مقاله پژوهشی

تأثیر ال-گلوتامین و نوع محیط‌کشت بر کشت ریشه موین زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* 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 زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) به‌عنوان یکی از تکنیک‌های کشت بافتی و زیست‌محیطی در تولید متابویت‌های ثانویه این گیاه، مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به‌صورت کشت درون شیشه‌ای انجام گرفت. بهترین سویه اگروباکتریوم رایزوژنز از میان سویه‌های MSU، A7 و A4-N از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه و بهترین سن برگ جهت تلقیح با باکتری، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای، سه هفته‌ای و چهار هفته‌ای انتخاب شدند. به‌منظور القای ریشه موین مناسب‌ترین محیط‌کشت در مرحله هم‌کشتی از میان محیط‌کشت‌های MS و MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف (NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_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 هفته‌ایی (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 ژن‌های *rolC* و *aux1* 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 بهینه‌سازی‌شده ریشه موین مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، ال-گلوتامین، ریشه موین، محیط‌کشت MS

مقدمه

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 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

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mtalebi@iut.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

(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 نعناعیان به‌ویژه در زرین‌گیاه یافت می‌شود (Petersen and Simmonds, 2003; Fattahi *et al*., 2013). زرین‌گیاه یا بادرنجبویه دنایی با نام علمی *Dracocephalum kotschyi* 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 زرین گیاه 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 کشت‌بافت مانند کشت ریشه مویین 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 مویین، کشت تمایز یافته‌ای است که در آن ریشه‌های مویین دارای سرعت رشد بالا در محیط‌کشت فاقد هورمون، پایداری ژنتیکی و تولید بالای متابولیت ثانویه هستند (Cai *et al*., 2012). ریشه مویین اصطلاحی است که اولین بار توسط استوارت (Stewart) و همکاران در سال ۱۹۰۰ استفاده شد. مشخصه بیماری ریشه مویین تشکیل توده‌ای از ریشه است. به‌دنبال آلودگی با *Agrobacterium rhizogenes*، تشکیل ریشه مویین در نتیجه بیرون‌زدگی تعداد زیادی از ریشه‌های کوچک به‌صورت موهای ظریف مستقیماً از محل آلودگی ایجاد می‌شود (Chandra, 2012). *A. rhizogenes* یک باکتری خاکزی، میله‌ای شکل، گرم منفی و غیراسپورزا است که آرایش این باکتری‌ها به‌صورت منفرد یا دوتایی است و آرایش تاژه‌ها در این گونه به‌صورت منفرد (Monotrichous) یا پیرامونی (Peritrichous) است (Meyer *et al*., 2000). تمام سویه‌های *A. rhizogenes* با حضور یک پلاسمید بزرگ القاکننده ریشه (Ri) حاوی یک منطقه بسیار حفاظت‌شده (هسته)، توالی‌ای از پلاسمید جهت تشکیل ریشه مویین (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 مویین می‌شود (Weller and Stead, 2002; Weller *et al*., 2005).

در تحقیقی فتاحی و همکاران (۲۰۱۳) موفق به تولید ریشه مویین از کشت ریزنمونه‌های تلقیح‌شده (برگ و ساقه‌های ۵ تا ۷ هفته‌ای) با *A. rhizogenes* که از زرین گیاه تهیه شده بود، در محیط‌کشت MS $\frac{1}{2}$ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

تلقیح برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه با اگروباکتریوم رایزوژنز در محیط‌کشت هم‌کشتی MS فاقد ترکیبات دارای عناصر پرمصرف (NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_4) به ریشه‌های مویین بسیاری (۸۹٪ تراریختگی) دست پیدا کنند (Sharafi *et al*., 2014). در تحقیق دیگری ایوبی و همکاران (۲۰۱۷) موفق به تولید ریشه مویین از برگ‌های زرین‌گیاه یک هفته‌ای تلقیح‌یافته با اگروباکتریوم رایزوژنز در محیط‌کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم شدند (Ayyobi and Fattahi, 2017). افزودن آمینواسیدهایی مانند گلیسین، آسپارژین، ال-گلوتامین و ال-پرولین به محیط‌کشت به‌عنوان منابع غنی از نیتروژن سبب تحریک رشدونمو سلول‌های گیاهی می‌شود و به دلیل اینکه به آسانی در دسترس سلول‌ها قرار می‌گیرند، سرعت رشدونمو سلول‌ها را افزایش می‌دهند. نقش مؤثر استفاده از ال-گلوتامین در جلوگیری از اکسیدشدن 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 به‌عنوان تکمیل‌کننده‌های محیط‌کشت در مرحله هم‌کشتی و پس از هم‌کشتی باعث بهبود تراریختگی و افزایش القا و تولید ریشه مویین از کالوس‌های گیاه *Camellia sinensis* تلقیح‌یافته با اگروباکتریوم رایزوژنز گردید (Rana *et al*., 2016). در این تحقیق اثر محیط‌کشت MS فاقد عناصر پرمصرف در مرحله هم‌کشتی، اثر ال-گلوتامین در مرحله پس از هم‌کشتی و اثر متقابل آن‌ها به‌منظور بهبود تولید ریشه مویین از زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

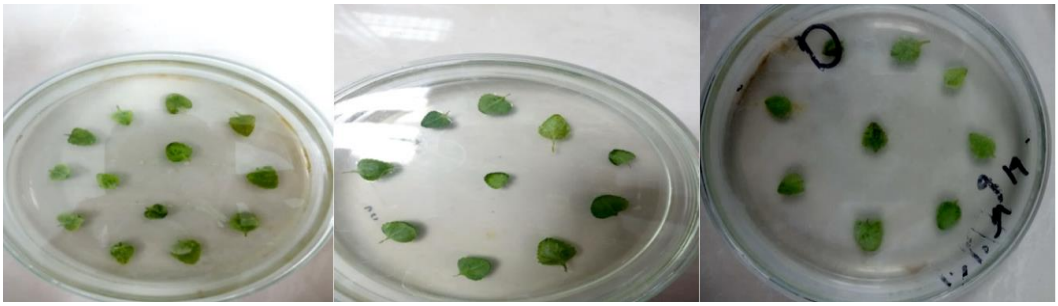
مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایش: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به‌صورت 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 مویین و طول ریشه با اعمال تیمارها در دو مرحله اول مورد بررسی قرار گرفت و در مرحله آخر تنها درصد ریشه مویین با اعمال تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول به‌منظور انتخاب بهترین سویه اگروباکتریوم رایزوژنز از میان سویه‌های MSU، A7 و A4-N (تهیه‌شده 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 به‌منظور تعیین مناسب‌ترین محیط‌کشت در مرحله هم‌کشتی و پس از هم‌کشتی به‌منظور القا و تولید ریشه مویین از محیط‌کشت‌های MS و MS فاقد ترکیبات حاوی عناصر پرمصرف (NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_4) در مرحله هم‌کشتی و محیط‌کشت‌های MS و MS حاوی آمینواسید ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در مرحله پس از هم‌کشتی استفاده شد.

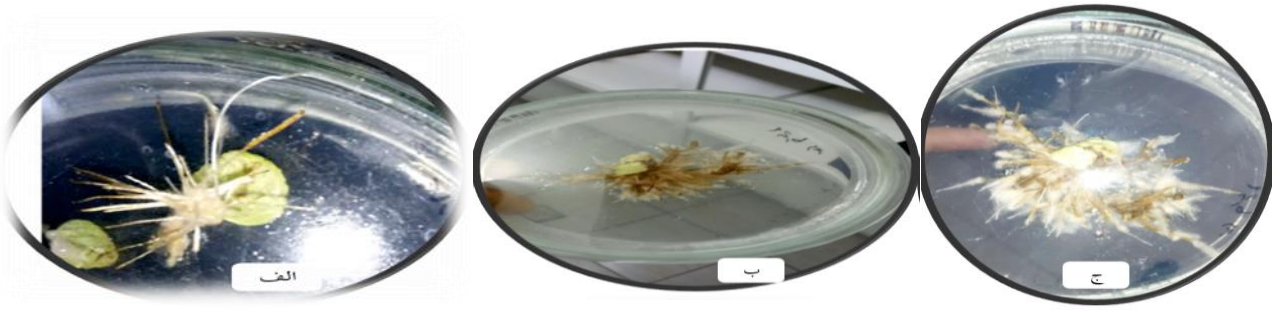
آماده‌سازی ریزنمونه و تهیه محیط‌های کشت: در این تحقیق از بذور زرین گیاه تهیه‌شده از شرکت پاکان بذر اصفهان استفاده شد. به‌منظور از بین‌رفتن خواب بذور و حداکثر میزان جوانه‌زنی، بذور به‌مدت ۱۰ دقیقه با اسید سولفوریک غلیظ تیمار شدند. به‌منظور کشت بذور زرین گیاه از محیط‌کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) استفاده شد. این محیط‌کشت شامل ترکیبات دارای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، ویتامین‌ها، میواینوزیتول (Myoinositol) و ساکارز است. در آخر pH محیط‌کشت در محدوده ۵/۸ تنظیم شد و جهت ژلاتینی‌شدن محیط‌کشت مقدار ۷ گرم آگار (شرکت سیگما، آمریکا) به آن اضافه گردید. محیط‌کشت به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با فشار ۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل و پس از سردشدن مورد استفاده قرار گرفت.

جهت کشت بذور، پس از از بین‌بردن خواب، دوبار با آب‌مقطر شسته شدند و ضدعفونی، زیر هود لامینار انجام گرفت. ابتدا بذور به‌مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم تجاری ۱۰ درصد (حاوی ۵ درصد کلر فعال) غوطه‌ور شدند. در مرحله بعدی، بذور سه بار با آب‌مقطر استریل شسته و بر روی کاغذ صافی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]



شکل ۱- کشت ریزنمونه‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه بر روی محیط‌کشت تولید ریشه مویین (حاصل تلقیح با سویه MSU اگروباکتریوم رایزوژنز)



شکل ۲- تولید ریشه مویین از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه (حاصل تلقیح با سویه MSU اگروباکتریوم رایزوژنز) به‌ترتیب بعد از گذشت الف: سه هفته، ب: شش هفته و ج: هشت هفته از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت تولید ریشه مویین

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 ۲±۲۴ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برگ‌های گیاهچه‌ها به‌ترتیب بعد از گذشت دو، سه و چهار هفته از جوانه‌زنی بذور به‌منظور تلقیح با سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده قرار گرفت.

جهت تلقیح برگ‌های گیاهچه‌ها با اگروباکتریوم رایزوژنز، 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 محیط‌کشت LB (Bertani, 1951) جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و ۱۵ گرم بر لیتر آگار در محدوده pH ۷/۵-۷ برداشته شده و به فالکون‌های حاوی محیط‌کشت LB مایع و ریفامپسین به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در محدوده pH ۷/۵-۷ منتقل گردید. سپس فالکون‌ها به‌مدت 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 طول‌موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید (OD_{600}=۰/۶-۰/۸). پس از این مراحل، فالکون‌ها به‌مدت 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 محیط‌کشت تلقیح استریل (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) اضافه گردید. در نهایت فالکون‌ها به‌مدت پنج ساعت در شیکر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

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 خرده به ظرف پتری حاوی سوسپانسیون باکتری انتقال شدند. ظرف پتری حاوی سوسپانسیون باکتری و برگ‌های برش خرده به‌مدت 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 ۲±۲۴ 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 اگروباکتریوم رایزوژنز (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 ۲±۲۴ 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. واکشت 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 واکشت ریشه‌های موین در اتاق رشد در دمای ۲±۲۴ 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 اگروباکتریوم رایزوژنز (MSU، A7 و A4-N) به‌عنوان کنترل مثبت ابتدا به‌ترتیب استخراج DNA کل به روش CTAB (Khan *et al*., 2007) و استخراج DNA پلاسمیدی 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 اگروباکتریوم رایزوژنز انجام گردید (جدول ۱) (Fattahi *et al*., 2013). به‌منظور تهیه ۱۰ میکرولیتر از PCR

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های *rolC*، *virD* و *aux1* مورد استفاده در این تحقیق

ژن	آغازگر	توالی
rolC	F	5'-TAA CAT GGC TGA AGA CGA CC-3'
	R	5'-AAA CTT GCA CTC GCC ATG CC-3'
aux1	F	5'-TTC GAA GGA AGC TTG TCA GAA-3'
	R	5'-CTT AAA TCC GTG TGA CCA TAG-3'
virD	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 *aux1* با آغازگرهای اختصاصی واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴Ċ، پس از آن ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی (Denaturation) در دمای ۹۴Ċ به‌مدت یک دقیقه، اتصال (Denaturation) در دمای ۵۵/۹ Ċ به‌مدت یک دقیقه و بسط (Elongation) در دمای ۷۲Ċ به‌مدت ۱/۵ دقیقه و در ادامه یک سیکل حرارتی ۷۲Ċ به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. تکثیر ژن *virD* با آغازگرهای اختصاصی نیز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴Ċ به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴Ċ به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶Ċ به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲Ċ به‌مدت یک دقیقه و در ادامه یک سیکل حرارتی ۷۲Ċ به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، به‌منظور تأیید حضور ژن‌های *rolC* و *aux1* در DNA ژنومی هر یک از ریشه‌های مویین احتمالی و تأیید حضور ژن‌های *rolC*، *virD* و *aux1* در DNA پلاسمیدی سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز 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. به‌منظور 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 اگروباکتریوم رایزوژنز (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 به‌ترتیب در ریشه‌زایی (۵۲/۵ و ۱۵ درصد ریشه‌زایی) از برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه اثرگذار بودند. مقایسه میانگین بین سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز 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 اگروباکتریوم رایزوژنز داشتند و بعد از آن به‌ترتیب 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 اگروباکتریوم رایزوژنز 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 اگروباکتریوم رایزوژنز 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

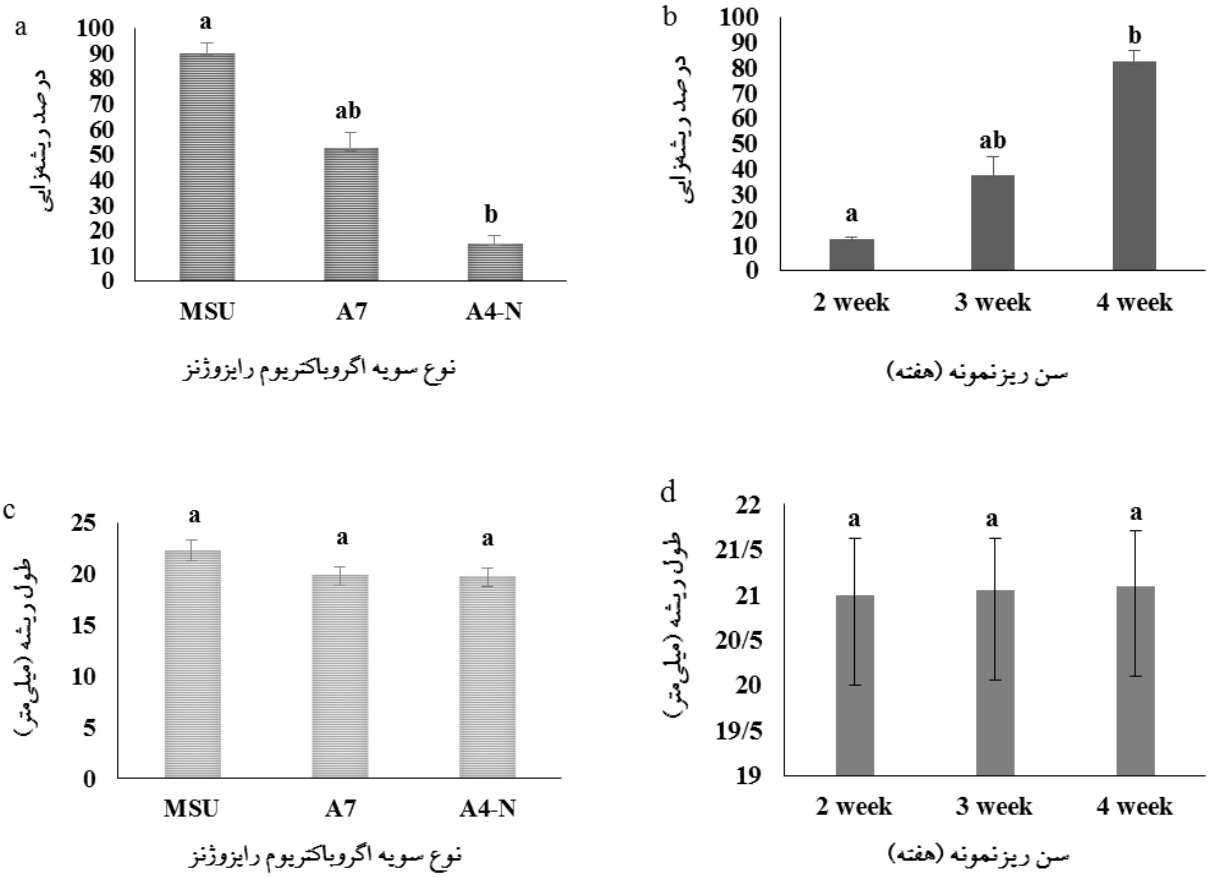
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع سویه و سن ریزنمونه بر صفاتی شامل درصد ریشه‌زایی و طول ریشه تشکیل‌شده از زرین‌گیاه

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

ns، * و ** به‌ترتیب 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 تشکیل‌شده از زرین‌گیاه با دقت اندازه‌گیری ۰/۰۰۰۱

موبین از زرین‌گیاه مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیقی که به منظور تولید ریشه موبین از گیاه عروسک پشت‌پرده (*Physalis alkekengi*) انجام گرفت، بیشترین درصد تراریختگی مربوط به ریزنمونه‌های تلقیح‌یافته با سویه MSU بود (Dorani and Aharizad, 2018).

در گونه‌های مختلف گیاهی اغلب برگ‌ها به‌عنوان ریزنمونه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

جهت تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز و تولید ریشه مویین 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 اگروباکتریوم رایزوژنز به‌منظور القا و تولید ریشه مویین استفاده شد و اثر سایر ریزنمونه‌های دیگر جهت تولید ریشه مویین مورد بررسی قرار نگرفت. به‌طورکلی هر چه سن ریزنمونه کمتر باشد، تمایز سلول‌ها کمتر بوده و برای انتقال ژن به وسیله اگروباکتریوم 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 مویین کاهش می‌یافت. یافته‌های این پژوهش با نتایج مطالعه تأثیر سنین مختلف ریزنمونه (برگ‌های ۳۰، ۳۷، ۴۴، ۵۱ و ۵۸ روزه) بر القای ریشه مویین 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 اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد (Sharafi *et al*., 2014).

اثر نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین بر القاء و تولید ریشه مویین: 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 اگروباکتریوم رایزوژنز 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 NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_4 در مرحله هم‌کشتی به‌منظور القای ریشه مویین و همچنین استفاده از ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در محیط‌کشت تولید ریشه مویین در مرحله پس از هم‌کشتی بیش‌ترین تأثیر بر ریشه‌زایی (۷۵/۷۸ درصد ریشه‌زایی) از برگ‌های چهار هفته‌ای تلقیح‌یافته با سویه MSU اگروباکتریوم رایزوژنز داشت و پس از آن به‌ترتیب استفاده از محیط‌کشت 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 اگروباکتریوم رایزوژنز مؤثر بودند (شکل ۴).

افزودن استوسیرینگون به محیط‌کشت در مرحله هم‌کشتی منجر به القای بیان ژن‌های *Vir* پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوژنز 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 اگروباکتریوم رایزوژنز 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 (NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_4) در مرحله هم‌کشتی (کشت با اگروباکتریوم رایزوژنز) تأثیر فزاینده‌ای بر انتقال T-DNA از پلاسمید باکتری به ژنوم سلول میزبان و در نتیجه تولید ریشه مویین 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 اگروباکتریوم

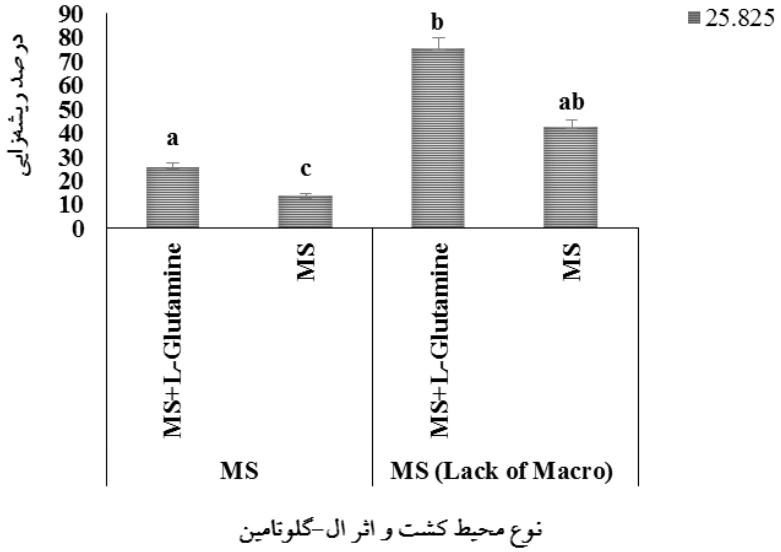
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر متقابل نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین بر روی ریشه‌زایی از زرین‌گیاه

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

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

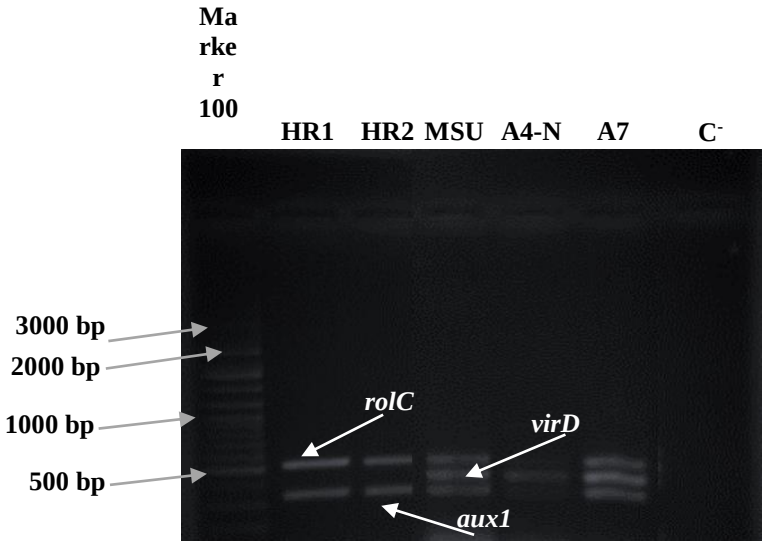


شکل ۴- اثر متقابل نوع محیط‌کشت و ال-گلوتامین بر تولید ریشه موین در نمونه‌های تلقیح‌شده با سویه MSU اگروباکتریوم رایزوژنز

رایزوژنز 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 اگروباکتریوم 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 محیط‌کشت، سبب افزایش تولید ریشه موین از ریزنمونه‌های زرین‌گیاه 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 محیط‌کشت می‌تواند کمبود هورمون اکسین در ریزنمونه را جبران کند (Brown *et al*., 2001; Peer and Murphy, 2007). ال-گلوتامین از اکسیدشدن ترکیبات پلی‌فنلی در گیاهان جلوگیری می‌کند. اضافه‌کردن ال-گلوتامین به محیط کشت هم‌کشتی باعث از بین رفتن اثرات باکتری‌کشی (Bactericidal) پلی‌فنل‌های تراوش‌شده 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 تراریختگی 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]



شکل ۵- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تأیید مولکولی تراریختگی ریشه‌های موین زرین‌گیاه و اصالت هر یک از سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز

موین (pRi) اگروباکتریوم رایزوژنز به ژنوم ریشه‌های موین تشکیل شده (HR1 و HR2) و در نتیجه بیانگر تأیید تراریختگی آن‌ها بود. همچنین مشاهده باندهای مربوط به ژن‌های *rolC*، *aux1* و *virD* (به طول ۴۳۸bp) بر روی ژل بیانگر وجود پلاسمید القاکننده ریشه موین در هر یک از سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز (MSU، A7 و A4-N) و قابلیت آن‌ها در ایجاد ریشه موین 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 زرین‌گیاه) 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*، *rolC* و *rolD*) هست، برای القای ریشه موین 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 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 اگروباکتریوم رایزوژنز جهت انتقال T-DNA به ژنوم سلول میزبان، برگ‌های چهار هفته‌ای زرین‌گیاه جهت تلقیح با باکتری و محیط‌کشت MS فاقد ترکیبات پرمصرف (NH_4NO_3، KNO_3، $CaCl_2$ و KH_2PO_4) در مرحله هم‌کشتی و محیط‌کشت MS حاوی ال-گلوتامین به غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر در مرحله پس از هم‌کشتی جهت القا و تولید ریشه موین بیشترین بازده را داشت. استفاده از روش بهینه‌سازی شده می‌تواند در تولید ترکیبات دارویی این گیاه مانند رزمارینیک اسید در مطالعات بعدی استفاده شود.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

تشکر و قدردانی

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.

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 kotschyi* 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 kotschyi* Boiss. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 30*, 1-13. 20.1001.1.23832738.1396.30.1.1.0.

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 kotschyi* 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 kotschyi* 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

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: Minipreparation. 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]

The effect of L-glutamine and medium culture on hairy root culture of *Dracocephalum kotschyi* 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 kotschyi* 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. kotschyi 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. kotschyi* 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. kotschyi* 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. kotschyi* 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 rosmarie acid, through the optimized hairy root technique.

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

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.56.18.2]