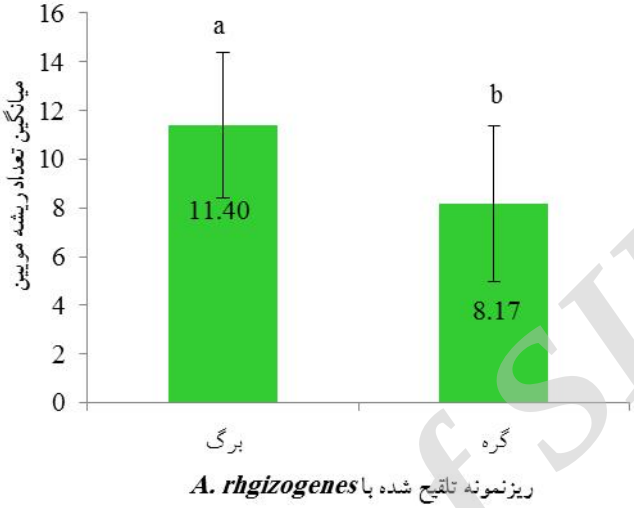
## تأیید تراریختی ریشه‌ها

نتایج آنالیز PCR بر روی ریشه‌های تراریخته احتمالی، حضور قطعه ۱۱۵۰ جفت بازی مربوط به ژن *rol*A-B را در لاین‌های انتخاب شده نشان داد. این قطعه مطابق انتظار هم اندازه قطعه تکثیرشده در نمونه شاهد مثبت (باکتری مورد استفاده در تلقیح) بود، در حالیکه ریشه طبیعی گیاه (شاهد منفی اول) فاقد قطعه تکثیری بود. وجود عدم تکثیر در نمونه شاهد منفی دوم (واکنش PCR بدون DNA الگو) حکایت از درستی آنالیز و عدم وجود آلودگی در PCR داشت (شکل ۵- A، B). برای اطمینان از ماهیت تراریختگی ریشه‌های مویین و عدم وجود آلودگی فضای‌های بین سلولی در ریشه‌مویین، از آنالیز PCR با آغازگر اختصاصی ژن *vir*$D_2$ استفاده شد. در حقیقت تکثیر این آغازگر اختصاصی تحت برنامه

Archive of SID

www.SID.ir

خاص در دستگاه ترموسایکلر حضور ژن $virD_2$، واقع در خارج از ناحیه T-DNA پلاسمید Ri که در ژنوم سلول‌های تراریخته درج نمی‌شود، استفاده شد. در لاین‌های تراریخته حاوی ژن‌های *rol*، تکثیری برای ژن $virD_2$ تشخیص داده نشد که نشان‌دهنده این است که ریشه‌های مویین فاقد آلودگی آگروباکتری هستند (شکل C-۵).




**شکل ۴- اثر نوع ریزنمونه بر تعداد ریشه مویین القاء شده به‌واسطه *A. rhizogenes* سویه A13 در گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*)**

میله‌های "SE± میانگین درصد ریشه القاء شده در سه آزمایش مستقل" را نشان می‌دهد.

حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) براساس آزمون FLSD است.

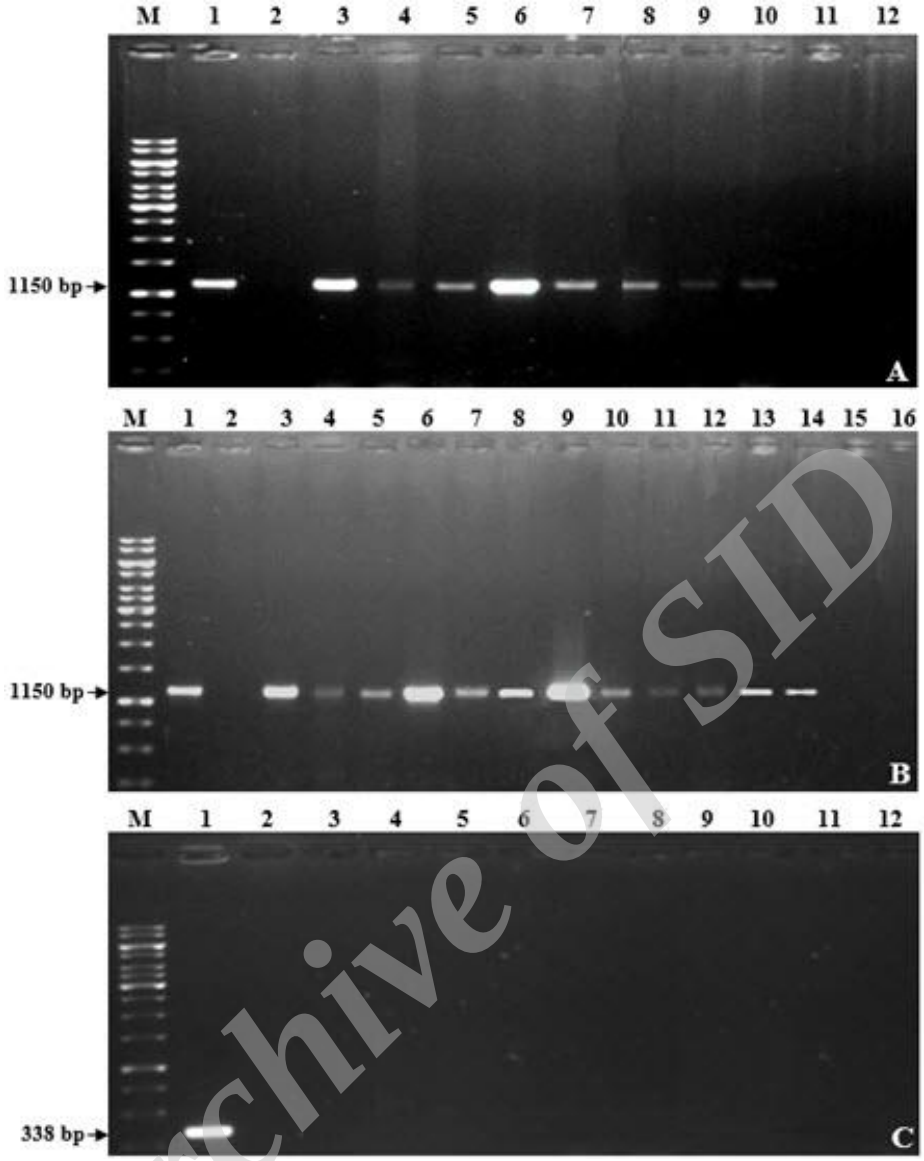
**خصوصیات رشدی ریشه‌های مویین در محیط جامد**

تعداد ۲۰ لاین مختلف از ریشه‌های مویین تراریخته مستقل از هم، از نظر طول ریشه اصلی و تعداد انشعابات طی دو دوره واکشت سه هفته‌ای در محیط جامد مورد مقایسه قرار گرفتند. ریشه‌های مویین پس از یک هفته رشد طولی به‌تدریج افزایش تعداد انشعابات عرضی را نشان دادند (شکل A-D-۶). نتایج آنالیز آماری نشان داد که بین لاین‌های مورد ارزیابی از نظر طول ریشه اصلی و قدرت انشعاب‌دهی در هر دو دوره سه هفته‌ای اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) وجود دارد (شکل A-۷ و B).

در بین لاین‌ها، لاین‌های TC-HR-2، TC-HE-15 و TC-HE-16 بیشترین طول ریشه اصلی (بیشتر از ۱۵cm) و تعداد انشعابات جانبی (بیشتر از ۱۱ انشعاب) در طی این مدت نشان دادند و لاین‌های TC-HR-3، TC-HR-4 و TC-HR-6 دارای کمترین اندازه طول ریشه (کمتر از ۷cm) و انشعابات جانبی (کمتر از ۴ انشعاب) بودند. با توجه به میانگین هر یک از متغیرهای اندازه‌گیری شده برای لاین‌ها، رفتار یک لاین در انتهای سه هفته دوم تقریباً مشابه رفتاری است که همان لاین در انتهای سه هفته اول نشان داده بود. البته همبستگی متغیرها در انتهای هر دوره واکشت بالا بود (شکل A-۸ و B)، همچنین بین دو متغیر در انتهای واکشت دوم (پس از ۴۲ روز) نیز همبستگی بالایی وجود داشت (شکل C-۸). این نتایج نشان‌دهنده پایداری رفتاری لاین‌ها از نظر این متغیرها پس از ۴۲ روز است و همچنین ارتباط شدید و مستقیم بین دو متغیر بیانگر این است که ریشه‌های طویل عمدتاً میزان انشعاب‌دهی بالایی نیز داشته‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

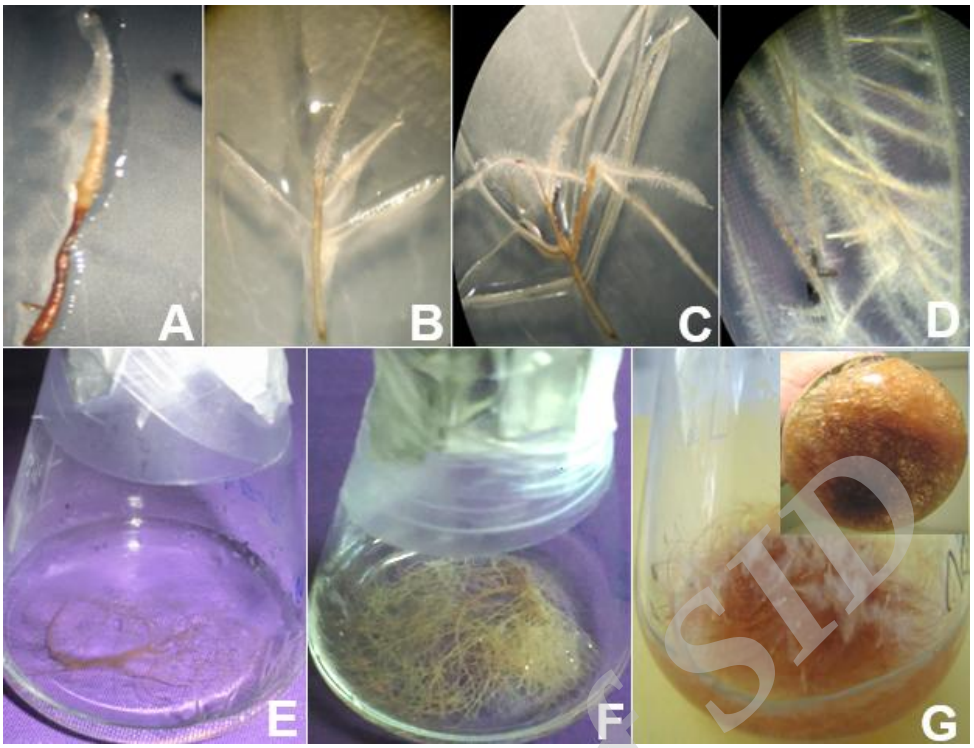



**شکل ۵- آنالیز PCR ریشه‌های مویین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بخش‌هایی از هر دو ژن *rol*A و *rol*B (A و B) یا آغازگر اختصاصی ژن *vir*D$_2$ (C)**

M: نشانگر 1 Kb DNA Ladder (Fermentas)، ۱: در هر سه شکل پلاسمید Ri از آگروباکترویوم سویه A13، ۲: در هر سه شکل چاهک خالی، ۱۰-۳ (A و C) و ۱۴-۳ (B): ریشه‌های مویین تراریخته القاء شده از ریزنمونه‌های برگ و گره، ۱۱: در هر سه شکل ریشه طبیعی گیاه بدون انتقال ژنتیکی به‌عنوان کنترل منفی اول، ۱۲: در هر سه شکل واکنش PCR بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی دوم

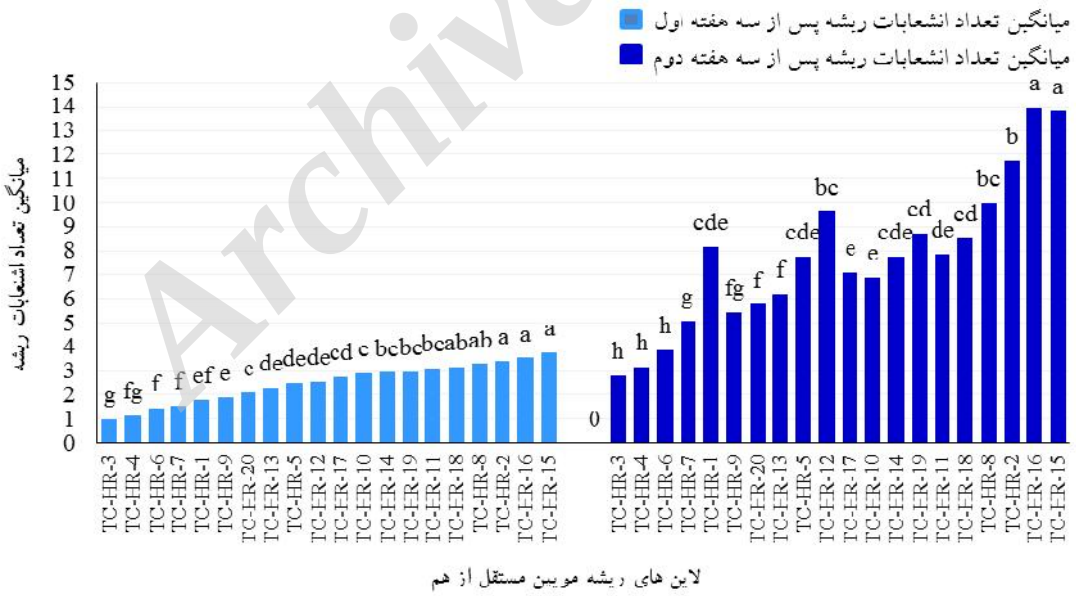
Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۶- استقرار و رشد مویین گیاه مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys*) در محیط کشت جامد و مایع**

A-D: رشد و ایجاد انشعابات جانبی فراوان ریشه مویین جداشده از روی ریزنمونه به‌ترتیب پس از یک هفته، دو هفته، چهار هفته و شش هفته پس از کشت در محیط MS جامد بدون تنظیم‌کننده رشد، E-G: رشد و افزایش تدریجی زیست‌توده ریشه مویین در محیط کشت ½ MS مایع بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی پس از سه ماه



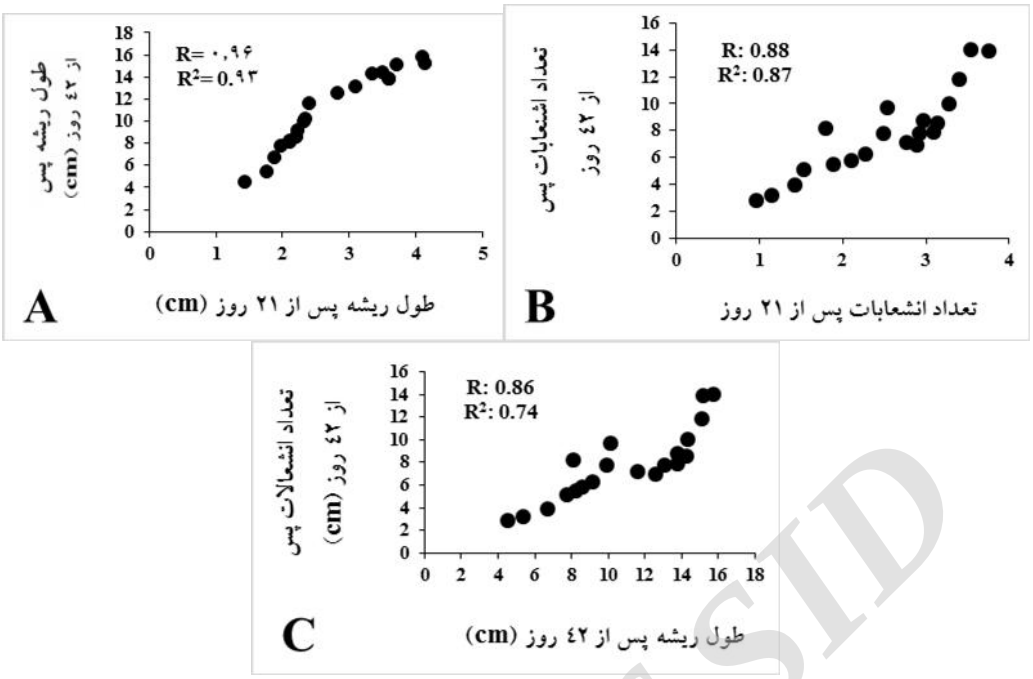

**شکل ۷- مقایسه ۲۰ لاین ریشه مویین تراریخته مستقل از هم (Independent transgenic hairy root) گیاه مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys*) از نظر طول ریشه اصلی و تعداد انشعابات جانبی**

میله‌ها "میانگین طول ریشه یا میانگین تعداد انشعابات" را نشان می‌دهد.

حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۸- همبستگی بین متغیرهای طول ریشه اصلی و تعداد انشعابات در لاین‌های ریشه مویین گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*) در انتهای دو دوره واکشت سه هفته‌ای**

R و $R^2$ به‌ترتیب مقادیر همبستگی و ضریب تبیین را نشان می‌دهند.

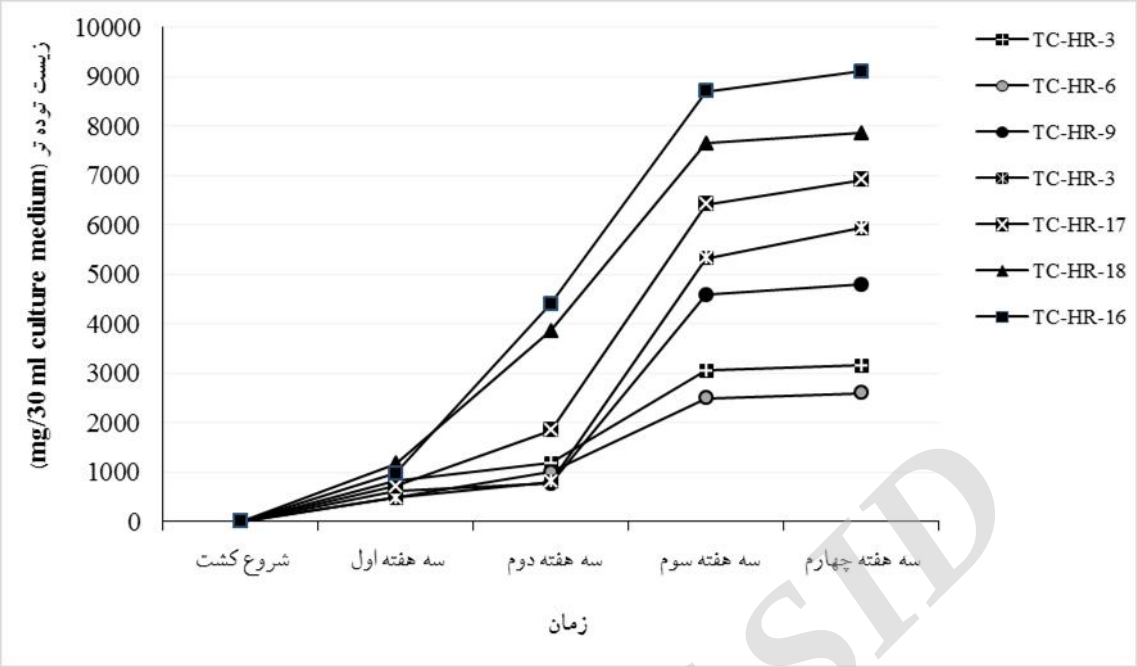
**قدرت رشد لاین‌های ریشه مویین در محیط کشت مایع**

ریشه های مویین تراریخته پس از انتقال به محیط کشت مایع به سرعت منشعب شده و در طی سه ماه بیوماس قابل توجهی تولید کردند (شکل ۶-E-G). مقایسه لاین‌های ریشه مویین تراریخته نشان داد که آنها از سرعت رشد متفاوتی برخوردار هستند و بین لاین ها از نظر میزان زیست‌توده تفاوت معنی داری ($P<0/01$) وجود داشت (شکل ۹). رشد مداوم ریشه ها و افزایش زیست‌توده در طی سه هفته متوالی دلیل بر حفظ توانایی ریشه‌های مویین در تداوم رشد بود. در بین لاین‌ها، لاین TC-HR-16 و TC-HR-18، به‌ترتیب ۸۷۰۰ و ۷۶۵۰ میلی‌گرم در هر ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت دارای بیشترین زیست‌توده تر در انتهای ماه سوم بودند، در حالیکه برای لاین‌های TC-HR-6 و TC-HR-3، به‌ترتیب ۳۰۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در هر ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، دارای کمترین زیست‌توده تر در انتهای ماه سوم برآورد شد.

روند رشدی لاین ها به صورت یک منحنی تقریباً سیگموئیدی شکل بود (شکل ۹). با توجه به منحنی، فاز تأخیری (lag phase) تا هفته دوم ادامه داشت و طول این فاز می تواند به‌دلیل ماده تلقیح اولیه کم (۲۰mg) باشد و معمولاً باعث افزایش زمان دو برابر شدن ( doubling time) می‌گردد. هفته دوم تا هفته هفتم را می‌توان محدوده فاز لگاریتمی (log phase) تعیین کرد و بعد از تقریباً هفته هشتم رشد ریشه ها کند شده که بیانگر شروع فاز ایستایی (stationary phase) است.

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۹- مقایسه ۷ لاین ریشه مویین تراریخته مستقل از هم (Independent transgenic hairy root) گیاه مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys*) از نظر تولید زیست‌توده در طی سه ماه کشت در محیط کشت MS مایع بدون تنظیم‌کننده رشد**

زیست‌توده برای شروع کشت برای همه لاین‌ها به‌طور یکسان و تقریباً ۲۰mg برداشته شد. زیست‌توده تر در انتهای هر سه هفته اندازه‌گیری شد.

## بحث

موفقیت در القاء ریشه مویین از طریق *A. rhizogenes* به عوامل مختلفی نظیر گونه، جنس و سن بافت گیاهی بستگی دارد (Porter, 1991). در این تحقیق ریزنمونه‌های مختلف پاسخ متفاوتی از نظر القاء ریشه مویین نشان دادند. بهترین ریزنمونه‌ها به‌منظور القاء ریشه مویین با فراوانی بالا در گیاه مریم‌نخودی طناز، به‌ترتیب برگ و گره ساقه بود. البته وابستگی القاء ریشه مویین به نوع ریزنمونه در گونه‌های مختلف گیاهی نیز گزارش شده‌است (Gupta *et al.*, 2011؛ Samadi *et al.*, 2012؛ Md Setamam *et al.*, 2014). سویه باکتری مورد استفاده، غلظت سوسپانسیون باکتری برای تلقیح از دیگر عوامل مؤثر در فرایند تراریختی است. تماس و برهم‌کنش مناسب آگروباکتری با سلول‌های گیاهی یک پیش‌نیاز اساسی برای انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم است. این مسئله به‌ویژه در گیاهان سرسخت از نظر تراریختی بسیار حائز اهمیت است. بنابراین روش مناسب تلقیح می‌تواند موفقیت در این فرایند را بهبود بخشد. در بیشتر مطالعات مربوط به تولید ریشه مویین، برای تلقیح از روش شناورسازی ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری استفاده شده‌است (Wang *et al.*, 2006؛ Kim *et al.*, 2009؛ Samadi *et al.*, 2012). با این حال روشهای دیگری مانند خراش‌دهی با سرسوزن آلوده به باکتری نیز برای تلقیح استفاده شده است که موفقیت آن با توجه به گیاه متفاوت بوده است (Lin *et al.*, 2003؛ Ahmadi Moghadam *et al.*, 2013). در این تحقیق برای اولین بار از روش اسپری سوسپانسیون باکتری در کنار روش معمول شناورسازی برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. اگرچه در روش اسپری نیز القاء ریشه مویین مشاهد شد، با این حال روش شناورسازی کارایی تراریختی بالایی (سه برابر) نسبت آن روش نشان داد. در این تحقیق از دو سویه آگروباکتری برای بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

قابلیت آنها در القاء ریشه مویین در گیاه مریم‌نخودی طناز استفاده شد که با استفاده از سویه GMI9534 ریشه مویین روی هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها القاء نشد، ولی سویه A13 باعث القای تعدادی زیادی ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه شد. A13 یک سویه وحشی آگروباکتری و از نظر نوع اوپاین تولیدی، جزء تیپ میکیموپاین (Mikimopine) است و در پلاسمید Ri آن تعداد توالی‌های القاءکننده T-DNA ( T-DNA transfer stimulator sequences, TSS) ۱۲ تکرار وجود دارد ( Veena & Taylor, 2007) و با توجه به نقش توالی TSS در انتقال T-DNA، انتظار بر این است که این سویه از قدرت تراریخت‌سازی بالایی برخوردار باشد. در مطالعات قبلی کارایی بالای این سویه در القای ریشه مویین گیاهان دارویی گزارش شده‌است (Samadi *et al.*, 2012؛ Ooi *et al.*, 2013؛ Torkamani *et al.*, 2014). در این تحقیق نیز کارایی بالای تراریختی (۷۳/۳٪) با استفاده از این سویه در گیاه مریم‌نخودی طناز گزارش شد (شکل‌های ۱ و ۲). ژن *rol*B نقش مهمی در القاء ریشه مویین دارد، با این حال ژن‌های *rol*A و *rol*C و دیگر چارچوب‌های خوانش باز (ORFs) اثر تشدیدکنندگی بر تشکیل ریشه مویین دارند (Welander & Zhu, 2006؛ Veena & Taylor, 2007). حضور ترکیبی از این سه ژن در ژنوم ریشه‌های مویین تراریخته و بیان آنها منجر به رشد بیشتر و انشعاب‌دهی مناسب ریشه‌های مویین می‌گردد ( Welander & Zhu, 2006). در این تحقیق آزمون PCR توانست حضور ژن‌های مؤثر در القاء ریشه مویین را تشخیص دهد. برای اطمینان از عدم آلودگی بافت ریشه مویین با آگروباکتری، از حضور ژن $virD_2$ موجود در خارج از ناحیه T-DNA، معمولاً غیرقابل انتقال به سلول‌های گیاهی، به‌وسیله PCR استفاده گردید. عدم تکثیر این ژن در آنالیز PCR، تراریخته بودن ریشه‌های مویین و اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی را تأیید می‌کند. بنابراین نیازی به استفاده از آنالیز سخت و طاقت‌فرسایی و هزینه‌بر مانند لکه‌گذاری سادرن (Southern blot) برای تأیید تراریختی ریشه مویین نیست، اما برای تعیین تعداد نسخه‌های درج شده از ژن‌های *rol* شاید لازم باشد از این تکنیک استفاده گردد.

به‌طور کلی ریشه‌های مویین تراریخته از رشد سریعی برخوردار هستند، با این حال در این مطالعه تنوع زیادی بین لاین‌های مختلف از نظر میزان رشد و مورفولوژی ریشه مشاهده گردید که این تنوع را می‌توان به تعداد نسخه‌های درجی T-DNA، میزان بیان ژن‌های *rol* و دیگر ژن‌های موجود روی T-DNA و اثرات جانبی تلفیق T-DNA در ژنوم گیاه نسبت داد (Cho *et al.*, 1998). در این تحقیق نیز تنوع رشدی بین لاین‌های ریشه مویین قابل مشاهده بود، به‌طوری که لاین‌هایی با رشد بسیار سریع و با مورفولوژی پرانشعاب قابل غربال بودند. با این حال مورفولوژی‌های نامطلوب مانند ریشه‌های قطور با انشعابات کم و یا ریشه‌هایی کالوسی (callus-like roots) مشاهد نشد. اما مطالعات متعددی وجود چنین مورفولوژی‌ها را در ریشه‌های مویین القاءشده گزارش کرده‌اند (Mathur *et al.*, 2010؛ Soleimani *et al.*, 2012). استفاده از یک محیط کشت مناسب برای رشد و تولید زیست‌توده برای تولید در مقیاس زیاد متابولیت‌های ثانویه بسیاری حیاتی است و ترکیب‌های محیط کشت تأثیر بسزایی در رشد و نمو سلول‌ها در شرایط درون شیشه‌ای دارد (Sivakumar *et al.*, 2005). نتایج این تحقیق نشان داد که لاین‌های ریشه مویین در محیط کشت ½ MS با منبع کربن ساکارز و بدون نیاز به PGRs به خوبی رشد کرده و قادر به میزان مناسبی زیست‌توده هستند. مناسب بودن محیط کشت ½ MS برای ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی به اثبات رسیده است (Park *et al.*, 2010؛ Udomsuka *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌است که ساکارز مناسب‌ترین منبع کربن برای کشت‌های سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه است، همچنین ساکارز اثر تحریک‌کنندگی در تجمع زیست‌توده ریشه‌های مویین دارد (Lourenco *et al.*, 2002). البته عدم نیاز به PGRs در لاین‌های حاصل در این تحقیق بیانگر اتوتروف بودن آنها از نظر اکسین می‌باشد که دلیلی

Archive of SID

www.SID.ir

بر بیان ژن‌های aux انتقال یافته توسط T-DNA است. با توجه به اینکه در این سویه فقط یک ناحیه T-DNA وجود دارد، از این‌رو انتظار بر این است که با انتقال T-DNA همه ژن‌های روی آن ازجمله ژن‌های aux به سلول گیاهی منتقل یابند. در بعضی از گیاهان، ریشه مویین القایی توسط سویه‌های تیپ آگروپین آگروباکتری ممکن است بدون افزودن اکسین به محیط کشت رشد مطلوبی نشان ندهند (Alpizar *et al.*, 2008) و این به این دلیل است که این تیپ سویه‌ها دارای دو نوع ناحیه T-DNA ($T_R$-DNA و $T_L$-TDNA) روی پلاسمید Ri هستند که آنها به‌طور مستقل از هم به سلول‌های گیاهی انتقال می‌یابند (Filippini *et al.*, 1994)، در صورتی‌که $T_R$-DNA دربردارنده ژن‌های aux در ژنوم گیاهی درج نشده باشد یا بیان این ژن‌ها با توجه به محل درج یا تعداد نسخه‌های آن به‌طور مطلوب نباشد، ریشه مویین حاصل معمولاً اگزوتروف به اکسین خواهند بود (Camilleri & Jouanin, 1991). افزودن PGRs به‌ویژه اکسین به محیط کشت ریشه‌های مویین معمولاً تأثیر منفی بر تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه دارد (Yoshimatsu *et al.*, 2004).

البته ریشه‌های مویین حاصل در این تحقیق، پایداری بالایی از نظر خصوصیات رشدی و مورفولوژیک در طی واکشت‌های مختلف نشان دادند که احتمالاً منعکس‌کننده پایداری ژنتیکی آنها باشد. پایداری ژنتیکی از خصوصیات بارز ریشه‌های مویین تراریخته است (Suza *et al.*, 2008). انتخاب چنین ریشه‌های مویین یکنواخت از نظر ژنتیکی می‌تواند برای تولید بیوماس قابل توجه و همچنین تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت باشد. البته آهنگ رشدی ریشه‌های مویین به‌صورت منحنی تیپیک S شکل (سیگموئید) بود. چنین الگویی می‌تواند به‌عنوان راهنمایی برای برداشت مقدار ماده تلقیح اولیه برای حصول حداکثر زیست‌توده استفاده شود. با توجه به زمان شروع مرحله ایستایی می‌توان زمان بهینه برای واکشت را تقریباً در بیست و یکمین روز کشت تعیین کرد، همچنین این الگو می‌تواند برای تعیین زمان مناسب افزودن عوامل محرک (elicitors) به محیط کشت ریشه‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که براساس منابع علمی قابل دسترس، این تحقیق اولین گزارش در مورد تولید ریشه مویین در گیاه مریم‌نخودی طناز است. علاوه‌بر تعیین مناسب‌ترین ریزنمونه، روش تراریختی کارآمدی نیز در این گیاه معرفی شد. بهترین لاین‌ها از نظر میزان رشد و تجمع زیست‌توده تعیین شدند و لاین‌هایی مانند TC-HR-16 و TC-HR-18 می‌توانند در مطالعات بعدی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد ارزیابی قرار گیرند. از الگوی رشدی تیپیک S شکل حاصل برای لاین‌ها می‌توان برای بهینه‌سازی‌های بعدی برای بهبود میزان تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار داد. استفاده از لاین‌های ریشه مویین نه تنها وابستگی صنایع داروسازی به زیستگاه‌های طبیعی گیاهان دارویی را از بین می‌برد، بلکه منبعی با کیفیت از مواد گیاهی خام برای تولید متابولیت‌های دارویی مهم فراهم می‌سازد.

## سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهران (NIGEB) به‌دلیل اهدای سویه‌های آگروباکتری و از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به‌موجب در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود. همچنین از جناب آقای مهندس احمدی (مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی)، به‌دلیل فراهم کردن بذر مریم‌نخودی طناز کمال تشکر را داریم.

## منابع مورد استفاده

- Ahmadi Moghadam, Y., Piri, Kh., Bahramnejad, B. and Habibi, P., 2013. Methyl jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (Purslan). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science, 2(6): 86-94.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C.,

Archive of SID

www.SID.ir

- Lin, H.W., Kwok, K.H. and Doran, P.M., 2003. Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin. Biotechnology Letters, 25: 521-525.
- Lourenco, P.M.L., Castro, S.D., Martins, T.M., Clemente, A. and Domingos, A., 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. Enzyme and Microbial Technology, 31: 242-249.
- Mathur, A., Ganwar, A., Mathur, A.K., Verma, P., Uniyal, G.C. and Lal, R.K., 2010. Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy roots of American ginseng-*Panax quinquefolium* L. Biotechnolgy Letters, 32: 457-461.
- Md Setamam, N., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, Z. and Che Mohd Zain, C.R., 2014. Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants. BMC Research Notes, 7: 414.
- Morteza-Semnani, K., Akbarzadeh, M. and Rostami, B., 2005. The essential oil composition of *Teucrium Chamaedrys* L. from Iran, Flavour and Fragrance Journal, 20: 544-546.
- Museli, A., Desjobert, J.M., Paolini, J., Bernardini, A.F., Costa, J., Rosa, A. and Dessi, M.A., 2009. Chemical Composition of the essential oil of *Teucrium Chamaedrys* L. from Corsica and Sardinia. Journal of Essential Oil Research, 21(2): 138-143.
- Nader, B.L., Taketa, A.T., Pereda-Miranda, R. and Villarreal, M.L., 2006. Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*. Planta Medica, 72: 842-844.
- Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J. and Maziah, M., 2013. Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Solanum mammosum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29: 421-430.
- Park, S.U., Li, X., Eom, S.H., Lee, C.Y. and Lee, S.Y., 2010. E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. Archives of Biological Sciences, 62: 649-652.
- Porter, J.R., 1991. Host range and implications of plant infections by *Agrobacterium rhizogenes*. Critical Reviews in Plant Sciences, 10: 387-421.
- Rechinger, K.H., 1982. *Teucrium* L.: 23-44. In: Rechinger, K.H., (Ed.). Flora Iranica. Akademische Druck und Verlagsanstalt, Wienna, 597p.
- Sadeghi, H., Jamalpoorb, S. and Shirzadib, M.H., 2014. Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. Industrial Crops and Products, 54: 130-134.
Lashermes, P. and Etienne, H. 2008. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. Annals of Botany, 101(7): 929-940.
- Bagci, E., Yazgin, A., Hayta, S. and Cakilcioglu, U., 2010. Composition of the essential oil of *Teucrium Chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. Journal of Medicinal Plants Research, 4(23): 2588-2589.
- Bensaddek, L., Villarreal, M.L. and Fliniaux, M.A., 2008. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3(1): 2-9.
- Camilleri, C. and Jouanin, L., 1991. The $T_R$-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. Molecular Plant-Microbe Interactions, 4: 155-162.
- Cho, H.J., Widholm, J.M., Tanaka, N., Nakanishi, Y. and Murooka, Y., 1998. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus Sinicus* (Chinese milk). Plant Science, 138: 53-65.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- Filippini, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Costantino, P. and Trovato, M., 1994. The plant oncogene rolB alters binding of auxin to plant cell membranes. Plant Cell Physiology, 35: 767-771.
- Gupta, S.K., Liu, R.B., Liaw, S.Y., Chan, H.S. and Tsay, H.S., 2011. Enhanced tanshinone production in hairy roots of '*Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture. Botanical Study, 52(4): 435-443.
- Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H., 2008. Hairy root source for the production of valuable pharmaceutical compounds, Medicinal Plants, 29: 1-17.
- Hu, Z.B. and Du, M., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology, 48(2): 121-127.
- Kazemizadeh, Z. and Heidari Rikan, M., 2009. Investigation of chemical composition of essential oil of flowering branches of *Teucrium chamaedrys* L. subsp. Chamaedrys from Marmishoo valley, Urmia, http://www.azaranrc.com.
- Kim, Y.K., Li, X., Xu, H., Park, N.I., Uddin, M.R., Pyon, J.Y. and Park, S.U., 2009. Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Journal of Crop Science and Biotechnology, 12: 53-57.

Archive of SID

www.SID.ir

- Samadi, A., Carapetian, J., Heidary, R., Jafari, M. and Hssanzadeh, A., 2012. Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. an anti-tumor lignans production plant. Nothlae Botanicae Hortiagrobatanici Cluj-Napaca, 40(1): 125-131.
- Sivakumar, G., Yu, K.W. and Paek, K.Y., 2005. Production of biomass and ginsenoides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. Engineering in Life Sciences, 5(4): 333-342.
- Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K. and Hasanloo, T., 2012. Morphological evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L. and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. International Journal of Agriculture: Research and Review, 2: 1005-1013.
- Stankovic, M.S., Curcic, M.G., Zizic, J.B., Topuzovic, M.D., Solujic, S.R. and Markovic, S.D., 2011. *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. International Journal of Molecular Science, 12: 4190-4205.
- Suza, W., Harris, R.S. and Lorence, A., 2008. Hairy Roots: From high-value metabolite production to phytoremediation. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3(1): 57-65.
- Torkamani, M.R., Jafari, M., Abaspour, N., Heidary R. and Safaie, N., 2014. Enhanced production of velerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. Central European Journal of Biology, 9: 853-863.
- Udomsuka, L., Jarukamjorna, K., Tanakab, H. and Putaluna, W., 2009. Isoflavonoid production in a hairy roots culture of *Pueraria candollei*. Zeitschrift für Naturforschung, 64: 687-691.
- Veena, V. and Taylor, C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cell Developmental Biology-Plant, 43: 383-403.
- 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 and Surfaces B: Biointerfaces, 53: 101-104.
- Welander, M. and Zhu, L.H., 2006. Rol genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses: 79-97. In: Janick, J., (Eds.). Plant Breeding Reviews, Wiley, NewYork, 394p.
- Yoshimatsu, K., Sudo, H., Kamada, H., Kiuchi, F., Kikuchi, Y., Sawada, J. and Shimomura, K. 2004. Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*-D. *leichhardtii* hybrid. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27: 1261-1265.

Archive of SID

www.SID.ir

# Optimization of induction and hairy root culture establishment of *Teucrium chamaedrys* L.

**I. Bernousi[1] and M. Jafari[2*] and J. Ahmadi Dizaji[1]**

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran, E-mail: m.jafari@urmia.ac.ir

Received: August 2014 Revised: May 2015 Accepted: May 2015

## Abstract

This research was aimed to investigate the effect of two infection methods (immersion and spray) and two *Agrobacterium rhizogenes* strains (strain A13 and GMI9534) to induce hairy roots on different explants (hypocotyl, cotyledon, leaf, and stem node) of *Teucrium chamaedrys*. Strain GMI9534 could not induce hairy roots in any of the explants, whereas strain A13 was only able to induce hairy roots in leaf and stem node explants. Infection by immersion method was more successful, with higher root induction efficiency (more than 73.3%), and leaf explants showed the highest induction frequency (83.3%). The transformed hairy root lines were confirmed by PCR using *rol*A and *rol*B gene-specific primers. Significant differences were shown among the 20 independent hairy root lines cultured on growth regulator-free MS solid medium for total root length and for the root branching. These variables were stable across subcultures and hence seven independent hairy root lines were selected based on these growth properties. Subsequently, the cultures for these hairy root lines were established in half-strength MS liquid medium to monitor their biomass production during a 90-day culture period. Considerable variations were observed in growth capacity among the lines. Line TC-HR-16 produced the highest fresh biomass (9100 mg/30 ml culture medium), a 455-fold increase over initial inoculum, during the 10-weeks culture period. The best-characterized hairy root lines, resulted in this study, can be used to improve the production of secondary metabolites of pharmaceutical values of *T. chamaedrys*.

**Keywords:** *Teucrium chamaedrys* L., *Agrobacterium rhizogenes*, bacterial strain, explant, biomass.

Archive of SID

www.SID.ir