مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بهینه‌سازی القاء و شرایط کشت ریشه‌های مویین تراریخته در گیاه دارویی گل میمونی بیابانی (*Scrophularia deserti*)

راحله ابراهیمی[1]، مراد جعفری*[2]، مرتضی قدیم‌زاده[2]، بابک عبدالهی مندولکانی[2]

[1]به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

[2]دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۲٤، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۳/۲۹

چکیده

گل میمونی بیابانی یک دارویی مهم متعلق به خانواده Scrophulariaceae است. تحقیقات نشان داده است که عصاره این گیاه دارای خواص ضد دیابتی و ضد سرطانی است. این گونه منبع با ارزشی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مخصوصا گلیکوزیدهای ایروئیدی و فلاونوئیدها است. سیستم ریشه مویین می-تواند برای تولید درون شیشه‌ای ترکیبات با ارزش دارویی استفاده شود. در این تحقیق، ریشه‌های مویین تراریخته در گل میمونی بیابانی بواسطه تلقیح با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه A13 تولید شدند. تأثیر ریزنمونه‌های مختلف (گیاهچه بدون ریشه‌چه، کوتیلدون و برگ) تهیه شده از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با سنین مختلف (۱۰، ۱۸، ۲۵، ۵۰ و ۷۲ روزه) در ۳ زمان مختلف تلقیح (۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه) بر کارآیی القاء ریشه مویین مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر تعداد ریشه‌های مویین (۲۲/۳۳ ریشه در هر ریزنمونه) در ریزنمونه‌های گیاهچه‌ای ۱۸ روزه تلقیح شده با باکتری به مدت ۵ دقیقه حاصل شد. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین بوسیله PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*A و *rol*B انجام گرفت. برای تعیین محیط کشت مناسب برای رشد بهینه ریشه‌های مویین، دو لاین G و H در چهار محیط کشت مختلف(MS، ½ MS، B5 و PG_{oB}) کشت شدند. نتایج نشان داد که MS بهترین محیط کشت برای افزایش زیست توده ریشه‌های مویین است. لاین H بیشترین زیست‌توده (۱٦/۳۳میلی‌گرم در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت) را بعد از ٤ هفته کشت تولید کرد. سیستم ریشه مویین ایجاد شده در این مطالعه می‌تواند برای بررسی تولید متابولیت‌های مهم دارویی گل میمونی بیابانی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: *گل میمونی بیابانی، ریشه مویین تراریخته، ریزنمونه، محیط کشت.*

* نویسنده مسئول: مراد جعفری تلفن: ۰٤٤۳۱۹٤۳۱٤۹ Email: m.jafari@urmia.ac.ir

مقدمه

گل میمونی بیابانی در کشورهای عربی حاشیه خلیج فارس و همچنین در ایران در بیشتر نواحی، بخصوص در نواحی غربی و جنوبی کشور از جمله در شهرهایی چون ایلام، کرمانشاه، همدان، خوزستان، اهواز، لرستان، بوشهر، هرمزگان و یزد یافت می‌شود (Ghahreman, 2002). گل میمونی بیابانی دارای خواص ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد سرطانی (Ahmed *et al.*, 2003)، ضد باکتریایی و ضد قارچی (Bahmani *et al.*, 2010) است. از مهمترین ترکیبات شیمیایی مهم آن می‌توان به scropolioside-D2 و harpagosside B، از دسته گلیکوزیدهای ایروئیدی، اشاره نمود (Ahmed *et al.*, 2003). گیاهان دارویی زیستگاه طبیعی محدودی داشته و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آنها با مشکلاتی همراه است. از طرفی مشکلات مربوط به اهلی نمودن، برداشت‌های بی‌رویه افراد بومی و چرای مفرط، آنها را در معرض خطر انقراض قرار داده است که گل میمونی بیابانی هم از این خطر در امان نیست. در سال‌های اخیر کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان، به عنوان تکنیکی پر سرعت در جهت باززایی سریع و تکثیر انبوه مواد گیاهی خارج از فصل و ایجاد گیاهان یکنواخت ژنتیکی بسیار مورد توجه بوده است (Maleki *et al.*, 2011). بررسی‌ها نشان داده است که میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه طبیعی است و حتی سلول‌های گیاهان کشت بافت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (Hasanlu *et al.*, 2008). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین تولید متابولیت‌های دارویی با استفاده از گیاهان وحشی اقتصادی نبوده و به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه آنها از فنون کشت سلول و بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود (Ionkova, 2007). پیشرفت در کشت بافت همراه با تکنیک‌های مهندسی ژنتیک بویژه تکنیک تراریخته کردن، رویه جدیدی برای تولید مقدار بالای متابولیت‌های ثانویه و سایر ترکیبات دارویی فراهم کرده است. از طرفی فناوری DNA نوترکیب و انتقال ژن بواسطه *Agrobacterium* برای مهندسی متابولیک گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات دارویی استفاده می‌شوند.

باکتری *Agrobacterium rhizogenes* یک باکتری خاکزی است که موجب تولید ریشه مویین در محل زخم می‌شود. انتقال T-DNAی پلاسمید Ri از این باکتری به سلول‌های گیاهی باعث تولید ریشه‌های مویین می‌شود (Hasanlu *et al.*, 2008). *A. rhizogenes* قادر است علاوه بر T-DNA پلاسمید Ri خود، T-DNAی موجود بر روی هر ناقل دوگانه دیگری را که در این باکتری حضور داشته باشد، به طور همزمان به سلول گیاه هدف منتقل نماید. بدین ترتیب در

طی یک فرایند تراریزش مضاعف، باعث القای ریشه‌های مویین تراریخته می‌گردد (Tomilov *et al.*, 2007; Lee *at al.*, 2004). امروزه استفاده از کشت ریشه‌های مویین تراریخته به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش از گیاهان دارویی بسیار گسترش یافته است (Giri & Narasu, 2000; Srivastava & Srivastava, 2007). بزرگترین مزیت ریشه‌های مویین در مقایسه با گیاهان مادری، توان تولید بالای متابولیت‌های ثانویه و ثبات ژنتیکی آن‌ها می‌باشد (Hasanlu, 2008). ریشه‌های مویین تراریخته در گیاهان دارویی مختلف از جمله *Salvia miltiorrhiza* (Yan *et al.*, 2005)، *Cichorium intybus* (Kabirnetaj *et al.*, 2012)، *Linum mucronatum* ssp (Samadi *et al.*, 2012)، *Atropa belladonna* (Zarei *et al.*, 2013) و در جنس *Scrophularia* هم در گونه‌های *striata* (Avish *et al.*, 2014) و *buergeriana* (Park *et al.*, 2010) تولید شده است. کارآیی تراریختی با *A. rhizogenes* و میزان القای ریشه مویین به عوامل مختلفی بستگی دارد. از فاکتور مهم و موثر می‌توان به سویه باکتری و مدت زمان تلقیح (Cao *et al.* 2009; Weber *et al.*, 2011) و نوع و سن ریزنمونه (Kabirnetaj *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012) اشاره نمود. همچنین بهینه سازی محیط رشد ریشه‌های مویین از نظر ترکیبات و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت جهت رشد مناسب و تولید بهینه زیست توده ضروری است (Shinde *et al.*, 2010). بر اساس منابع علمی قابل دسترس، تاکنون مطالعات زیست‌فناورانه روی گیاه گل میمونی بیابانی انجام نشده است. لذا با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، در این تحقیق برای اولین بار تولید سیستم ریشه مویین در آن گزارش می‌شود. در این تحقیق، اثر نوع و سن ریزنمونه‌ها و نیز مدت زمان تلقیح با باکتری *A. rhizogenes* برای بهینه-سازی القاء ریشه‌های مویین تراریخته و همچنین تعیین بهترین محیط کشت برای رشد بهینه ریشه-های مویین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بوته‌های گیاه گل میمونی بیابانی همراه با بذور از دامنه کوه مانشت در شمال شرقی شهرستان ایلام جمع‌آوری شدند و نمونه‌های گیاهی توسط محققین مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام شناسایی و تایید شدند. بذور ابتدا در اسید سولفوریک ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه تیمار شدند و پس از شستشو با آب مقطر جهت حذف اثر اسید، به مدت ۷۲ ساعت با غلظت بهینهٔ اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ ppm، داده‌ها نشان داده نشدند) در دمای ٤ °C برای شکستن خواب بذر تیمار شدند. سپس بذور تیمار شده، در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم تجاری ۱/۵ درصد (دارای ۵ درصد کلر فعال) ضد عفونی شدند. در نهایت، بذور پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل هر بار به

مدت ۵ دقیقه، در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با ویتامین‌های B5 (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و بدون تنظیم‌کننده رشد کشت شدند و کشت‌ها در دمای ۲±۲٤ °C درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تولید شده به عنوان منبعی برای تهیه ریزنمونه جهت القاء ریشه مویین مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری

به منظور القاء ریشه مویین، از یک سویه وحشی باکتری *A. rhizogenes* یعنی "A13" که از دسته میکیموپین[1] است، استفاده شد. تهیه سوسپانسیون باکتری به روش Jafari و همکاران (۲۰۰۹) به شرح زیر انجام گرفت. یک کلونی از باکتری در محیط کشت مایع LB (Bertani, 1952) حاوی ۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (Sigma، آمریکا) کشت گردید و کشت باکتری بر روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ °C و با تکانش ۱۸۰ rpm به مدت ٤۸ ساعت قرار گرفت، سپس سوسپانسیون باکتری با سرعت ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دوباره در محیط MS که pH آن روی ۵/۵ تنظیم شده بود، حل گردید. OD_{600} سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB بین ۰/٤ تا ۰/٦ تنظیم شد. ریزنمونه‌های گیاهچه بذری (پس از حذف ریشه‌چه)، کوتیلدون و برگ از گیاهچه‌های بذری درون شیشه‌ای با سنین مختلف ۱۰، ۱۸، ۲۵، ۵۰ و ۷۲ روزه تهیه شده و در شرایط استریل در سوسپانسیون باکتری با در نظر گرفتن مدت زمان‌های مختلف تلقیح (۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه) غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده در روی کاغذ صافی، برای حذف باکتری اضافی، نسبتا خشک شدند و سپس روی محیط کشت MS حاوی ۷ g/l آگار کشت و به مدت ٤ روز در دمای ۲±۲٤°C و شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ٤ روز کشت توام[2]، ریزنمونه‌ها در محیط ½ MS حاوی ۲۵۰mg/l آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (Duchefa، هلند) شستشو داده شده و در نهایت بر روی محیط کشت MS جامد حاوی ۲۵۰ mg/l سفوتاکسیم و فاقد تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند. هر دو هفته یکبار واکشت ریزنمونه‌ها انجام گرفت و در هر دوره واکشت، غلظت سفوتاکسیم به میزان mg/l ۵۰ کاهش داده شد تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید. در نهایت ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌ها جدا و برای رشد بیشتر در محیط کشت MS جامد بدون تنظیم‌کننده رشد کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲٤°C در تاریکی نگهداری شدند.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین

برای تایید مولکولی ریشه‌های مویین،

[1] Mikimopine

[2] Co-culture

استخراج DNA از ریشه‌های مویین احتمالی بدست آمده در محیط جامد و ریشه حاصل از ریزنمونه تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) به روش CTAB (Khan *et al.*, 2007) انجام گرفت. کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و همچنین الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. جهت تایید وضعیت تراریختی ریشه‌های مویین احتمالی، از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*A و *rol*B استفاده شد. آغازگرها برای تکثیر همزمان بخش‌هایی از هر دو ژن مذکور طراحی شدند. توالی آغازگرها به صورت زیر بود: ′5-ATGGATCCCAAATTACTAATCCCCA 5′-CGA (آغازگر مستقیم) و ′3-TAAGGCTTCAGTCATACGGTCTACT 3′-GCAGC (آغازگر معکوس). برنامه PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ °C به مدت ۵ دقیقه، اتصال آغازگرها ۵۵/۵ °C به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت زمان ۷ دقیقه بود. PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Veriti® 60-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro (Carestream Health، آمریکا) مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند.

استقرار ریشه‌های مویین در محیط مایع و انتخاب اولیه لاین‌ها

پس از رشد مناسب ریشه‌ها در محیط جامد و تایید تراریختی آنها بوسیله PCR، پنج لاین تراریخته مستقل از هم (A, G, V, H, M) یا رخدادهای تراریخته مستقل از هم[1] (یعنی هر کدام از این لاین‌ها از یک تک سلول تراریخته مستقل حاصل شده‌اند) که در محیط جامد بیشترین انشعابات و رشد ریشه را نشان داده بودند انتخاب و به منظور استقرار در محیط مایع و همچنین مقایسه میزان رشد آنها، در محیط مایع کشت شدند. بدین منظور، قطعات حاوی مریستم راسی (cm ۳-٤) از لاین‌های انتخابی در محیط کشت MS مایع حاوی g/l ۳۰ ساکارز در ارلن-های ml ۱۰۰ منتقل و بر روی شیکر با دور rpm ۱۰۰ و دمای ۲٤±۲°C در تاریکی قرار گرفتند و هر دو هفته یکبار واکشت ریشه‌ها انجام گردید. کشت‌ها در همین شرایط نگهداری شدند. میزان تجمع زیست‌توده تر[2] ریشه‌ها بر حسب گرم در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت پس از ٤ هفته یعنی در فاز ایستایی[3] تعیین شد.

مقایسه میزان رشد لاین‌های ریشه مویین انتخابی در محیط کشت‌های مختلف

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میزان رشد لاین‌های انتخابی در مرحله اول در محیط کشت پایه MS (محیط کشت استفاده شده در طی

[1] Independent transgenic events
[2] Fresh Biomass
[3] Stationary phase

فرآیند تراریختی)، دو لاین G و H به عنوان بهترین لاین انتخاب و اثر محیط کشت‌های دیگر شامل B5، ½ MS و PG_{oB} (De Greef & Jacobs, 1979) بر میزان رشد ریشه‌های مویین در مقایسه با محیط کشت اولیه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، mg ۲۰±۳۰۰ ریشه مویین وزن گردیده و در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ml ۳۰ محیط کشت، کشت شدند و سپس بر روی شیکر با سرعت rpm ۱۰۰ تحت شرایط تاریکی و دمای ^{o}C ۲±۲٤ نگهداری شدند. وزن تر ریشه‌ها (گرم در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت) هر هفته و طی ٤ هفته متوالی پس از کشت اندازه-گیری و یادداشت برداری شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایشات مربوط به تاثیر مدت زمان تلقیح و سن ریزنمونه (در هر ریزنمونه به طور جداگانه) بر میزان القاء ریشه مویین در قالب آزمایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملا تصادفی و آزمایشات مربوط به تاثیر نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام گردید. آزمایشات مربوط به انتخاب لاین برتر و تاثیر محیط کشت بر رشد لاین‌ها دوبار تکرار شدند. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.1 انجام گرفت. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون نرمالیتی داده‌ها انجام گردید و برای داده‌های تعداد ریشه‌های القاء شده تبدیل جذری انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (FLSD[1]) محاسبه گردید و نمودارها توسط نرم-افزار Excel ترسیم شدند.

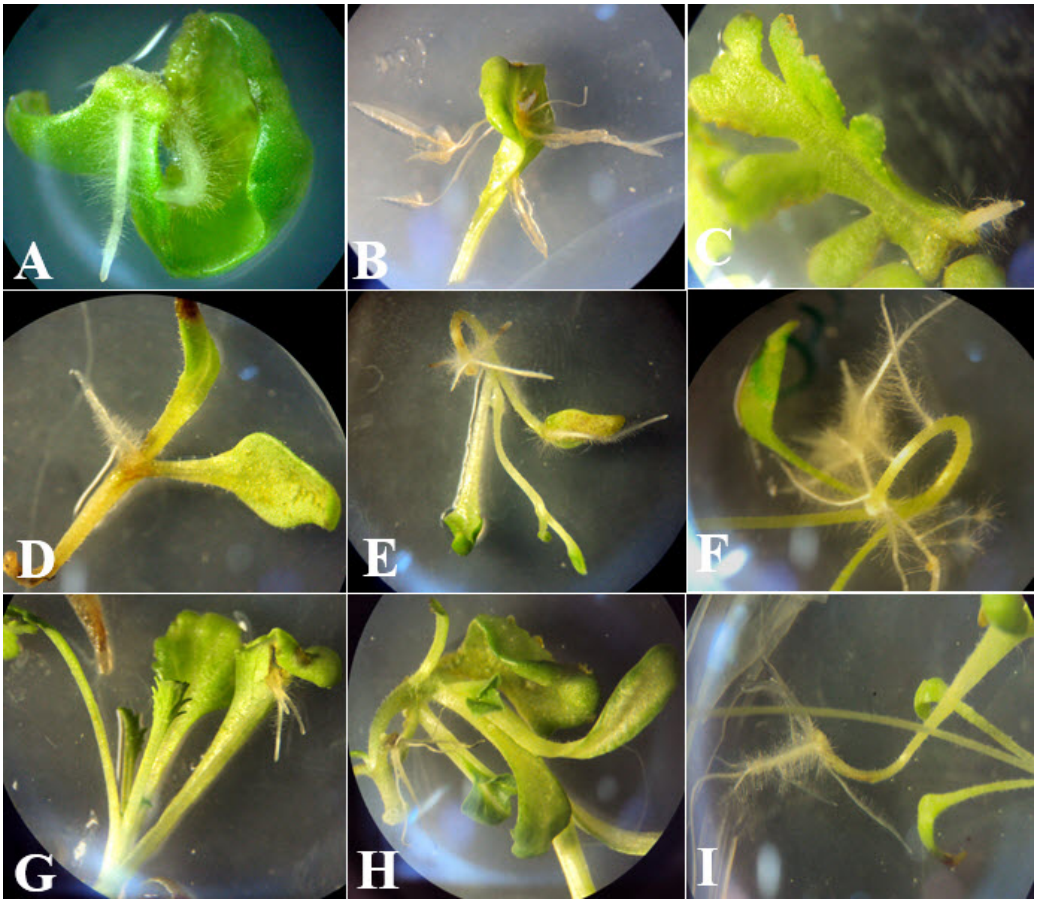
نتایج و بحث

تاثیر مدت زمان تلقیح، نوع و سن ریزنمونه بر القاء ریشه مویین

زمان ظهور ریشه‌ها بر حسب سن ریزنمونه‌ها متفاوت بوده بدین صورت که در ریزنمونه‌های با سن پایین (گیاهچه‌های ۱۰ تا ۲۵ روزه) اولین ریشه‌ها پس از گذشت ۹ روز، ولی در ریزنمونه‌های با سن بالا (۵۰ و ۷۲ روزه) ریشه‌ها بعد از ۲ هفته ظاهر شدند و تا یک ماه پس از تلقیح، القاء ریشه مویین احتمالی از ریزنمونه‌ها مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین در ریزنمونه‌های بدون تلقیح با باکتری (شاهد) نیز القاء ریشه مشاهده شد. بدلیل القاء ریشه در ریزنمونه‌های تلقیح نشده، دقت لازم برای گزینش ریشه‌های مویین تراریخته از ریشه‌های غیرتراریخته انجام شد که بدین منظور، قبل از آنالیز PCR، گزینش ریشه‌ها بر مبنای سرعت رشد بالا و همچنین محل ظهور ریشه‌ها انجام گرفت. در ریزنمونه‌های تلقیح شده، ریشه‌ها از مکان‌های غیرمتعارف مانند اطراف گره کوتیلدونی (شکل ۱، A)، از وسط و نزدیک به انتهای هیپوکوتیل گیاهچه بذری (شکل ۱، E و F)، زیر برگ و کوتیلدون گیاهچه‌های حقیقی (شکل ۱، G و H) القاء شدند، ولی در ریزنمونه‌های تلقیح نشده ریشه‌های نابجا عمدتا از انتهای هیپوکوتیل

[1] Fisher's least significant difference

گیاهچه‌ها، احتمالا به دلیل بقایای مریستم ریشه در اثر برش نادرست، القا گردید (شکل ۱، I). لذا ریشه‌های القا شده از وسط برگ، کوتیلدون و هیپوکوتیل که از رشد سریع و بیشتری هم برخوردار بودند، بوسیله PCR مورد بررسی قرار گرفتند.



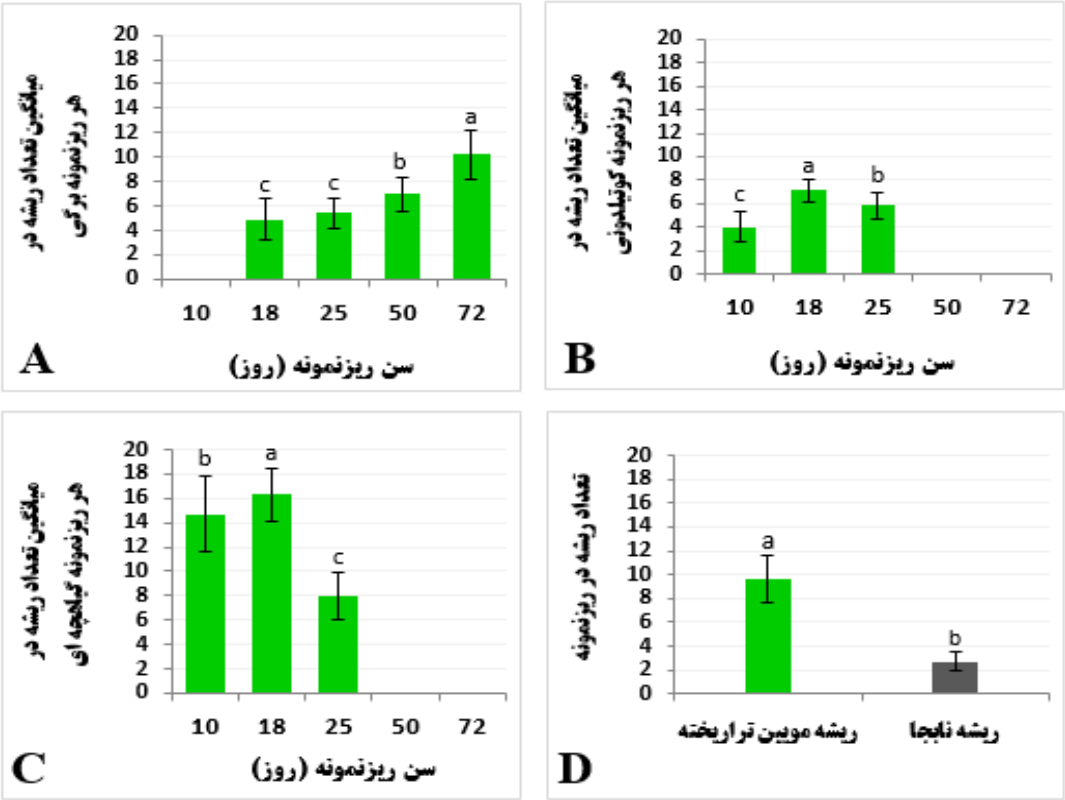
شکل ۱- القاء ریشه‌های مویین احتمالی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه گل میمونی بیابانی بواسطه *A. rhizogenes*. A: کوتیلدون، B و C: برگ، D، E و F: گیاهچه‌های بذری ۱۸-۱۰ روزه (پس از حذف ریشه‌چه)، G و H: گیاهچه‌های ۲۵ روزه، I: گیاهچه بذری ۱۰ روزه بدون تلقیح با باکتری (شاهد).

Figure 1- *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction from different explants of *Scropholaria deserti*. A: Cotyledon; B and C: Leaf; D, E and F: 10-18 day-old seedlings (after cutting off radicle); G and H: 25-day old seedlings; I: 10-day-old non-transformed seedling (control).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اختلاف آماری معنی‌دار ($P <$ ۰/۰۱) بین سن ریزنمونه‌ها، زمان تلقیح و برهمکنش ریزنمونه با زمان تلقیح از نظر تعداد ریشه مویین القاء را نشان داد. بر اساس نتایج مقایسات میانگین، در ریزنمونه برگ (شکل ۲، A) بیشترین تعداد ریشه مویین تراریخته در برگ‌های تلقیح شده با سن ۷۲ روزه (۱۰/۲۲ ریشه در هر ریزنمونه) و کمترین تعداد ریشه در برگ‌های تلقیح شده با سن ۱۸ روزه (٤/۹۲ ریشه در هر ریزنمونه) مشاهده گردید و

در ریزنمونه‌های ۱۰ روزه ریشه‌ای القا نشد. در ریزنمونه کوتیلدون (شکل ۲، B)، بیشترین تعداد ریشه مویین تراریخته در کوتیلدون‌های تلقیح شده ۱۸ روزه (۷/۱٦ ریشه در هر ریزنمونه) و کمترین تعداد ریشه در ریزنمونه با سن ۱۰ روز (٤/۰۳ ریشه در هر ریزنمونه) مشاهده گردید و در ریزنمونه‌های ۵۰ و ۷۲ روزه ریشه‌ای القا نشد. در ریزنمونه‌های گیاهچه‌ای (شکل ۲، C)، بیشترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های تلقیح شده دارای سن ۱۸ روزه (۱٦/۳۳ ریشه در هر ریزنمونه) و کمترین تعداد ریشه در ریزنمونه-های ۲۵ روزه (۸ ریشه در هر ریزنمونه) مشاهده شد و در ریزنمونه‌های ۵۰ و ۷۲ روزه ریشه‌ای القا نگردید. به طور کلی با مقایسه نوع ریزنمونه، بیشترین تعداد ریشه مویین تراریخته در ریزنمونه‌های گیاهچه‌ای با سن پایین (۱۸ روزه) مشاهده گردید (شکل ۲، C) و از نظر سن ریزنمونه، با افزایش سن ریزنمونه‌های برگی، تعداد ریشه القاء افزایش نشان داد ولی در ریزنمونه گیاهچه‌ای و کوتیلدونی این روند برعکس بود. اگرچه در ریزنمونه‌های گیاهچه بدون ریشه‌چه تلقیح نشده هم ریشه‌های نابجا القا شدند با اینحال فراوانی چنین ریشه‌هایی بسیار کمتر از ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده بود (شکل ۲، D) که بیانگر فراوانی بالای ریشه مویین تراریخته در ریزنمونه‌های تلقیح شده در مقابل القاء خود بخودی ریشه نابجا در ریزنمونه‌های تلقیح نشده است.

نوع و سن ریزنمونه گیاهی تاثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه مویین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین کننده ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است (Kabirnetaj *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر زمان القاء ریشه‌های مویین بسته به سن ریزنمونه‌ها متفاوت بود، در ریزنمونه‌های با سن ۱۰ تا ۱۸ روزه در کوتاهترین زمان (پس از ۹ روز) ریشه‌ها ظاهر شدند ولی در ریزنمونه‌های ۵۰ و ۷۲ روزه ریشه‌های مویین احتمالی دیرتر (۲ الی ٤ هفته ماه بعد از تلقیح) القا شدند. هر چه تعداد روزهای لازم جهت ظهور ریشه‌های مویین کمتر باشد از نظر صرفه-جویی در وقت بسیار مطلوب می‌باشد (Cao *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2011). پاسخ وابسته به ریزنمونه از نظر زمان القاء ریشه مویین در گیاهان دارویی دیگر نیز گزارش شده است، به عنوان مثال در ریزنمونه‌های برگی درمنه خزری (Soleimani *et al.*, 2012)، خرفه (Pirian & Piri, 2012) و *Coleus forskohlii* Briq (Reddy *et al.*, 2012) به ترتیب ۷ تا ۱۰ روز، ۱۰ روز و ٤-۱ هفته پس از تلقیح و در ریزنمونه-های کوتیلدونی کاسنی، ۸ روز پس از تلقیح اولین ریشه‌های مویین ظاهر شدند (Kabirnetaj *et al.*, 2012).

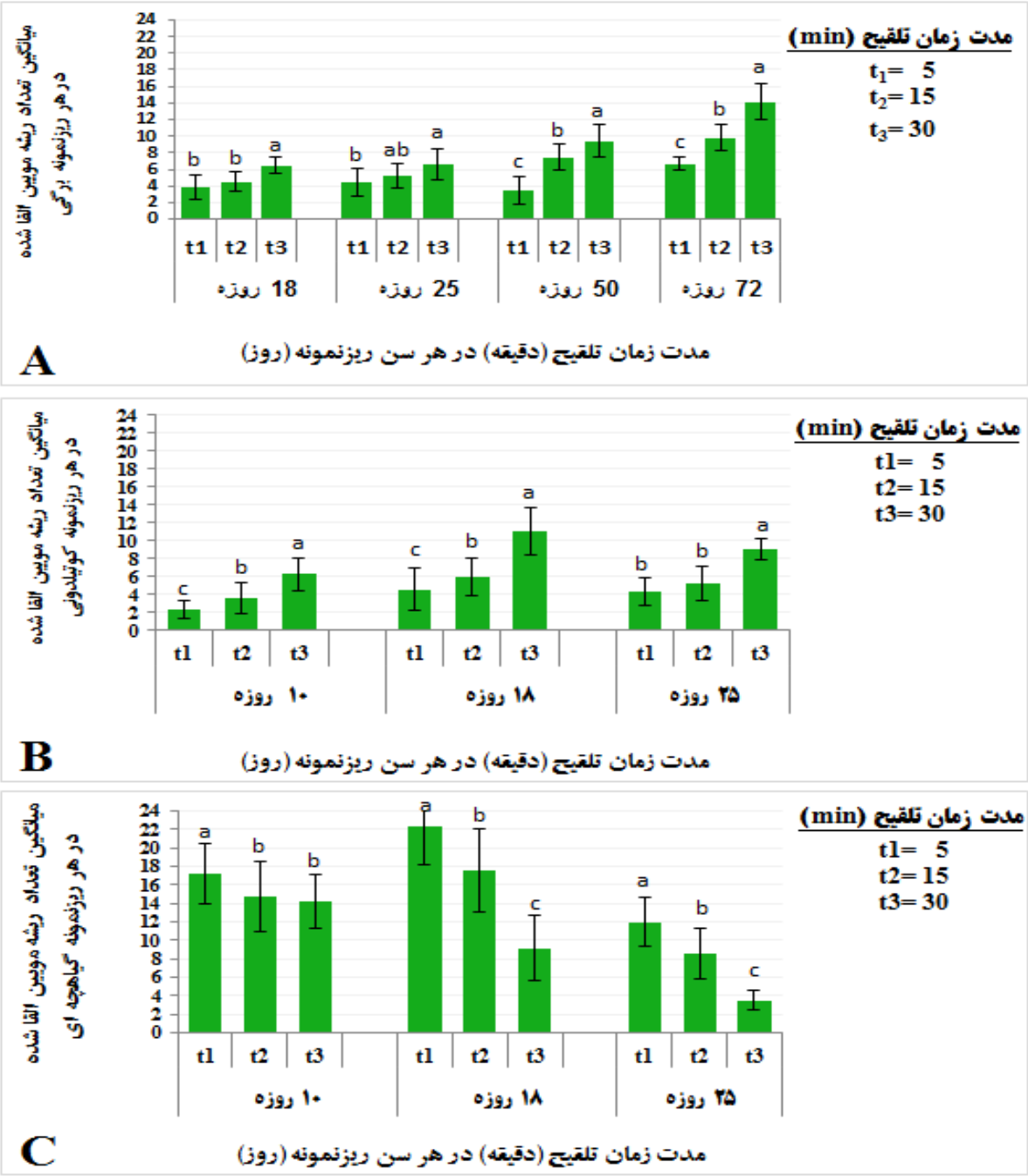


شکل ۲- تاثیر نوع و سن ریزنمونه بر میزان القاء ریشه¬های موین تراریخته. A: ریزنمونه برگی، B: ریزنمونه کوتیلدونی، C: ریزنمونه گیاهچه‌ای بدون ریشچه. D: میانگین تعداد ریشه‌های موین تراریخته (میانگین تمام ریزنمونه‌ها) در مقایسه با ریشه‌های موین نابجا (ریشه‌های غیرتراریخته) حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نیافته. حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی¬دار (P < ۰/۰۱) بر اساس آزمون FLSD است.

Figure 2- The effects of type of explant and age on induction of transgenic hairy roots. A: Leaf explant; B: Cotyledon explant; C: Seedling explant without radicle; D: Mean number of transgenic hairy root versus adventitious hairy root (non-transgenic roots) raised from nontransformed explants. Bars followed by the different letters are significantly different (P < 0.01) according to FLSD test.

تاثیر مدت زمان تلقیح بر القاء ریشه موین

نتایج مقایسات میانگین (شکل ۳، A-C) نشان داد که در هر سن ریزنمونه بین زمان‌های تلقیح از نظر تعداد ریشه موین القاء اختلاف معنی‌دار آماری (P < ۰/۰۱) وجود دارد. اگر چه در همه زمان‌های تلقیح القاء ریشه موین مشاهده شد، با اینحال میزان القاء در ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون در مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه‌ای بیشترین مقدار بود، ولی در ریزنمونه گیاهچه مدت زمان تلقیح ۵ دقیقه‌ای باعث القاء بیشترین تعداد ریشه موین شد. نتایج این آزمایش نشان داد که مدت زمان تلقیح بهینه برای موفقیت در تراریختی کارآمد به نوع و سن ریزنمونه بستگی دارد.



شکل ۳- تاثیر مدت زمان تلقیح با *Agrobacterium rhizogenes* بر القاء ریشه مویین در ریزنمونه‌های گیاهچه، برگ و کوتیلدون جدا شده از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای. **A**: ریزنمونه برگی، **B**: ریزنمونه کوتیلدونی، **C**: ریزنمونه گیاهچه‌ای (ریشه‌چه حذف شده). حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P < ۰/۰۱ یا P < ۰/۰۵) بر اساس آزمون FLSD است.

Figure 3- Effect of *Agrobacterium rhizogenes* inoculation time on hairy root induction in different explants isolated from in vitro-raised seedlings. A: Leaf explant; B: Cotyledon explant; C: Seedling explant without radicle; D: Bars followed by the different letters are significantly different (P < 0.01 or P < 0.05) according to FLSD test.

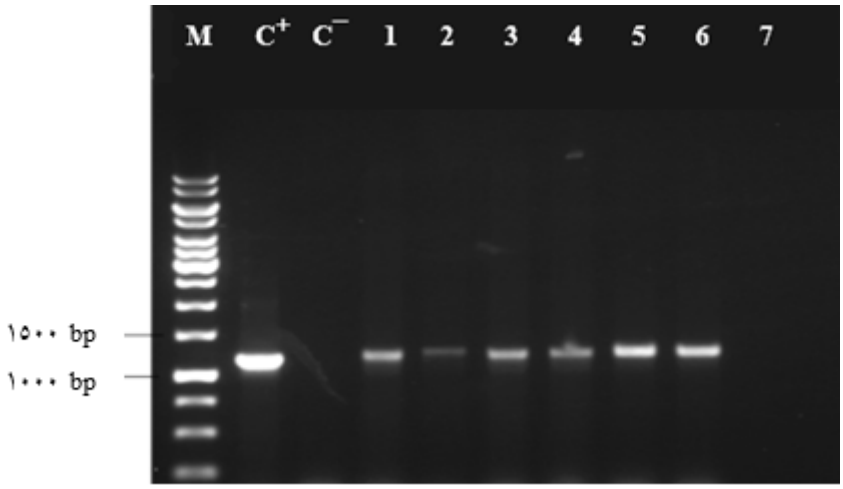
تایید وضعیت تراریختی ریشه‌های مویین

اگر چه رشد پلاژیوتروپیک[1] (ورین‌گرا، سوگرائی به صورت انشعابات افقی) سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد، معرف مویین بودن ریشه‌ها بود، ولی با این‌حال ماهیت تراریختی آنها بوسیله PCR مورد بررسی قرار گرفت. PCR برای ریشه‌های تراریخته احتمالی حضور نوار مورد انتظار ۱۱۰۵ bp مربوط به تکثیر همزمان بخش-هایی از ژن‌های *rol*A و *rol*B را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری مورد استفاده در تلقیح) هم اندازه بود، در مقابل برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه تلقیح نیافته (شاهد منفی) نواری در تکثیر نگردید (شکل ٤). با توجه به اینکه ریشه‌های مویین در واکشت‌های مختلف در محیط کشت جامد و همچنین در محیط کشت مایع بدون آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم فاقد هر گونه آلودگی آگروباکتریوم بودند، لذا احتمال حضور باکتری در فضاهای بین سلولی تقریبا صفر بود و نوار تکثیر شده در PCR برای نمونه‌های DNA ریشه‌های مویین احتمالی، نشان دهنده تلفیق ژن-های *rol* در ژنوم آنها است و بدین ترتیب تراریخته بودن ریشه‌ها بوسیله PCR تایید شد.

بررسی میزان تجمع زیست‌توده تر در لاین‌های ریشه مویین مختلف

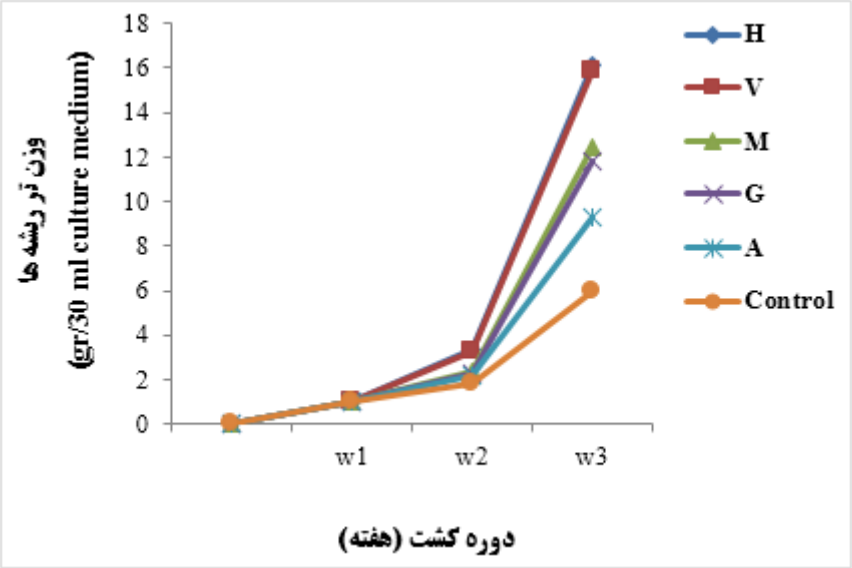
از آنجا که ریشه‌های مویین از ریزنمونه-های مختلف و یا از بخش‌های مختلف یک ریزنمونه القاء شده بودند، بنابراین می‌توان هر ریشه مویین را یک لاین یا رخداد تراریخته مستقل در نظر گرفت. لذا برای بررسی فنوتیپ رشدی لاین‌های ریشه مویین، ۵ لاین تراریخته مستقل از هم انتخاب شدند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (داده‌ها نشان داده نشدند)، بین لاین‌های مختلف از نظر تولید زیست توده اختلاف آماری معنی‌دار ($P <$ ۰/۰۱) وجود داشت. در بین لاین‌های ریشه مویین، بیشترین و کمترین وزن تر متعلق به لاین‌های H و V (به ترتیب ۱٦/۱۷ gr و ۱۵/۸٦ gr در هر ml ۳۰ محیط کشت) و A (۹/۲۷ gr در هر ml ۳۰ محیط کشت) در انتهای هفته سوم بود، در حالیکه ریشه غیرتراریخته (شاهد) پس از ۳ هفته کمترین رشد و تجمع زیست توده (۵/۹۷ gr در هر ml ۳۰ محیط کشت) را نشان داد (شکل ۵). بالا بودن (تقریبا ۳ برابر) زیست توده تولید شده در ریشه-های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح شده نسبت به ریشه شاهد در یک محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد تأییدی دوباره بر مویین بودن این ریشه‌ها از لحاظ سریع الرشد بودن آنها است (شکل ٦).

[1] Plagiotropic growth



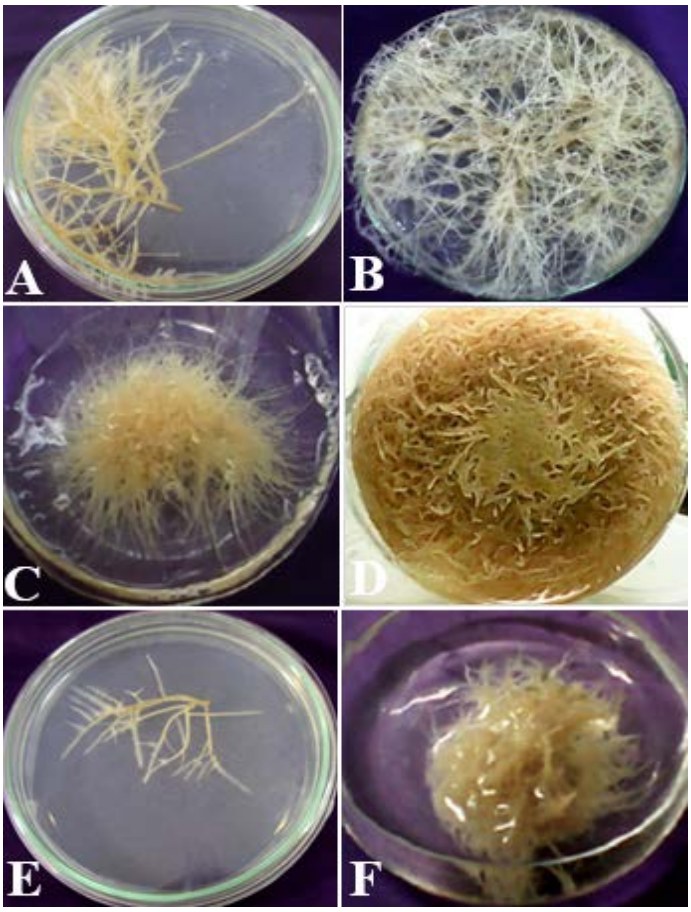
شکل ٤- الگوی PCR ریشه‌های مویین تراریخته گل میمونی بیابانی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*A-B. M: 1Kb DNA Ladder (Fermentas)، چاهک‌های ٦-۱: لاین‌های ریشه مویین حاصل از ریزنمونه‌های مختلف تراریخته، چاهک C^+: A. rhizogenes سویه A13 به عنوان شاهد مثبت، چاهک C^-: ریشه نابجای حاصل از ریزنمونه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی اول، چاهک ۷: واکنش PCR بدون DNA به عنوان شاهد منفی دوم.

Figure 4- PCR pattern of hairy roots of *Scrophularia deserti* using the *rol*A-B genes specific primers. M: 1 Kb DNA Ladder (Fermantas); Lane C^+: *A. rhizogenes* strain A13 as positive control; Lane C^-: Adventitious root raised form non-transformed explant as first negative control; Lanes 1-6: Transgenic hairy root lines raised from different transformed explants; Lane 7: Non-DNA template PCR reaction as second negative control.



شکل ٥- مقایسه میزان رشد بر اساس تجمع زیست توده تر در لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین (A, G, H, M, V) کشت شده در محیط کشت پایه MS مایع بدون تنظیم کننده رشد در یک دوره کشت سه هفته‌ای. Control: ریشه حاصل از ریزنمونه تلقیح نشده.

Figure 5- Comparison of growth rate on a fresh biomass accumulation basis in hairy root lines (A, G, H, M and V) cultured on liquid growth regulator-free MS basal medium over a 3-week growth period. Control: root raised from the non-transformed explant.



شکل ٦- استقرار ریشه‌های مویین تراریخته در محیط کشت مایع بدون تنظیم کننده رشد و تولید زیست توده. A و B: رشد ریشه مویین در محیط کشت MS جامد بدون تنظیم کننده رشد به ترتیب پس از ۱۰ و ۲۱ روز کشت و ایجاد وضعیت توری مانند به دلیل رشد پلاژیوتروپیک و درجه بالای انشعاب‌دهی، C و D: رشد نمایی ریشه‌های مویین در محیط کشت MS مایع بدون تنظیم کننده رشد به ترتیب پس از ١٤ و ۲۸ روز کشت. E: رشد بسیار کم ریشه نابجا القا شده از ریزنمونه تلقیح نیافته در محیط کشت جامد بدون تنظیم کننده رشد، F: رشد کم با انشعاب بسیار کم و تشکیل ساختار شبه کالوس در ریشه نابجای غیرتراریخته در محیط کشت MS مایع بدون تنظیم کننده رشد پس از ۲۸ روز کشت.

Figure 5- Establishment of hairy roots in growth regulator-free liquid medium and biomass production. A and B: Growth of hairy root on solid growth regulator-free MS medium after 10 and 21 days of culture, respectively and making a mesh-like structure due to its plagiotropic growth and high degree lateral of branching. C and D: Exponential growth of transgenic hairy roots in liquid growth regulator-free MS medium after 14 and 28 days of culture, respectively; E: Lowest growth rate in adventitious root, raised from non-transformed explant cultured on solid growth regulator-free MS medium; F: low growth with lower branching of the non-transformed root and formation of callus-like structure on liquid growth regulator-free MS medium after 28 days of culture.

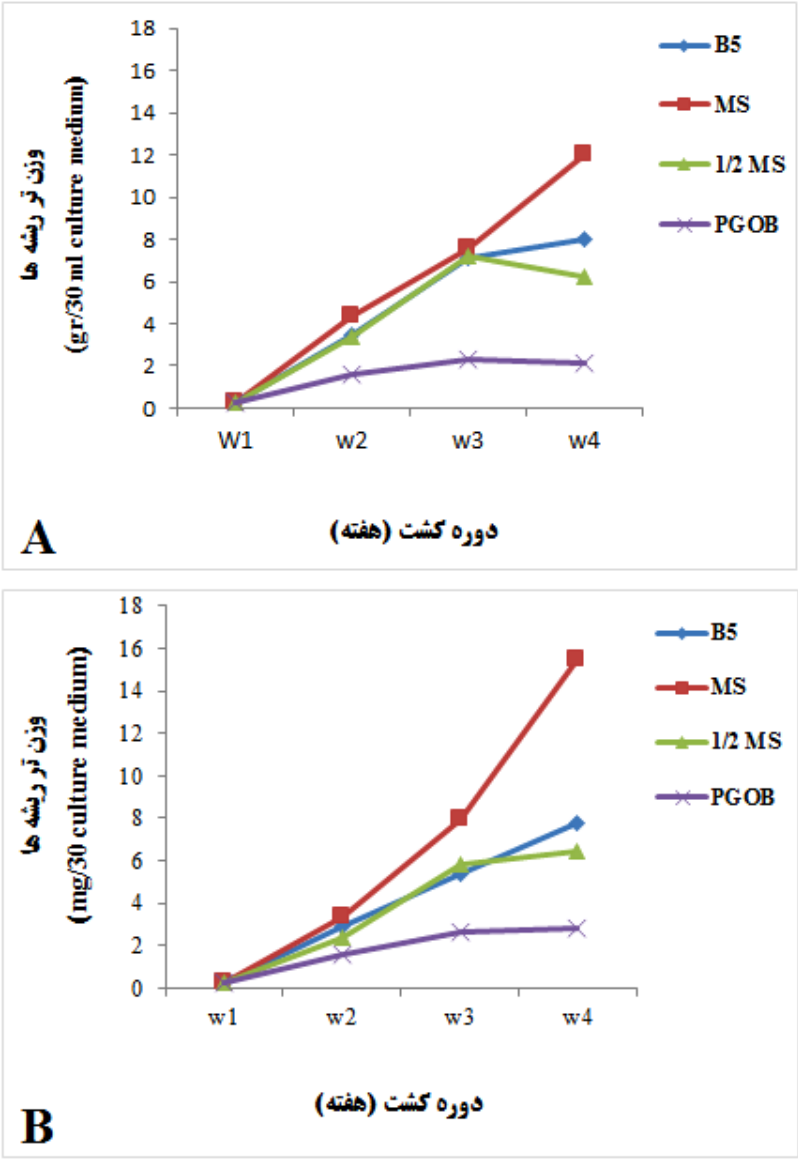
در مطالعه حاضر، لاین‌های مورد بررسی از نظر رشد و تجمع زیست‌توده تنوع معنی‌داری نشان دادند. تنوع در مورفولوژی و فنوتیپ رشدی ریشه‌های مویین ممکن است به دلیل بیان ژن‌های T-DNA در داخل ریشه‌های مویین، تعداد متفاوت کپی‌های T-DNA که منتقل می‌شوند و اثرات ادغام T-DNA در ژنوم میزبان باشد (Cho *et al.*, 1998). علاوه بر عوامل فوق الذکر، چنین تنوعی به میزان بیان ژن‌های *rol* نیز نسبت داده می‌شود، چرا که بیان این ژن‌ها، سطوح تنظیم کننده‌های اکسینی و سیتوکینینی درونی و یا میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطوح آنها را تغییر می‌دهد (Shen *et al.*, 1988). Mano و همکارن (1989) نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد، تجمع متابولیت‌های ثانویه و بازدهی ٤٥ لاین ریشه مویین گیاه *Duboisia leichhardtii* گزارش نمودند. Soleimani و همکاران (2012) در مقایسه لاین‌های ریشه مویین گیاه درمنه خزری، آنها را از نظر ویژگی رشدی به گروه‌هایی با انشعابات فراوان، سرعت رشد خوب و غیر کالوس‌زا و لاین‌های تولید کننده کالوس با سرعت رشد متفاوت تقسیم‌بندی کردند (Soleimani *et al.*, 2012).

تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر روی زیست-توده تر ریشه‌های مویین

دو لاین G و H از نظر میزان رشد در بین لاین‌های مختلف متمایز بودند. لذا این دو لاین علاوه بر محیط کشت پایه MS در محیط کشت-های مختلف طی ٤ هفته مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع محیط کشت و زمان تلقیح تاثیر معنی‌داری ($P <$ ۰/۰۱) بر تجمع زیست‌توده تر ریشه‌های مویین دارد (داده‌ها نشان داده نشدند). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر در لاین-های G و H (به ترتیب ۱۲ gr و ۱٦/۳۳ gr به ازای هر ۳۰ ml محیط کشت) در محیط کشت MS و کمترین زیست توده (۲/۱٤ gr برای لاین G و ۲/۸۰ gr برای لاین H) با استفاده از محیط کشت PG_{oB} در انتهای هفته چهارم مشاهده گردید (شکل ۷، A و B). محیط‌های کشت بر اساس میزان رشد و تولید زیست‌توده در لاین‌ها به صورت PG_{oB} < ½ MS < B5 < MS رتبه بندی شدند. به نظر می‌رسد تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت، تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد ریشه‌های مویین دارد و غلظت و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت در میزان رشد یک لاین ریشه مویین تاثیر به سزایی دارد. بنابراین، بهینه سازی محیط کشت به منظور رشد مطلوب و افزایش تجمع متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های مویین است بسیار حائز اهمیت است (Condori *et al.*, 2010; Shinde *et al.*, 2010). در این تحقیق، دو لاین G و H در ٤ نوع محیط کشت مختلف مورد بررسی قرار گرفت که محیط MS مناسب‌ترین محیط کشت برای افزایش زیست-توده در لاین‌های ریشه مویین بود. تحقیقات

گذشته حاکی از تأثیر بسیار مهم نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه به ویژه آلکالوییدها است (Wink, 1999). نوع قند موجود در محیط کشت و نسبت آن در مقایسه با ترکیبات نیتروژنه، اثر تعیین کننده‌ای بر میزان آلکالوییدها به ویژه تاکسوئید در کشت سلولی سرخدار داشت (Hirasuna *et al.*, 1996). به طور کلی نقش تعیین کننده ترکیبات نیتروژنه در افزایش متابولیت‌ها به حضور نیتروژن به عنوان مولکول اصلی در ترکیب اسیدهای آمینه و بعضی از متابولیت‌های حاصل از آنها نسبت داده می‌شود (Facchini *et al.*, 2001). در تحقیق حاضر هم وجود ارتباط مستقیم میان مقدار تجمع زیست-توده و ترکیبات نیتروژنه محیط کشت مشهود است و در بین محیط کشت‌های استفاده شده، محیط کشت‌های MS و B5 دارای بیشترین میزان نیتروژن (به ترتیب ۳۲/۵ و ۲٦/۸ میلی‌مولار) هستند و تأثیر قابل توجه آن‌ها بر میزان زیست-توده ریشه‌ها موید این موضوع است. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در آزمایشی طی مقایسه اثر سه نوع محیط کشت MS، B5 و LS بر میزان رشد ریشه‌های موئین در گیاه کاسنی، محیط کشت MS به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت معرفی گردید (Kabirnetaj *et al.*, 2012). در گیاه *Scrophularia buergeriana* Miquel از ٤ نوع محیط کشت مورد بررسی (MS, 1/2 MS, SH, 1/2 SH)، محیط MS ½ مناسب‌ترین محیط برای کشت ریشه‌های مویین گزارش شد (Park et al, 2010). مطالعات انجام شده در کشت ریشه مویین گیاه *Glycrrhiza glabra* نشان داد که از میان ٤ تیمار محیطی MS, NB, WP و B5، محیط کشت NB بیشترین تاثیر را بر سرعت رشد و در نتیجه وزن خشک آن داشته است (Mehrotra *et al.*, 2008). این تفاوت در نتایج را می‌توان به تفاوت در نوع ژنوتیپ گیاهی و تفاوت در نیازهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاه و همچنین نوع سویه باکتری مورد استفاده نسبت داد (Shakti *et al.*, 2008). تحقیق حاضر برای اولین بار القاء بهینه ریشه مویین در گیاه گل میمونی بیابانی را گزارش نمود. بر اساس نتایج حاصل، میزان القاء ریشه مویین بسته به سن و نوع ریزنمونه و مدت زمان تلقیح متفاوت بود. بیشترین میزان ریشه مویین در ریزنمونه‌های گیاهچه‌ای با سن ۱۸ روزه و مدت زمان تلقیح ۵ دقیقه‌ای حاصل شد. در بین لاین‌های ترایخته ریشه مویین، دو لاین H و G به عنوان بهترین لاین‌ها از نظر میران تجمع زیست‌توده در محیط کشت MS انتخاب شدند. در مطالعات بعدی این لاین‌ها می‌توانند برای بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه مهم این گیاه از طریق روش‌های زیست-فناورانه مانند استفاده از عوامل محرک[1] و یا دستکاری‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

[1] Elicitors



شکل ۷- اثر محیط‌های کشت مختلف بر تجمع زیست توده تر لاین‌های ریشه مویین تراریخته G و H کشت شده در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت مایع بدون تنظیم کننده رشد در یک دوره کشت ٤ هفته‌ای. A. لاین G، B: لاین H. میزان تجمع زیست توده به صورت وزن تر در هر ۳۰ میلی‌لیتر هر هفته طی یک دوره-ای ٤ هفته‌ای اندازه‌گیری شد.

Figure 7- Effect of different culture media (B5, PG_{oB}, ½ MS and MS) on accumulation of fresh biomass in transgenic hairy root lines G and H cultured on 30 ml liquid growth regulator-free medium over a 4-week growth period. Control: root raised from the non-transformed explant. A: Line A; B: Line H. Biomass accumulation was measured as free weight per 30 ml culture medium.

سپاسگزاری

از پژوهشکده علوم و زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم برای آنالیز PCR کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Ahmed B, Al-Rehaily AJ, Al-Howiriny TA, El-Sayed KA, Ahmad MS (2003). Scropolioside-D_2 and Harpagoside-B: two new iridoid glycosides from *Scrophularia deserti* and their antidiabetic and antiinflammatory activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin 26: 462–467.

Avish M, Jafari M, Maleki R (2014). Hairy root induction in the medicinal plant, *Scrophularia striata* Boiss. 1st International and 13th National Iranian Genetics Congress, May 24-26, Tehran, Iran.

Bahmani M, Ghorbani M, Momtaz H, Bahmani E, Rafieian M (2010). The comparison of the in vitro effects of *Scrophularia deserti* plant and amphotricin B on *Candida albicans*. Arak Medical University Journal 13: 15–21.

Bertani G (1952). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 62: 293–300.

Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y, Han T (2009). Assessment of condition affecting *Agrobacterium rhizogenes*–mediated transformation of soybean. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96: 45–52.

Cho HJ, Widholm JM, Tanaka N, Nakanishi Y, Murooka Y (1998). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus Sinicus* (Chinese milk). Plant Science 138: 53–65.

Condori J, Sivakumar G, Hubstenberger J, Dolan M, Sobolev V, Medina-Bolivar F (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoidsarachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage. Plant Physiology and Biochemistry 48: 310–318.

Facchini PJ (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 52: 29–66.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151–158.

Ghahreman A (2002). Colorful flora of Iran.Vol. 24, Farhang Moaser Publications, Tehran.

Giri A, Narasu L (2000). Transgenic hairy root: recent trends and applications. Biotechnology Advances 18: 1–22.

De Greef W, Jacobs M (1979). *In vitro* culture of the sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Science Letters 17: 55–61.

Hasanlu T, rezazadeh S, rahnama H (2008). Hairy roots sources for the production of valuable pharmaceutical compounds. Journal of Medicinal Plants 29: 1–17.

Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V, Shuler ML (1996). Taxol production in suspension cultures of Taxus baccata. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 95–102.

Ionkova I (2007). Biotechnological approaches for the production of Lignans. Pharmacognosy Reviews 1: 427–443.

Jafari M, Norouzi P, Malboobi MA, Ghareyazie B, Valizadeh M, Mohammadi SA, Mousavi M (2009). Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing Synthetic *cry1Ab* gene. Euphytica 165: 333–344.

Kabirnetaj S, Zolala J, Nematzadeh GA, Shokri E (2012). Optimization of hairy root cultue establishment in chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian journal of agricultural biotechnology 4: 61–75.

Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ (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: 175–178.

Lee MH, Yoon ES, Jeong JH, Choi YE (2004). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. Plant Cell Reports 22: 822–827.

Maleki S, Ghadimzadeh M, Jafari M, Bernousi I (2011). Direct shoot regeneration from stem nodal explants of two wild *Medicago* species- *Medicago scutellata* and *Medicago rigidula*. Australian Journal of Crop Science 5: 668–673.

Mano Y, Ohkawa H, Yamada Y (1989). Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Science 59: 191–201.

Mehrotra S, Kukreja A, Khanuja SPS, Mishra BN (2008). Genetic transformation studies and scal up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology 11: 1–6.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum 15: 473–476.

Park SU, Li X, Eom SH, Lee CY, Lee SY (2010). E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. Archives of Biological Sciences Belgrade 62: 649–652.

Pirian K, Piri K (2012). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3: 213–218.

Reddy CS, Praveena CH, Veeresham C (2012). Strategies to improve the production of Forskolin from hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq. Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology 5: 1720–1726.

Samadi A, Carapetian J, Heidari R, Jafari M, Hassanzadeh Gorttapeh A (2012). Hairy Root Induction in *Linum mucronatum* ssp. *mucronatum*, an Anti-Tumor Lignans Producing Plant. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 40: 125–131.

Shakti M, Arun KK, Suman P, Singh K, Bhartendu NM (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology 11: 1–7.

Shen WH, Peti A, Guern J, Tempe J (1988). Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 3417–3421.

Shinde A, Malpathak N, Fulzele D (2010). Impact of nutrient components onproduction of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. Journal of Natural Medicines 64: 346–353.

Srivastava S, Srivastava AK (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology 27: 29-43.

Soleimani T, Keyhanfar M, Piri KH, Hasanloo T (2012). Hairy Root Induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). Journal of Medicinal Plants.

Tomilov A, Tomilova N, Yoder JI (2007). *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic-plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. Planta 225: 1059-1071.

Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH (2011). Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Pesquisa

Agropecuaria Brasileira 46: 1070-1075.

Wink M (1999). Biochemistry of Plant Secondary Product Metabolism. CRC Press, USA. pp: 1- 16.

Yan Q, Hu Z, Tan XR, Wu J (2005). Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. Journal of Biotechnology 119: 416–424.

Zarei B, Kahrizi D, Mousavi SA, Nasrollahnezhad Ghomi AA (2013) *Agrobacterium rhizogense* - mediated transformation of *Atropa belladonna*. Iranian journal of agricultural biotechnology 5: 59–68.

Optimization of induction and culture conditions of transgenic hairy roots in the medicinal plant *Scrophularia deserti*

Ebrahimi R.[1], Jafari M.[2*], Ghadimzadeh M.[2], Abdollahi Mandoulakani B.[2]

[1]MSc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Nazloo Campus, P.O.Box: 165, Urmia, Iran.
[2]Assoc. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Nazloo Campus, P.O.Box: 165, Urmia, Iran.

Abstract

Scrophularia deserti is an important medicinal plant belonging to the Scrophulariaceae family. Research has demonstrated that extracts of the plant have antidiabetic and anticancer effects. This species is a valuable source of biologically active compounds, specially iridoid glycosides and flavonoids. Hairy root system can be used for the *in vitro* production of pharmaceutically valuable compounds. In this research, transgenic hairy root induction was established through the mediation of the A13 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. The effects of various explants (seedling without radicle, cotyledon and leaf) prepared from *in vitro* grown plants at different ages (10, 18, 25, 50 and 72-day old) and three different inoculation times (5, 15 and 30 min) on the efficiency of hairy root induction were investigated. The maximum hairy roots (22.33 roots per explant) induced from 18-day-old seedlings explants inoculated with bacterial suspension for 5 min. The transgenic status of hairy roots was confirmed by PCR using *rol*A and *rol*B genes-specific primers. Four different culture media (MS, half strength MS, B5 and PG_{oB}) were used to determine the best suitable media composition for the optimum cell growth of two hairy root lines (G and H). The results revealed that MS medium was superior for growth and high biomass production of hairy roots . Hairy root line H showed maximum biomass production (16.33 mg/30 ml culture medium, in terms of fresh weight) after 4 weeks of culture. Hairy root lines developed in this study can be used to investigate the production of pharmaceutically important metabolites of *S. deserti*.

Keywords: *Scrophularia deserti, transgenic hairy root, explant, culture medium.*

* Corresponding Author: Jafari M. Tel: 04431943149 Email: m.jafari@urmia.ac.ir