

بهینه‌سازی القاء و تثبیت کشت ریشه‌های موین *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- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳

چکیده

در این مطالعه، اثر دو روش تلقیح (شناورسازی و اسپری) و دو سویه *Agrobacterium rhizogenes* (A13 و GMI9534) برای القاء ریشه‌های موین روی ریزنمونه‌های مختلف (هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و گره ساقه *Teucrium chamaedrys* L. بررسی شد. سویه GMI9534 نتوانست در هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها ریشه موین القاء کند، در حالیکه سویه A13 فقط قادر به القاء ریشه‌های موین روی ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه بود. البته روش تلقیح شناورسازی، با فراوانی بالای القای ریشه موین (بیش از ۷۳/۳٪)، بسیار موفقیت‌آمیز بود و ریزنمونه‌های برگ بالاترین فراوانی القاء (۸۳/۳٪) را نشان دادند. لاین‌های ریشه موین تراریخته به‌وسیله آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rolA* و *rolB* تأیید شدند. ۲۰ لاین ریشه موین 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 این رو ۷ لاین ریشه موین 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 لاین‌ها 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. لاین‌های ریشه موین با خصوصیات عالی حاصل از این مطالعه می‌توانند برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی *Teucrium chamaedrys* L. استفاده شوند.

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

مقدمه

بیضوی، بی‌کرک و کنگره‌ای و گل‌های ارغوانی که در جنگل‌های نواحی مرکزی و جنوبی اروپا و شمال غربی آسیا از جمله ایران در ارتفاعات خراسان شمالی، گلستان، مازندران و آذربایجان توزیع جغرافیایی دارد

مریم‌نخودی طنناز (*Teucrium chamaedrys* L.) از خانواده Lamiaceae، گیاه‌یست علفی پایا، بوته‌ای به ارتفاع ۱۰ تا ۲۵ سانتی‌متر با ساقه کرکپوش، برگ‌های

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 ریشه‌های موئین (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 ریشه‌های موئین می‌شود. علاوه بر این، از ریشه‌های موئین به‌عنوان یک سیستم مدل ارزشمند برای توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان استفاده می‌شود (Hu & Du, 2006). این بافت‌های تمایز یافته به دلیل رشد سریع، پایداری بیوشیمیایی و قابلیت باززایی گیاهان تراریخته به‌عنوان بهترین مدل سیستم‌های کشت بافتی معرفی شده است (Nader et al., 2006). این ریشه‌ها بستر باارزشی برای متابولیت‌های ثانویه می‌باشند، به طوری که ریشه‌های موئین یک گیاه دارویی می‌توانند متابولیت‌های ثانویه متنوعی را تولید کنند (Hasanloo et al., 2008). کشت ریشه‌های موئین 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 از جمله تولید ریشه موئین در گیاه مریم نخودی طناز انجام نشده است. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه موئین که بتواند امکان کشت در مقیاس وسیع در یک

(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 ترکیب‌های شیمیایی تشکیل‌دهنده این گونه گیاهی وجود دارد. به طور کلی بررسی‌ها نشان داده‌اند که جرماکرن دی، بتا-کاریوفیلن، آلفا-پینن، آلفا-هومولن و دلتا-کادنن از عمده‌ترین ترکیب‌های شیمیایی این گونه گیاهی هستند (Morteza-Bagci; Muselli et al., 2009; Semnani et al., 2005; et al., 2010). در مورد محتوای ترکیب شیمیایی جمعیت گیاهی بررسی شده در این تحقیق فقط یک گزارش وجود دارد و عمده‌ترین ترکیب‌های شیمیایی گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه مارمیشو آذربایجان غربی، بتا-کاریوفیلن، آلفا-مورولن، آلفا-پینن و بتا-فارنزن گزارش شده است (Kazemizadeh & Heidari Rikan, 2009). چنین تنوعی در محتوای شیمیایی و میزان آنها در یک گونه گیاهی از رویشگاه‌های مختلف علاوه بر 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 می‌توان به خاصیت لاغرکنندگی، ضد دیابت، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی آن اشاره کرد (Bagci et al., 2010). اخیراً در مطالعه‌ای، عصاره متانولی این گیاه اثرات سیتوتوکسیتی بالایی نسبت به سلول‌های سرطانی کولون انسانی نشان داده است (Stankovic et al., 2011).

با توجه به برداشت‌های بی‌رویه گیاهان دارویی از جمله 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 ترکیب‌های شیمیایی گیاه، کشت دورن شیشه‌ای (*in vitro*) این گیاهان به منظور حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی و امکان استفاده در مقیاس صنعتی برای تولید انبوه ترکیب‌های مؤثره دارویی آنها حائز اهمیت است. کشت‌های سازمان یافته

تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium rhizogenes* دو سویه GMI9534 و A13 (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 $OD_{600} = 0.4-0.5$ ، 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 $28^{\circ}C$ 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 آنتی‌بیوتیک مناسب، استوسیرینگان (۵۰ μ M) و گلوکز (۵۰mg/l)، حل و سوسپانسیون باکتری در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰rpm و دمای $28^{\circ}C$ و به مدت ۵ ساعت نگهداری شد. پس از آن، سوسپانسیون باکتری تهیه شده برای تلقیح استفاده شد. برای القاء ریشه موئین، از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و گره ساقه جدا شده از گیاهچه‌های بذری دورن شیشه‌ای استفاده شد. تلقیح ریزنمونه‌ها به دو روش شناورسازی و اسپری به شرح زیر انجام شد: در تلقیح به روش اسپری، ۲۰۰ ریزنمونه از هر یک از ریزنمونه‌های جدا شده، که با تیغ اسکالپل به طور سطحی زخمی شده بودند، به وسیله سرنگ شیشه‌ای 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 (۵۰ μ M) 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 ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط هم کشتی شامل محیط پایه MS حاوی استوسیرینگان (۵۰ μ M) کشت گردیدند. تعدادی ریزنمونه با محیط کشت MS بدون باکتری

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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق بذره‌های مریم نخودی طراز توسط آقای مهندس احمدی (مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی) از منطقه‌ای با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب $37^{\circ} 10' 33'' N$ و $45^{\circ} 04' 33'' E$ و ارتفاع ۱۶۵۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری و درستی آن در هر بار یوم گیاهی این مرکز توسط ایشان تأیید و نمونه هر بار یومی آن با شماره PBB-WAZ-78 نگهداری شد.

ضد عفونی بذر و تهیه ریزنمونه

بذره‌های مریم نخودی 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 هیپوکلریت سدیم (حاوی ۵٪ کلر فعال) ۱/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند و بعد سه بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه، با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذره‌های ضد عفونی شده در محیط MS پایه که حاوی ۷ گرم در لیتر آگار گیاهی، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با $pH=5.8$ بودند کشت شد و تمام کشت‌ها در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور $2000 Lux$ و دمای $24 \pm 2^{\circ}C$ 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.

سفوتاکسیم طی واکنش 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 ریشه های موین احتمالی، استخراج DNA ژنومی از ریشه ها طبق روش Doyle & (CTAB Doyle, 1990) انجام شد. آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن های *rolA* و *rolB* 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 ژن های *rol* در ژنوم ریشه ها و عدم هر گونه آلودگی آگروباکتری در فضاهای بین سلولی، PCR برای تکثیر ژن *virD2* (واقع در بخش خارج از بخش T-DNA روی پلاسمید Ri باکتری) به اندازه ۳۳۸bp انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن های *rol* عبارت بودند از: 5'-TTAGCTTCCAAGTTACTGCAGC-3' (مستقیم) و 5'-GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3' (معکوس) و توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *virD2* عبارت بودند از: 5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3' (مستقیم) و 5'-CCTGACAACATCTCGGCTGCCCA-3' (معکوس). برای آماده سازی 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 Eppendorf مدل 5331 Mastercycler طبق برنامه حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی 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

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 کم نور (Dim) با دمای ۲۵±۲°C به مدت ۴ شبانه روز نگهداری شدند. پس از اتمام دوره هم کشتی، ریزنمونه های تلقیح شده در محیط شستشو، شامل محیط کشت نصف غلظت MS (۱/۲) 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 تنظیم کننده 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 کارایی القاء ریشه موین (کارایی تراریختی) به واسطه آگروباکتریوم ریزوزنز پیاده شد و آزمایش سه بار تکرار شد. کارایی القای ریشه (%) به صورت فرمول زیر محاسبه گردید. داده های حاصل در نرم افزار 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.

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

پس از ظهور و رشد نسبی (۳-۴cm) ریشه های موین احتمالی، آنها از سطح ریزنمونه ها در محل القاء قطع شدند و در محیط 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 واکنش ریشه ها انجام شد و میزان

نتایج

تأثیر نوع سویه باکتری و روش تلقیح میزان القای ریشه مویین تعداد ۲۴۰۰ ریزنمونه در مجموع سه بار تکرار آزمایش، به وسیله هر یک 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 ریشه مویین 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 کارایی القای ریشه مویین تفاوت معنی دار آماری ($P < 0.01$) مشاهده شد، به طوری که روش تلقیح شناورسازی ۷۳/۳۰٪ کارایی القای ریشه نشان داد که این میزان تقریباً سه برابر روش اسپری بود (شکل ۱).

تأثیر نوع ریزنمونه بر میزان القای ریشه مویین

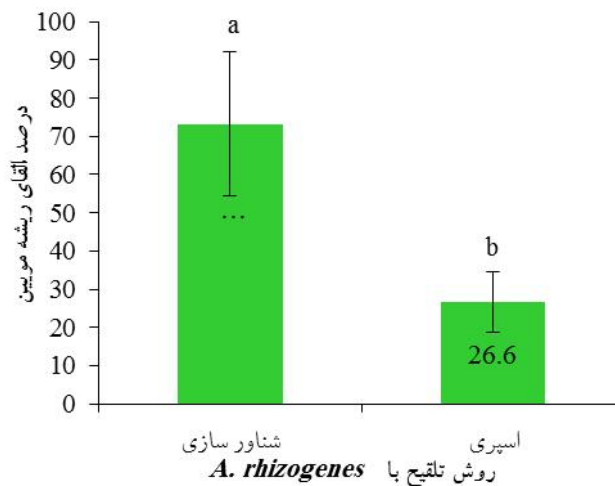
بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر پاسخ به روش تلقیح با آگروباکتری A13، اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.01$) وجود داشت. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون هیچ ریشه مویینی القاء نشد، ولی در ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه از نظر میزان القای ریشه اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.01$) وجود داشت، به طوری که در ریزنمونه‌های برگ 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 معنی دار 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)، با وجود این از نظر تعداد ریشه القایی، بین دو ریزنمونه تفاوت معنی دار آماری ($P < 0.01$) 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 تلقیح نشده با آگروباکتری (شاهد) هیچ ریشه‌ای القاء نشد (شکل ۳-G-I).

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

ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین

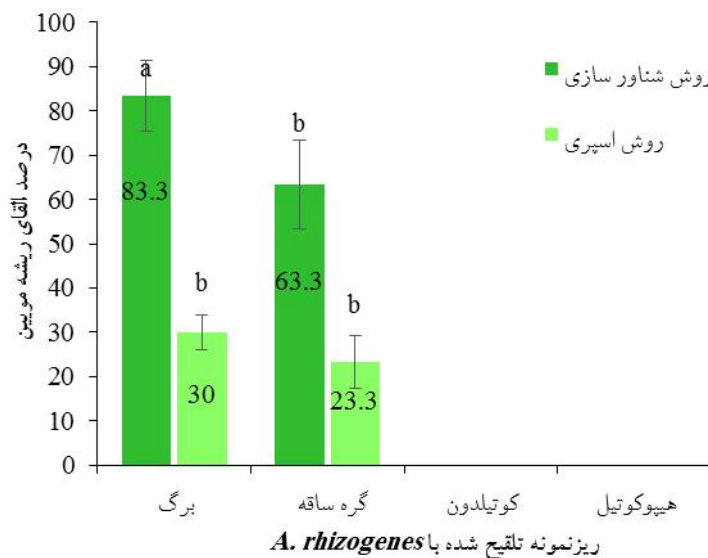
برای ارزیابی لاین‌های مویین از نظر میزان رشد دو آزمایش مستقل اجرا شد. در آزمایش اول، تعداد ۲۰ لاین مختلف ریشه مویین انتخاب شد. لازم به ذکر است که لاین‌های تراریخته مستقل از هم (independent transgenic events) انتخاب شدند و منبای انتخاب، استفاده از لاین‌های ریشه مویین با محل القاء متفاوت بر روی ریزنمونه‌ها بود. به طور طبیعی چنین لاین‌هایی با احتمال بسیار بالا از نظر تعداد نسخه‌های تراژن‌ها و محل درج آنها از هم متفاوت بوده، از این رو لاین‌های تراریخته مستقل از هم به حساب می‌آیند. ریشه‌های 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 داده‌ها با آزمون t-test تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین رفتار رشدی لاین‌ها طی دوره‌های واكشت، همبستگی بین متغیرها به وسیله نرم‌افزار SPSS v. 18 محاسبه شد.

در آزمایش دوم، قطعات ریشه (۳-۴cm) دارای نوک ریشه از ۷ لاین انتخاب شده از آزمایش اول، به ارلن‌های ۱۰۰ml حاوی ۲۰ml محیط کشت MS ½ مایع و بدون هر گونه آنتی‌بیوتیک و PGRs منتقل و در اتاقک رشد روی دستگاه شیکر با ۹۰rpm و دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ قرار داده شدند و در طی سه ماه و به طور 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.



شکل ۱- اثر روش تلقیح ریزنمونه با *A. rhizogenes* سویه A13 بر میزان القای ریشه موئین 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 ($P < 0.01$) براساس آزمون FLSD است.



شکل ۲- اثر نوع ریزنمونه بر کارایی القای ریشه موئین 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 ($P < 0.01$) براساس آزمون FLSD است.



شکل ۳- القای ریشه موئین بواسطه *A. rhizogenes* سویه A13 در ریزنمونه‌های برگ (A-C) و گره ساقه (D-F)

گیاه مریم‌نخودی طناز (*Teucrium chamaedrys*)

A: ظهور ریشه موئین در ریزنمونه برگ بعد از یک هفته پس از تلقیح، B: افزایش تعداد ریشه‌های 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 موئین از محل گره ساقه یک هفته پس از تلقیح، E: افزایش تعداد ریشه‌های 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 (به ترتیب سطح رویی و پشتی برگ) بدون تلقیح با آگروباکتری به‌عنوان شاهد و فاقد ریشه القایی، I: ریزنمونه گره ساقه بدون تلقیح با آگروباکتری به‌عنوان شاهد و فاقد ریشه القایی و رشد جوانه‌های جانبی در طول زمان

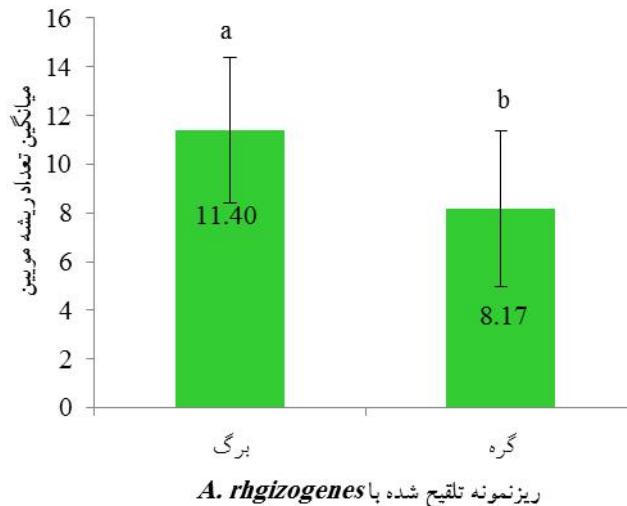
تأیید تراریختی ریشه‌ها

بود. وجود عدم تکثیر در نمونه شاهد منفی دوم (واکنش PCR بدون الگو) حکایت از درستی آنالیز و عدم وجود آلودگی در PCR داشت (شکل ۵-A، B). برای اطمینان از ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین و عدم وجود آلودگی فضای‌های بین سلولی در ریشه‌موئین، از آنالیز PCR با آغازگر اختصاصی ژن *virD2* استفاده شد. در حقیقت تکثیر این آغازگر اختصاصی تحت برنامه

نتایج آنالیز PCR بر روی ریشه‌های تراریخته احتمالی، حضور قطعه ۱۱۵۰ جفت بازی مربوط به ژن *rolA-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

$virD_2$ تشخیص داده نشد که نشان‌دهنده این است که ریشه‌های مویین فاقد آلودگی آگروباکتری هستند (شکل ۵-C).

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

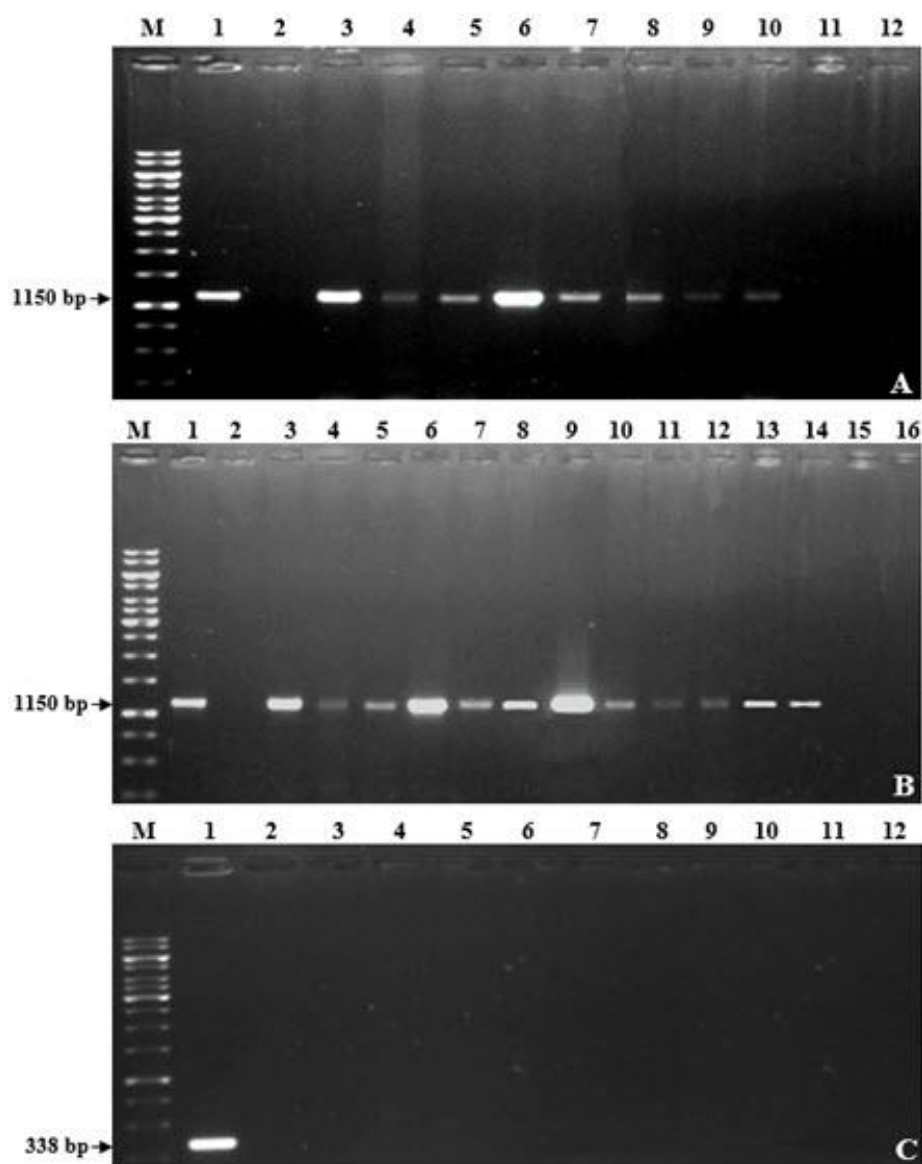


شکل ۴- اثر نوع ریزنمونه بر تعداد ریشه مویین القاء شده به واسطه *A. rhizogenes* سویه A13 در گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*)

میله‌های "±SE" میانگین درصد ریشه القاء شده در سه آزمایش مستقل را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.01$) براساس آزمون FLSD است.

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 ۸-A و B)، همچنین بین دو متغیر در انتهای واکشت دوم (پس از ۴۲ روز) نیز همبستگی بالایی وجود داشت (شکل ۸-C). 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 طولی عمدتاً میزان انشعاب‌دهی بالایی نیز داشته‌اند.

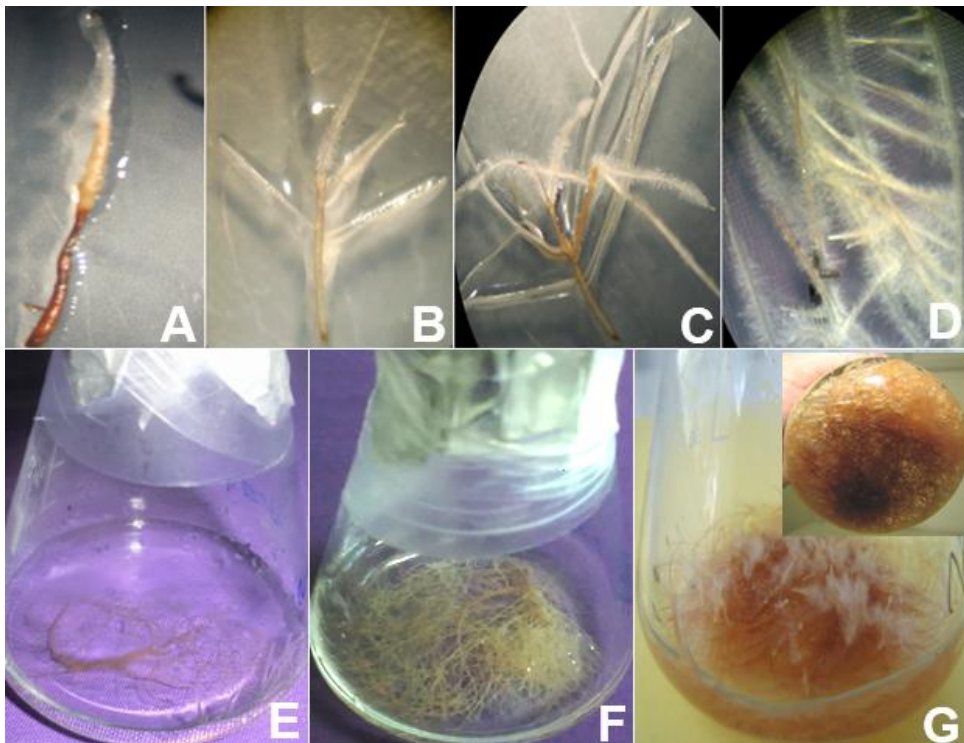
خصوصیات رشدی ریشه‌های مویین در محیط جامد تعداد ۲۰ لاین مختلف از ریشه‌های مویین تراریخته مستقل از هم، از نظر طول ریشه اصلی و تعداد انشعابات طی دو دوره واکشت سه هفته‌ای در محیط جامد مورد مقایسه قرار گرفتند. ریشه‌های مویین پس از یک هفته رشد طولی به تدریج افزایش تعداد انشعابات عرضی را نشان دادند (شکل ۶-A-D). 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 ($P < 0.05$) وجود دارد (شکل ۷-A 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



شکل ۵- آنالیز PCR ریشه‌های مویبین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بخش‌هایی از ژن *rolA* و *rolB*

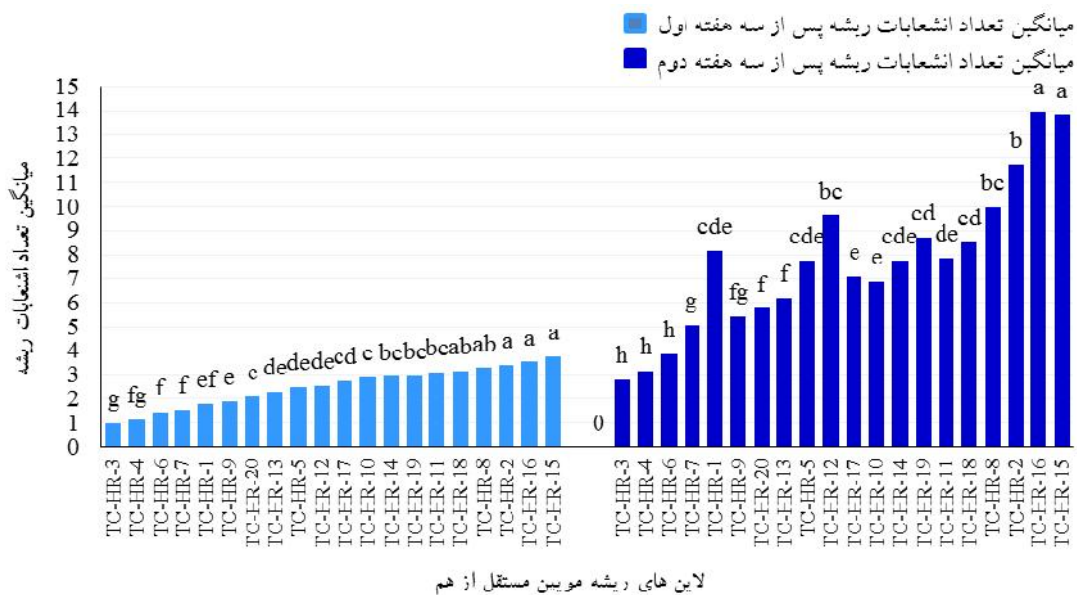
(A و B) یا آغازگر اختصاصی ژن *virD₂* (C)

M: نشانگر 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), ۱: در هر سه شکل پلاسمید Ri از آگروباکتریوم سویه A13, ۲: در هر سه شکل چاهک خالی, ۳-۱۰ (A و C) و ۳-۱۴ (B): ریشه‌های مویبین 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



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

A-D: رشد و ایجاد انشعابات جانبی فراوان ریشه مویین جداشده از روی ریزنمونه به ترتیب 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 $MS \frac{1}{2}$ مایع بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی پس از سه ماه

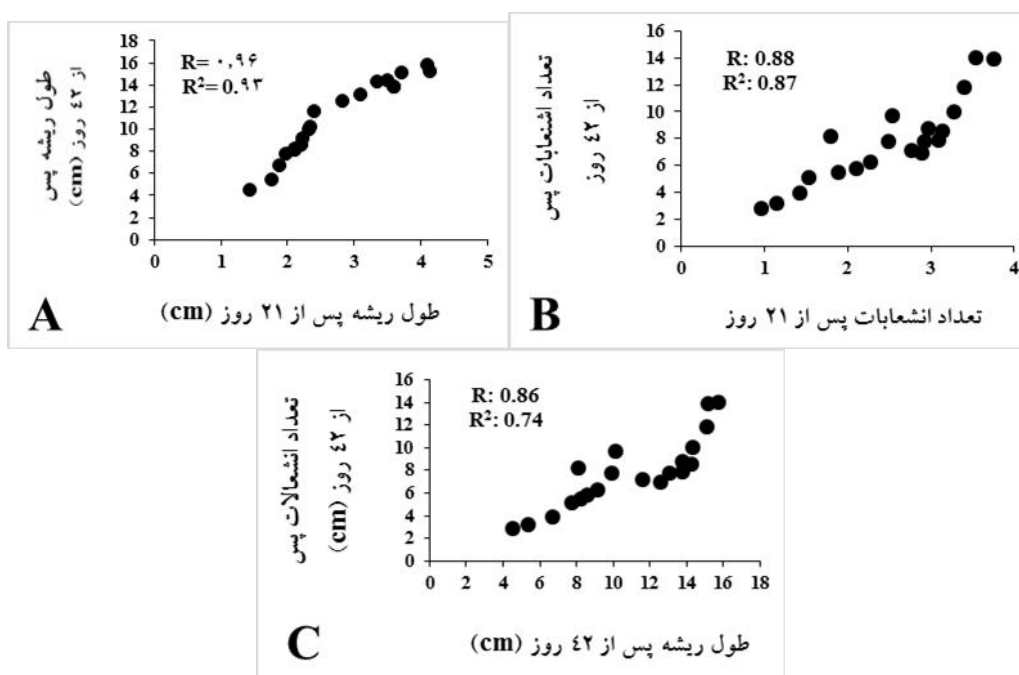


شکل ۷- مقایسه ۲۰ لاین ریشه مویین تراریخته مستقل از هم (Independent transgenic hairy root)

گیاه مریم‌نخودی طنناز (*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 ($P < 0.05$) براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



شکل ۸- همبستگی بین متغیرهای طول ریشه اصلی و تعداد انشعابات در لاین‌های ریشه مویین

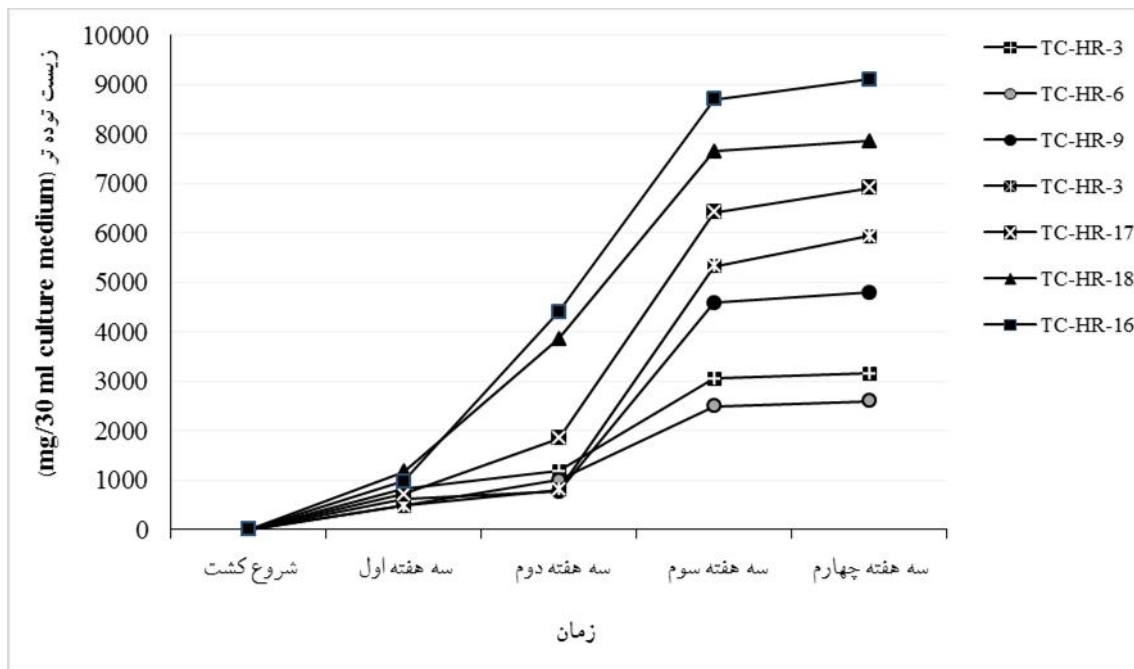
گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium chamaedrys*) در انتهای دو دوره واکشت سه هفته‌ای

R و R^2 به ترتیب مقادیر همبستگی و ضریب تبیین را نشان می‌دهند.

حالی‌که برای لاین‌های TC-HR-3 و TC-HR-6، به ترتیب ۳۰۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در هر ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، دارای کمترین زیست‌توده تر در انتهای ماه سوم برآورد شد.

روند رشدی لاین‌ها 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 می‌تواند به دلیل ماده تلقیح اولیه کم (۲۰ mg) 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 ریشه‌ها کند شده که بیانگر شروع فاز ایستایی (stationary phase) است.

قدرت رشد لاین‌های ریشه مویین در محیط کشت مایع ریشه‌های 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 لاین‌ها از نظر میزان زیست‌توده تفاوت معنی‌داری ($P < 0.01$) وجود داشت (شکل ۹). رشد مداوم ریشه‌ها 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، به ترتیب ۸۷۰۰ و ۷۶۵۰ میلی‌گرم در هر ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت دارای بیشترین زیست‌توده تر در انتهای ماه سوم بودند، در



شکل ۹- مقایسه ۷ لاین ریشه موئین 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 ۲۰ mg برداشته شد. زیست‌توده تر در انتهای هر سه هفته اندازه‌گیری شد.

بحث

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 موئین، 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 موئین مشاهده 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

موفقیت در القاء ریشه موئین 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 موئین نشان دادند. بهترین ریزنمونه‌ها به‌منظور القاء ریشه موئین با فراوانی بالا در گیاه مریم‌نخودی طناز، به‌ترتیب برگ و گره ساقه بود. البته وابستگی القاء ریشه موئین 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

نسخه‌های درج شده از ژن‌های *rol* شاید لازم باشد از این تکنیک استفاده گردد.

به‌طور کلی ریشه‌های موپین 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 موپین 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) مشاهده نشد. اما مطالعات متعددی وجود چنین مورفولوژی‌ها را در ریشه‌های موپین القاء شده 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 موپین در محیط کشت MS 1/2 با منبع کربن ساکارز و بدون نیاز به PGRs به خوبی رشد کرده و قادر به میزان مناسبی زیست‌توده هستند. مناسب بودن محیط کشت MS 1/2 برای ریشه‌های موپین 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 موپین 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

قابلیت آنها در القاء ریشه موپین در گیاه مریم‌نخودی طناز استفاده شد که با استفاده از سویه GMI9534 ریشه موپین روی هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها القاء نشد، ولی سویه A13 باعث القای تعدادی زیادی ریشه موپین 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 پلاسמיד 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 موپین 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 *rolB* نقش مهمی در القاء ریشه موپین دارد، با این حال ژن‌های *rolA* و *rolC* و دیگر چارچوب‌های خوانش باز (ORFs) اثر تشدیدکنندگی بر تشکیل ریشه موپین دارند (Welander & Zhu, 2006؛ Veena & Taylor, 2007). حضور ترکیبی از این سه ژن در ژنوم ریشه‌های موپین تراریخته و بیان آنها منجر به رشد بیشتر و انشعاب‌دهی مناسب ریشه‌های موپین می‌گردد (Welander & Zhu, 2006). در این تحقیق آزمون PCR توانست حضور ژن‌های مؤثر در القاء ریشه موپین را تشخیص دهد. برای اطمینان از عدم آلودگی بافت ریشه موپین با آگروباکتری، از حضور ژن *virD2* 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 موپین و اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی را تأیید می‌کند. بنابراین نیازی به استفاده از آنالیز سخت و طاقت‌فرسای و هزینه‌بر مانند لکه‌گذاری سادرن (Southern blot) برای تأیید تراریختی ریشه موپین نیست، اما برای تعیین تعداد

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 موپین در گیاه مریم‌نخودی طناز است. علاوه بر 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 موپین 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 آذربایجان غربی)، 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.,

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 این رو انتظار بر این است که با انتقال T-DNA همه ژن‌های روی آن از جمله ژن‌های aux به سلول گیاهی منتقل یابند. در بعضی از گیاهان، ریشه موپین القایی توسط سویه‌های تیپ آگروپین آگروباکتری ممکن است بدون افزودن اکسین به محیط کشت رشد مطلوبی نشان دهند (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 صورتی که T_R-DNA در بردارنده 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 موپین حاصل معمولاً آگروتروف به اکسین خواهند بود (Camilleri & Jouanin, 1991). افزودن PGRs به‌ویژه اکسین به محیط کشت ریشه‌های موپین معمولاً تأثیر منفی بر تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه دارد (Yoshimatsu *et al.*, 2004).

البته ریشه‌های موپین حاصل در این تحقیق، پایداری بالایی از نظر خصوصیات رشدی و مورفولوژیک در طی واکنش‌های مختلف نشان دادند که احتمالاً منعکس‌کننده پایداری ژنتیکی آنها باشد. پایداری ژنتیکی از خصوصیات بارز ریشه‌های موپین تراریخته است (Suza *et al.*, 2008). انتخاب چنین ریشه‌های موپین یکنواخت از نظر ژنتیکی می‌تواند برای تولید بیوماس قابل توجه و همچنین تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت باشد. البته آهنگ رشدی ریشه‌های موپین 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 واکنش را تقریباً در بیست و یکمین روز کشت تعیین کرد، همچنین این الگو می‌تواند برای تعیین زمان مناسب افزودن عوامل محرک (elicitors)

- 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. *Biotechnology 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.
- Muselli, 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, Vienna, 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.

- 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.
- 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 Hortiagrobotanici 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.

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

I. Bernousi¹ and M. Jafari^{2*} and J. Ahmadi Dizaji¹

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 *rolA* and *rolB* 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.