

## Assessment of hairy roots induction in *Echium khuzistanicum* by different strains of *Agrobacterium rhizogenes*

### Samira Mohammadi

PhD student, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Tel: +989350615355, Email: [s1mir1mohammadi@gmail.com](mailto:s1mir1mohammadi@gmail.com)

### Raheem Haddad

\*Corresponding Author, Associate Professor, Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, IR of Iran. POBox 34149-16818. Tel: +982833901242, Email: [r.haddad@Eng.ikiu.ac.ir](mailto:r.haddad@Eng.ikiu.ac.ir)

### Vahid Shariati

Faculty member of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. Iran. Tel: +989136002347, Email: [v.shariati@nigeb.ac.ir](mailto:v.shariati@nigeb.ac.ir)

### Abstract

#### Objective

In this study for the first time, different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, co-cultivation times, and concentrations of acetosyringon in leaf explants of *Echium khuzistanicum* were examined to produce hairy roots.

#### Materials and methods

The leaves of 21-day-old plant, different concentrations of acetosyringone (0,100,200  $\mu$ M) and 3 strains of *Agrobacterium* (A4, ATCC15834 and 11325) were used for hairy root induction. In each explant, surficial wounds were created by a syringe contaminated with the bacterium and put for 10 minutes in bacterial suspension. After infection, the explants were transferred in the  $\frac{1}{2}$  MS solid medium supplemented with ascorbic acid (100 mg/L) to a light free growth chamber with 25 ° C temperature for 48 or 72 hours. PCR technique was used to confirm transformation by gene amplification with the *rolB* primers. HPLC analysis was conducted on a high performance liquid chromatography system for shikonin measurement.

## Results

The results of this study showed that, the first hairy roots emerged from wounded places after 14-21 days. The presence of *A. rhizogenes* T-DNA in the hairy root genome was confirmed by PCR using specific primers for *rolB* gene. Strain ATCC15834 had the highest rate of hairy root induction at 100 and 200  $\mu$ M concentrations of acetosyringone indicating that the phenolic compound, acetosyringone, was effective in increasing hairy root induction. Generally, High concentrations of acetosyringone and more co-cultivation time together resulted in a significant increase in the hairy root induction in three strains of *Agrobacterium rhizogenesis*. Line 1 of hairy root produced  $254.4 \pm 0.56$   $\mu$ g/g FW of shikonin.

## Conclusions

For the first time the results of this research showed that transformation and hairy root induction in *E.khuzistanicum* is possible by *Agrobacterium rhizogenes* and it can be used in the gene transfer and hairy root culture in order to shikonin production.

**Keywords:** *Echium khuzistanicum*, Medicinal plants, Secondary metabolite, shikonin.

**Citation:** Mohammadi S, Haddad R, Shariati V (2020) Assessment of hairy roots induction in *Echium khuzistanicum* by different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 63-80.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 63-80.

DOI: 10.22103/jab.2020.14131.1137

Received: June 9, 2019; Accepted: February 26, 2020.

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

## القای ریشه‌های موپین به کمک *Agrobacterium rhizogenes* در گیاه دارویی

### گل گاوزبان خوزستانی (*Echium khuzistanicum*)

#### سمیرا محمدی

دانشجوی دوره دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران. تلفن: ۰۹۳۵۰۶۱۵۳۵۵، ایمیل: [s1mir1mohammadi@gmail.com](mailto:s1mir1mohammadi@gmail.com)

#### رحیم حداد

\*نویسنده مسئول، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران. تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۲۴۲، ایمیل: [r.haddad@Eng.ikiu.ac.ir](mailto:r.haddad@Eng.ikiu.ac.ir)

#### وحید شریعتی

استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۶۰۰۲۳۴۷، ایمیل: [v.shariati@nigeb.ac.ir](mailto:v.shariati@nigeb.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۷

#### چکیده

**هدف:** در پژوهش حاضر برای اولین بار تاثیر سویه‌های مختلف باکتری، زمان هم‌کشتی و غلظت‌های مختلف استوسرینگون برای تولید ریشه‌های موپین در گیاه گل‌گاوزبان خوزستانی بررسی شد.

**روش:** برگ‌های گیاه ۲۱ روزه و سه غلظت مختلف استوسرینگون (0، 100 و 200  $\mu\text{M}$ ) و سه سویه باکتری اگروباکتریوم رایزوترنز (A4، ATCC15834 و 11325) در دو زمان هم‌کشتی ۴۸ و ۷۲ ساعت برای القای ریشه موپین استفاده شدند. در هر ریزنمونه، زخم‌های سطحی با سرنگ آغشته به باکتری ایجاد شد. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS 1/2 جامد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک منتقل و به مدت ۴۸ یا ۷۲ ساعت در اتاق رشد نگه‌داری شدند. از تکنیک PCR برای تایید تریاریختی ریشه‌های موپین با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *rolB* استفاده شد. اندازه گیری شیکونین بر مبنای سیستم کروماتوگرافی مایع با توان بالا انجام شد.

**یافته‌ها:** اولین ریشه‌های مویین از محل‌های زخمی برگ پس از ۱۴ تا ۲۱ روز ظاهر شدند. وجود T-DNA آگروباکتریوم در ژنوم ریشه‌های مویین با تکنیک PCR و استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rolB* تأیید شد. سویه ATCC15834 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون بیشترین میزان القای ریشه مویین را داشت، که نشان می‌دهد ترکیبات فنلی مثل استوسرینگون در افزایش القای ریشه مویین مؤثر است. به طور کلی، افزایش زمان هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون با یکدیگر منجر به افزایش القای ریشه مویین توسط هر سه سویه باکتری شد. بیشترین میزان تولید شیکونین در ریشه مویین با فنول کمتر و به میزان  $254.4 \pm 0.56 \mu\text{g/g FW}$  بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان می‌دهد که تراریختی و القا ریشه‌های مویین در گیاه گل‌گاوزبان خوزستانی *E. khuzistanicum* توسط *Agrobacterium rhizogenes* امکان‌پذیر بوده و می‌تواند در تحقیقات انتقال ژن و کشت ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت با ارزش شیکونین مورد استفاده قرار گیرد. **واژه‌های کلیدی:** گل‌گاوزبان خوزستانی، گیاهان دارویی، شیکونین، متابولیت ثانویه.

#### مقدمه

گل‌گاوزبان خوزستانی (*Echium khuzistanicum*)، گیاهی دوساله از خانواده بوراژیناسه است. این گونه گیاهی انحصاری ایران و نمونه تیپ از خوزستان است که در جنوب غرب ایران پراکنده شده است (Mozaffarian 1994). اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی (Mohammadi et al. 2019) و ضدقارچی برای این گیاه گزارش شده است (Mohammadi & Piri 2014). در ریشه حداقل ۱۵۰ گونه از تیره گاوزبانیان رنگدانه‌های نفتوکونینون مثل مشتقات آلکانین و شیکونین وجود دارد. شیکونین رنگدانه قرمز رنگی است که نقش مؤثر آن در درمان چاقی (Gwon et al. 2011; Lee et al. 2015)، زخم روده (Andujar et al. 2013)، بیماری‌های پوستی (Fan et al. 2015; Deng et al. 2013; Yang et al. 2014; Zhang et al. 2011)، انواع سرطان (Chen et al. 2003) تأیید شده است. پاپاگورجیو (۱۹۹۹) شیکونین و مشتقات آن را به‌عنوان یک عامل بهبود دهنده زخم معرفی کرد. داروی این ترکیب با نام تجاری HELIXDERM و به‌صورت فیلم، ژل و اسپری وجود دارد (Papageorgiou et al. 1999). روش‌های شیمیایی برای سنتز شیکونین وجود دارد ولی منبع اصلی این

ترکیب، گیاهان خانواده‌ی بوراژیناسه است. از جمله این گیاهان که مطالعات مختلفی برای افزایش میزان شیکونین در آن‌ها انجام شده است می‌توان *Lithospermum erythrorhizon*، *Arnebia euchroma* و *Alkanna tinctoria* را نام برد (Kim et al. 2012). در چند دهه اخیر، کشت ریشه‌های مویین از طریق تراریختی به واسطه *A. rhizogenes* به عنوان منبع زیستی فوق‌العاده‌ای برای ترکیبات فیتوشیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. ریشه مویین سرعت رشد بالا بدون استفاده از هورمون‌های گیاهی و پایداری ژنتیکی بالایی دارد. کشت ریشه‌های مویین دارای قابلیت تولید متابولیت ثانویه بالایی نسبت به ریشه‌های طبیعی گیاه است و در مقایسه با کشت سلول غیر تمایز یافته ترکیبات فعال بیشتری را تولید می‌کنند (Sevon & Oksman-Caldentey 2002). عوامل مختلفی مثل دما، محیط کشت، اسیدیته، نوع ریزنمونه گیاهی، سویه باکتری و ترکیبات فنلی مثل استوسرینگون، میزان تراریختی به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Porter & Hector 1991; Sevón & Oksman-Caldentey 2002).

استوسرینگون ترکیبی فنلی است که به صورت برون‌زا به منظور افزایش میزان تراریختی استفاده می‌شود. این ترکیب نقش مهمی در القا و شیمیوتاکسی باکتری‌ها دارد، از همین رو کاربرد این ماده افزایش نرخ تراریختی را به همراه خواهد داشت (Kimura & Isobe 2018). ریشه‌های مویین تراریخته در گیاهان دارویی مختلف از جمله *Salvia*، *Atropa*، *Linum mucronatum* ssp. *Cichorium intybus*، *multiorrhiza* (Samadi et al. 2012)، *belladonna* (Zarei et al. 2013) و در جنس *Scrophularia* در گونه‌های *striata* و *buergeriana* (Park et al. 2010) تولید شده است. در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط القای ریشه‌های مویین از طریق انتخاب سویه مناسب باکتری، زمان هم‌کشتی و غلظت‌های مختلف استوسرینگون در گیاه گل‌گاوزبان خوزستانی به‌عنوان اولین گام مؤثر در کشت ریشه‌های مویین این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**باکتری:** سه سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز (A4، ATCC15834 و 11325) در محیط کشت جامد LB کشت و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز نگهداری شد. پس از رشد تک کلونی‌ها، با لوب استریل یکی از تک کلونی‌ها را در محیط کشت مایع LB با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپسین (داروسازی حکیم، ایران) کشت و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت یک شبانه روز نگهداری شد. قبل از آلوده کردن برگ با باکتری، سلول‌های باکتری به کمک سانتریفیوژ با سرعت  $3000 \times g$  به مدت ده دقیقه رسوب داده

شد. پس از دور ریختن محلول رویی، محیط کشت MS ½ دارای غلظت‌های مختلف استوسرینگون (0، 100 و 1000 μM) (200) (USA, Sigma-Aldrich) به رسوب باکتری اضافه شد و OD محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۵ تا ۱ تنظیم گردید (Brijwal & Tamta 2015).

**مواد گیاهی و القا ریشه مویین:** بذر گل گاوزبان خوزستانی از منطقه الحای اطراف اهواز در استان خوزستان جمع-آوری شد. بذرها ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ (V/V) و ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد رقیق شده در آب (V/V) قرار داده شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از آبیگری به کمک کاغذ صافی استریل، بذرها به محیط کشت MS ½ جامد و اتاق رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برگ‌های گیاه ۲۱ روزه برای القا استفاده شد. در هر ریز نمونه، زخم‌های سطحی با سرنگ آغشته به باکتری ایجاد شد (Balasubramanian et al. 2011). سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS ½ جامد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک منتقل و به مدت ۴۸ یا ۷۲ ساعت در اتاق رشد نگهداری شدند. پس از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS ½ جامد دارای ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم برای حذف باکتری منتقل شدند (Thwe et al. 2016). برای اطمینان از حذف باکتری، ریشه‌های مویین در محیط مایع بدون سفاتوکسیم به مدت یک ماه کشت داده شدند (Kumar et al. 2006). زمانی که رشد ریشه‌ها به حد مطلوب رسید به محیط M9 منتقل تا میزان تولید متابولیت ثانویه شیکونین در آنها افزایش یابد. ریشه‌ها را به مدت یک هفته در محیط M9 قرار داده تا ریشه‌ها رنگی مایل به قرمز پیدا کنند (Tabata et al. 1974).

**تأیید تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):** پس از اطمینان از حذف باکتری در ریشه‌های مویین تولید شده، استخراج DNA به روش کای و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد (Cai et al. 1997). استخراج DNA از باکتری به روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد (Sambrook & Russell 2001). تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر روی ریشه‌های مویین با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *rolB*، به منظور تأیید تراریختی استفاده شد. از دستگاه ترموسیکلر مدل اپندروف آمریکا و با برنامه ایی ۳۰ چرخه‌ای که ابتدا در آن رشته‌های DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ذوب شدند و در هر چرخه یک دقیقه ذوب در دمای ۹۴ درجه، یک دقیقه اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه و یک دقیقه گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه برای تکثیر استفاده شد. توالی آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *rolB* ساخت شرکت سینا ژن به صورت زیر بود.

Reverse primer TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3'-5'

Forward primer ATGGATCCCAAATTGCTATCCCCACGA-3'-5'

**استخراج شیکونین:** استخراج شیکونین با دستگاه اولتراسونیک (Elmasonic, 30H) و به روش چاودری و پاول (۲۰۱۰) انجام شد (Chaudhury & Pal 2010). ریشه‌های مویین به کمک نیتروژن مایع در هاون پودر شده، سپس کلروفرم به ریشه‌های پودر شده اضافه (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. از سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ g برای رسوب ذرات بزرگ استفاده شد. محلول رویی تا زمان اندازه‌گیری میزان شیکونین با HPLC در فریزر نگهداری شد.

**اندازه‌گیری شیکونین به کمک HPLC:** از دستگاه HPLC (Waters, MA, USA) برای اندازه‌گیری شیکونین استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول استخراج به درون ستون کروماتوگرافی Symmetry C-18 تزریق شد. جداسازی ترکیبات محلول به کمک دو حلال برای تفکیک بهتر مشتقات شیکونین انجام شد. حلال اول شامل آب/متانول ۹۵:۵ (V/V) و حلال دوم استونیتریل/متانول ۵۰:۵۰ (V/V) و برنامه تغییر جریان حلال با گذشت زمان مطابق با جدول ۱ بود. برای تجزیه نمونه‌ها از طول موج جذبی ۲۴۵ نانومتر استفاده شد. با مقایسه زمان بازداری و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه استاندارد شیکونین خالص (۹۸٪ خلوص، Sigma-Aldrich)، مقدار شیکونین سنجیده شد. زمان بازداری برای استاندارد شیکونین ۱۰ دقیقه و ۳۵ ثانیه بود.

**اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:** در این پژوهش محتوای فنل تام با استفاده از واکنش گر فولین سیوکالتو سنجیده شد. به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، یک میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو ۱ نرمال اضافه و سپس ۵/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. بعد از ۳ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد به محلول واکنش اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. میزان جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Singleton & Rossi 1965). مقدار فنل اندازه‌گیری شده، به روش فولین سیوکالتو بر حسب میکروگرم اسیدگالیک بر میلی‌گرم عصاره خشک گیاه بر اساس معادله خط منحنی استاندارد ( $y=0.0012x-0.0034$ ) و ضریب تشخیص  $R^2 = 0.9877$  محاسبه شد.

## جدول ۱. برنامه زمانی ترکیب حلال‌های HPLC برای کمی سنجی شیکونین

**Table 1. The programmed flow elution of HPLC for the quantification of Shikonin**

شماره	جریان بازگشت (میلی لیتر/دقیقه)	زمان (دقیقه)	درصد حلال اول	درصد حلال دوم
No	Flow (ml/min)	Time (min)	A Solvent%	B Solvent %
1	1	-	100	0
2	1	6	30	70
3	1	12	5	95
4	1	18	95	5

### روش آماری

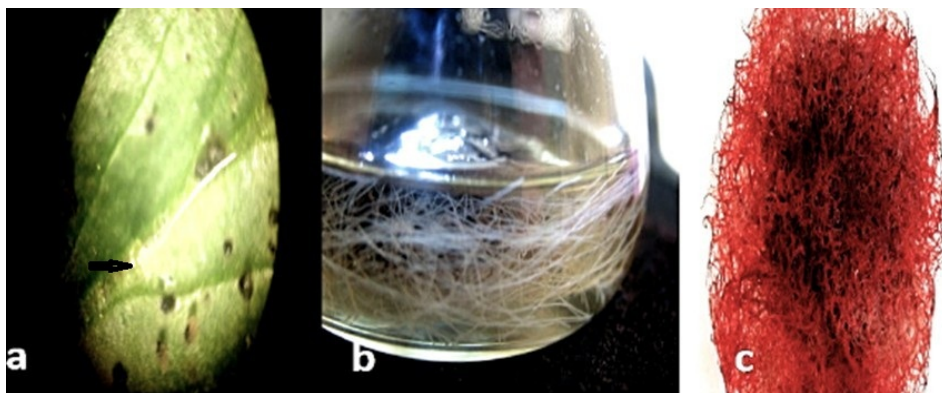
ریز نمونه‌هایی که با باکتری تلقیح نشده بودند به منزله شاهد در نظر گرفته شدند. آزمایش القای ریشه موئین به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور سویه باکتری (A4، ATCC15834 و 11325)، زمان هم‌کشتی (۴۸ و ۷۲ ساعت) و غلظت‌های مختلف استوسرینگون (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم) به کمک نرم‌افزار SPSS v21 برای القای ریشه موئین آنالیز شدند. مقایسه میزان تولید فنل و شیکونین به صورت طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه شدند.

### نتایج و بحث

**اثر سویه‌های مختلف باکتری، زمان هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون روی القای ریشه موئین:** اولین ریشه‌های موئین، از محل‌های زخمی برگ، پس از ۱۴ تا ۲۱ روز ظاهر شدند (شکل ۱-a). درحالی‌که ریشه‌های غیر تراریخت از انتهای ریزنمونه و پس از ۵ روز شروع به رشد کردند. پس از کشت ریشه موئین در محیط مایع بدون سفاتوکسیم، هیچ آلودگی



باکتریایی دیده نشد. در محیط مایع سرعت رشد ریشه‌های موئین نسبت به ریشه طبیعی بیشتر بود و انشعابات بیشتری تولید کرد (شکل ۱-b). پس از انتقال ریشه موئین به محیط کشت M9 رنگدانه شیکونین تولید شد (شکل ۱-C).



شکل ۱. a توسعه ریشه‌های موئین از محل زخمی بافت برگ؛ b توسعه انشعابات ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع؛ c تولید شیکونین در ریشه موئین پس از انتقال به محیط کشت M9

**Figure 1. a: Development of the hairy root from the wounded site of the leaf b: Branching growth of the hairy root on the liquid medium c: Shikonin production in hairy root after transferring to M9 medium**

مشابه با گروه کنترل، سویه‌های ۱۱۳۲۵ و A4 در زمان هم کشتی ۴۸ ساعت و بدون استوسرینگون، هیچ ریشه موئینی تولید نکردند. لاین‌های ریشه موئین از محل‌های زخمی شده برگ بر اساس سرعت رشد و میزان انشعابات جانبی و نبود زمین‌گرایی انتخاب شدند. تراریختی ریشه موئین به کمک PCR تأیید شد. با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر متقابل دوگانه سویه باکتری با غلظت استوسرینگون بسیار معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سویه ATCC15834 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون بیشترین میزان القای ریشه موئین را داشت که به ترتیب برابر با  $86 \pm 0.16$  و  $96 \pm 0.08$  درصد می‌باشد که نشان می‌دهد ترکیب فنلی استوسرینگون، در افزایش قدرت بیماری‌زایی سویه ATCC15834 و القای ریشه موئین مؤثر است. القا ریشه موئین در نبود این ترکیب برای سویه ATCC15834 کم و برابر با  $60 \pm 0.17$  درصد بود (شکل ۲). غلظت استوسرینگون و نوع سویه باکتری با هم در میزان القای ریشه موئین تأثیر دارند (شکل ۲).

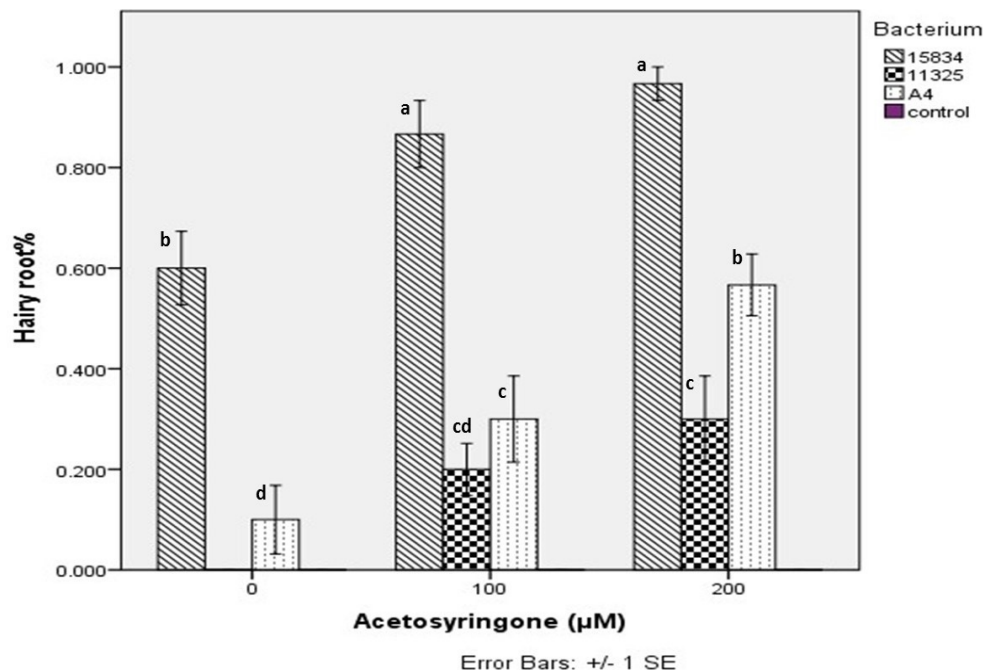
جدول ۲. جدول تجزیه واریانس سویه باکتری و زمان هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون بر القای ریشه

مویین

**Table 2. ANOVA analysis of different strains of agrobacterium and co-cultivation times and concentrations of acetosyringone on hairy root induction**

میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (Source of Variation)
2.202**	3	سویه باکتری (Bacterium)
0.29**	1	زمان هم‌کشتی (Co-cultivation time)
0.48**	2	غلظت استوسرینگون (Acetosyringone)
0.66**	6	اثر متقابل سویه باکتری و غلظت استوسرینگون Acetosyringone * Bacterium
0.002	2	اثر متقابل زمان هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون Acetosyringone * Co-cultivation time
0.046		اثر متقابل سویه باکتری و زمان هم‌کشتی Bacterium * Co-cultivation time
0.013	6	اثر متقابل سویه باکتری و غلظت استوسرینگون و زمان هم‌کشتی Bacterium*Acetosyringone*Co- cultivation time
0.012	48	خطا (Error)
-	71	کل (Total)

\*\* معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف استوسرینگون و سویه‌های مختلف باکتری بر القا ریشه‌های موپین

Figure 2. Effect of acetosyringone concentrations and different strains of agrobacterium on hairy root induction

تأیید تراریختی ریشه‌های موپین با PCR: همان‌طور که انتظار می‌رفت، در آزمون PCR قطعه‌هایی با طول ۷۵۰

جفت باز که مطابق با اندازه ژن *rolB* بود در لاین‌های تراریخت تکثیر شد که با نمونه کنترل مثبت مطابقت داشت (شکل ۳).

تولید شیکونین: تولید شیکونین در ۳ لاین تراریخت ریشه موپین با ریشه‌های غیر تراریخت به صورت طرح کاملاً

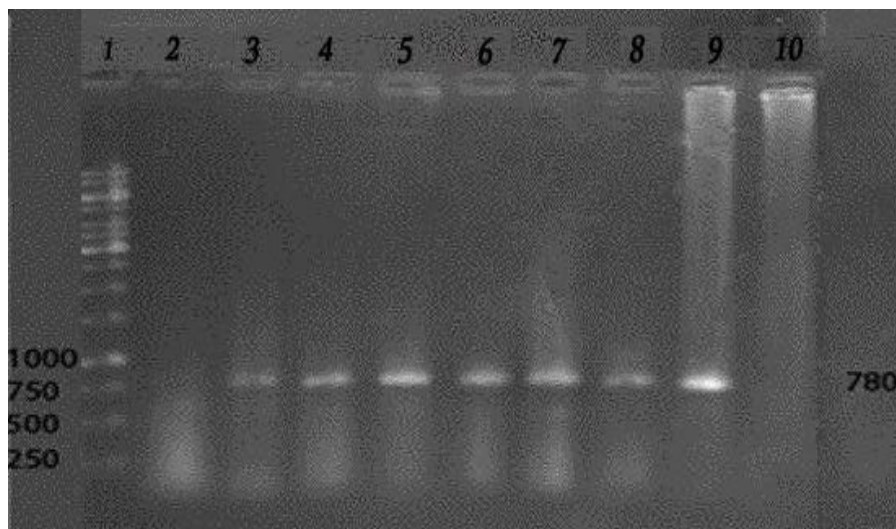
تصادفی مقایسه شد. ریشه‌های غیر تراریخت قابلیت تولید شیکونین را نداشتند و همچنین تولید شیکونین در ریشه موپین تنها پس

از انتقال به محیط کشت M9 آغاز شد. لاین ۱ ریشه موپین بیشترین میزان شیکونین را که معادل  $254.4 \pm 0.56 \mu\text{g/g FW}$

بود تولید کرد و پس از آن لاین‌های ۲ و ۳ به ترتیب با  $134.07 \pm 0.22$  و  $23.60 \pm 0.42 \mu\text{g/g FW}$  بیشترین میزان تولید

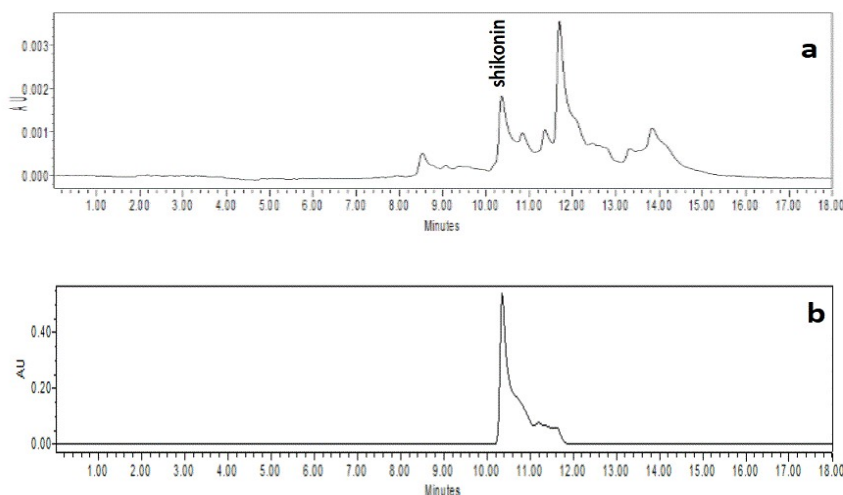
شیکونین را به خود اختصاص دادند. شکل ۴ طیف‌های حاصل از کروماتوگرافی HPLC برای محتوای شیکونین در ریشه‌های

موپین و استاندارد شیکونین را نشان می‌دهد.



شکل ۳. تصویر ژل الکتروفورز آگارز حاصل از تکثیر ژن *rolB*. چاهک ۱: نشانگر مولکولی با اندازه ۱۰۰۰۰ جفت باز؛ چاهک ۲: کنترل منفی؛ چاهک ۳ تا ۸: DNA استخراج شده از ریشه مویین نمونه‌های ترانسژنیک؛ چاهک ۹: DNA استخراج شده از باکتری؛ چاهک ۱۰: DNA استخراج شده از ریشه

Figure 3. Agarose gel electrophoresis analysis of *rolB* gene. Lane 1: 10000 bp ladder, Lane 2: Negative control , Lane 3- 8: Hairy root DNA, Lane 9: Bacterial DNA, Lane 10: Root DNA



شکل ۴. کروماتوگرافی HPLC برای محتوای شیکونین. a: لاین ۱ ریشه مویین؛ b: استاندارد شیکونین  
**Figure 4. HPLC chromatogram of shikonin in the line 1 of the hairy root (a) and the standard shikonin (b)**

**محتوای فنل:** نتایج نشان داد که ریشه‌های مویین مقدار بالایی از فنل تولید کرده و سیاه‌رنگ می‌شوند و در غیاب آسکوربیک اسید از بین می‌روند. بیشترین میزان تولید این ماده مربوط به لاین ۳ ریشه مویین و برابر با  $230/33 \pm 7/9$  میکروگرم گالیک اسید/میلی‌گرم عصاره استخراجی می‌باشد. میزان فنل در لاین ۱ و ۲ ریشه مویین به ترتیب برابر با  $117/79 \pm 5/6$  و  $125/1 \pm 55$  میکروگرم گالیک اسید/میلی‌گرم عصاره استخراجی بود.

عوامل مختلفی در افزایش القا ریشه مویین دخیل هستند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها نوع سویه و خاصیت بیماری‌زایی باکتری است. تفاوت در پلاسمید باکتری‌ها، منشأ اختلاف قدرت بیماری‌زایی باکتری‌ها به شمار می‌رود و این موضوع ارتباطی با وضعیت تاکسونومیکی بین میزبان گیاهی و سویه باکتریایی ندارد (Young et al. 2015). میزان بیماری‌زایی سویه‌های باکتری *A. rhizogenes* در برخی از پژوهش‌های پیشین با نتایج مطالعه ما تطابق دارد، به طوری که قدرت بیماری‌زایی برای سویه‌های باکتریایی:  $K47 = K599 = HRI > TR105 > 15834 > A4 > 1855 > 2655 > TR101 > 8196 > 232 >$  تفاوت معنی‌داری در قابلیت تراریختی سویه‌های مختلف باکتریایی وجود دارد. سویه ATCC11325 در آزمایش‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است اما این باکتری توانایی بیماری‌زایی متوسطی دارد. این در حالی است که سویه‌های A4 و ATCC15834 بیشترین میزان بیماری‌زایی را

نشان داده‌اند (Porter & Hector 1991). با مقایسه پلاسמידهای سه سویه باکتری استفاده شده در مطالعه حاضر، تفاوت در بیماری‌زایی این سه را می‌توان به تفاوت در ژنوم آن‌ها منتسب نمود، اما متأسفانه اطلاعات کافی برای اثبات این موضوع در پایگاه‌های داده، وجود ندارد. در همین راستا، بررسی مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ژن‌هایی که در هنگام حمله باکتری، در ژنوم گیاه درج نمی‌شوند، نیز نقش مهمی در بیماری‌زایی پلاسמידها بر عهده دارند (Sevón & Oksman-Caldentey 2002).

با توجه به اینکه اتصال باکتری، انتقال T-DNA و درج محتوای ژنتیکی خارجی به ژنوم گیاهی در مرحله هم‌کشتی رخ می‌دهد، از این‌رو زمان هم‌کشتی یکی از مهم‌ترین عوامل در تراریختی توسط رایزوزنز به شمار می‌رود. زمان ناکافی برای هم‌کشتی، انتقال ماده ژنتیکی به گیاه و تکمیل فرآیند تراریختی، توسط باکتری را با محدودیت جدی مواجه می‌سازد (Balasubramanian et al. 2018). عوامل مختلف و متعددی درصد تراریختی را دستخوش تغییر قرار می‌دهند، اما در گیاه مورد مطالعه ما استفاده از سویه باکتری ATCC15834، اعمال تیمار استوسرینگون با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، بیشترین میزان درصد تراریختی را به همراه داشت. در مطالعات پیشین نیز قدرت بیماری‌زایی بالای سویه ATCC15834 و نقش ترکیب استوسرینگون در افزایش میزان تراریختی گزارش شده‌است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد (Kimura & Isobe 2018).

احتمالاً تولید ترکیبات فنلی و اکسیداسیون این ترکیبات، سرعت رشد و همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هرچند مسیر بیوستز ترکیبات فنلی و شیکونین کاملاً مستقل از هم می‌باشند، با این وجود کاهش ترکیبات فنلی از طریق کاهش سیاه شدن ریشه‌ها و افزایش زنده‌مانی ریشه‌های مویین احتمالاً منجر به افزایش تولید شیکونین می‌شود. از سوی دیگر بررسی منابع نشان داد که هم‌افزایی اثر ژن *rolA* و *rolB* منجر به افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Bulgakov et al. 2008).

**نتیجه‌گیری:** در تحقیق حاضر برای اولین بار، *Echium khuzistanicum* به‌عنوان منبع جدید تولید شیکونین معرفی شد که صحت آن نیز با آنالیز کروماتوگرافی به روش HPLC مورد تأیید قرار گرفت. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که ریشه‌های مویین *Echium khuzistanicum* با استفاده از سویه باکتری ATCC15834، اعمال تیمار استوسرینگون با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، بیشترین میزان درصد تراریختی را به همراه داشت. میزان تولید ترکیبات فنلی و متابولیت ثانویه شیکونین در ریشه مویین بیشتر از ریشه‌های طبیعی بود از این‌رو با توجه به اهمیت ترکیب شیکونین در پزشکی، بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط رشد ریشه‌های مویین می‌تواند در بهره‌وری هر چه بیشتر این محصول مؤثر باشد.

## References

- Andujar I, Rios JL, Giner RM et al. (2013) Shikonin promotes intestinal wound healing in vitro via induction of TGF-beta release in IEC-18 cells. *Eur J Pharm Sci* 49, 637-41.
- Balasubramanian M, Anbumegala M, Surendran R et al. (2018) Elite hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids. *3 Biotech* 8, 128.
- Balasubramanian A, Venkatachalam R, Selvakesavan KR et al. (2011) Optimisation of methods for *Agrobacterium rhizogenes* mediated generation of composite plants in *Eucalyptus camaldulensis*. *BMC Proc* 5, O45.
- Brijwal L, Tamta S (2015) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus* 4, 443.
- Chen X, Yang L, Zhang N et al. (2003) Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Anti Agents Chem* 47, 2810-6.
- Deng C, Zheng J, Wan W et al. (2013) Suppression of cell proliferation and collagen production in cultured human hypertrophic scar fibroblasts by Sp1 decoy oligodeoxynucleotide. *Mol Med Rep* 7, 785-90.
- Dinarvand M, Hamzehee B (2017) Conservation status of *Echium khuzistanicum*. *Iran nature* 3, 100-103.
- Fan C, Xie Y, Dong Y et al. (2015) Investigating the potential of Shikonin as a novel hypertrophic scar treatment. *J Biomed Sci* 22, 1-13.
- Gwon SY, Choi WH, Lee DH et al. (2015) Shikonin protects against obesity through the modulation of adipogenesis, lipogenesis, and  $\beta$ -oxidation in vivo. *J Funct Foods* 16, 484-493.
- Hanafy MS, Matter MA, Asker MS et al. (2016) Production of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* L. and their antimicrobial activity. *S Afric J Bot* 105, 9-18.
- Kim JY, Jeong HJ, Park JY et al. (2012) Selective and slow-binding inhibition of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on glycosyl hydrolase 33 and 34 sialidases. *Bioorg med chem* 20, 1740-8.
- Kimura M and Isobe S (2018) Small-Molecule Screening to Increase *Agrobacterium*-Mediated Transformation Efficiency in Legumes. *Plant Chem Gen* 1795, 93-99.
- Kontogiannopoulos KN, Assimopoulou AN, Tsvintzelis I et al. (2011) Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications. *Int J Pharm* 409, 216-28.

- Kumar V, Sharma A, Prasad BCN et al. (2006) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Plant Biotech* 9, 349-358.
- Lee H, Bae S, Kim K et al. (2011) Shikonin inhibits adipogenesis by modulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *Life Sci* 88, 294-301.
- Lee YJ, Choi SY and Yang JH (2014) NMDA receptor-mediated ERK 1/2 pathway is involved in PFHxS-induced apoptosis of PC12 cells. *Life Sci* 3, 491-492.
- Li F, Yin Z, Zhou B et al. (2015) Shikonin inhibits inflammatory responses in rabbit chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rabbit knee. *Int Immuno* 29, 656-62.
- Mohammadi S, Piri K, Dinarvand M (2019) Antioxidant and Antibacterial Effects of Some Medicinal Plants of Iran. *Int J Sec Metabol* 6, 62-78.
- Mohammadi S and Piri K (2014) Antifungal Effects of Two Medicinal Plant Native to Iran. *Int J Adv Bio Biomed Res* 2, 2712-15.
- Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA et al. (1999) The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Ange Chem Int Edit* 38, 270-301.
- Park S, Eom S, lee C et al. (2010) Ep-methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *scrophularia buergeriana* miquel. *Arch biol sci* 62, 649-652.
- Porter JR and Hector F (1991) Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit Rev Plant Sci* 4, 387-421.
- Samadi A, Carapetian J, Heidari R et al. (2012) Hairy root induction in *linum mucronatum* ssp. *Mucronatum*, an anti-tumor lignans producing plant. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj- napoca* 40, 125-131.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sevon N and Oksman-Caldentey KM (2002) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica* 68, 859-68.
- Singleton VL and Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Amer J Enol Viti* 16, 144-158.



- Skrzypczak A, Przystupa N, Zgadzaj A et al. (2015) Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and *Arnebia euchroma* callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method. *Toxico in Vitro* 30, 364-72.
- Tabata M, Hajime M, Noboru H et al. (1974) Pigment Formation in Callus Cultures of *Lithospermum Erythrorhizon*. *Phytochem* 13, 927-32.
- Thwe A, Valan Arasu M, Li X et al. (2016) Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction and Phenylpropanoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Front microbiol* 7, 318.
- Yang Y, Wang J, Yang Q et al. (2014) Shikonin inhibits the lipopolysaccharide-induced release of HMGB1 in RAW264.7 cells via IFN and NF-kappaB signaling pathways. *Int Immunopharm* 19, 81-7.
- Zarei b, kahrizi d, mousavi s et al. (2013) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *atropa belladonna*. *J agric biotechnol* 5, 59-67.
- Zhang FY, HuY, Que ZY et al. (2015) Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated beta-Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine. *Int J Mol Sci* 16, 23823-48.

