مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJRFPBGR.2022.356510.1395
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۳۰۵-۲۹۴ (۱۴۰۱) شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.2.9.5

بهینه‌سازی و القای ژنتیکی ریشه‌های موئین گیاه دارویی کلوس (*Kelussia odoratissima* Mozaff)

نازنین خطیبی‌نیا[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲*] و میترا خادمی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استاد، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

پست‌الکترونیک: nazarian.f@lu.ac.ir

۳- دانش‌آموخته دکتری، اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

چکیده

کلوس (*Kelussia odoratissima* Mozaff) یکی از گیاهان دارویی، ادویه‌ای و معطر انحصاری ایران است که در نقاط محدودی در کشور می‌روید. با توجه به اهمیت ترکیبات داروئی آن در طب سنتی، برداشت بی‌رویه، کلوس را در معرض انقراض قرار داده است. از این‌رو، برای جلوگیری از انقراض کلوس، می‌توان از کشت بافت گیاهی در جهت تولید ترکیبات مفید و متابولیت‌های ثانویه استفاده نمود. کشت ریشه موئین یک سیستم کارآمد برای تولید ترکیبات داروئی و متابولیت ثانویه ارزشمند در گیاهان است. به همین منظور، برای بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر روی القاء و تولید ریشه موئین در گیاه کلوس، از دو سویه بیماری‌زای *Agrobacterium rhizogenes* (A4 و ATCC15834)، دو ریزنمونه (لپه و زیرلپه)، سه سطح استوسرینگون (a_1=۰، a_2=۵۰ و a_3=۱۰۰ میکرو مولار) و سه سطح گلوکز (صفر=b_1، b_2=۰/۵٪ و b_3=۱٪) به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده شد. نتایج نشان داد که هر دو سویه اگروباکتریوم توانستند سبب القاء ریشه موئین در گیاه کلوس شوند. همچنین سویه اگروباکتریوم ATCC15834 در محیط کشت MS پایه با ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون در حضور ۰/۵ درصد گلوکز بالاترین کارایی را در تولید ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های لپه داشت و کمترین میزان تولید ریشه موئین در سویه اگروباکتریوم A4 در محیط کشت MS پایه بدون استوسرینگون و گلوکز در هر دو ریزنمونه مشاهده شد. صحت القاء ریشه‌ها توسط *A. rizhogenes* به کمک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C نیز تایید شد. نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان داد که القاء ریشه موئین در ریزنمونه‌های کلوس امکان پذیر است.

ریزنمونه‌های کلوس امکان پذیر است .

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium rhizogenes*، استوسرینگون، ریزنمونه، ریشه موئین، کلوس، گلوکز

مقدمه

گیاه کلوس (*Kelussia adoratissima mozaff*) یکی از گونه‌های کمتر شناخته‌شده دارویی و علوفه‌ای بومی مراتع غرب ایران، به‌ویژه استان‌های لرستان، چهارمحال و بختیاری و اصفهان است که تاکنون وجود آن در سایر مناطق جهان گزارش نشده است (Salimi *et al.*, 2010). کلوس گیاهی از تیره چتریان، چند ساله، معطر با ساقه‌ای استوانه‌ای به ارتفاع ۲۰۰-۱۲۰ سانتی‌متر، برگ‌های قاعده‌ای بزرگ و دوبار شانه-ای با شمای عمودی گل‌آذین بزرگ چتری انتهایی کاملاً بارور است (Salimi *et al.*, 2010). این گیاه در ارتفاعات و مناطق

برف‌گیر ناحیه زاگرس مرکزی و با حداقل ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا و بارش سالیانه حدود ۴۰۰ میلیمتر (بیشتر به صورت برف) می‌روید. این گیاه در اوایل دوره رویشی به دلیل فشردگی برگ‌های قاعده‌ای، به شکل غنچه است و به‌شدت توسط مردم محلی برداشت و در بازارهای محلی با قیمت بالا به فروش می‌رسد. از این‌رو، به دلیل پراکنش محدود و برداشت بی‌رویه آن، این گیاه فرصت تجدید حیات و تولید بذر را ندارد، به‌همین دلیل، در حال حاضر این گیاه یکی از گیاهان در حال انقراض ایران محسوب می‌شود (Ebrahimi *et al.*, 2018). در طب سنتی، از قسمت‌های مختلف این گیاه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. اندام‌های هوایی دارای خواصی مانند ضددرد، ضدالتهاب و تصفیه خون هستند و از جوشانده بذرها در درمان سرماخوردگی و ضدآلرژی، آنتی ترومبوز، حفاظت از دستگاه گوارش، ضد دیابت و از اثر خواب‌آوری عصاره این گیاه استفاده می‌شود (Haj hashemi *et al.*, 2007 Ahmadi *et al.*, 2003.2002, Dewick). گیاه کلوس حداقل دارای ۲۳ ترکیب شیمیایی شناخته شده در عصاره خود است (Omidbaigi *et al.*, 2008). مشخص شده است که سیس- لیگوستیلید[1]،-۳- ترانس-بوتیلیدن فتالید[2]، دو ترکیب اصلی اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند (Rao & Ravishankar, 2002). امروزه رهیافت نسبتاً نوینی برای تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان به‌ویژه گیاهانی که خاصیت دارویی دارند پدید آمده است که مستلزم دست‌ورزی ژنتیکی گونه‌های مولد ترکیبات هدف است که با استفاده از یک سیستم ناقل طبیعی به نام *Rhizobium rhizogenes* *Agrobacterium rhizhogenes* انجام می‌شود (Nader *et al.*, 2006). این باکتری گرم منفی خاکزی مولد بیماری ریشه موئین (Hairy Root) در گیاهان است. زمانی که باکتری در تماس با گیاه قرار می‌گیرد، تعدادی از ژن‌های موجود بر روی پلاسمید Ri خود را به ژنوم هسته‌های گیاه میزبان وارد می‌کنند.

الحاق ناحیه موسوم به T-DNA در ژنوم گیاه سبب القا ریشه‌های موئین در نزدیکی جایگاه ورود باکتری می‌شود. ناحیه T- DNA دارای دو نوع انکوژن، انکوژن کدکننده آنزیم‌های شرکت کننده در سنتز هورمون‌های اکسین و سیتوکینین است. بیان این ژن‌ها به همراه بیان ژن‌های کدکننده بیوسنتز اُپین‌ها، باعث تشکیل ریشه‌های موئین زیاد در ناحیه آلوده می‌شود. ریشه‌های موئین به سرعت رشد می‌کنند و در محیط بدون هورمون‌های گیاهی به خوبی تکثیر شده و تولید انشعابات فرعی می‌نمایند (Hasanloo *et al.*, 2009). این ریشه‌های جداشده از گیاهان تراریزش شده با پلاسمید Ri توانایی رشد درون شیشه در شرایط استریل را دارند، به صورت ژنتیکی پایدارند و توانایی سنتز فراوان متابولیت‌هایی را دارند که در ریشه و اندام‌های دیگر یافت می‌شوند (Li *et al.*, 2000; Oksman-Caldentey and Hiltunen, 1996). عوامل متعددی روی کارایی ریشه موئین تأثیر دارد که ازجمله آن می‌توان به استوسرینگون اشاره کرد. استوسرینگون یک ترکیب فنولیکی است که منجر به ترغیب باکتری برای اتصال به دیواره سلولی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌شود که به‌طور موفقیت‌آمیزی به تراریزش ژنتیکی با واسطه *A. rhizhogenes* کمک می‌کند و به‌عنوان عامل تحریک کننده ژن‌های بیماری‌زای *A. rhizhogenes* مطرح است (Gelvin, 2000). با توجه به اینکه تاکنون مطالعات کمی بر روی افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه کلوس انجام شده ولی در سایر گونه‌ها مطالعات متعددی انجام شده است، ازجمله می‌توان به سنبل‌الطیب اشاره کرد. گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که از دیرباز بسیار مورد توجه طب سنتی بوده است. در این گیاه نیز برای بهینه‌سازی و افزایش مقدار متابولیت‌های مهم، از فرایند القای ریشه موئین استفاده شده است (Dini torkamani *et al.*, 2014). یکی دیگر از گیاهان دارویی ارزشمند گیاه شاه‌اسپرم (*Tanacetum balsamita*) است که از خانواده کاسنی می‌باشد و غنی از متابولیت‌های ثانویه با ارزشی مانند فلاونوئیدها، مشتقات فنیل

[1] Z-ligustilide

[2] E-butyldiene phthalide

پروپان‌ها، تانن‌ها و اسانس‌هاست. در این گیاه هم به منظور بهینه‌سازی و استفاده از خواص درمانی آن در مقیاس‌های وسیع از کشت ریشه موئین به کمک *A.rhizhogenes* استفاده شد (Maroufi and Majdi, 2015). ازاین‌رو با توجه به اهمیت زیاد دارویی و صنعتی گیاه کلوس، استفاده از روش‌های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، ازجمله القای ریشه موئین با هدف اصلاح این گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن، ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که متابولیت‌های ثانویه بیشتر در مقادیر اندک در بافت‌های تمایز یافته تولید می‌شوند، استخراج، جداسازی و خالص‌سازی آنها عموماً به عنوان یک مشکل اساسی تولید مطرح است Kim (*et al.*, 2002). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در درون شیشه از طریق کشت بافت‌های گیاهی امکان‌پذیر است، اما به منظور غلبه بر مشکلات سیستم‌های کشت سلول‌های گیاهی تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کشت ریشه موئین در گیاه کلوس انجام نشده است. ازاین‌رو، در این مطالعه به بررسی اثر سویه اگروباکتری، غلظت‌های مختلف استوسرینگون و درصد گلوکز برای بهینه‌سازی القاء ریشه‌های موئین تراریخته در گیاه کلوس پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه کلوس در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۹ از ارتفاعات کوه‌های الیگودرز لرستان به مختصات °۴۹ و°۴۲ طول شرقی و °۳۳ و °۲۴ عرض شمالی جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در پاکت‌های پلاستیکی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمایش در اسفندماه ۱۳۹۹ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان اجرا گردید. به منظور حذف مواد بازدارنده احتمالی از جوانه‌زنی، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در یک ظرف در مسیر جریان آب جاری قرار گرفتند. به منظور ضدعفونی بذرها و رفع آلودگی‌های احتمالی، از یک روش سه مرحله‌ای شامل قرار دادن بذرها در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، سپس انتقال آنها به هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن شدید و در نهایت پنج بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار به مدت پنج دقیقه استفاده شد. سپس بذرها به منظور جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های استریل، به مدت ۲۴ ساعت در هورمون اسید جیبرلیک با غلظت ۵۰۰mg/l قرار گرفتند. در مرحله بعد، بذرها روی محیط کشت پایه MS حاوی هورمون BA به غلظت ۱/۵mg/l به مدت شش تا هشت هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تیمار شدند (شکل ۱a). پس از تهیه گیاهچه‌های استریل، به منظور القای ریشه موئین از دو سویه باکتری *A. rhizhogenes* A4 و ATCC15834 استفاده شد. باکتری‌ها در محیط کشت LB (Lauria-bertani) مایع حاوی ۵۰mg/l از آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. سوسپانسیون باکتری با OD برابر با ۰/۴ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه رسوب داده شد و دوباره هر یک از باکتری‌ها در محیط مایع MS حاوی گلوکز (شاهد-٪۰=b_1، ٪۰/۵=b_2 و ٪۱=b_3) به مدت دو ساعت سوسپانسیون شدند. از این سوسپانسیون برای تلقیح نمونه‌های گیاهی استفاده شد. از نمونه‌های لپه و زیرلپه سترون شده از گیاهان دو هفته‌ای به عنوان ریزنمونه استفاده شد (شکل ۱b). ریزنمونه‌های لپه و زیرلپه به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند و بعد ریزنمونه‌ها به وسیله اسکالپل به صورت تصادفی و با پراکنش و تعداد یکسان زخم شدند. سپس ریزنمونه‌ها به درون مایع تلقیح حاوی *A.rhizhogenes* منتقل و به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه تکان داده شدند، در پایان ریزنمونه‌های آلوده بر روی کاغذهای صافی استریل قرار داده شدند تا آبگیری شوند. در مرحله بعد، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS بدون هورمون حاوی غلظت‌های مختلف استوسرینگون (۰μM=a_1، ۵۰=a_2 و ۱۰۰=a_3) به مدت سه روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (شکل ۱c) و به‌منظور حذف باکتری‌های اضافی، ریزنمونه‌ها به مدت ۴-۳ بار با محیط MS حاوی ۵۰۰mg/l سفوتاکسیم (Cefotaxime) شستشو داده شدند و آنگاه این ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی حاوی سفوتاکسیم با

غلظت ۲۰۰mg/l منتقل گردیدند. همچنین از کشت ریزنمونه-های بدون تلقیح به عنوان شاهد استفاده شد. سپس نمونه‌ها به اتاقک‌های رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته تا ظهور کامل ریشه‌های موئین منتقل شدند. پس از گذشت سه هفته صفت‌های مورد مطالعه شامل طول و تعداد ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و داده‌ها با استفاده برنامه MSTATC تجزیه‌وتحلیل شدند.

شکل ۱– a: بذرهای جوانه زده، b: گیاهچه درون شیشه‌ای گیاه کلوس، c: محیط کشت توأم

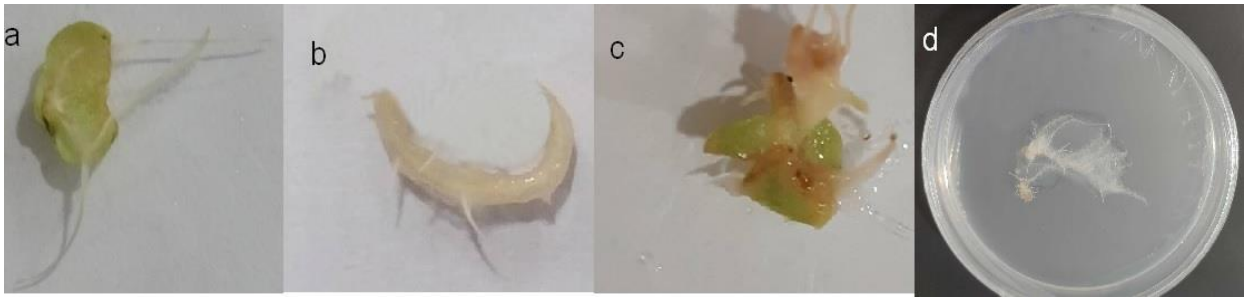
Figure 1: a: Germinated seeds b: *In vitro* kelus seedlings c: Germination in a co-cultivation medium

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور تأیید تراریختی ریشه‌های موئین احتمالی، DNA ژنومی از ریشه‌های موئین به روش CTAB استخراج شد (Gawel & Jarret, 1991) و بعد به منظور تأیید تراریختی از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C با توالی رفت /CTCCTGACATCAAAACTCGTC -3/– 5/ و آغازگرهای برگشتی-/5 TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3/ و آغازگر اختصاصی ژن virG با توالی رفت -/5 CCGCGGTCAGCCGCAATTCT-3/ و آغازگرهای اختصاصی برگشتی CCTGCACGTCCGCGTCAAAGAAATA-3/ 5/- برای انجام PCR استفاده شد (Khademi et al., 2019). شرایط دمایی برای تکثیر ژن *rol*C با یک چرخه واسرشت سازی اولیه یکبار در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه؛ مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه؛ تکثیر DNA الگو ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای تکثیر ژن virG شرایط دمایی PCR اینگونه بود: یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه یکبار در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه؛ مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه؛ تکثیر DNA الگو ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه. سپس محصول PCR در یک ژل آگارز ۱٪ زیر نور UV با استفاده از دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

نتایج

اولین ریشه‌ها بعد از گذشت ۸ روز از تلقیح با باکتری در ریزنمونه لپه (شکل ۲a) و بعد از ۱۲ روز در ریزنمونه زیرلپه (شکل ۲b) ظاهر شدند. بیشترین تراکم ریشه‌ها در محل زخم یا در نزدیکی آن ظاهر شد (شکل ۲).

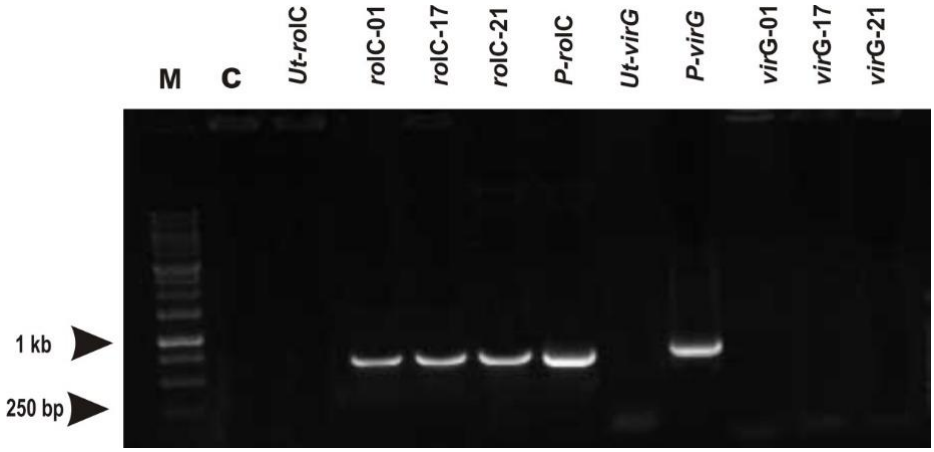


شکل ۲- توسعه ریشه موئین در ریزنمونه‌های گیاه کلوس a: ریشه‌های تولید شده بعد از ۸ روز، b: ریشه‌های تولید شده بعد از ۱۲ روز در ریزنمونه زیرلپه، c: ریشه‌های تولید شده بعد از ۱۴ روز، d: ریشه موئین رشد کرده

Figure 2: Hairy root development in kelus explants a: roots produced after 8 days: b: roots produced after 12 days from hypocotyls, c: roots produced after 14 days, d: Fully developed hairy roots

بررسی تأیید تراریختی ریشه‌های موئین با PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۲۶ bp گردید که با طول مورد انتظار از ژن *rol*C مطابقت داشت، همچنین برای اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی و بقایای ژن‌های باکتری بر روی لاین‌های تراریخت، انجام PCRبا استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir*G انجام شد. هیچ قطعه‌ای با انجام PCR تولید نشد، می‌توان نتیجه گرفت که عدم حضور ژن *vir*G در ریشه‌های موئین، دلیلی بر نبود هرگونه آلودگی باکتریایی ریشه‌های موئین بود (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج واکنش PCR به ترتیب برای تأیید تراریختی و عدم آلودگی ریشه‌های موئین با استفاده آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C و virG در گیاه کلوس. M: نشانگر اندازه ۱kb (شرکت Fermentas)، C: شاهد بدون DNA الگو، Ut: شاهد غیر-تراریخت، *rol*C-01، *rol*C-17 و *rol*C-21 ریشه¬های کلون¬های تراریخت P-*rol*C: اگروباکتریوم حاوی ژن *rol*C، P-virG: اگروباکتریوم، virG-01، virG-17، virG-21 گیاهان تراریخت با پرایمر virG

Figure 3: Results of PCR analysis to confirm transgenic and non-contaminated hairy roots using specific primers of *rol*C and virG genes in kelus, respectively. M: 1 Kb DNA Lader (Fermentas), C: DNA-free cont*rol* template, Ut: non-transgenic cont*rol*, *rol*C-01, *rol*C-17 and *rol*C-21 roots of transgenic clones P-*rol*C: *Agrobacterium* containing *rol*C gene , P-virG: Agrobacterium, virG-01, virG-17, virG-21 transgenic plants with virG primer

همان‌طوری که در جدول تجزیه واریانس داده‌های آزمایش مشاهده می‌شود اثر سویه باکتری، غلظت استوسرینگون و گلوکز بر روی کارایی و القای ریشه موئین معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه غلظت استوسرینگون× درصد گلوکز× سویه باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد بر روی صفت تعداد و طول ریشه انجام شد (جدول ۲).

جدول ۱- خلاصه نتایج تجزیه واریانس تأثیر سویه باکتری، ریزنمونه، غلظت گلوکز و استوسرینگون بر صفات مورد بررسی در القاء ریشه موئین در گیاه دارویی کلوس

Table 1 - Summary of the results of analysis of variance of the effect of bacterial strain, explant type, glucose and estrosringon concentrations on the some klus traits associated with hairy roots induction

منبع تغییرات **Source of variation**	درجه آزادی **DF**	**MS** میانگین مربعات وزن تر ریشه موئین **Wet weight of hairy roots(g)**	وزن خشک ریشه موئین **Dry weight of hairy roots(g)**
غلظت استوسرینگان **Concentration of acetosyringone**	2	10.95**	6.65**
میزان گلوکز ***Glucose concentration***	2	16.73**	9.53**
غلظت استوسرینگان×میزان گلوکز **Concentration of acetosyringone× *Glucose concentration***	4	3.02**	1.22**
سویه باکتری **Bacterial strain**	1	17.12**	8.44**
غلظت استوسرینگان×سویه باکتری **Concentration of acetosyringone× Bacterial strain**	2	0.67*	0.98**
میزان گلوکز×سویه باکتری ***Glucose concentration*× Bacterial strain**	2	0.56*	0.94**
غلظت استوسرینگان×میزان گلوکز×سویه باکتری **Concentration of acetosyringone× *Glucose concentration*× Bacterial strain**	4	0.66**	0.46**
نوع ریزنمونه ***Type of explant***	1	*0.75	0.31**
غلظت استوسرینگان×نوع ریزنمونه **Concentration of acetosyringone× *Type of explant***	2	0.36 ns	0.009 ns
میزان گلوکز×نوع ریزنمونه ***Glucose concentration* ×Type of explant**	2	0.25 ns	0.088 ns
غلظت استوسرینگان×میزان گلوکز×نوع ریزنمونه **Concentration of acetosyringone× *Glucose concentration* ×Type of explant**	4	0.15 ns	0.104*

منبع تغییرات **Source of variation**	درجه آزادی **DF**	**MS** میانگین مربعات وزن تر ریشه موئین **Wet weight of hairy roots(g)**	وزن خشک ریشه موئین **Dry weight of hairy roots(g)**
سویه باکتری×نوع ریزنمونه **Bacterial strain×*Type of explant***	1	0.75*	0.02 ns
غلظت استوسرینگان×سویه باکتری×نوع ریزنمونه **Concentrationacetosyringone× Bacterial strain×*Type of explant***	2	0.08 ns	0.22 ns
میزان گلوکز×سویه باکتری×نوع ریزنمونه **Level Glucose × Bacterial strain×*Type of explant***	2	0.19 ns	0.07**
غلظت استوسرینگان×میزان گلوکز×سویه باکتری×ریزنمونه **Concentration of acetosyringone× *Glucose concentration* × Bacterial strain×Type of explant**	4	0.23 ns	0.036 ns
خطا **error**	72	0.15	0.042
درصد ضریب تغییرات **Coefficient of variation CV%**		28.38	20.26

ns،*و**: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** non significant and significanat at 5% and 1% probability levels, respectively

طول ریشه موئین در ریزنمونه

همان‌طور که مشاهده می‌شود سویه باکتری ATCC15834 در محیط کشت MS پایه با ۱۰۰µM استوسرینگون و ۰/۵ درصد گلوکز بالاترین کارایی را با افزایش طول ریشه‌های موئین در هر دو ریزنمونه لپه و زیرلپه داشت. نخستین ریشه‌های موئین بعد از گذشت ۸ روز پدیدار شدند و پس از مدت ۱۲ تا ۱۴ روز این ریشه‌ها دارای رشد بسیار سریعی بودند. کمترین طول ریشه در محیط کشت‌های با میزان کمتری از غلظت‌های استوسرینگون و گلوگز در سویه A4 مشاهده شد (جدول ۲).

تعداد ریشه موئین در ریزنمونه

بیشترین تعداد ریشه‌موئین در ریزنمونه لپه برای سویه باکتری ATCC15834 در محیط کشت MS پایه با ۱۰۰µM استوسرینگون و ۰/۵ درصد گلوکز به میزان ۴/۵ عدد بدست آمده است، این در حالی بود که برای همین سویه در شرایط ذکر شده برای ریزنمونه زیرلپه تعداد متوسط ریشه موئین ۳/۵ بود (جدول ۲).

جدول ۲- اثر فاکتورهای مختلف آزمایشی بر روی طول و تعداد ریشه موئین در ریزنمونه

Table 2 - The effect of different experimental factors on the length and number of hairy roots from different explant

غلظت استوسرینگون Concentration of acetosyringone	میزان گلوکز *Glucose concentration*	سویه اگروباکتریوم Agrobacterium strain	طول ریشه موئین Hairy root length (cm)	تعداد ریشه موئین Number of hairy roots
شاهد 0	0	A4	0.00 g	0.00 l
		ATCC15834	1.00e	0.40 jk
	0.5	A4	0.66 ef	0.23 kl
		ATCC15834	1.00 e	0.65 ij
	1	A4	1.16 de	0.93 fghi
		ATCC15834	1.66 cd	1.00 fgh
50 µM	0	A4	0.33 fg	0.23 kl
		ATCC15834	1.00 e	0.78 hi
	0.5	A4	1.16 de	1.13 efg
		ATCC15834	2.16 c	1.65 bc
	1	A4	1.33 de	1.25 def
		ATCC15834	1.66 cd	1.5 cd
100 µM	0	A4	0.33 fg	0.26 kl
		ATCC15834	1.00 e	0.80 ghi
	0.5	A4	2.00 c	1.10 efgh
		ATCC15834	3.83 a	2.90 a
	1	A4	2.00 c	1.40 cde
		ATCC15834	2.83 b	1.86 b

میانگین اعداد در هر ردیف که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

The average numbers in each row that have the same letters are not significantly different at the 1% probability level based on Duncan's multiple range test

بحث

A. rhizhogenes دارای پلاسمید Ri است و ژن‌های *rol*A، *rol*C و *rol*B در قسمت T-DNA پلاسمید باکتری قرار دارند که با انتقال این ژن‌ها به گیاه در محل زخم ریشه‌های موئین تراریخت پدیدار می‌شوند. در این پژوهش، امکان القای ریشه موئین با استفاده از *A. rhizhogenes* در گیاه کلوس (*Kelussia adoratissima* Mozaff) بررسی شد. با توجه به اثرهای متقابل گیاه-پاتوژن، نوع سویه باکتری نقش اساسی در فرایند القای ریشه موئین ایفا می‌کند و بسیاری از مطالعات به‌خوبی این موضوع را تأیید کرده‌اند. در این مطالعه با توجه به هدف القاء و تولید ریشه موئین در گیاه داوریی کلوس به بررسی فاکتورهای کلیدی و مهمی مانند نوع ریزنمونه، سویه اگروباکتریوم، غلظت‌های مختلف استوسرینگون و گلوکز پرداخته شد. در همین راستا از دو سویه بیماری‌زای باکتری ATCC15834 و A4 استفاده شد که بیشترین کارایی تراریختی را بر اساس مطالعات قبلی بر روی خانواده چتریان داشتند. نتایج حاصل از بررسی سویه‌های بیماری‌زای *A. rhizhogenes* نشان داد که سویه ATCC15834 از کارآمدترین سویه‌های باکتری برای القای ریشه موئین بود که نتایج مشابه نشان‌دهنده حساسیت بالا و قدرت ریشه‌زایی بالای این سویه است. در این مطالعه، هر دو سویه باکتری توانایی القای ریشه‌های موئین را در ریزنمونه‌های گیاهی داشتند، اما درصد ریشه‌زایی در سویه ATCC15834 در مقایسه با سویه A4 از فراوانی بیشتری برخوردار بود. برای

نمونه در همین راستا، Montazeri و همکاران (2015) به بررسی سویه‌های مختلف *A.rhizhogenes* (۱۵۸۳۴، ۱۷۲۴، ۲۶۵۹ و A4) بر القای ریشه موئین در گیاه باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) از خانواده چتریان پرداختند. نتایج مطالعه آنان نشان‌دهنده تفاوت در قدرت تولید ریشه موئین در بین سویه‌های مختلف *A. rhizhogenes* بود، به‌طوری‌که در مقایسه بین چهار سویه *A. rhizhogenes* شامل ۱۵۸۳۴، A4، ۱۷۲۴ و ۲۶۵۹ سویه ۱۵۸۳۴ با ۸۰ درصد ریشه‌زایی، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد (Montazeri *et al.*, 2015). در مطالعه دیگری، به‌منظور بررسی تحریک ریشه‌های موئین در بین گونه‌های مختلف بنگ‌دانه (*Hyoscyamu*) از ۵ سویه باکتری ۱۵۸۳۴، A4، ۱۷۲۴، ۲۶۵۹ و LBA9502 استفاد شد که در گونه *H.archnoideus* بالاترین درصد تحریک ریشه موئین با سویه ATCC15834 مشاهده شد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (Akramian *et al.*, 2008). همچنین در مطالعه دیگر، از سه سویه باکتری ATCC15834،A4 و GMI9534 به منظور تحریک ریشه موئین در گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferumL.*) استفاده شد که سویه ATCC15834 دارای بالاترین و بهترین کارایی تولید ریشه موئین در این گیاه بود (Jalilian, 2017). از دلایل مهم تفاوت قدرت بیماری‌زایی سویه‌های مختلف باکتری‌ها در مطالعات معتدد می‌توان به توانایی انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های یک گونه خاص، توالی و طول ناحیه T-DNA پلاسمید القاکننده ریشه اشاره کرد، همچنین حتی در برخی موارد T-DNA ناحیه توانایی الحاق را در ژنوم میزبان ندارد (Jafari Hajati *et al.*, 2016). وجود تفاوت در نوع ریزنمونه، در میزان توانایی تولید ریشه‌های موئین در این پژوهش به‌خوبی مشخص شد. از میان دو نوع ریزنمونه مورد استفاده، ریزنمونه لپه بیشترین تولید ریشه موئین را نسبت به زیرلپه داشت، به‌طوری‌که می‌توان گفت لپه‌ها مکان مناسبی برای ایجاد القای ژنتیکی در این گیاه هستند و نسبت به زیرلپه، از توان تولید ریشه‌های موئین بیشتری برخوردارند. در گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamitaa*) به نظر می‌رسد که لپه‌ها در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها قابلیت بیشتری نسبت به انتقال ژن از خود نشان می‌دهند که در تحقیق مذکور به خوبی مشهود است (Maroufi & Majdi, 2015). همچنین در این تحقیق از دو تیمار استوسرینگون و گلوکز برای القای ریشه‌های - موئین استفاده‌شد. استوسرینگون به عنوان عامل تحریک کننده برای ژن‌های بیماری‌زای *A. rhizhogenes* مطرح است و باعث افزایش کارآیی تراریزش می‌شود. مطالعات انجام شده بر روی پیش القای *A. rhizhogenes* (در محیط تلقیح) با استوسرینگون یا استفاده از آن در محیط هم‌کشتی نشان‌دهنده افزایش قابل توجه انتقال ژن به کمک *A. rhizhogenes* بود. این مطالعات نشان می‌دهند که اضافه کردن استوسرینگون در محیط کشت-های باکتری کارآیی انتقال ژن را ۴-۲ برابر افزایش می‌دهد. استوسرینگون نه تنها تعداد متوسط وقایع انتقال ژن ثابت در هر ریزنمونه را افزایش می‌دهد، بلکه سبب افزایش درصد ریزنمونه‌هایی با انتقال ژن پایدار می‌شود. این نتایج با نتایج سایر محققان در گونه‌های مختلف ازجمله ذرت (Shen *et al.*, 1993)، سویا (Godwin *et al.*, 1991) و صنوبر (Levee *et al.*, 1999) مطابقت دارد. همچنین کاربرد استوسرینگون بر روی توتون در محیط هم‌کشتی نیز باعث افزایش چهار برابری در فراوانی القای ریشه موئین شد (Kumar et al., 2006). در گیاه زرشک هندی (*Berberis aristata*) که گیاهی در معرض انقراض است افزایش القای ریشه موئین با *A. rhizhogenes* انجام شد (Brijwal and Tamta, 2015). در این مطالعه از سه غلظت مختلف گلوکز برای القای و بهینه-سازی ریشه موئین استفاده شد که بهترین کارایی تراریزش در ترکیب استوسرینگون ۱۰۰ μM با ۰/۵ درصد گلوکز بدست آمد. گلوکز ازجمله قندهای ساده است که به‌عنوان منبع انرژی برای رشد مطلوب و مؤثر در متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ضروریست. این قند می‌تواند به عنوان مولکول سیگنالی به عنوان تنظیم کننده‌های بیان ژن در رشد و نمو گیاهان دخالت کند (*Rol*land *et al.*, 2006). بسیاری از مطالعات نشان داده-اند که قندهای مختلف به‌طور قابل توجهی بر رشد ریشه موئین تأثیر می‌گذارد (Petrova *et al.*, 2015) که در گیاهان مختلفی ازجمله جینسینگ (Saponins Tri pterpenoid)

(Sivakumar *et al.*, 2005) و تنباکوی کوهی (*Arnica montana*) (Petrova *et al.*, 2015) استفاده شده است. در این مطالعه بهترین تیمارها برای بهینه‌سازی و القا ریشه‌های مویین، استوسرینگون در غلظت ۱۰۰ μM و گلوکز ۰/۵ درصد بودند که بالاترین کارایی را در القای ریشه موئین از خود نشان دادند. مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است تا شرایط رشدی ریشه‌های موئین کلوس از دیدگاه‌های متفاوت مورد بررسی کامل قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

گیاه کلوس، یکی از معدود گیاهان مهم دارویی در معرض انقراض ایران است. بنابراین به منظور پیدا کردن راهکاری برای کشت درون شیشه‌ای و تولید متابولیت‌های ارزشمند آن، لازم است از روش‌های مولکولی و آزمایشگاهی کشت بافت استفاده شود. کشت ریشه موئین یک فرصت خوب و یک چشم‌انداز عالی برای تولید و انبوه‌سازی متابولیت‌های-ثانویه و پروتئین‌های نوترکیب در شرایط درون شیشه‌ای است. ریشه‌های موئین به دلیل نگهداری آسان و مناسب برای سازگاری در بیورآکتورها و ترکیبات فعال زیستی از نظر ثبات شیمیایی و ژنتیکی دارای کاربرد بسیار است. نتایج این مطالعه نشان داد که عوامل مختلفی ازجمله سویه *A. rhizhogenes* و نوع ریزنمونه و مقدار غلظت استوسرینگون و گلوکز در تحریک ریشه موئین در گیاه کلوس مؤثر هستند. پیشنهاد می-شود در تحقیقات آینده از فاکتورهای زیستی و غیرزیستی بیشتری برای تولید و بهینه‌سازی این گیاه استفاده شود.

منابع مورد استفاده

– Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima Mozaff.* in model and food systems. Food chemistry, 105(1): 57-64.

– Akramian, M., Tabatabaei, S.M.F. and Mirmasoumi, M. 2008. Virulence of different strains of Agrobacterium rhizogenes on genetic transformation of four Hyoscyamus species.American-Eurasian journal of Agricultural & Environmental Sciences, 3(5): 759-763.

– Brijwal, L. and Tamta, S. 2015. Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in endangered Berberis aristata DC. SpringerPlus, 4(1): 1-10.

– Dewick, P.M. 2002. Medicinal natural products: a biosynthetic approach, John Wiley & Sons,507 pages.

– Dini torkamani, M.R., Abaspour, N., Jafari, M. And Samadi, A. 2014. Induction and optimization of hairy root growth condition for Valeriana officinalis, through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*, Journal of cell and tissue, 5(1):23-30.

– Ebrahimi, M., Mokhtari, A. and Amirian, R 2018. A highly efficient method for somatic embryogenesis of *Kelussia odorotissima* Mozaff. an endangered medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 132(1): 99-110.

– Gawel, N. and Jarret, R. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. Plant Molecular Biology Reporter, 9(3):262-266.

– Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B. and Newbury, H.J. 1991. The effects of acetosyringone and pH on Agrobacterium-mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Reports, 9(12): 671-675.

– Gelvin, Stanton B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, June 2000, vol. 51, p. 223-256.

– Haj hashemi, V.A., Ghanadi, A. and Soltani, L. 2003. Analgesic and antiinfammatory effects of amirkabiria adrotissima. Journal of Reserch in Medical Sciences (JRMS), 7(2):121-125.

– Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H. 2009. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. Journal of Medicinal Plants, 8(29): 1-190.

– Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadian Chashmi, N 2016. Production of pharmaceutical active ingredients via hairy root induction of Birch (*Betula pendula*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 165-176.(In persian).

– Jalilian, A. 2017.Induction of Transgenic Hairy Roots in Medicinal Plant Poppy (*Papaver Somniferum* L.) by Agrobacterium Rhizogenes-Mediated Transformation. Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture), 39(4): 1-14. (In persian).

– Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F. and Ismaili, A. 2019. The effect of phosphorus and nitrogen on hairy roots production in Nicotiana tobaccum as a model plant. Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture), 44(1):13-24. Inpersian.

Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field crops research, 45(1): 57-69.
– Omidbaigi, R ,.Sefidkon, F. and Saeedi, K. 2008. Essential oil content and composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. as an Iranian endemic plant. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 11(6): 594-597.
– Petrova, M., Zayova, E., Dincheva, I., Badjakov, I. and Vlahova, M. (2015). Influence of carbon sources on growth and GC-MS based metabolite profiling of Arnica montana L. hairy roots. Turkish Journal of Biology, 39(3): 469-478.
– Rao, S.R. and Ravishankar, G. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances. 20(2): 101-153.
– *Rol*land, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology, 57(1): 675-709.
– Salimi, M., Ebrahimi, A.E., Shojaei Asadieh, Z. And Saei Dehkordi, S. 2010. Essential oil composition of *kelussia adrotissima* mozaff. Iranian Journal of Medicinal and Aromatics Plants. 26(2):147-156. (Inpersian).
– Shen, W.-H., Escudero, J., Schläppi, M., Ramos, C ,. Hohn, B. and Koukolíková-Nicola, Z. 1993. T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of beta-glucuronidase activity in maize tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(4): 1488-1492.
– Sivakumar, G., Yu, K., Hahn, E. and Paek, K. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Current Science, 89(4): 641-649.
– Kim, Y., Wyslouzil, B.E. and Weathers, P.J. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 38(1): 1-10.
– Kumar, V., Sharma, A., Narasimha Prasad, B.C., Bhaskar Gururaj, H. and Aswathanarayana Ravishankar, G. 2006. Agrobacterium rhizogenes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electronic Journal of Biotechnology, 9(4): 349-357.
– Levee, V., Garin, E., Klimaszewska, K. and Seguin, A. 1999. Stable genetic transformation of white pine (Pinus strobus L.) after cocultivation of embryogenic tissues with Agrobacterium tumefaciens. Molecular Breeding, 5(5): 429-440.
– Li, W., Asada, Y. and Yoshikawa, T. 2000. Flavonoid constituents from Glycyrrhiza glabra hairy root cultures. Phytochemistry, 55(5): 447-456
– Maroufi, A. and Majdi, M. 2015. Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant Alecost (*Tanacetum balsamita* L.) using Agrobacterium rhizogenes. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 4(2): 103-111.
– Montazeri, F., Omidi, M., Khialparast, F. and Sabokdast, M. 2015. Hairy root induction by Agrobacterium rhizogenes in galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 22(2):251-260. (In persian).
– Nader, B.L., Taketa, A.T.C., Pereda-Miranda, R. and Villarreal, M.L. 2006. Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of Galphimia glauca. Planta Medica. 72(9): 842-844.
– Oksman-Caldentey, K.-M. and Hiltunen, R. 1996.

Optimization and genetic induction of hairy roots in kelus *(Kelussia odoratissima* Mozaff.*)*

N. Khatibi Nia[1], F. Nazarian-Firouzabadi[2*], M. Khademi[3]

1- M.Sc. *Graduate* in Biotechnology, Faculty of Agriculture, Production Engineering and Plant Genetics Department, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2*- Corresponding Author, Prof. Faculty of Agriculture, Production Engineering and Plant Genetics Department, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: nazarian.f@lu.ac.ir

3- Ph.D *Graduate* in plant breeding, Faculty of Agriculture, Production Engineering and Plant Genetics Department, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 28.10.2021 Accepted: 15.03.2022

Abstract

Kelus *(Kelussia odoratissima* Mozaff.) is one of the medicinal, spicy, aromatic and endemic herbs that grows in restricted regions of Iran. Due to the importance of its pharmaceutical compounds in traditional medicine, the excessive harvesting has led to a nearly risk of extinction. To protect kelus from extinction, plant tissue culture can be used to produce useful compounds and secondary metabolites. The hairy root culture is an efficient system for the production of medicinal compounds and valuable secondary metabolites in plants. For this purpose, two pathogenic strains of *Agrobacterium rhizogenes* (A4 and ATCC15834), two types of explants (cotyledon and hypocotyl), three levels of acetosringon (a_1= 0 µM, a_2=50 µM, and a_3= 100 µM), and three levels of glucose (b_1=0, b_2=0.5%, b_3=1%) were applied using a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. The results of this study showed that both *Agrobacterium* strains were able to induce hairy roots production in kelus. Also, ATCC15834 strain in MS medium with 100 µM of acetosringon in the presence of 0.5% glucose had the highest effect in producing hairy roots from cotyledon explants. The lowest amount of hairy roots was observed for A4 strain in MS medium with no acetosringon and glucose added. PCR analysis was performed with *rol*C specific primers to ensure hairy root induction by *A. rizhogenes*. The results of this part of the study, for the first time in Iran, showed that it was possible to induce hairy roots in kelus explants, paving the way to propagate kelus *in vitro*.

Keywords: Acetosringon, explant, hairy root, kelus, glucose