بررسی اثر نوع سویه باکتری و گونه گیاه در القای ریشه مویین در جنس Salvia

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

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 2- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 3- مربی گروه فیزیولوژی گیاهی، پردیس علوم دانشگاه تهران. 4- استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی.

نویسندهٔ رابط: رضا نوروزی (reza.noroziabhari@yahoo.com)

چکیده

ترانسفورماسیون ژنتیکی بافت‌های گیاهی توسط اگروباکتریوم رایزوژنز باعث ایجاد ریشه‌های مویین می‌گردد، که توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه را دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نوع سویه باکتری و گونه گیاهی در القای ریشه مویین در دو گونه *Salvia eremophila* و *S. macrosiphon* توسط چهار سویه باکتری شامل A4، 15834، 1724، 2659 به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. دو گونه‌ی مختلف جنس *Salvia* تفاوتی در تعداد و فراوانی ریشه‌های مویین نداشتند. اما تفاوت معنی‌داری میان سویه‌های مختلف باکتری از نظر تعداد و فراوانی ریشه‌های مویین وجود داشت. باکتری سویه 15834 بیشترین تعداد (3/9) و فراوانی (3/78) ریشه مویین را داشت. بیشترین فراوانی ریشه مویین (5/08) از تلقیح گونه *S. macrosiphon* با سویه 15834 به دست آمد.

کلمات کلیدی: ریشه مویین، اگروباکتریوم رایزوژنز، مریم‌گلی

1. مقدمه

گیاهان عالی از زمان حضور انسان در کره خاکی کلید رفاه او بوده‌اند. خاصیت دارویی بودن برخی گیاهان، به واسطه ی مواد متنوعی است که طی واکنش های متابولیتی در پیکره‌ی این گیاهان تولید و تجمع می یابند. [1] . ریشه‌های مویین که از ترانسفورماسیون ژنتیکی بافت‌های گیاهی توسط باکتری گرم منفی اگروباکتریوم رایزوژنز به وجود می‌آیند، می‌توانند محل بیوسنتز یا تجمع برخی از متابولیت-های ثانویه باشند. این باکتری با وارد کردن DNA منتقل شونده T-DNA از پلاسمید القا کننده ریشه (پلاسمید Ri) به ژنوم سلول‌های گیاهی و بیان پایدار آن در سلول‌های گیاه منجر به ظهور فنوتیپ ریشه‌های مویین می‌گردد[2-4]. فرایند ترانسفورماسیون بافت‌های گیاهی و القا ریشه مویین در آن‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که شامل گونه، سن و نوع بافت گیاهی و وضعیت فیزیولوژیکی آن ، نوع نژاد اگروباکتریوم و غلظت سوسپانسیون باکتریایی است [5]. جنس *Salvia* بزرگترین جنس خانواده‌ی *Lamiacea* است و بالغ بر 900 گونه علفی و درختچه‌ای دارد [6 , 7]. علی‌رغم تنوع گونه‌ای قابل ملاحظه این جنس در محدوده کشور ایران، تا کنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه ریشه‌های مویین آن‌ها در ایران صورت نگرفته است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نوع سویه باکتری و گونه گیاهی در القای ریشه مویین در جنس مریم‌گلی است.

2. مواد و روش ها

بذرهای دو گونه مریم گلی (جدول 1) که از بانک ژن منابع طبیعی سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شده بودند در گلدان-های حاوی مخلوطی از پیت‌ماس و پرلیت کشت شدند.

جدول 1- مشخصات هرباریومی گیاهان مورد آزمایش

گونه گیاهی	نام فارسی	محل جمع آوری	شماره هرباریومی	توضیحات
S. eremophila	مریم‌گلی بیابانی	جیرفت- کرمان، ارتفاع: 790 متر	26566	اندمیک
S. macrosiphon	مریم‌گلی لوله‌ای	روستای نعمت‌آباد، قروه- کردستان، ارتفاع: 2195 متر	26016	غیراندمیک

کشت سوسپانسون باکتری از چهار سویه اگروباکتریوم شامل A4، 15834، 1724، 2659 در ارلن‌های 100 ml حاوی 25 ml از محیط LB مایع انجام گرفت. سپس ارلن‌ها به مدت 48 ساعت در تاریکی بر روی شیکر با سرعت 100 rpm در دمای 26 C قرار گرفتند. جهت تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از برگ‌های جوان گیاهچه‌های چهارهفته‌ای دو گونه‌ی مریم‌گلی استفاده شد. پس از ضدعفونی، با استفاده از اسکالپل ریز نمونه‌ها به قطعات دو سانتی متری تقسیم شدند و به مدت 10 دقیقه در سوسپانسون باکتری غوطه‌ور گردیدند. سپس ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت جامد MS عاری از هورمون قرار گرفتند و به اتاق رشد با دمای 25 ± 2 C و تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت 72 ساعت از تلقیح و اطمینان از ورود ژن‌های ریشه‌زایی، به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد، حاوی 500 ppm آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. و این عمل تا حذف کامل باکتری چند بار با فواصل 4-2 روز و غلظت‌های کمتر تکرار شد. بررسی القای ریشه‌زایی مویین به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار و پنج مشاهده انجام پذیرفت. ریزنمونه‌هایی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که با باکتری تلقیح نشدند. فراوانی ریشه‌زایی برای هر تکرار از تقسیم تعداد ریشه‌های ظاهر شده در هر مشاهده (ریزنمونه‌ی برگی) به تعداد نمونه‌های موجود در هر پتری به دست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نگارش 9/1 انجام گرفت و میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% مقایسه گردیدند.

3. نتایج

پس از حدود 22- 9 روز از تلقیح، از محل بریدگی ریزنمونه‌های برگی ریشه‌های مویین ظاهر شدند. تقریبا تمام ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده قادر به تشکیل ریشه مویین بودند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری میان سویه‌های مختلف باکتری در تعداد و فراوانی ریشه‌های مویین تشکیل شده مشاهده گردید، در حالی‌که میان گونه‌های مختلف جنس *Salvia* تفاوتی از این نظر وجود نداشت (جدول 2).

جدول 2. تجزیه واریانس اثر سویه‌های مختلف باکتری بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف مریم‌گلی

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه	فراوانی ریشه‌زایی
گونه گیاهی	1	0/53 ns	0/62 ns
باکتری	3	14/8*	13/8**
گونه گیاهی × باکتری	3	10*	10/4**
خطا	32	3/6	0/93

معنی‌دار در سطح 1%، *معنی‌دار در سطح 5%، **ns غیرمعنی‌دار

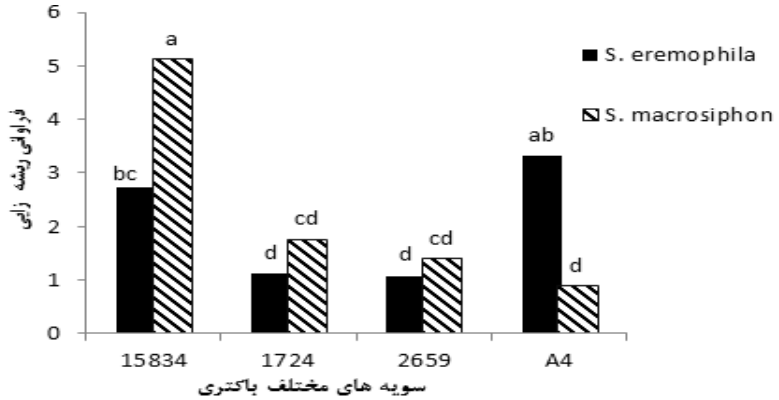
همچنین از میان باکتری‌های استفاده شده جهت تلقیح ریزنمونه‌ها، باکتری 15834 با میانگین 3/9 ریشه مویین در هر نمونه برگی بیشترین میزان القای ریشه را به‌خود اختصاص داد. بیشترین فراوانی ریشه زایی (3/78) نیز توسط این سویه به دست آمد. از طرفی سویه‌های 2659 و 1724 از نظر تعداد ریشه و فراوانی ریشه‌زایی اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول 3). نتایج نشان می‌دهد که اثر متقابل معنی‌داری میان گونه‌های مختلف مریم‌گلی و سویه‌های مختلف باکتری از نظر تعداد ریشه مویین و فراوانی ریشه‌زایی وجود دارد (جدول 2).

جدول 3. اثر نوع سویه باکتری بر تعداد ریشه و بسامد ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف مریم‌گلی

نوع باکتری	تعداد ریشه	فراوانی ریشه‌زایی
A_4	2/1 b	2/1 b
2659	1/3 c	1/2 c
15834	3/9 a	3/78 a
1724	1/4 c	1/4 c

میانگین هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی داری ندارند

بیشترین فراوانی ریشه مویین (5/08) از برهمکنش تلقیح گونه *S. macrosiphon* با باکتری سویه 15834 و کمترین میزان (0/8) نیز از تلقیح این گونه با سویه A_4 به دست آمد. با ملاحظه در نتایج می‌توان دریافت که بیشترین میزان فراوانی ریشه‌زایی (3/2) در گونه *S.eremophila* توسط باکتری A_4 به‌دست آمد (شکل 1).



شکل 1. اثر نوع گونه مریم‌گلی و سوبه‌های باکتریایی مختلف بر فراوانی ریشه‌زایی

4. بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر نوع سویه باکتری بر تعداد ریشه‌های مویین تشکیل شده و فراوانی ریشه‌زایی معنی‌دار بود (جدول 2). توالی ژنوم باکتریایی و پلاسمیدی نقش به سزایی در القای ریشه مویین در گیاهان دارد. به طور مثال ژن‌های TL-DNA پلاسمید Ri سنتز موادی را که موجب تحریک سلول‌ها برای تمایزیابی به سمت تولید ریشه می‌شوند بر عهده دارند. عمل تمایزیابی تحت تاثیر اکسین درونی انجام می‌گیرد گاهی اوقات T-DNA ها شامل ژن‌های *tms* هستند که مستقیما سبب سنتز اکسین و القای ریشه می‌شوند [8]. مشخص شده

است که ژن rol ABC و rol C به تنهایی نقش به‌سزایی را در تولید و سرعت ریشه‌هایی مویین دارند [9]. پژوهش‌های فراوانی نشان می-دهد که سویه‌های مختلف باکتریایی از نظر القای ریشه مویین توانایی متفاوتی دارند [3, 10, 11]. دلیل احتمالی این پدیده می‌تواند وجود پلاسمیدهای متفاوت در درون هر یک از سویه‌ها باشد [12, 13]. در این پژوهش اثر متقابل معنی‌داری میان دو گونه‌ی مختلف مریم‌گلی و سویه‌های مختلف باکتری از نظر تعداد ریشه تشکیل شده و فراوانی ریشه‌زایی وجود داشت. فرایند انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به درون ژنوم سلول‌های گیاه میزبان مستلزم مشارکت دو سویه باکتری و سلول گیاهی است. تشخیص سلول‌های گیاهی مستعد توسط باکتری با مکانیسم کموتاکسی صورت می‌پذیرد. [14] . از طرفی بیان شدن ژن‌های توالی مرزی راست T-DNA، ژن‌های ناحیه *vir* پلاسمید و کرموزم باکتری نقش موثری در عمل انتقال T-DNA از پلاسمیدها دارند [15]، که نشان می‌دهد پدیده ریشه‌زایی مویین در اثر انتقال T-DNA اگروباکتریوم به ژنوم گیاه یک رابطه دو جانبه میان باکتری و گیاه است و از این‌رو لازم است به منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه‌های باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون گردند.

5. مراجع

1. Vanisree, M., Ch. Lee, Sh. Lo, S M .Nalawade, ChY. Lin, and HS. Tsay. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Baont. Bull. Acad. 45(2): 1-22.

2. Kumar, V., A. Sharma, B. Prasad, HB. Gururaj, and GA. Ravishankar. 2006. Agrobacterium rhizogenes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electronic Journal of Biotechnology. 9(4): 349-357.

3. Krolicka, A., I. Staniszewska, and K. Bielawski. 2001. Establishment of hairy root cultures of Ammi majus. Plant Science. 160: 259–264.

4. Chaudhuri, KN., B. Ghosh, D. Tepfer, and S. Jha. 2005. Genetic transformation of Tylophora indica with Agrobacterium rhizogenes A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. Plant Cell Rep. 24(1): 25-35.

5. Hu, ZB., and M. Du. 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. Journal of Integrative Plant Biology. 48(2): 121-127.

6. Barrett, SCH., DH. Wilken, and WW. Cole. 2000. Heterostyly in the Lamiaceae: The case of Salvia brandegeei. Plant Systematics and Evolution. 223(3): 211-219.

7. Esmaeili, A., A. Rustaiyan, M. Nadimi, K. Larijani, F. Nadjafi, L. Tabrizi, F. Chalabian, and H. Amiri. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of Salvia reuterana Boiss. grown in Iran. Nat Prod Res. 22(6): 516-20.

8. Tao, J. and L. Li. 2006. Genetic transformation of Torenia fournieri L. mediated by Agrobacterium rhizogenes. South African Journal of Botany. 72(2): 211-216.

9. Bonhomme, V., MD. Laurain, and MA. Fliniaux. 2000. Effects of the rol C gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by Atropa belladonna. J Nat Prod. 63(9): 1249-52.

10. Ercan, AG., and KM. Taskin. 1999. Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root formation in some Rubia tinctorum L. populations grown in Turkey. Tr J of Botany. 23: 373-377.

11. Zehra, M., S. Banerjee, AA. Naqavi, and S. Kumar. 1998. Variaton in the growth and alkaloid production capability of the hairy root of Hyoscyamus albus. Plant Sci. 136: 93-99.

12. Vanhala, L., R. Hiltunen, and KM. Oksman-caldenty. 1995. Virulence of different Agrobacterium strains on hairy root formation of Hyoscyamus muticus. Plant cell Rep.14: 236-240.

13. Nguyen, C., F. Bourgaud, P. Forlot, and A. Guckert . 1992. Establishment of hairy root cultures of <i>Psoralea species. Plant Cell Rep. 11(8): 424-427.

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

15. Chandran, RP., and VP. Potty. 2008. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of Agrobacterium rhizogenes on five host plants. IJBT. 7: 122-128.

Study the effect of bacterium strain and plant species type in hairy root induction in *Salvia* genus

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

1- Dep. of Horticultural Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran. 2- Dep. of Botany, College of Sciences, University of Tehran, Iran. 3- Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran.

*Corresponding author: Reza Norouzi (reza.noroziabhari@yahoo.com).

Abstract

Genetic transformation of plant tissues by the *Agrobacterium rhizogenes* causes to induction of hairy roots, which can produce secondary metabolites. Present study was conducted to investigate the effect of bacterium strain and plant species type in hairy root induction in *Salvia eremophila* and *S. macrosiphon* by four bacterium strain included 1724, 2659, 15834 and A4. The experimental design was considered as Completely Randomized Factorial Designs. Different *Salvia* species didn't differ in number and frequency of infected hairy root. While there were significantly differences among various strains of bacterium in number and frequency of hairy root. Strain 15834 showed maximum number of roots (3.9) and root frequency (3.78). The infection of *S. macrosiphon* via strain 15834 showed the highest root frequency (5.08).

Keywords: hairy root, *Agrobacterium rhizogenes*, *Salvia*