

Effect of Different Factors on Induction of Hairy Roots in Iranian Garlic

Fatemehe Moradi¹, Mahboobeh Zare Mehrjerdi^{2*}, Kourosh Vahdati³ and Tahereh Hasanloo⁴

- 1- M. Sc. Graduate of Horticultural Science, Department of Horticulture, Faculty of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran (mzarem@ut.ac.ir)
- 3- Professor, Department of Horticulture, Faculty of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

Received: 3 July, 2017

Accepted: 3 January, 2018

Abstract

Background and Objectives

Garlic (*Allium sativum*) is one of the most important pharmaceutical and industrial plants with medicinal properties such as lowering blood pressure and cholesterol, fighting against infectious diseases, cancer prevention, anti-diabetic properties, antioxidant and anti-fungal properties. It is a rich source of organosulphur compounds such as allicin (diallyl disulphide oxide) which is produced enzymatically from alliin (S-2-propenyl-L-cystiene sulfoxide) if cells are damaged. Hairy root culture using *Agrobacterium rhizogenes* is one of the practical methods for studying secondary metabolite pathway. These hairy roots are genetically stable and grow rapidly.

Materials and Methods

In this study, the hairy root induction is studied in two separate experiments which were run in a factorial completely randomized design with three replications. In the first experiment, the effects of bacterial strain (ATCC15834 and A4), variety (Gorgon and Ramhormoz), inoculation medium (MS, MS containing 3% sucrose and MS containing 6% sucrose) and bacterial densities ($OD_{600} = 0.6$ to 0.9 and 1.2 to 1.5) were examined. In the second experiment, the effects of co-culture medium (MS, MS containing acetosyringone, B5 and B5 containing acetosyringone) and co-culture time (24, 48 and 72 hours) were studied.

Results

A systematic study using two strains and densities of *Agrobacterium rhizogenes* was carried out to determine the best condition for hairy root induction in two varieties of garlic in different inoculation and co-culture media. Results showed that bacterial strain A4, MS inoculation medium containing 6% sucrose, OD between 0.5 and 1 , MS co-culture medium containing acetosyringone, and co-culture time 72 hours had the highest percentage of hairy root induction. Hairy roots were approved using polymerase chain reaction for gene *rol B*. Amplification of the specific gene was noted in the transformant at 780 bp.

Discussion

Hairy root cultures have received more attention in recent years and were extensively used to produce important secondary metabolites and also as experimental systems for secondary metabolic pathway elucidation studies. The results of this study may be very helpful for hairy

root induction in garlic which could further be useful for studying gene function and consequently, production of secondary metabolites in this plant.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, Medicinal plant

تأثیر عوامل مختلف بر القای ریشه‌های موین در سیر ایرانی

فاطمه مرادی^۱، محبوبه زارع مهرجردی^{۲*}، کوروش وحدتی^۳ و طاهره حسنلو^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- *نویسنده مسئول: استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران (mzareem@ut.ac.ir)

۳- استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲

چکیده

سیر (*Allium sativum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی - دارویی می‌باشد که از خواص دارویی آن می‌توان به ویژگی کاهندگی فشار خون و کلسترول، مبارزه با بیماری‌های عفونی، جلوگیری از سرطان، ویژگی‌های ضددیابتی، آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی اشاره کرد. کشت ریشه موین با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* یکی از روش‌های کاربردی برای مطالعه مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در این مطالعه القای ریشه موین در سیر در دو آزمایش مجزا به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول اثر سویه باکتری (ATCC15834 و A₄)، اکوتیپ (گرگان و رامهرمز)، محیط تلقیح (MS فقیر، MS حاوی ۳ درصد ساکارز و MS حاوی ۶ درصد ساکارز) و تراکم باکتری (OD₆₀₀ ۰/۶ تا ۰/۹ و ۱/۲ تا ۱/۵) مورد بررسی قرار گرفت و در آزمایش دوم اثر محیط هم‌کشتی (MS، MS حاوی استوسرینگون، B5 و B5 حاوی استوسرینگون) و زمان هم‌کشتی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) ارزیابی شد. نتایج نشان داد سویه باکتری A₄، محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز، ۰/۶-۰/۹ OD₆₀₀، محیط هم‌کشتی MS حاوی استوسرینگون و زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت بالاترین درصد القای ریشه موین را داشتند. ریشه‌های موین حاصل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای ژن *rol B* مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج این مطالعه می‌تواند برای القای ریشه موین در سیر مورد استفاده قرار گرفته و در مطالعات بعدی در ارتباط با بیان ژن و در نهایت تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مفید واقع شود.

کلیدواژه‌ها: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه موین، گیاه دارویی

مقدمه

جلوگیری از سرطان، ویژگی‌های ضددیابتی، آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی می‌بخشد (Singh and Singh, 2008). آلیسین ماده مؤثره اصلی سیر، در اثر واکنش آنزیم آلیناز موجود در برگ و غده سیر بر روی آلین تولید می‌شود. محل ذخیره آلیناز در واکنش است که در اثر صدمه دیدن بافت با چاقو و یا له‌شدن آزاد شده و بر روی آلین موجود در سیتوسول اثر گذاشته و آلیسین بسیار ناپایدار را تولید می‌کند (Ovesna et al., 2015). با وجودی که سال‌های زیادی از شناخته شدن اثرات درمانی سیر می‌گذرد اما کاربرد کلینیکی آن به دلیل ناپایداری ماده مؤثره آلیسین

سیر با نام علمی *Allium sativum* و با عدد کروموزومی ۲n=۱۶، یکی از اعضا خانواده *Amaryllidaceae* و از جمله مهم‌ترین گیاهان صنعتی - دارویی جهان می‌باشد. این گیاه دارای ۱۷ آمینواسید، مواد معدنی همانند سلنیوم، چندین آنزیم و ۳۳ ترکیب گوگردی از جمله آلین و آلیسین است (Londhe et al., 2011). ترکیبات سولفوره موجود در این گیاه از سایر گونه‌های جنس آلیم بیشتر بوده و به این گیاه خواص دارویی همچون کاهندگی فشارخون و کلسترول، مبارزه با بیماری‌های عفونی،

کلیدی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، مهندسی متابولیت و انتقال ژن نیز مورد استفاده واقع شود (Krystal and Ressler, 2001). اولین گام برای بهره‌گیری از مزایای کشت ریشه‌های موین، بهینه‌سازی القای ریشه‌های موین در گیاه مورد نظر است. در این مطالعه این موضوع در گیاه سیر مورد توجه قرار گرفته که دستیابی به روشی برای تولید کارآمد این ریشه‌ها، می‌تواند در تحقیقات آینده برای بررسی مسیر بیوسنتزی، مهندسی متابولیت و انتقال ژن در این گیاه ارزشمند راهگشا باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی امکان القای ریشه‌های موین در گیاه سیر دو آزمایش فاکتوریل جداگانه و با تیمارهای مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شد. در آزمایش اول اثر سویه باکتری، اکوتیپ، محیط تلقیح و OD باکتری بر القای ریشه موین مورد بررسی قرار گرفت و در آزمایش دوم نیز محیط هم‌کشتی و زمان هم‌کشتی بررسی شد.

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در ابتدا ارقام سیر گرگان و رامهرمز که بر اساس مطالعات قبلی (Baghalian et al., 2005) به ترتیب دارای میزان آلیسین بالا (۱۳/۳ درصد) و پایین (۱/۷۵ درصد) بودند، برای انجام آزمایش تهیه گردیدند. برای تهیه ریزنمونه از سیرچه‌های سالم استفاده گردید. جهت استریل کردن، ابتدا سیرچه‌ها از یکدیگر جدا شده و سپس پوسته‌رویی حذف شد. سیرچه‌های جدا شده با آب مقطر استریل شسته شده، سپس ضد عفونی به وسیله هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه و اتانول ۶۰ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل سه بار شستشو شدند (Ramin et al., 2002). پس از ضد عفونی سیرچه‌ها، بافت طبق در زیر هود لامینار از نمونه‌ها جدا سازی و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول تنها از اکوتیپ گرگان استفاده شد.

تهیه سوپانسیون باکتری

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزورنژ ۱۵۸۳۴ و A4

و نیز سمی بودن مصرف بیش از حد آن محدود است. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی برای رفع این موانع صورت گرفته است. از جمله این تلاش‌ها استفاده از یک سیستم دوتایی متشکل از آنزیم آلیناز و سوبسترای آن آلین به منظور تولید در محل آلیسین، و رفع محدودیت ناپایداری این ترکیب فعال است (Apple et al., 2010؛ Gupta et al., 2015؛ Strehlow et al., 2016). علاوه بر این استفاده از آنتی‌بادی در کنار این سیستم کمک کرده است که این ترکیب به‌طور اختصاصی و در بافت هدف تولید شود و اثر سمی بر روی سایر سلول‌ها نگذارد که این موضوع در درمان سرطان بسیار مورد توجه است (Miron et al., 2003). برای خالص‌سازی آلین مورد استفاده در این روش‌ها سعی می‌شود که به طریقی همانند استفاده از حرارت، آنزیم آلیناز گیاه غیرفعال شود تا بر استخراج آلین تأثیر نگذارد (Mallika et al., 2014). مطالعات اخیر توجه زیادی نیز به جداسازی آنزیم آلیناز از میکروارگانیسم‌ها به دلیل پایداری بیشتر آن‌ها در مقایسه با آنزیم جدا شده از گیاهان کرده‌اند (Chhabria and Desai, 2016؛ Yutani et al., 2011). مطالعه بر روی کارآیی این آنزیم‌های دارای منشاء میکروارگانیسم، تأثیر آن‌ها بر روی آلین با منشا گیاهی و ترکیبات حاصل از فعالیت آن‌ها و نیز دستیابی به گیاهی فاقد فعالیت آنزیم آلیناز از طریق مهندسی ژنتیک برای تأمین آلین مورد استفاده، نیاز به سیستمی کارآمد، کنترل شده و مناسب برای مطالعه مسیرهای بیوسنتزی همانند کشت ریشه‌های موین با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* دارد.

کشت ریشه‌های موین از جمله روش‌هایی است که در سال‌های اخیر به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مختلفی استفاده شده است (Georgiev et al., 2007؛ Talano et al., 2012؛ Jalilian et al., 2017؛ Siahmansour et al., 2018). رشد سریع و نامحدود بدون نیاز به هورمون و ثبات بیوشیمیایی و ژنتیکی از جمله مزیت‌های این کشت است (Sharma et al., 2013). این روش علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه می‌تواند برای مطالعه مسیر بیوسنتزی، بررسی مداخله‌کننده‌ها و آنزیم‌های

ریشه موین تولید شده بر تعداد کل ریزنمونه تلقیح شده ضربدر صد محاسبه گردید.

تأیید مولکولی ریشه‌های موین

برای تأیید مولکولی ریشه‌های موین ایجاد شده، حضور ژن *rol B* از پلاسמיד باکتری در ژنوم ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی مطابق روش Kumar et al. (2006)، مقداری از ریشه‌ها بریده شد و به محیط LB مایع منتقل گردید. محیط حاوی ریشه در شیکری با دمای ۲۸ درجه قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت رشد باکتری در این محیط بررسی شد و ریشه‌هایی موینی که فاقد آلودگی بودند برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. DNA به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) از نمونه‌ها استخراج شد. DNA استخراج شده از ریشه معمولی سیر و باکتری نیز به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شدند. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* (Soleimani et al., 2012) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

در هر یک از آزمایش‌های اجرا شده ریشه‌های موین القاشده (شکل ۱) و درصد القای آن‌ها به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت.

اثر سویه، اکوتیپ، محیط تلقیح و تراکم باکتری بر فراوانی القای ریشه موین

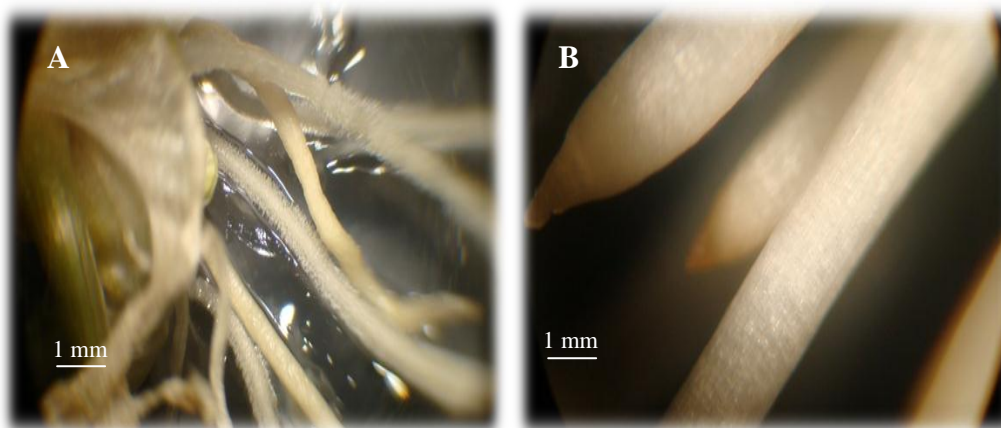
بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش اول، سویه A₄ با ۱۵ درصد فراوانی ریشه موین در مقایسه با سویه ۱۵۸۳۴ (با ۹ درصد فراوانی ریشه موین) در القای ریشه‌های موین موفق تر بود. تأثیر سویه باکتری و کارایی آن در گیاهان مختلف متفاوت است به گونه ای که در مطالعه‌ای بر روی سنبل الطیب همانند پژوهش حاضر بالاترین نرخ القای ریشه موین با کاربرد سویه A₄ حاصل شد و سویه ۱۵۸۳۴ در رتبه دوم قرار داشت (Pakdin and Farsi, 2013)، اما کاربرد سویه ۱۵۸۳۴ در بررسی القای ریشه موین بر روی *Plumbago indica* نتیجه بهتری را حاصل کرد (Gangopadhyay et al., 2008).

از مرکز زیست فناوری دانشگاه اصفهان دریافت شد. در آزمایش اول از هر دو سویه و در آزمایش دوم تنها از سویه A₄ استفاده گردید. کشت سویه‌ها در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفاپسین و در دمای ۲۸ درجه و بر روی شیکر صورت پذیرفت. پس از رسیدن به رشد مناسب که در آزمایش اول OD₆₀₀ پایین (۰/۶ - ۰/۹) و بالا (۱/۲ - ۱/۵)، و در آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول تنها OD₆₀₀ پایین در نظر گرفته شد، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و محیط تلقیح به آن اضافه گردید. محیط تلقیح در آزمایش اول شامل MS فقیر (MS فاقد MgSO_4 ، $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ، Na_2SO_4 ، MnSO_4 و NaH_2PO_4)، حاوی ۳ درصد ساکارز و MS حاوی ۶ درصد ساکارز و در آزمایش دوم MS حاوی ۳ درصد ساکارز بود. در زمان تلقیح استوسرینگون به غلظت ۱۰۰ μM به محیط تلقیح به صورت تازه اضافه شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها و محاسبه درصد فراوانی ریشه موین

پس از آماده سازی باکتری، ریزنمونه‌های استریل به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون تهیه شده از باکتری قرار گرفته و به آرامی تکان داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به کاغذ صافی استریل منتقل گردیدند تا باقیمانده سوسپانسیون باکتری اطراف ریزنمونه‌ها زدوده شود. ریزنمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط هم کشتی MS در آزمایش اول و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط‌های هم کشتی MS، MS حاوی ۱۰۰ μM استوسرینگون، B5 و B5 حاوی ۱۰۰ μM استوسرینگون در آزمایش دوم، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

پس از طی زمان هم کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند تا باکتری‌های اضافی حذف گردد. ۱۰ تا ۱۴ روز بعد از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط دارای آنتی بیوتیک، ریشه‌های موین ظاهر شده‌اند. درصد القای ریشه موین در هر تیمار با تقسیم تعداد



شکل ۱- القای ریشه‌های موئین در سیر. A: ریشه‌های موئین و B: ریشه‌های معمولی
Figure 1. Hairy roots induction in garlic. A: Hairy roots and B: Normal roots

بین ۰/۷ تا ۰/۹ بیان شد (Petrova *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که OD₆₀₀ زیر یک برای القای ریشه‌های موئین به دلیل جوان بودن باکتری‌ها و تراکم مناسب آن‌ها کارآیی بهتری را داراست.

در مطالعه حاضر دو اکوتیپ سیر با وجودی که در مقدار متابولیت ثانویه متفاوت بودند ولی تفاوت معنی داری در میزان القای ریشه موئین نشان ندادند. اما در سویا پاسخ به القای ریشه موئین در میان ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود (Weber and Bodanese, 2011).

اثر متقابل سویه و محیط تلقیح، محیط تلقیح و تراکم باکتری، محیط تلقیح، سویه و اکوتیپ و همچنین محیط تلقیح، تراکم باکتری و اکوتیپ به ترتیب در سطح ۱ درصد، ۵ درصد، ۱ درصد و ۵ درصد در فراوانی القای ریشه موئین تفاوت معنی داری داشت در حالی که سایر اثرهای متقابل تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

در بررسی اثر متقابل محیط تلقیح، سویه و اکوتیپ بر فراوانی ریشه موئین، بالاترین فراوانی (۲۵ درصد) مربوط به محیط MS حاوی ۶ درصد ساکارز، سویه A₄ و اکوتیپ رامهرمز بود و کمترین فراوانی به محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز، سویه ۱۵۸۳۴ و اکوتیپ رامهرمز (۵ درصد) تعلق داشت (شکل ۲).

در بررسی اثر متقابل اکوتیپ، محیط تلقیح و تراکم باکتری بر فراوانی ریشه موئین در سیر نیز بالاترین مقدار فراوانی ریشه در اکوتیپ گرگان، محیط تلقیح MS

در این مطالعه بررسی محیط تلقیح نشان داد که محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز با فراوانی ریشه موئین ۱۵/۸ درصد بالاترین میزان القای ریشه موئین را داشت که این میزان با درصد القاشده در محیط تلقیح MS فقیر (با ۱۲/۵ درصد ریشه موئین) تفاوت معنی داری نداشت. پایین‌ترین میزان ریشه موئین تولیدشده مربوط به محیط تلقیح MS حاوی ۳ درصد ساکارز با ۸/۷ درصد ریشه موئین بود. Sharafi *et al.* (2014) تأثیر محیط تلقیح را بر القای ریشه موئین در زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که استفاده از MS فاقد NH₄NO₃، KNO₃، KH₂PO₄ و CaCl₂ به عنوان محیط تلقیح منجر به راندمان القای ریشه بالاتری در این گیاه شد. بالاترین مقدار فراوانی ریشه موئین در OD₆₀₀ پایین با میزان ۱۵ درصد مشاهده گردید و پایین‌ترین مقدار مربوط به OD₆₀₀ بالا و به میزان ۹/۷ درصد فراوانی ریشه موئین بود. در مطالعه ای با کاربرد تراکم‌های باکتریایی مختلف (OD₆₀₀ شامل ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶) بر روی ریز نمونه‌های برگ و ساقه دو اکوتیپ شنبلیله کرج و بوشهر بیان شد که در اکوتیپ کرج بهترین OD₆₀₀ برای القای ریشه موئین ۱/۲، برای اکوتیپ بوشهر در ریزنمونه برگ ۱/۶ و در ریزنمونه ساقه ۰/۸ بود (Shahabzade *et al.*, 2013). در مطالعه بر روی گیاه تباکوی کوهی (*Arnica Montana*) نیز بهترین تراکم باکتری برای القای ریشه موئین OD₆₀₀

است افزایش کارآیی ترانسفورماسیون در حضور آن دور از انتظار نیست. کاربرد استوسرینگون بر روی توتون در محیط هم کشتی نیز باعث افزایش چهار برابری در فراوانی القای ریشه مویی شد (Kumar *et al.*, 2006) و در گیاه در معرض انقراض *Berberis aristata* نیز افزایش القای ریشه‌های مویین را در پی داشت (Brijwal and Tamta, 2015).

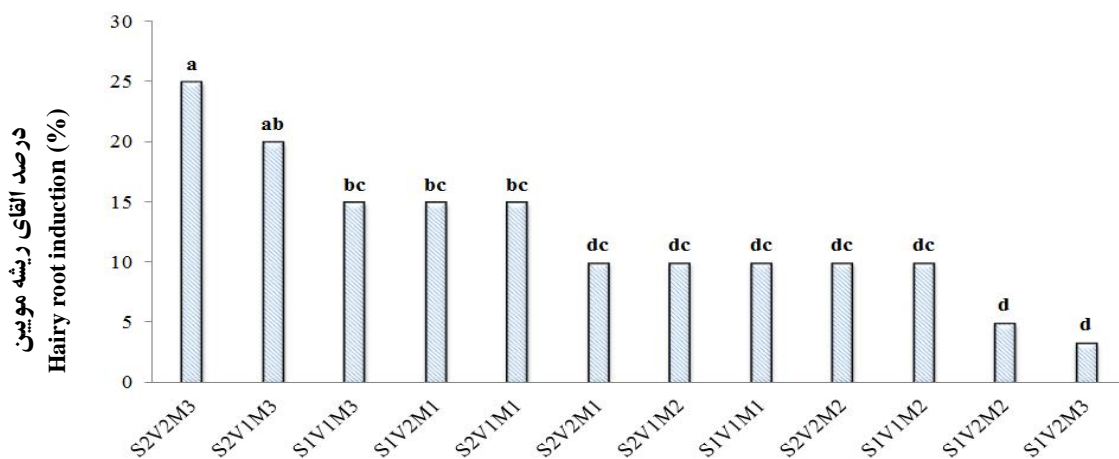
بررسی زمان هم کشتی نشان داد که زمان‌های هم کشتی ۷۲ ساعت با ۵۰ درصد و ۴۸ ساعت با ۴۲/۵ درصد فراوانی ریشه مویین بالاترین میزان القای را داشته و این دو تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. زمان ۲۴ ساعت کمترین مقدار درصد فراوانی ریشه مویین را نشان داد (شکل ۵). در مطالعه Bivadi *et al.* (2014) بهترین زمان هم کشتی برای دستیابی به بالاترین میزان القای ریشه مویین در گل راعی ۷۲ ساعت و کمترین القای آن در ۲۴ ساعت گزارش شد. به نظر می‌رسد که با افزایش زمان هم کشتی و کنار هم قرارگیری باکتری و ریزنمونه کارآیی انتقال افزایش می‌یابد که در این مطالعه نیز چنین نتیجه‌ای حاصل گردید.

حاوی ۶ درصد ساکارز و تراکم باکتری پایین به میزان ۲۰ درصد مشاهده شد. پایین ترین مقدار فراوانی ریشه مویین (۵ درصد) مربوط به اکوتیپ گرگان، محیط تلقیح MS حاوی ۳ درصد ساکارز و تراکم باکتری بالا بود (شکل ۳).

اثر محیط هم کشتی و زمان آن بر فراوانی القای ریشه مویین

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش دوم، اثر محیط هم کشتی و زمان هم کشتی هر دو بر درصد القای ریشه مویین در سطح ۱ درصد معنی دار بودند اما اثر متقابل محیط هم کشتی و زمان هم کشتی غیرمعنی دار بود. در بین محیط‌های هم کشتی مورد بررسی، محیط‌های حاوی استوسرینگون، بالاترین مقدار فراوانی ریشه مویین را داشتند. محیط MS حاوی استوسرینگون با ۷۳/۳ درصد و محیط B5 حاوی استوسرینگون با ۶۳/۳ بالاترین مقدار فراوانی را نشان دادند. کمترین میزان ریشه مویین تولید شده مربوط به محیط MS و B5 بود که تفاوت معنی داری را با هم نشان ندادند (شکل ۴).

از آنجایی که استوسرینگون به عنوان عامل تحریک کننده ژن‌های بیماری زای آگروباکتریوم مطرح

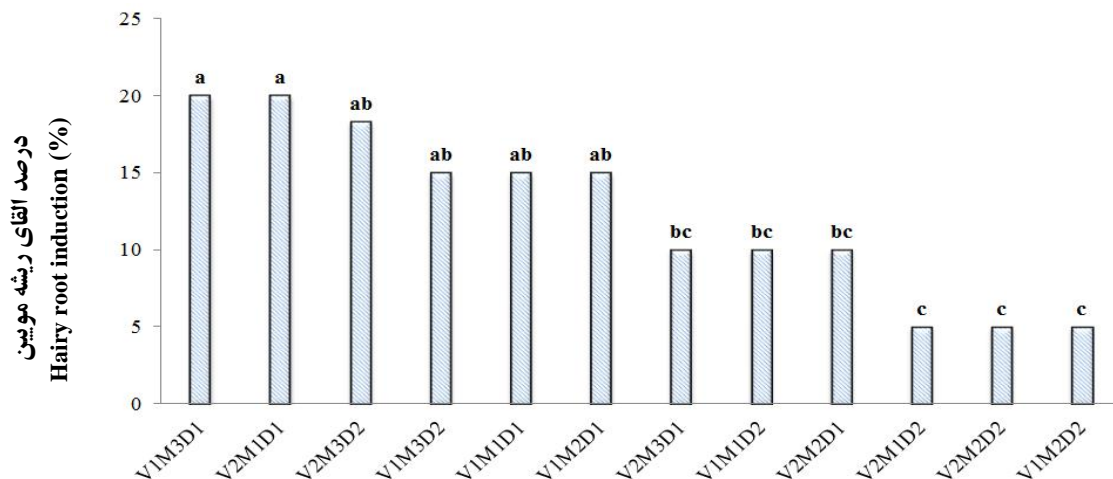


شکل ۲- اثر متقابل سویه، اکوتیپ و محیط تلقیح بر درصد القای ریشه مویین در سیر

S₁: سویه باکتری ۱۵۸۳۴، S₂: سویه باکتری A₄، V₁: سیر گرگان، V₂: سیر رامهرمز، M₁: MS فقیر، M₂: MS با ۳ درصد ساکارز و M₃: MS با ۶ درصد ساکارز

Figure 2. The interaction effect of strains, varieties and inoculation media on percentage of hairy root induction in garlic

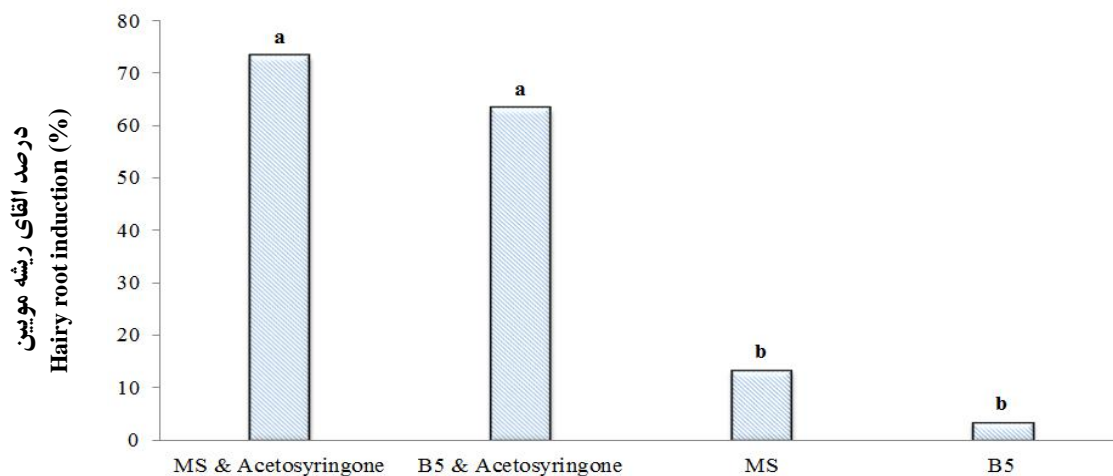
S₁: *A. rhizogenes* strain 15834, S₂: *A. rhizogenes* strain A₄, V₁: Gorgan garlic, V₂: Ramhormoz garlic, M₁: Poor MS, M₂: MS with 3% sucrose and M₃: MS with 6% sucrose



شکل ۳- اثر متقابل اکوتیپ، محیط تلقیح و تراکم باکتریایی بر درصد القای ریشه موئین در سیر
 V₁: سیر گرجان، V₂: سیر رامهرمز M₁: MS فقیر، M₂: MS با ۳ درصد ساکارز، M₃: MS با ۶ درصد ساکارز D₁: OD₆₀₀ باکتری ۰/۹-۰/۶ و D₂: OD₆₀₀ باکتری ۱/۲-۱/۵

Figure 3. The interaction effect of different varieties, inoculation media and bacterial densities on percentage of hairy root induction in garlic.

V₁: Gorgan garlic, V₂: Ramhormoz garlic, M₁: Poor MS, M₂: MS with 3% sucrose, M₃: MS with 6% sucrose, D₁: OD₆₀₀ 0.6-0.9 and D₂: OD₆₀₀ 1.2-1.5



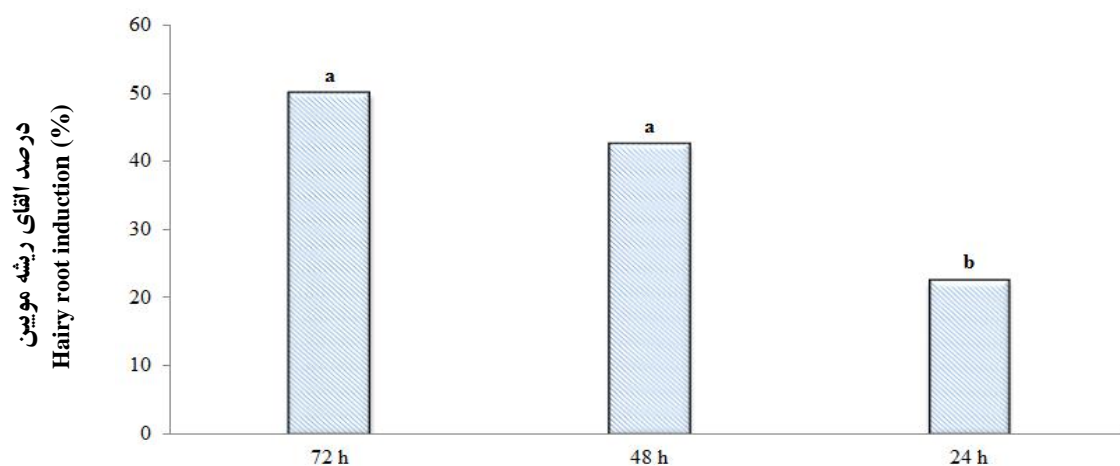
شکل ۴- اثر محیط‌های مختلف هم‌کشتی بر درصد القای ریشه موئین در سیر

Figure 4. Effect of different co-cultivation media on percentage of hairy root induction in garlic

(Tzfira et al., 2004). با توجه به این که طول توالی تکثیر شونده با این آغازگر ۷۸۰ bp می‌باشد، تکثیر قطعه ای با این مشخصات در گیاهان تراریخت حضور حداقل یک نسخه از ژن را در آن‌ها تأیید می‌کند. قطعه مورد نظر در باکتری به عنوان کنترل مثبت تکثیر شد و ریشه معمولی به عنوان کنترل منفی تکثیری نشان نداد (شکل ۶).

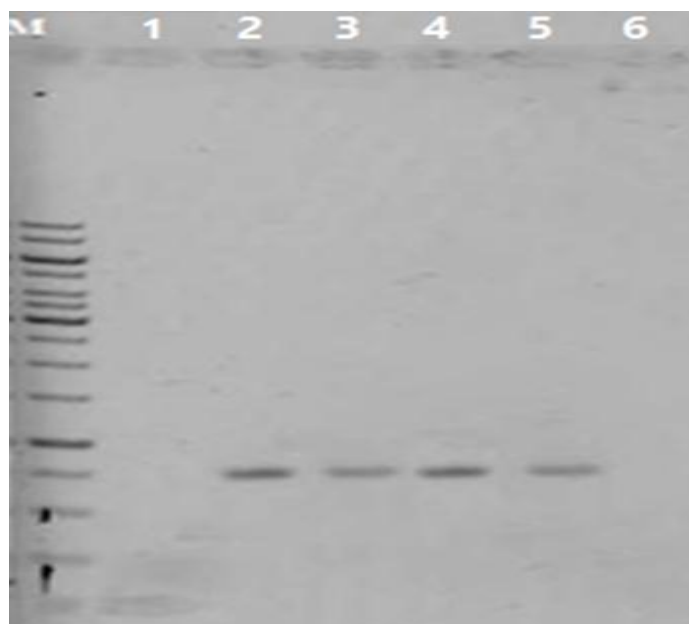
تأیید تراریختی ریشه‌های موئین

برای تأیید تراریختی ریشه‌های موئین حاصل، واکنش زنجیره‌های پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ژن *rol B* استفاده شد. از آنجایی که *rol B* در بسیاری از گیاهان به تنهایی برای القای ریشه موئین کافی است، بسیاری از مطالعات از آغازگرهای اختصاصی این ژن برای تأیید تراریختگی ریشه‌های موئین استفاده می‌کنند



شکل ۵- اثر زمان‌های مختلف هم‌کشتی بر درصد القای ریشه موئین در سیر

Figure 5. Effect of different co-cultivation times on percentage of hairy root induction in garlic



شکل ۶- تأیید القای ریشه موئین توسط *A. rhizogenes* با استفاده از PCR برای ژن *rol B*

M: نشانگر اندازه DNA (1 Kb)، ۱: PCR بدون DNA الگو (کنترل منفی)، ۲، ۳، ۴ و ۵: لاین‌های تواریخته ریشه موئین، ۶: ریشه عادی (کنترل منفی)

Figure 6. Confirmation of hairy root induction by *A. rhizogenes* using *rol B* detection by PCR
M: 1kb ladder, 1: Non-DNA template PCR reaction (negative control), 2, 3, 4, 5: Transgenic hairy root lines, 6: Normal root

توجه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که سویه باکتری A_4 و محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز در هر دو اکوتیپ گرگان و رامهرمز بالاترین درصد القای ریشه موئین را داشت. میزان القای ریشه در OD_{600} پایین و در

نتیجه‌گیری

متابولیت‌های ارزشمند موجود در سیر توجهات زیادی را به این گیاه دارویی سودمند معطوف کرده‌است. در این مطالعه بهینه‌سازی القای ریشه موئین در سیر مورد

ارزشمند و مهندسی آن‌ها برای بهره‌گیری بیشتر و سودمندتر از خواص شگفت‌انگیز این گیاه باشد.

سپاس‌گزاری

مؤلفان بر خود لازم می‌دانند از خانم دکتر کیهان‌فر عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان به جهت تأمین سویه‌های باکتری مورد استفاده در این تحقیق قدردانی نمایند.

محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز برای اکوتیپ گرگان و MS فقیر برای اکوتیپ رامهرمز بالاترین بود. محیط‌های هم‌کشتی حاوی استوسرینگون و زمان هم‌کشتی بیش از ۲۴ ساعت نیز مناسب‌ترین شرایط برای دستیابی به بالاترین درصد القای ریشه موین بودند. القای ریشه‌های موین در سیر می‌تواند گامی اولیه در جهت بررسی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های این گیاه

References

- Apple, E., Vallon Eberhard, A., Rabinkov, A., Brenner, O., Shin, I., Sasson, K., Shadkchan, Y., Osherov, N., Jung, S. and Mirelman, D. (2010). Therapy of murine pulmonary aspergillosis with antibody-alliinase conjugates and alliin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 898-906.
- Baghalian, K., Ziai, A., Naghavi, M. R. and Naghdi Badi, H. (2005). Pre-planting evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic ecotypes. *Journal of Medicinal Plants*, 1(13), 50-59. [In Farsi]
- Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N. and Yazdani, B. (2014). Effects of different tissue culture conditions in Hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 8(5), 597-604.
- Brijwal, L. and Tamta, S. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *Springer Plus*, 4, 443-453.
- Chhabria, S. and Desai, K. (2016). Purification and characterization of alliinase produced by *Cupriavidus necator* and its application for generation of cytotoxic agent: Allicin. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7), 1429-1438. [In Farsi]
- Doyle, J. and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- Gangopadhyay, M., Sircar, D., Mitra, A. and Bhattacharya, S. (2008). Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. *Biologia Plantarum*, 52(3), 533-537.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I. and Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1175-1185.
- Gupta, S., Jayathilaka, L., Huang, J. S., Lee, J. and Lee, B. S. (2015). Anti-cancerous/anti bacterial activities of allicin generated *in situ* from diastereo pure alliin by alliinase. *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 8(2), 1-16.
- Jalilian, A., Ismaili, A., Nazarian Firouzabadi, F. and Hosseini, S. Z. (2017). Induction of transgenic hairy roots in medicinal plant poppy (*Papaver somniferum*) by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Journal of Plant Production*, 39(4), 1-14. [In Farsi]
- Krystal, A. D. and Ressler, I. (2001). The use of valerian in neuropsychiatry. *CNS Spectrums*, 6(10), 841-847.
- Kumar, V., Sharma, A., Narasimha-Prasad, B. C., Bhaskar-Gururaj, H. and Aswathanarayana Ravishankar, G. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation

- is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 349-357.
- Londhe, V. P., Gavasane, A. T., Nipate, S. S., Bandawane, D. D. and Chaudhari, P. D. (2011). Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases-An overview. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*, 1(4), 129-134.
- Mallika, T., Omer, E. and Lianfu, Z. (2014). Separation and purification of alliinase and alliin from garlic (*Allium sativum*). *Journal of Academia and Industrial Research*, 2(11), 599-605.
- Miron, T., Mironchik, M., Mirelman, D., Wilchek, M. and Rabinkov, A. (2003). Inhibition of tumor growth by a novel approach: *In situ* allicin generation using targeted alliinase delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(12), 1295-1301.
- Ovesna, J., Mitrova, K. and Kucera, L. (2015). Garlic (*A. sativum* L.) alliinase gene family polymorphism reflects bolting types and cysteine sulphoxides content. *BMC Genetics*, 16(1), 53-63.
- Pakdin, A. and Farsi, M. (2013). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Valeriana officinalis* L. *Continental Journal of Biological Sciences*, 6(2), 9-15.
- Petrova, M., Zayova, E. and Vlahova, M. (2013). Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Central European Journal of Biology*, 8(5), 470-479.
- Ramin, A., Kashi, A. and Etemadi, N. (2002). The effect of hormone combination and explants on garlic callus induction *In vitro*. *The Scientific Journal of Agriculture*, 25(1), 1-11.
- Shahabzadeh, Z., Heidari, B. and Hafez, R. F. (2013). Induction of transgenic hairy roots in *Trigonella foenum-graceum* co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* harboring a GFP gene. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16(4), 263-268.
- Sharafi, A., Sohi, H. H., Azadi, P. and Sharafi, A. A. (2014). Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(2), 257-262.
- Sharma, P., Padh, H. and Shrivastava, N. (2013). Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 62-75.
- Siahmansour, Sh., Ismaili, A. and Nazarian Firouzabadi, F. (2018). Effect of different elicitor treatments on hairy roots of medicinal plant poppies (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Plant Production*, 41(1), 29-42. [In Farsi]
- Singh, V. K. and Singh, D. K. (2008). Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum* L.). *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10(1), 6-26.
- Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K. H. and Hasaloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 4(44), 176-184. [In Farsi]
- Strehlow, B., Bakowsky, U., Pinnapireddy, S. R., Kusterer, J., Mielke, G. and Keusgen, M. (2016). A novel microparticulate formulation with allicin *in situ* synthesis. *Journal of Pharmaceutics and Drug Delivery Research*, 5(1), 1-6.
- Talano, M. A., Oller, A. L. W., Gonzalez, P. S. and Agostini, E. (2012). Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(2), 1-19.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. T. and Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. *Trends in Genetics*, 20(8), 375-383.
- Weber, R. L. M. and Bodanese-Zanettini, M. H. (2011). Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(9), 1070-1075.

Yutani, M., Taniguchi, H., Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K. and Tanaka, T. (2011). Alliinase from *Ensifer adhaerens* and its use for generation of fungicidal activity. *AMB Express*, 1(2), 1-8.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).