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

Fatemehe Moradi[1], Mahboobeh Zare Mehrjerdi[2]*, Kourosh Vahdati[3] and Tahereh Hasanloo[4]

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 *Agrobactrium 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 *Agrobactrium 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

© 2018 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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

Keywords: Agrobactrium rhizogenes, Hairy root, Medicinal plant

تأثیر عوامل مختلف بر القای ریشه‌های مویین در سیر ایرانی

فاطمه مرادی[۱]، محبوبه زارع مهرجردی[۲]*، کوروش وحدتی[۳] و طاهره حسنلو[۴]

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

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳

چکیده

سیر (*Allium sativum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی- داروئی می‌باشد که از خواص داروئی آن می‌توان به ویژگی کاهندگی فشار خون و کلسترول، مبارزه با بیماری‌های عفونی، جلوگیری از سرطان، ویژگی های ضددیابتی، آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی اشاره کرد. کشت ریشه مویین با استفاده از *Agrobactrium rhizogenes* یکی از روش‌های کاربردی برای مطالعه مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در این مطالعه القای ریشه مویین در سیر در دو آزمایش مجزا به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول اثر سویه باکتری (ATCC15834 و A_4)، اکوتیپ (گرگان و رامهرمز)، محیط تلقیح (MS فقیر، MS حاوی ۳ درصد ساکارز و MS حاوی ٦ درصد ساکارز) و تراکم باکتری (OD_{600} ۰/٦ 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 (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) ارزیابی شد. نتایج نشان داد سویه باکتری A_4، محیط تلقیح MS حاوی ٦ درصد ساکارز، OD_{600} ۰/٦-۰/۹، محیط هم‌کشتی MS حاوی استوسرینگون و زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت بالاترین درصد القای ریشه مویین را داشتند. ریشه‌های مویین حاصل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن *rol B* مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج این مطالعه می‌تواند برای القای ریشه مویین در سیر مورد استفاده قرار گرفته و در مطالعات بعدی در ارتباط با بیان ژن و درنهایت تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مفید واقع شود.

کلیدواژه‌ها: اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین، گیاه دارویی

مقدمه

سیر با نام علمی *Allium sativum* و با عدد کروموزومی ۲n=۱۶، یکی از اعضا خانواده *Amaryllidaceae* و از جمله مهم‌ترین گیاهان صنعتی- داروئی 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 آلیوم بیشتر بوده و به این گیاه خواص دارویی همچون کاهندگی فشارخون و کلسترول، مبارزه با بیماری‌های عفونی، 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 واکوئل است که در اثر صدمه دیدن بافت با چاقو و یا له‌شدن آزادشده 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 موثره آلیسین

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 براین 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 جداشده 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، کنترل‌شده و مناسب برای مطالعه مسیرهای بیوسنتزی همانند کشت ریشه‌های مویین با استفاده از *Agrobactrium rhizogenes* دارد.

کشت ریشه‌های مویین ازجمله 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 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 مویین، بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین 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 مویین 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 مویین 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) به‌ترتیب 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 جداشده و سپس پوسته‌رویی حذف شد. سیرچه‌های جداشده با آب‌مقطر استریل شسته‌شده، سپس ضدعفونی به وسیله هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه و اتانول ۶۰ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. درنهایت ریزنمونه ها با آب مقطر استریل سه بار شستشو شدند (Ramin *et al*., 2002). پس از ضدعفونی سیرچه‌ها، بافت طبق در زیر هود لامینار از نمونه‌ها جداسازی و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول تنها از اکوتیپ گرگان استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز ۱۵۸۳۴و A_4

از مرکز زیست فناوری دانشگاه اصفهان دریافت شد. در آزمایش اول از هر دو سویه و در آزمایش دوم تنها از سویه A_4 استفاده گردید. کشت سویه‌ها در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و در دمای ۲۸ درجه و بر روی شیکر صورت پذیرفت. پس از رسیدن به رشد مناسب که در آزمایش اول OD_{600} پایین (۰/۶ – ۰/۹) و بالا (۱/۲ – ۱/۵)، و در آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول تنها OD_{600} 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 $NH_4(SO_4)_2$، $MgSO_4$، Na_2SO_4، NaH_2PO_4 و $MnSO_4$)، MS 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 به‌صورت تازه اضافه شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها و محاسبه درصد فراوانی ریشه مویین

پس از آماده‌سازی باکتری، ریزنمونه‌های استریل به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری قرارگرفته و به‌آرامی 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 هم‌کشتی MS در آزمایش اول و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط‌های هم‌کشتی MS، MS حاوی ۱۰۰µM استوسرینگون، B5 و B5 حاوی ۱۰۰µM استوسرینگون در آزمایش دوم، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

پس از طی زمان هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند تا باکتری های اضافی حذف گردد. ۱۰ تا ۱۴ روز بعد از انتقال ریزنمونه ها به محیط دارای آنتی‌بیوتیک، ریشه‌های مویین ظاهر شده‌اند. درصد القای ریشه مویین در هر تیمار با تقسیم تعداد ریشه مویین تولیدشده بر تعداد کل ریزنمونه تلقیح‌شده ضربدر صد محاسبه گردید.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین

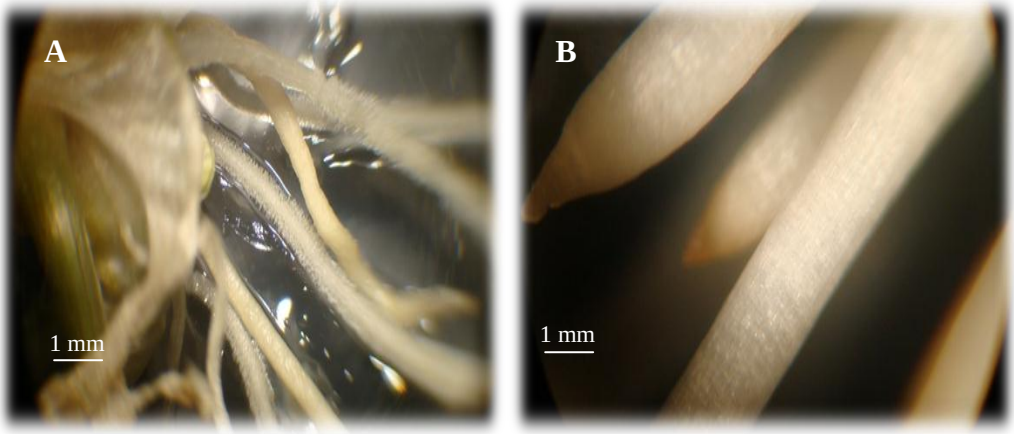
برای تأیید مولکولی ریشه های مویین ایجادشده، حضور ژن *rol B* از پلاسمید باکتری در ژنوم ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی مطابق روش Kumar *et al.* (2006)، مقداری از ریشه ها بریده شد و به محیط LB مایع منتقل گردید. محیط حاوی ریشه در شیکری با دمای ۲۸ درجه قرار گرفت.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

نتایج و بحث

در هر یک از آزمایش‌های اجراشده ریشه‌های مویین القاشده (شکل ۱) و درصد القای آن‌ها به‌صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت.

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

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمایش اول، سویه A_4 با ۱۵ درصد فراوانی ریشه مویین در مقایسه با سویه ۱۵۸۳۴ (با ۹ درصد فراوانی ریشه مویین) در القای ریشه‌های مویین موفق تر بود. تأثیر سویه باکتری و کارآیی آن در گیاهان مختلف متفاوت است به گونه ای که در مطالعه‌ای بر روی سنبل‌الطیب همانند پژوهش حاضر بالاترین نرخ القای ریشه مویین با کاربرد سویه A_4 حاصل شد و سویه ۱۵۸۳۴ در رتبه دوم قرار داشت (Pakdin and Farsi, 2013)، اما کاربرد سویه ۱۵۸۳۴در بررسی القای ریشه مویین بر روی *Plumbago indica* نتیجه بهتری را حاصل کرد (Gangopadhyay *et al.*, 2008).



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

در این مطالعه بررسی محیط تلقیح نشان داد که محیط تلقیح MS حاوی ۶ درصد ساکارز با فراوانی ریشه مویین ۱۵/۸ درصد بالاترین میزان القای ریشه مویین را داشت که این میزان با درصد القاشده در محیط تلقیح MS فقیر (با ۱۲/۵ درصد ریشه مویین) تفاوت معنی داری نداشت. پایین ترین میزان ریشه مویین تولیدشده مربوط به محیط تلقیح MS حاوی ۳ درصد ساکارز با ۸/۷ درصد ریشه مویین بود. Sharafi *et al.* (2014) تأثیر محیط تلقیح را بر القای ریشه مویین در زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که استفاده از MS فاقد NH_4NO_3، KH_2PO_4، KNO_3 و $CaCl_2$ به‌عنوان محیط تلقیح منجر به راندمان القای ریشه بالاتری در این گیاه شد. بالاترین مقدار فراوانی ریشه مویین در OD_{600} پایین با میزان ۱۵ درصد مشاهده گردید و پایین‌ترین مقدار مربوط به OD_{600} بالا و به میزان ۹/۷ درصد فراوانی ریشه مویین بود. در مطالعه ای با کاربرد تراکم‌های باکتریایی مختلف (OD_{600} شامل ۰/۸، ۱/۲و ۱/۶) بر روی ریز نمونه‌های برگ و ساقه دو اکوتیپ شنبلیله کرج و بوشهر بیان شد که در اکوتیپ کرج بهترین OD_{600} برای القای ریشه مویین ۱/۲، برای اکوتیپ بوشهر در ریزنمونه برگی ۱/۶ و در ریزنمونه ساقه ۰/۸ بود (Shahabzade *et al.*, 2013). در مطالعه بر روی گیاه تنباکوی کوهی (*Arnica Montana*) نیز بهترین تراکم باکتری برای القای ریشه مویین OD_{600} بین ۰/۷ تا ۰/۹ بیان شد (Petrova *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که OD_{600} زیر یک برای القای ریشه‌های مویین 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 مویین نشان نداند. اما در سویا پاسخ به القای ریشه مویین 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 به‌ترتیب در سطح ۱ درصد، ۵ درصد، ۱ درصد و ۵ درصد در فراوانی القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری داشت در حالی که سایر اثرهای متقابل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

در بررسی اثر متقابل محیط تلقیح، سویه و اکوتیپ بر فراوانی ریشه مویین، بالاترین فراوانی (۲۵ درصد) مربوط به محیط MS حاوی ۶ درصد ساکارز، سویه A_4 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 اثرمتقابل اکوتیپ، محیط تلقیح و تراکم باکتری بر فراوانی ریشه مویین در سیر نیز بالاترین مقدار فراوانی ریشه در اکوتیپ گرگان، محیط تلقیح MS

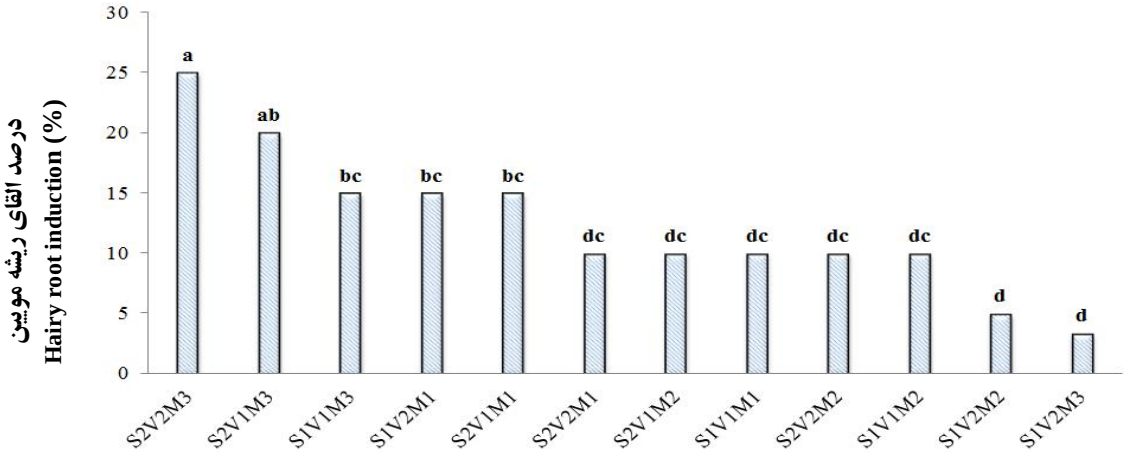
حاوی۶ درصد ساکارز و تراکم باکتری پایین به میزان ۲۰ درصد مشاهده شد. پایین ترین مقدار فراوانی ریشه مویین (۵ درصد) مربوط به اکوتیپ گرگان، محیط تلقیح MS حاوی۳ درصد ساکارز و تراکم باکتری بالا بود (شکل ۳).

اثر محیط هم‌کشتی و زمان آن بر فراوانی القای ریشه مویین

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش دوم، اثر محیط هم‌کشتی و زمان هم‌کشتی هر دو بر درصد القای ریشه مویین در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند اما اثر متقابل محیط هم‌کشتی و زمان هم‌کشتی غیرمعنی‌دار بود. در بین محیط‌های هم‌کشتی 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 تولیدشده مربوط به محیط MS و B5 بود که تفاوت معنی‌داری را با هم نشان ندادند (شکل ۴).

از آنجایی که استوسرینگون به عنوان عامل تحریک‌کننده ژن‌های بیماری زای اگروباکتریوم مطرح است افزایش کارآیی ترانسفورماسیون در حضور آن دور از انتظار نیست. کاربرد استوسرینگون بر روی توتون در محیط هم‌کشتی 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 هم‌کشتی نشان داد که زمان‌های هم‌کشتی ۷۲ ساعت با ۵۰ درصد و ۴۸ ساعت با ۴۲/۵ درصد فراوانی ریشه مویین بالاترین میزان القای را داشته و این دو تفاوت معنی‌داری 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 هم‌کشتی برای دستیابی به بالاترین میزان القای ریشه مویین در گل راعی ۷۲ ساعت و کمترین القا در آن در ۲۴ ساعت گزارش شد. به نظر می‌رسد که با افزایش زمان هم‌کشتی و کنار هم قرارگیری باکتری و ریزنمونه کارآیی انتقال افزایش می‌یابد که در این مطالعه نیز چنین نتیجه‌ای حاصل گردید.

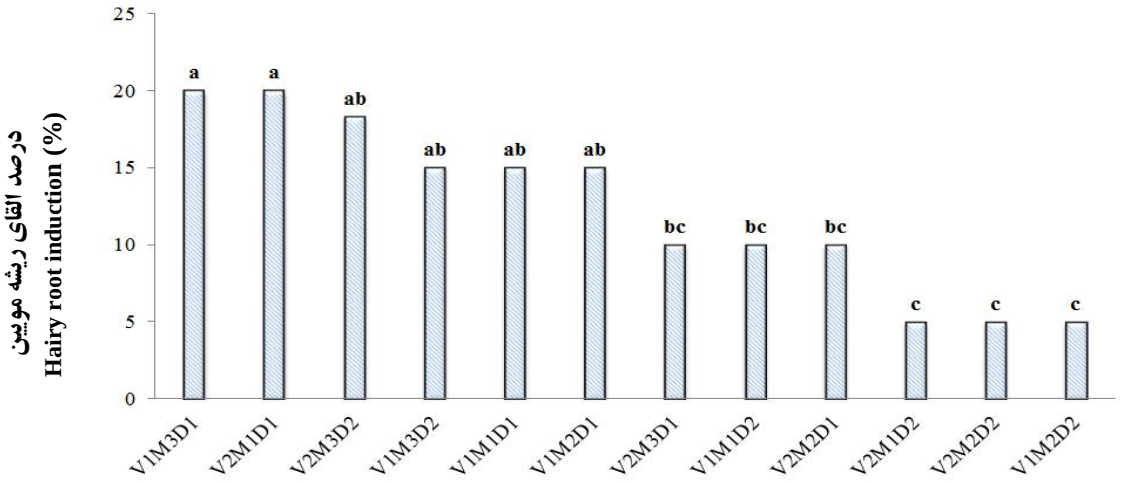


شکل ۲- اثر متقابل سویه، اکوتیپ و محیط تلقیح بر درصد القای ریشه مویین در سیر

S_1: سویه باکتری ۱۵۸۳٤، S_2: سویه باکتری A_4، V_1: سیر گرگان، V_2: سیر رامهرمز M_1: MS فقیر، M_2: MS با ۳ درصد ساکارز و M_3: MS با ٦ درصد ساکارز

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

S_1: *A. rhizogenes* strain 15834, S_2: *A. rhizogenes* strain A_4, V_1: Gorgan garlic, V_2: Ramhormoz garlic, M_1: Poor MS, M2: MS with 3% sucrose and M3: MS with 6% sucrose

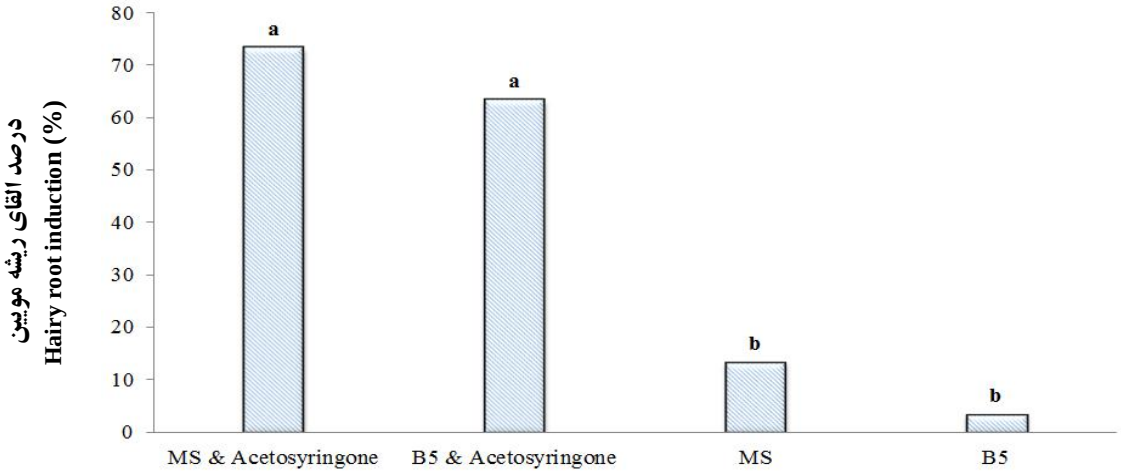


شکل ۳- اثر متقابل اکوتیپ، محیط تلقیح و تراکم باکتریایی بر درصد القای ریشه مویین در سیر

V_1: سیر گرگان، V_2: سیر رامهرمز M_1: MS فقیر، MS: M_2 با ۳ درصد ساکارز، M_3: MS با ٦ درصد ساکارز D_1: OD_{600} باکتری ٠/٦- ٠/٩ و D_2: OD_{600} باکتری ۲/ ۱- ۱/۵

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

V_1: Gorgan garlic, V_2: Ramhormoz garlic, M_1: Poor MS, M_2: MS with 3% sucrose, M_3: MS with 6% sucrose, D_1: OD_{600} 0.6-0.9 and D_2: OD_{600} 1.2-1.5

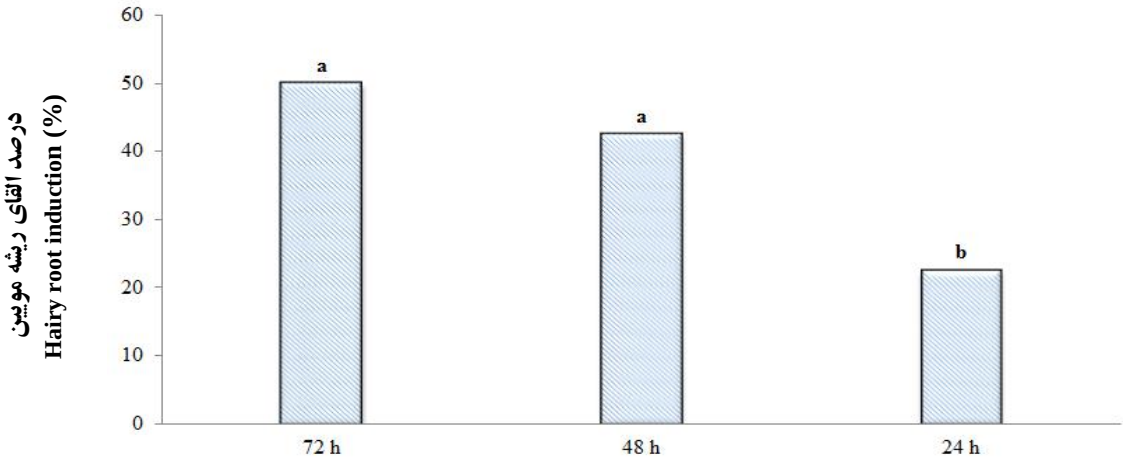


شکل٤- اثر محیط‌های مختلف هم‌کشتی بر درصد القای ریشه مویین در سیر

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

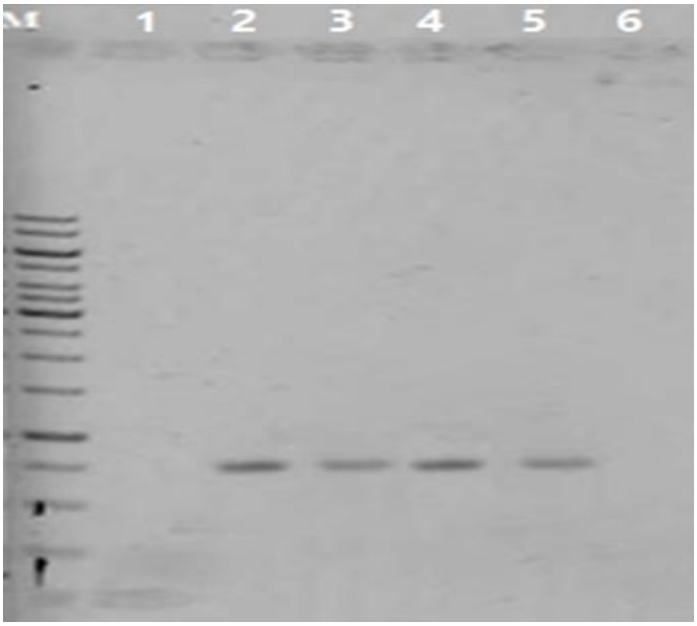
تأیید تراریختی ریشه‌های مویین

برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین حاصل، از واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای ژن *rol B* استفاده شد. از آنجایی که *rol B* در بسیاری از گیاهان به تنهایی برای القای ریشه مویین کافی است، بسیاری از مطالعات از آغازگرهای اختصاصی این ژن برای تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین استفاده می‌کنند (Tzfira *et al*., 2004). با توجه به این‌که طول توالی تکثیرشونده با این آغازگر bp ۷۸۰ می‌باشد، تکثیر قطعه ای با این مشخصات درگیاهان تراریخت حضور حداقل یک نسخه از ژن را در آن‌ها تأیید می‌کند. قطعه مورد نظر در باکتری به‌عنوان کنترل مثبت تکثیر شد و ریشه معمولی به‌عنوان کنترل منفی تکثیری نشان نداد (شکل ۶).



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

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



شکل ٦- تأیید القای ریشه مویین 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، ٤ و ٥: لاین‌های تراریخته ریشه مویین، ٦: 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

نتیجه‌گیری

متابولیت‌های ارزشمند موجود در سیر توجهات زیادی را به این گیاه دارویی سودمند معطوف کرده‌است. در این مطالعه بهینه‌سازی القای ریشه مویین در سیر مورد توجه قرارگرفت. 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 مویین را داشت. میزان القای ریشه در OD_{600} پایین و در

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 مویین بودند. القای ریشه‌های مویین در سیر می‌تواند گامی اولیه در جهت بررسی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های این گیاه 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.

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. *Appllied 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 alliins 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 Biolology 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.