

تأثیر ال-گلوتامین و نوع محیط کشت بر کشت ریشه موین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss.)

علی احمدی پزوه، مجید طالبی و بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۱/۲۲)

چکیده

القا و تولید ریشه موین در زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss.) به عنوان یکی از تکنیک‌های کشت بافتی و زیست‌محیطی در تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه، مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به صورت کشت درون شیشه‌ای انجام گرفت. بهترین سویه آگروباکتریوم رایزوزنز از میان سویه‌های MSU، A7 و A4-N از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین گیاه و بهترین سن برگ جهت تلقیح با باکتری، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای، سه هفته‌ای و چهار هفته‌ای انتخاب شدند. به منظور القای ریشه موین مناسب‌ترین محیط کشت در مرحله هم‌کشتی از میان محیط‌کشت‌های MS و MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف $(\text{KNO}_3, \text{NH}_4\text{NO}_3, \text{CaCl}_2, \text{KH}_2\text{PO}_4)$ و در مرحله پس از هم‌کشتی از میان محیط‌کشت‌های MS و MS حاوی ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر انتخاب شدند. بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی به هنگام استفاده از سویه MSU (۹۰٪)، برگ چهار هفته‌ای (۸۲/۲۸ درصد) و محیط‌کشت MS فاقد ترکیبات پرمصرف در مرحله هم‌کشتی و محیط‌کشت MS حاوی ال-گلوتامین در مرحله پس از هم‌کشتی (۷۵/۷۸ درصد) مشاهده شد. تراریختگی ریشه‌های موین تشکیل‌شده نیز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و به وسیله آغازگرهای زن‌های *rolC* و *auxI* تأیید شد. نتایج نشان داد که تولید ریشه موین از این گیاه به نوع سویه، سن برگ و نوع محیط‌کشت بستگی داشت. درحالی‌که نوع سویه و سن برگ تأثیری بر روی طول ریشه تشکیل‌شده نشان نداد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در تولید ترکیبات دارویی این گیاه مانند رزمارینیک اسید از طریق تکنیک بهینه‌سازی شده ریشه موین مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، ال-گلوتامین، ریشه موین، محیط کشت MS

مقدمه

طب سنتی چینی نقش دارند. به‌طورکلی هدف اصلی استفاده از گیاهان دارویی به‌دست آوردن تعامل مثبت با شیمی بدن (Body Chemistry) است (Van Wyk and Wink, 2018). در حال حاضر تحقیقات بر روی جداسازی ترکیبات فعال دارویی از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌هایی که داروهای موجود چندان مؤثر نیستند، متمرکز شده است (Foroozandeh and

وابستگی انسان به گیاهان به آغاز بشریت بر می‌گردد. امروزه بسیاری از داروها از گیاهان دارویی تهیه می‌شوند. شواهد محکمی را می‌توان یافت که گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین برای بازسازی و تقویت دستگاه‌های بدن در طب سنتی قدیم مانند آیورودا (Ayurvedic)، یونانی و

کشت بافت مانند کشت ریشه موپین می‌تواند در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه دارای ارزش اقتصادی بالا مانند رزمارینیک اسید از زرین گیاه، مؤثر باشد (Cai *et al.*, 2012; Foroozandeh and Asadi Gharooneh, 2021). کشت ریشه موپین، کشت تمایز یافته‌ای است که در آن ریشه‌های موپین دارای سرعت رشد بالا در محیط کشت فاقد هورمون، پایداری ژنتیکی و تولید بالای متابولیت ثانویه هستند (Cai *et al.*, 2012). ریشه موپین اصطلاحی است که اولین بار توسط استوارت (Stewart) و همکاران در سال ۱۹۰۰ استفاده شد. مشخصه بیماری ریشه موپین تشکیل توده‌ای از ریشه است. به دنبال آلودگی با *Agrobacterium rhizogenes* تشکیل ریشه موپین در نتیجه بیرون‌زدگی تعداد زیادی از ریشه‌های کوچک به صورت موهای ظریف مستقیماً از محل آلودگی ایجاد می‌شود (Chandra, 2012). *A. rhizogenes* یک باکتری خاکریزی، میله‌ای شکل، گرم منفی و غیر اسپورزا است که آرایش این باکتری‌ها به صورت منفرد یا دوتایی است و آرایش تازه‌ها در این گونه به صورت منفرد (Monotrichous) یا پیرامونی (Peritrichous) است (Meyer *et al.*, 2000). تمام سوبه‌های *A. rhizogenes* با حضور یک پلاسمید بزرگ القاکننده ریشه (Ri) حاوی یک منطقه بسیار حفاظت شده (هسته)، توالی‌ای از پلاسمید جهت تشکیل ریشه موپین (T-DNA)، مشخص می‌شوند (Gelvin, 2003; Veena and Taylor, 2007). مانند بیماری گال طوقه، که ناشی از *A. tumefaciens* است، *A. rhizogenes* از طریق انتقال ژن به گیاهان آلوده باعث بیماری ریشه موپین می‌شود (Weller and Stead, 2002; Weller *et al.*, 2005).

در تحقیقی فتاحی و همکاران (۲۰۱۳) موفق به تولید ریشه موپین از کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده (برگ و ساقه‌های ۵ تا ۷ هفته‌ای) با *A. rhizogenes* که از زرین گیاه تهیه شده بود، در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ایندول بوتریک اسید شدند (Fattahi *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Sharafi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، محققان توانستند از

(Asadi Gharooneh, 2021; Aslam and Ahmad, 2016). سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های کشنده است و به‌عنوان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌باشد. پرتودرمانی، ایمونوتراپی و شیمی‌درمانی رایج‌ترین روش‌هایی هستند که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند، اما این تکنیک‌ها بر روی سلول‌های سالم تأثیر منفی می‌گذارند. گیاهان دارویی و ترکیبات گیاهی آن‌ها از جمله فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و کاروتنوئیدها دارای اثرات محافظتی در برابر انواع مختلف سرطان هستند. داروهای گیاهی که از ساقه، ریشه، برگ، پوست، دانه، گل و میوه گیاهان دارویی بدست می‌آیند، یکی از بهترین منابع برای درمان سرطان‌ها هستند، زیرا ماهیتی غیرسمی دارند و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کنند یا هیچ عارضه جانبی ندارند (Akhtar and Swamy, 2018). امروزه چندین ترکیب گیاهی با خواص ضدسرطانی معرفی شده است که یکی از این ترکیبات رزمارینیک اسید است (Khojasteh *et al.*, 2014). رزمارینیک اسید معمولاً در تیره نعنائیان به‌ویژه در زرین‌گیاه یافت می‌شود (Petersen and Simmonds, 2003; Fattahi *et al.*, 2013). زرین‌گیاه یا بادرنجبویه دنیایی با نام علمی *Dracocephalum kotschy Boiss.* بومی ایران است و در مناطقی با ارتفاع ۲۰۰۰-۳۲۰۰ متر در استان‌های لرستان، فارس، گلستان، همدان، مازندران و تهران به‌صورت وحشی رشد می‌کند (Ashrafi *et al.*, 2017). برداشت غیراصولی این گیاه در مرحله گلدهی توسط افراد محلی، مانع از تکثیر مداوم این گیاهان در این مناطق شده است به‌طوری‌که زرین‌گیاه یکی از گیاهان در خطر انقراض در ایران است (Foroozandeh and Asadi Gharooneh, 2021).

استفاده از روش‌های شیمیایی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند پرهزینه و مشکل هستند. به‌طور مثال برای تهیه یک کیلوگرم پاکلی‌تاکسل (Paclitaxel) تقریباً ۱۰ هزار کیلوگرم پوست خشک حاصل از درخت *Taxus sp.* مورد نیاز است. از این رو به‌دلیل کاربرد متابولیت‌های ثانویه در صنایع مختلف اعم از دارویی و گیاهی باید به‌دنبال یک سیستم تولید دوست‌دار محیط‌زیست و تجدیدپذیر باشیم. استفاده از تکنیک

ریشه موین با اعمال تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول به منظور انتخاب بهترین سویه آگروباکتریوم ریزوژنز از میان سویه‌های MSU، A7 و A4-N (تهیه شده از پژوهشکده متابولیت‌های ثانویه استان اصفهان) از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین گیاه استفاده شد. سپس در مرحله دوم به منظور انتخاب بهترین سن برگ جهت تلقیح با باکتری، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای، سه هفته‌ای و چهار هفته‌ای استفاده شد. در آخرین مرحله به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت در مرحله هم‌کشتی و پس از هم‌کشتی به منظور القا و تولید ریشه موین از محیط کشت‌های MS و MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف (CaCl₂, KNO₃, NH₄NO₃) و (KH₂PO₄) در مرحله هم‌کشتی و محیط کشت‌های MS و MS حاوی آمینواسید ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در مرحله پس از هم‌کشتی استفاده شد.

آماده‌سازی ریزنمونه و تهیه محیط‌های کشت: در این تحقیق از بذور زرین گیاه تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان استفاده شد. به منظور از بین رفتن خواب بذور و حداکثر میزان جوانه‌زنی، بذور به مدت ۱۰ دقیقه با اسید سولفوریک غلیظ تیمار شدند. به منظور کشت بذور زرین گیاه از محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) استفاده شد. این محیط کشت شامل ترکیبات دارای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، ویتامین‌ها، میواینوزیتول (Myoinositol) و ساکارز است. در آخر pH محیط کشت در محدوده ۵/۸ تنظیم شد و جهت ژلاتینی شدن محیط کشت مقدار ۷ گرم آگار (شرکت سیگما، آمریکا) به آن اضافه گردید. محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با فشار ۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل و پس از سرد شدن مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت بذور، پس از از بین بردن خواب، دوبار با آب مقطر شسته شدند و ضد عفونی، زیر هود لامینار انجام گرفت. ابتدا بذور به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم تجاری ۱۰ درصد (حاوی ۵ درصد کلر فعال) غوطه‌ور شدند. در مرحله بعدی، بذور سه بار با آب مقطر استریل شسته و بر روی کاغذ صافی

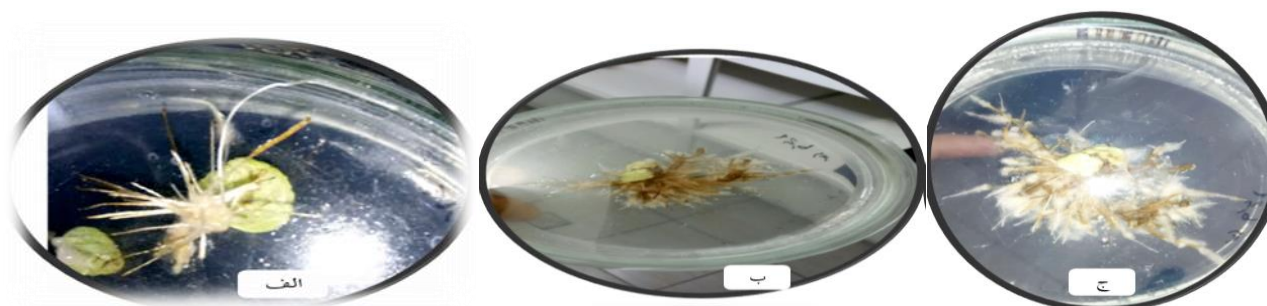
تلقیح برگ‌های چهار هفته‌ای زرین گیاه با آگروباکتریوم ریزوژنز در محیط کشت هم‌کشتی MS فاقد ترکیبات دارای عناصر پرمصرف (CaCl₂, KNO₃, NH₄NO₃) و (KH₂PO₄) به ریشه‌های موین بسیاری (۸۹٪ تراریختگی) دست پیدا کنند (Sharafi et al., 2014). در تحقیق دیگری ایوبی و همکاران (۲۰۱۷) موفق به تولید ریشه موین از برگ‌های زرین گیاه یک هفته‌ای تلقیح یافته با آگروباکتریوم ریزوژنز در محیط کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم شدند (Ayyobi and Fattahi, 2017). افزودن آمینواسیدهایی مانند گلیسین، آسپارژین، ال-گلوتامین و ال-پرولین به محیط کشت به عنوان منابع غنی از نیتروژن سبب تحریک رشد و نمو سلول‌های گیاهی می‌شود و به دلیل اینکه به آسانی در دسترس سلول‌ها قرار می‌گیرند، سرعت رشد و نمو سلول‌ها را افزایش می‌دهند. نقش مؤثر استفاده از ال-گلوتامین در جلوگیری از اکسید شدن ترکیبات پلی‌فنلی در گیاهان است (Kumar et al., 2013). استفاده از ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر و پلی‌ونیل پلی‌پیرولیدون (Polyvinyl Polypyrrolidone) به غلظت ۵ گرم بر لیتر به عنوان تکمیل‌کننده‌های محیط کشت در مرحله هم‌کشتی و پس از هم‌کشتی باعث بهبود تراریختگی و افزایش القا و تولید ریشه موین از کالوس‌های گیاه *Camellia sinensis* تلقیح یافته با آگروباکتریوم ریزوژنز گردید (Rana et al., 2016). در این تحقیق اثر محیط کشت MS فاقد عناصر پرمصرف در مرحله هم‌کشتی، اثر ال-گلوتامین در مرحله پس از هم‌کشتی و اثر متقابل آن‌ها به منظور بهبود تولید ریشه موین از زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایش: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به صورت کشت درون شیشه‌ای، در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ و در سه مرحله انجام گرفت و درصد تولید ریشه موین و طول ریشه با اعمال تیمارها در دو مرحله اول مورد بررسی قرار گرفت و در مرحله آخر تنها درصد



شکل ۱- کشت ریزنمونه‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه بر روی محیط کشت تولید ریشه موئین (حاصل تلقیح با سویه MSU آگروباکتریوم رایزوزنز)



شکل ۲- تولید ریشه موئین از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه (حاصل تلقیح با سویه MSU آگروباکتریوم رایزوزنز) به ترتیب بعد از گذشت الف: سه هفته، ب: شش هفته و ج: هشت هفته از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت تولید ریشه موئین

فالكون‌های حاوی محیط کشت LB مایع و ریفامپسین به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در محدوده pH ۷-۷/۵ منتقل گردید. سپس فالكون‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت تکانه ۱۸۰ دور بر دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفتند. غلظت بهینه باکتری‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید (OD₆₀₀=۰/۶-۰/۸). پس از این مراحل، فالكون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با شدت ۷۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و پس از تشکیل رسوب باکتری و حذف فاز رویی (LB مایع) در زیر هود میکروبی و در شرایط استریل، بر روی رسوب باکتری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح استریل (محیط کشت MS حاوی ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار هورمون استوسیرینگون با pH ۵/۵ و یا محیط کشت MS فاقد ترکیبات KNO₃، NH₄NO₃، CaCl₂، KH₂PO₄، حاوی ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار هورمون استوسیرینگون با pH ۵/۵) اضافه گردید. در نهایت فالكون‌ها به مدت پنج ساعت در شیکر

استریل خشک شدند. در نهایت بذور با پنس استریل در شیشه‌های مربایی ۵ سانتی‌متری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد، کشت شدند (شکل ۱ و ۲) و به منظور جوانه‌زنی به اتاق رشد با دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برگ‌های گیاهچه‌ها به ترتیب بعد از گذشت دو، سه و چهار هفته از جوانه‌زنی بذور به منظور تلقیح با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز مورد استفاده قرار گرفت.

جهت تلقیح برگ‌های گیاهچه‌ها با آگروباکتریوم رایزوزنز، از سویه‌های MSU، A7 و A4-N استفاده شد. جهت آماده‌سازی باکتری برای تلقیح با ریزنمونه‌ها، در زیر هود میکروبی در شرایط استریل یک تک کلون از هر یک از سویه‌های رشدیافته بر روی محیط کشت LB (Bertani, 1951) جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و ۱۵ گرم بر لیتر آگار در محدوده pH ۷-۷/۵ برداشته شده و به

انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت تکانه ۱۸۰ دور بر دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفتند. از سوسپانسیون حاصل به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده گردید.

در مرحله هم‌کشتی، جهت تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی با سوسپانسیون باکتری سویه‌های MSU، A7 و A4-N، به‌منظور انتخاب بهترین سویه، برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه و جهت انتخاب بهترین سن برگ، برگ گیاهچه‌های دو، سه و چهار هفته‌ای به جهت تلقیح با سویه MSU در زیر هود میکروبی از گیاه مادری جدا شده و به ظروف پتری استریل حاوی محیط‌کشت تلقیح منتقل شدند و توسط اسکالپل استریل زخم‌هایی بسیار سطحی بر روی رگبرگ اصلی واقع در سطح زیرین برگ‌ها ایجاد شد (این زخم‌ها سبب نفوذ بهتر باکتری به درون ریزنمونه می‌شوند). سوسپانسیون آماده درون ظرف پتری استریل دیگر ریخته شده و برگ‌های برش خورده به ظرف پتری حاوی سوسپانسیون باکتری انتقال شدند. ظرف پتری حاوی سوسپانسیون باکتری و برگ‌های برش خورده به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه به‌صورت دستی داخل هود لامینار مخلوط شدند. سپس ریزنمونه‌های گیاهی ابتدا جهت حذف رطوبت اضافی برگ‌ها بر روی کاغذ صافی به‌مدت کوتاهی قرار گرفتند و به‌دنبال آن بر روی ظروف پتری حاوی محیط‌کشت القای ریشه موین (محیط‌کشت MS حاوی ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار هورمون استوسیرینگون با pH ۵/۵ و یا محیط‌کشت MS فاقد ترکیبات NH_4NO_3 ، KNO_3 ، CaCl_2 و KH_2PO_4 ، حاوی ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار هورمون استوسیرینگون با pH ۵/۵) منتقل شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای 24 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

در مرحله پس از هم‌کشتی، پس از گذشت دو روز، ابتدا به‌منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌های تلقیح‌یافته با هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز (MSU، A7 و A4-N) در زیر هود میکروبی در شرایط استریل به ظروف پتری حاوی آب‌مقطر استریل که دارای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم بودند، انتقال داده شدند و به‌صورت دستی هم‌زده شدند. این

عمل سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. در نهایت ریزنمونه‌های خشک‌شده بر روی محیط‌کشت تولید ریشه موین (محیط‌کشت MS حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم، ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ایندول بوتریک اسید (IBA) و یا محیط‌کشت MS حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم، ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA و ۰/۱ گرم بر لیتر ال-گلوتامین) منتقل شده و در اتاق رشد در دمای 24 ± 2 درجه سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند (شکل ۱).

پس از گذشت سه هفته از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت تولید ریشه موین، ریشه‌های موین از محل زخم‌ها ظاهر شدند. بلافاصله بعد از ظهور ریشه‌های موین، ریزنمونه‌های ریشه‌دار بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم، ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ گرم بر لیتر ال-گلوتامین قرار گرفتند. واکنش ریزنمونه‌های ریشه‌دار هر ۱۴ روز یک بار صورت گرفت و هر بار مقدار سفاتوکسیم محیط‌کشت به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت (شکل ۲). تمامی مراحل بالا در شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام گرفت. محل نگهداری واکنش ریشه‌های موین در اتاق رشد در دمای 24 ± 2 درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی بود.

تأیید مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): به‌منظور تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موین احتمالی و تأیید اصالت هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز (MSU، A7 و A4-N) به‌عنوان کنترل مثبت ابتدا به‌ترتیب استخراج DNA کل به روش CTAB (Khan et al., 2007) و استخراج DNA پلاسמידی به روش لیز قلیایی انجام گرفت (Sambrook and Russell, 2006). سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌منظور تأیید حضور ژن *rolC* و *aux1* در هر یک از ریشه‌های موین احتمالی و تأیید حضور ژن *rolC*، *aux1* و *virD* در هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز انجام گردید (جدول ۱) (Fattahi et al., 2013). به‌منظور تهیه ۱۰ میکرولیتر از PCR

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژنهای *rolC* و *auxI* مورد استفاده در این تحقیق

ژن	آغازگر	توالی
<i>rolC</i>	F	5'-TAA CAT GGC TGA AGA CGA CC-3'
	R	5'-AAA CTT GCA CTC GCC ATG CC-3'
<i>auxI</i>	F	5'-TTC GAA GGA AGC TTG TCA GAA-3'
	R	5'-CTT AAA TCC GTG TGA CCA TAG-3'
<i>virD</i>	F	5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3'
	R	5'-GGA GTC TTT CAG CAG GAG CAA-3'

mix برای هر واکنش، ۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۲۵ نانوگرم DNA الگو و ۵ میکرولیتر مسترمیکس دو برابر غلظت شرکت آمپلیکون استفاده شد.

تکثیر ژنهای *rolC* و *auxI* با آغازگرهای اختصاصی واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، پس از آن ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی (Denaturation) در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال (Denaturation) در دمای ۵۵/۹°C به مدت یک دقیقه و بسط (Elongation) در دمای ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه و در ادامه یک سیکل حرارتی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تکثیر ژن *virD* با آغازگرهای اختصاصی نیز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در ادامه یک سیکل حرارتی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، به منظور تأیید حضور ژنهای *rolC* و *auxI* در DNA ژنومی هر یک از ریشه‌های مویین احتمالی و تأیید حضور ژنهای *rolC* و *auxI* در DNA پلاسمیدی سویه‌های آگروباکتریوم رایزورنز و مشاهده باندهای مربوط به ژن‌ها بر روی ژل، الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE با ولتاژ ۸ ولت بر سانتی‌متر انجام گرفت.

آزمایشات این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. به منظور آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ مورد مقایسه قرار گرفت.

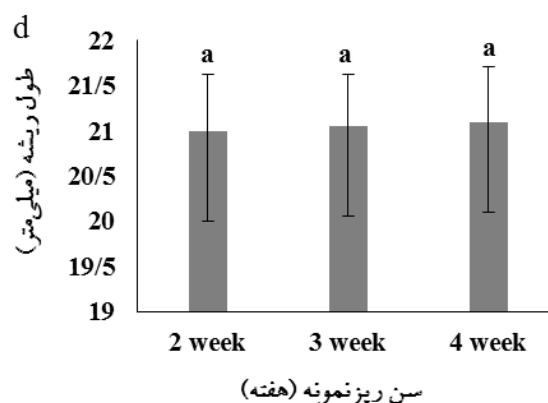
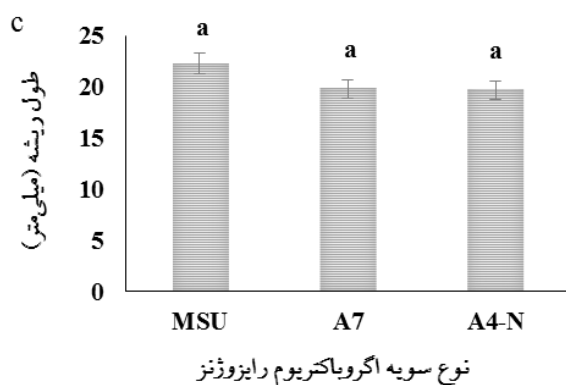
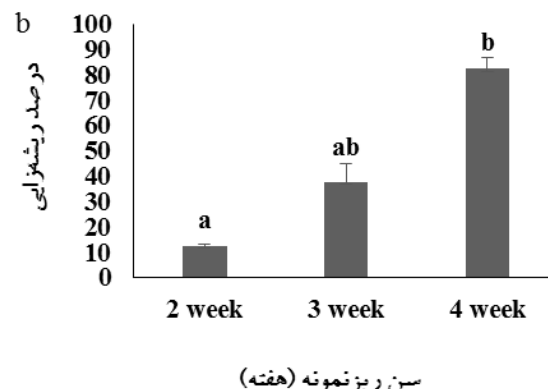
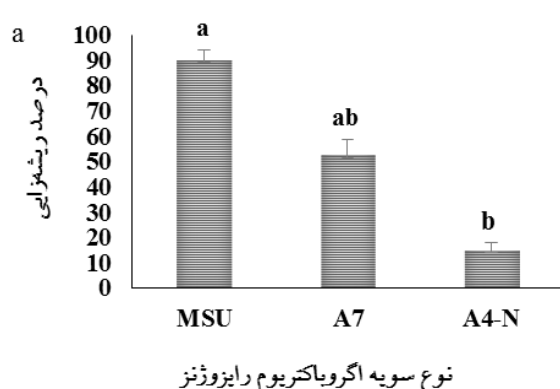
نتایج و بحث

تأثیر نوع سویه و سن ریزنمونه بر روی القا و تولید ریشه مویین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر معنی‌دار بودن اثر سویه و سن ریزنمونه بر صفت ریشه‌زایی در سطح احتمال ۱٪ و غیرمعنی‌دار بودن اثر سویه و سن ریزنمونه بر صفت طول ریشه تشکیل شده بود (جدول ۲). مقایسه میانگین بین سویه‌های آگروباکتریوم رایزورنز (MSU، A7 و A4-N) نشان داد که سویه MSU بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی (۹۰٪) ریشه‌زایی) از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه داشت و پس از آن سویه‌های A7 و A4-N به ترتیب در ریشه‌زایی (۵۲/۵ و ۱۵ درصد ریشه‌زایی) از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه اثرگذار بودند. مقایسه میانگین بین سویه‌های آگروباکتریوم رایزورنز نشان داد که هیچ یک از سویه‌های مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر طول ریشه تشکیل شده نداشتند. همچنین مقایسه میانگین بین سنین مختلف ریزنمونه مورد استفاده (برگ زرین گیاه) حاکی از آن بود که برگ‌های چهار هفته‌ای بیشترین تأثیر در تولید ریشه مویین (۸۲/۲۸ درصد ریشه‌زایی) در نتیجه تلقیح با سویه MSU آگروباکتریوم رایزورنز داشتند و بعد از آن به ترتیب برگ‌های سه هفته‌ای و دو هفته‌ای با میانگین (۳۷/۸۳ و ۱۲/۴۳ درصد ریشه‌زایی) در تولید ریشه مویین در نتیجه تلقیح با سویه MSU آگروباکتریوم رایزورنز اثرگذار بودند. مقایسه میانگین بین سنین مختلف ریزنمونه مورد استفاده (برگ زرین‌گیاه) نشان داد که سنین مختلف تأثیر معنی‌داری بر روی طول ریشه تشکیل شده نداشتند (شکل ۳). توانایی آگروباکتریوم رایزورنز برای انتقال T-DNA پلاسمیدی خود به ژنوم سلول میزبان بستگی به سویه باکتری دارد (Porter and Flores, 1991; Sharafi et al., 2013). در این تحقیق برای اولین بار اثر سویه‌های MSU، A7 و A4-N بر تولید ریشه

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع سویه و سن ریزنمونه بر صفاتی شامل درصد ریشه‌زایی و طول ریشه تشکیل شده از زرین گیاه

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
طول ریشه	درصد ریشه‌زایی		
۷/۷۶۶ ^{ns}	۵۶۲۵**	۲	نوع سویه
۳/۲۳۵	۸۶/۱۱۱	۹	خطای آزمایش
۸/۷۱۳	۱۷/۶۷۵	-	ضریب تغییرات
۰/۰۱۰ ^{ns}	۴۹۹۹/۹۹۰**	۲	سن ریزنمونه
۱/۴۵۰	۹۲/۵۰۳	۹	خطای آزمایش
۵/۷۲	۲۱/۷۷۲	-	ضریب تغییرات

ns, * و ** به ترتیب بیانگر غیرمعنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد هستند.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر نوع سویه و سنین مختلف ریزنمونه مورد استفاده بر روی صفاتی شامل ریشه‌زایی و طول ریشه تشکیل شده از زرین گیاه با دقت اندازه‌گیری ۰/۰۰۰۱

ریزنمونه‌های تلقیح‌یافته با سویه MSU بود (Dorani and Aharizad, 2018).

در گونه‌های مختلف گیاهی اغلب برگ‌ها به‌عنوان ریزنمونه

موین از زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیقی که به منظور تولید ریشه موین از گیاه عروسک پشت‌پرده (*Physalis alkekengi*) انجام گرفت، بیشترین درصد تراریختگی مربوط به

همچنین استفاده از ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در محیط‌کشت تولید ریشه موئین در مرحله پس از هم‌کشتی بیش‌ترین تأثیر بر ریشه‌زایی (۷۵/۷۸ درصد ریشه‌زایی) از برگ‌های چهار هفته‌ای تلقیح‌یافته با سویه MSU آگروباکتريوم رایزوزنز داشت و پس از آن به‌ترتیب استفاده از فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف و عدم استفاده از ال-گلوتامین، استفاده از محیط‌کشت MS و استفاده از ال-گلوتامین و در نهایت استفاده از محیط‌کشت MS و عدم استفاده از ال-گلوتامین بر روی تولید ریشه (به‌ترتیب ۴۲/۸، ۲۵/۸۳ و ۱۳/۵۵ درصد ریشه‌زایی) از برگ‌های تلقیح‌یافته با سویه MSU آگروباکتريوم رایزوزنز مؤثر بودند (شکل ۴).

افزودن استوسیرینگون به محیط‌کشت در مرحله هم‌کشتی منجر به القای بیان ژن‌های *Vir* پلاسمید Ri آگروباکتريوم رایزوزنز می‌شود. اثر استوسیرینگون به‌شدت به غلظت مورد استفاده، نوع ریزنمونه، نوع گونه گیاهی و نوع محیط‌کشت بستگی دارد (Rana et al., 2016; Nakano 2017). استفاده از استوسیرینگون در غلظت بالا (۲۰۰ میکرومولار) منجر به نکروزه و قهوه‌ای شدن کالوس‌های برنج تلقیح‌یافته با سویه EHA105 آگروباکتريوم رایزوزنز گردید و همچنین بهترین نتیجه (بیش‌ترین بیان ژن *GUS* در نتیجه تلقیح با باکتری) به هنگام استفاده از استوسیرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد (Perez Bernal et al., 2009). در پژوهشی که توسط Sharafi و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت، استفاده از محیط‌کشت MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف (KH_2PO_4 و CaCl_2 ، KNO_3 ، NH_4NO_3) در مرحله هم‌کشتی (کشت با آگروباکتريوم رایزوزنز) تأثیر فزاینده‌ای بر انتقال T-DNA از پلاسمید باکتری به ژنوم سلول میزبان و در نتیجه تولید ریشه موئین از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه داشت و همچنین تعداد سلول‌های باکتری در مقایسه با محیط‌کشت MS کامل افزایش یافته بود. رشد بیش از حد سلول‌های باکتری اثر بازدارندگی عناصر پرمصرف بر تکثیر سلول‌های آگروباکتريوم

جهت تلقیح با آگروباکتريوم رایزوزنز و تولید ریشه موئین مورد استفاده قرار می‌گیرند (Qin et al., 2022). در این پژوهش، با تکیه بر نتایج تحقیقات قبلی (Pawar and Maheshwari, 2004; Sevon and Oksman-Caldentey, 2002) تنها از برگ‌های زرین‌گیاه جهت تلقیح با سویه‌های مختلف آگروباکتريوم رایزوزنز به‌منظور القا و تولید ریشه موئین استفاده شد و اثر سایر ریزنمونه‌های دیگر جهت تولید ریشه موئین مورد بررسی قرار نگرفت. به‌طورکلی هر چه سن ریزنمونه کمتر باشد، تمایز سلول‌ها کمتر بوده و برای انتقال ژن به وسیله آگروباکتريوم مناسب‌تر هستند. با این حال، نتایج آزمایشات تجربی نشان داد که ریزنمونه‌های جوان‌تر توانایی کمتری در برابر آسیب مکانیکی به جهت امکان اتصال باکتری‌ها به دیواره سلولی میزبان و انتقال T-DNA به ژنوم سلول میزبان داشتند که باعث نکروزه‌شدن ریزنمونه و مرگ سلولی می‌شد و در نهایت درصد القا و تولید ریشه موئین کاهش می‌یافت. یافته‌های این پژوهش با نتایج مطالعه تأثیر سنین مختلف ریزنمونه (برگ‌های ۳۰، ۳۷، ۴۴، ۵۱ و ۵۸ روزه) بر القای ریشه موئین در گیاه *Macleaya microcarpa* همخوانی داشت (Huang et al., 2018). همچنین در پژوهش انجام‌گرفته توسط Sharafi و همکاران (۲۰۱۴)، از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین گیاه به‌عنوان ریزنمونه جهت تلقیح با آگروباکتريوم رایزوزنز استفاده شد (Sharafi et al., 2014).

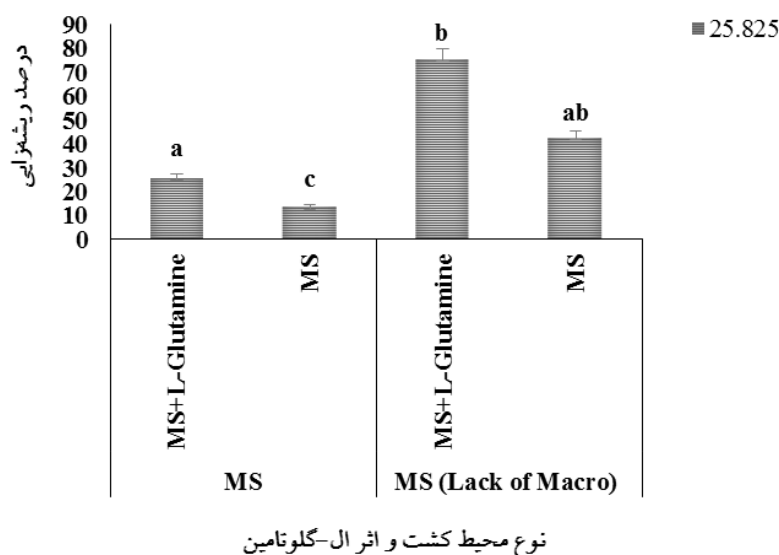
اثر نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین بر القاء و تولید

ریشه موئین: نتایج تجزیه واریانس بیانگر معنی‌دار بودن اثر نوع محیط‌کشت، ال-گلوتامین و اثر متقابل نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین بر ریشه‌زایی از برگ‌های چهار هفته‌ای تلقیح‌یافته با سویه MSU آگروباکتريوم رایزوزنز در سطح احتمال ۱٪ بود (جدول ۴). مقایسه میانگین بین اثر متقابل نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین نشان داد که استفاده از محیط‌کشت MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف KH_2PO_4 ، CaCl_2 ، KNO_3 ، NH_4NO_3 و در مرحله هم‌کشتی به‌منظور القای ریشه موئین و

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر متقابل نوع محیط کشت و ال-گلوتامین بر روی ریشه‌زایی از زرین گیاه

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۶۲۷۲/۶۴۰**	۱	نوع محیط کشت
۲۰۴۷/۵۶۳**	۱	ال-گلوتامین
۴۲۸/۴۹۰**	۱	نوع محیط کشت × ال-گلوتامین
۲۷/۰۳۷	۱۲	خطای آزمایش
۱۳/۱۶	-	ضریب تغییرات

ms, * و ** به ترتیب بیانگر غیرمعنی دار بودن، معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد و معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد هستند.

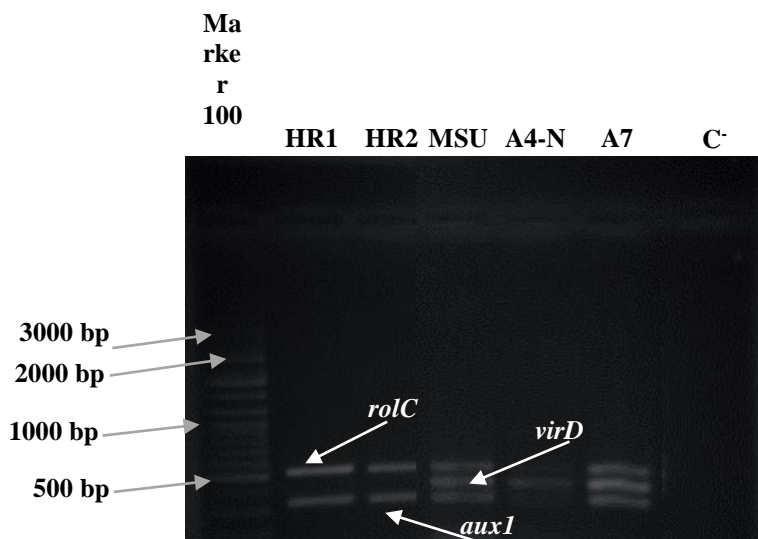


شکل ۴- اثر متقابل نوع محیط کشت و ال-گلوتامین بر تولید ریشه موین در نمونه‌های تلقیح شده با سویه MSU آگروباکتریوم رایزوزنز

(Murphy, 2007). ال-گلوتامین از اکسیدشدن ترکیبات پلی فنلی در گیاهان جلوگیری می‌کند. اضافه کردن ال-گلوتامین به محیط کشت هم‌کشتی باعث از بین رفتن اثرات باکتری‌کشی (Bactericidal) پلی‌فنل‌های تراوش شده از برگ چای شده و در نتیجه انتقال T-DNA از پلاسمید باکتری به ژنوم سلول میزبان را افزایش داد و باعث افزایش تراریختی ریشه‌های موین شد (Paul et al., 2012).

تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های موین: مشاهده باندهای مربوط به ژن‌های *rolC* و *aux1* بر روی ژل که به ترتیب در اندازه ۵۳۴bp و ۳۴۷bp هستند، بیانگر انتقال قطعه T-DNA (TR-DNA و TL-DNA) از پلاسمید القاکننده ریشه

رایزوزنز را ثابت می‌کند (Sharafi et al., 2014). نبود یون فسفات در فعال‌سازی ژن *virG* و تشکیل زیست‌لایه (Biofilm) و نبود یون کلسیم در بیان ژن‌های بیماری‌زایی آگروباکتریوم رایزوزنز و تکثیر سلولی نقش دارد (Winans, 1990; Flego et al., 1997; Danhorn et al., 2004; Azadi et al., 2010). افزودن هورمون ایندول بوتریک اسید به محیط کشت، سبب افزایش تولید ریشه موین از ریزنمونه‌های زرین گیاه شد (Fattahi et al., 2013). وجود ترکیباتی مانند فلاونوئیدها از انتقال هورمون ایندول استیک اسید (اکسین طبیعی) در گیاهان جلوگیری می‌کند. بنابراین افزودن هورمون IBA به محیط کشت می‌تواند کمبود هورمون اکسین در ریزنمونه را جبران کند (Brown et al., 2001; Peer and



شکل ۵- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تأیید مولکولی تراریختگی ریشه‌های مویین زرین گیاه و اصالت هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوتنز

β -گلوکوزیداز (Cytokinin β -glucosidase) را رمزگذاری می‌کند که با هیدرولیز سیتوکینین β -گلوکوزیدها، سیتوکینین‌های فعال را آزاد می‌کند و از این طریق در تنظیم سیتوکینین مؤثر است (Christey, 2001; Nemoto *et al.*, 2009). ژن *aux1* در افزایش مقدار هورمون اکسین نقش دارد و در قسمت TR-DNA قرار دارد (Alpizar *et al.*, 2006; Nemoto *et al.*, 2009). ژن‌های *vir* نیز در جداسازی، انتقال و ادغام T-DNA به درون ژنوم سلول میزبان مؤثر هستند (Bulgakov *et al.*, 2004; Pratheesh *et al.*, 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سویه MSU آگروباکتریوم رایزوتنز جهت انتقال T-DNA به ژنوم سلول میزبان، برگ‌های چهار هفته‌ای زرین گیاه جهت تلقیح با باکتری و محیط کشت MS فاقد ترکیبات پرمصرف (NH_4NO_3 ، KNO_3 ، CaCl_2 و KH_2PO_4) در مرحله هم‌کشتی و محیط کشت MS حاوی ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در مرحله پس از هم‌کشتی جهت القا و تولید ریشه مویین بیشترین بازده را داشت. استفاده از روش بهینه‌سازی شده می‌تواند در تولید ترکیبات دارویی این گیاه مانند رزمارینیک اسید در مطالعات بعدی استفاده شود.

مویین (pRi) آگروباکتریوم رایزوتنز به ژنوم ریشه‌های مویین تشکیل شده (HR1 و HR2) و در نتیجه بیانگر تأیید تراریختگی آن‌ها بود. همچنین مشاهده باندهای مربوط به ژن‌های *rolC*، *virD* و *aux1* (به طول ۴۳۸bp) بر روی ژل بیانگر وجود پلاسמיד القاکننده ریشه مویین در هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم رایزوتنز (MSU، A7 و A4-N) و قابلیت آن‌ها در ایجاد ریشه مویین در نتیجه تلقیح با ریزنمونه‌های گیاهی است. عدم وجود باندهای مربوط به هر یک از ژن‌ها بر روی ژل در نمونه کنترل منفی (ریشه‌های حاصل از کشت بذور زرین گیاه) بیانگر عدم تراریختگی آن‌ها بود (شکل ۵).

به‌طورکلی TL-DNA و TR-DNA به‌صورت جداگانه به ژنوم سلول گیاه میزبان منتقل و ادغام می‌شوند. تنها TL-DNA که حاوی ژن‌های رول (*rolA*، *rolB* و *rolC*) هست، برای القای ریشه مویین ضروری است (Georgiev *et al.*, 2007). توالی ژن *rolC* در سویه‌های مختلف خیلی متفاوت است اما اندازه آن‌ها در بین سویه‌های مختلف مشابه است و بین ۵۳۷ جفت باز (سویه ۸۱۹۶) تا ۵۴۳ جفت باز (سویه ۲۶۵۹) هست. ژن *rolC* پروتئینی به تعداد اسیدآمینه ۱۸۰-۱۷۸ (تقریباً ۲۰ کیلودالتون) رمزگذاری می‌کند که بیش از ۶۵ درصد یکسانی در بین سویه‌های مختلف دارد. *rolC* یک سیتوکینین

این پژوهش توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری حمایت شده است که بدین وسیله تقدیر و تشکر می‌گردد.

تشکر و قدردانی

منابع

- Akhtar, M. S., & Swamy, M. K. (2018). *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8064-7>.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A. C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., & Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, 25, 959-967. doi: 10.1007/s00299-006-0159-9.
- Ashrafi, B., Ramak, P., Ezatpour, B., & Talei, G. R. (2017). Investigation on chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic properties of essential oil from *Dracocephalum kotschy* Boiss. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14, 209-217. doi: 10.21010/ajtcam.v14i3.23.
- Aslam, M. S., & Ahmad, M. S. (2016). Worldwide importance of medicinal plants: Current and historical perspectives. *Recent Advances in Biology and Medicine*, 2, 909. doi: 10.18639/RABM.2016.02.338811.
- Ayyobi, N., & Fattahi, M. (2017). Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschy* Boiss. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30, 1-13. doi: 10.1001.1.23832738.1396.30.1.1.0.
- Azadi, P., Chin, D. P., Kuroda, K., Khan, R. S., & Mii, M. (2010). Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101, 201-209. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9677-9>.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300. doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L., & Muday, G. K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126, 524-535. doi: 10.1104/pp.126.2.524.
- Bulgakov, V., Tchernoded, G., Mischenko, N., Shkryl, Y. N., Fedoreyev, S., & Zhuravlev, Y. N. (2004). The *rolB* and *rolC* genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway. *Plant Science*, 166, 1069-1075. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.027>.
- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Exudation: An expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 31, 461-477. doi: 10.1007/s00299-011-1165-0.
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34, 407-415. doi: 10.1007/s10529-011-0785-3.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37, 687-700. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0120-0>.
- Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R., & Fuqua, C. (2004). Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 186, 4492-4501. doi: 10.1128/JB.186.14.4492-4501.2004.
- Dorani, E., & Aharizad, S. (2018). Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains and explants on induction of hair root in *Physalis alkekengi*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 7, 33-40. <http://gebsj.ir/article-1-238-en.html>.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R. M., Zamani, Z., & Palazon, J. (2013). A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Industrial Crops and Products*, 50, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.029>.
- Flego, D., Pirhonen, M., Saarilahti, H., Palva, T. K., & Palva, E. T. (1997). Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Microbiology*, 25, 831-838. doi: 10.1111/j.1365-2958.1997.mmi501.x.
- Foroozandeh, E., & Asadi Gharooneh, H. A. (2021). *Dracocephalum kotschy* Boiss.: An Iranian endemic medicinal plant; A review. *Journal of Medicinal Herbs*, 12, 9-17. doi: 10.30495/MEDHERB.2021.679008.
- Gelvin, S. B. (2003). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology*, 21, 95-98. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00005-2.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1175-1185. doi: 10.1007/s00253-007-0856-5.

- Huang, P., Xia, L., Liu, W., Jiang, R., Liu, W., Tang, Q., Xu, M., Yu, L., Tang, Z., & Zeng, J. (2018). Hairy root induction and benzylisoquinoline alkaloid production in *Macleaya microcarpa*. *Scientific Reports*, 8, 11986. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30560-0>.
- Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T., & Abdin, M. (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology*, 6, 175. <http://www.academicjournals.org/JAB>.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Hidalgo, D., Corchete, P., & Palazon, J. (2014). New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnology Letters*, 36, 2393-2406. doi: 10.1007/s10529-014-1640-0.
- Kumar, N., Gulati, A., & Bhattacharya, A. (2013). L-glutamine and L-glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1649-1664. doi: 10.1007/s12010-013-0286-z.
- Meyer, A., Tempe, J., & Costantino, P. (2000). Hairy root: A molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: Plant-Microbe Interactions. Pp. 93-139. APS Press, Minnesota.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Nakano, Y. (2017). Effect of acetosyringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* leaf disks. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 51, 351-355. <https://www.jircas.go.jp>.
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., & Mano, Y. (2009). Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division *in vitro*. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 1145-1147. doi: 10.4161/psb.4.12.9904.
- Paul, A., Bakshi, S., Sahoo, D. P., Kalita, M. C., & Sahoo, L. (2012). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. using leaf explants: Bactericidal effect of leaf extracts and counteracting strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1871-1895. doi: 10.1007/s12010-012-9612-0.
- Pawar, P. K., & Maheshwari, V. L. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 414-417. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:45695633>.
- Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2007). Flavonoids and auxin transport: Modulators or regulators?. *Trends in Plant Science*, 12, 556-563. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.003.
- Perez Bernal, M., Hernandez, C., Barcelo, M. T., Delgado, M., & Armas, R. (2009). Quantitative transient GUS expression in J-104 rice calli through manipulation of *in vitro* culture conditions. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, 11, 75-84.
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00513-7.
- Porter, J. R., & Flores, H. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 387-421. <https://doi.org/10.1080/07352689109382318>.
- Pratheesh, P., Vineetha, M., & Kurup, G. M. (2014). An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*, 56, 507-515. doi: 10.1007/s12033-013-9720-2.
- Qin, S., Liu, Y., Yan, J., Lin, S., Zhang, W., & Wang, B. (2022). An optimized tobacco hairy root induction system for functional analysis of nicotine biosynthesis-related genes. *Agronomy*, 12, 348. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020348>.
- Rana, M. M., Han, Z. X., Song, D. P., Liu, G. F., Li, D. X., Wan, X. C., Karthikeyan, A., & Wei, S. (2016). Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1132. doi: 10.3390/ijms17071132.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. Cold Spring Harbor Protocols 2006: pdb. prot4084.
- Sevon, N., & Oksman Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68, 859-868. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-2002-34924.pdf>.
- Sharafi, A., Sohi, H. H., Azadi, P., & Sharafi, A. A. (2014). Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 257-262. doi: 10.1007/s12298-013-0217-z.
- Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, K., & Ntui, V. O. (2013). A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0246-2>.
- Van Wyk, B. E., & Wink, M. (2018). Medicinal Plants of the World. CABI, London.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. In: Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. Pp. 383-403. Society for *In Vitro* Biology.

- Weller, S., & Stead, D. (2002). Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 118-126. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01506.x.
- Weller, S., Stead, D., & Young, J. (2005). Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri plasmid. *Plant Pathology*, 54, 799-805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01283.x>.
- Winans, S. C. (1990). Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. *Journal of Bacteriology*, 172, 2433-2438. doi: 10.1128/jb.172.5.2433-2438.1990.

The effect of L-glutamine and medium culture on hairy root culture of *Dracocephalum kotschy* Boiss.

Ahmadi Pozveh A., Talebi M. *, Sayed-Tabatabaei B.E.

Department of Biotechnology, Collage of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
(Received: 27/01/2023, Accepted: 11/04/2023)

Abstract

Hairy root induction and production in *Dracocephalum kotschy* Boiss. was investigated as an environmental and tissue culture technique for producing secondary metabolites. For this purpose, an in vitro experiment was carried out in the form of a completely randomized design (CRD) with four replicates. The best strain of *Agrobacterium rhizogenes* among MSU, A7 and A4-N strains from four-week-old leaves of *D. kotschy* and the best age of leaves for inoculation with *A. rhizogenes* from two, three and four-week-old seedlings were chosen. In order to induce hairy roots, the most appropriate culture medium in the co-cultivation and post-co-cultivation phases was selected among the MS and MS culture media without macro elements (NH₄NO₃, KNO₃, CaCl₂, and KH₂PO₄) and the MS and MS culture media containing L-glutamine (0.1 g/L), respectively. The highest percent transgenic hairy root was observed in the MSU strain (90%), four-week old leaf explants of *D. kotschy* seedlings (82.28%) and MS medium without macro elements in the co-cultivation stage, and MS medium containing L-glutamine in the post-co-cultivation stage (75.78%). PCR analysis also verified the transgenic nature of the hairy roots using rolC, aux1 and virD specific primers. The results showed that hairy root production in *D. kotschy* depended on the type of *A. rhizogenes* strain, the age of the explant, and the MS medium. Nevertheless, the length of the produced hairy root in *D. kotschy* did not depend on the type of *A. rhizogenes* strain and the age of the explant. The results of this study can be used in the production of medicinal compounds from this plant, such as rosmarinic acid, through the optimized hairy root technique.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, L-glutamine, Hairy root, MS medium

Corresponding author, Email: mtalebi@iut.ac.ir