

## The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Hairy Root Induction in *Hypericum perforatum*

Arezu Haghiri-Ebrahimabadi<sup>1</sup>, Yousef Hamidoghli<sup>2</sup>, Farzad Banaei-Asl<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Graduate, Dept. Horticulture, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Assoc. Prof. Dept. Horticulture, University of Guilan, Rasht, Iran.

3\* Corresponding Author: Assist. Prof. Dept. Biotechnology, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: f.banaei@rifr.ac.ir

Received: 07.04.2024

Accepted: 27.07.2024

### Abstract

#### Background and Objective:

*Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) is an endangered medicinal plant valued for its diverse secondary metabolites. The commercial extraction of these compounds from wild plants presents challenges, making *in vitro* hairy root culture an effective alternative for their production. Induction of hairy roots using *Agrobacterium rhizogenes* is a practical method for studying the biosynthetic pathway of secondary metabolites. Various studies indicate that among genes of *rolA*, *rolB*, *rolC*, and *rolD* in *A. rhizogenes*, the *rolB* gene plays a major role in inducing the hairy root than the other genes. The present study aimed to investigate the effect of different strains and explant types (leaf, stem, and root) on hairy root induction in *H. perforatum*.

#### Materials and Methods:

Seeds of *H. perforatum* were obtained from the Natural Resources Gene Bank at the Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, Iran. A factorial experiment was conducted with factor A included three explant types (leaf, stem, and root), while factor B included five *A. rhizogenes* strains (1724, ATCC, Mus, A4, and R1000) using a completely randomized design with three replications in 2022 in RIFR. Fifteen-day-old plantlets were subcultured twice in full-strength MS medium. The explants were then transferred to a growth medium and inoculated with *A. rhizogenes* strains for hairy root induction. Morphological traits, including primary and secondary root length, number of hairy roots, fresh and dry weight, and induction percentage were evaluated over two months. Since the *rolB* gene plays a major role in hairy root induction, Genomic DNA was extracted using the CTAB method, and the presence of the *rolB* gene was verified via PCR to confirm transgenic hairy root formation. Positive and negative control wells containing inoculated hairy roots were included in the bioassay. DNA fragments of different lengths were separated using electrophoresis. Data were statistically analyzed and means were compared via the Duncan multiple range test. Statistical analyses were conducted using SPSS, and graphs were generated in Excel.

#### Results:

In comparison between explants, the highest hairy root induction rate (24.44%), fresh weight (7.54 g), and dry weight (4.46 g) were observed in leaf explants inoculated with the R1000 strain, which was significantly higher than that of other *A. rhizogenes* strains. The lowest induction rate (17.77%) was observed in leaf explants treated with strain 1724, while stem explants inoculated with strain ATCC showed the lowest overall induction rate (8.88%). For root explants, only strains A4 and Mus successfully induced hairy roots, while the other strains failed. Transgenic hairy root lines were confirmed through PCR amplification of the *rolB* gene using gene-specific primers.

#### Conclusion:

The results showed that the type of explant, type of *A. rhizogenes* strains, and the type of culture medium are effective in production of transgenic hairy roots. The R1000 strain demonstrated superior performance in hairy root induction, biomass accumulation, and overall growth in leaf and stem explants, making it the most effective strain for *in vitro* hairy root production in *H. perforatum*. In root explants, the A4 strain had the highest impact on the induction rate. The strong response of leaf explants to the R1000 strain suggests enhanced interaction with the plant biosynthetic pathway, leading to improved hairy root formation and growth in *Hypericum perforatum*.

**Keywords:** St. John's wort, *Agrobacterium rhizogenes*, Bacterial strains, Tissue culture, Transgenesis.

## اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم (*Agrobacterium rhizogenes*) در القای ریشه موپین در گل‌راعی (*Hypericum perforatum*)

آرزو حقیر ابراهیم‌آبادی<sup>۱</sup>، یوسف حمیداوغلی<sup>۲</sup> و فرزاد بنائی‌اصل<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، ایران

<sup>۳\*</sup> نویسنده مسئول مکاتبات: استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیک: [f.banaei@rifr-ac.ir](mailto:f.banaei@rifr-ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶

### چکیده

#### سابقه و هدف:

گل‌راعی (*Hypericum perforatum*) از جمله گیاهان در معرض خطر انقراض است که به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه مختلف در صنعت داروسازی اهمیت فراوانی دارد. امروزه استخراج و تولید اقتصادی اغلب متابولیت‌های ثانویه از طریق جمع‌آوری گیاهان دارویی از رویشگاه طبیعی عمدتاً با مشکلات فراوانی همراه است و استفاده از فناوری کشت ریشه‌های موپین رهیافتی مؤثر در تولید تجاری متابولیت‌های ارزشمند دارویی در شرایط آزمایشگاهی است. کشت ریشه موپین با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* یکی از روش‌های کاربردی برای مطالعه مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. پژوهش‌های مختلف نشان داده است که از میان ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolD* موجود در *A. rhizogenes*، ژن *rolB* نقش اصلی در القای ریشه موپین دارد و بقیه ژن‌ها نقش کمتری در این موضوع ایفا می‌کنند. هدف از این پژوهش، تأثیر تلقیح سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* با ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه در القای ریشه‌های موپین در گیاه دارویی گل‌راعی بود.

#### مواد و روش‌ها:

بذر گل‌راعی از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در تهران تهیه شد. به منظور بررسی تأثیر سویه‌های آگروباکتریوم در القای ریشه‌های موپین، آزمایش فاکتوریل با فاکتور A نوع ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه گل‌راعی و فاکتور B پنج سویه *A. rhizogenes* شامل (ATCC، 1724، Mus، A4 و R1000) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در بخش زیست‌فناوری مؤسسه در سال ۱۴۰۱ انجام شد. گیاهچه‌های ۱۵ روزه گل‌راعی در محیط کشت MS کامل دو مرتبه واکشت شدند و بعد توسط پنج سویه *A. rhizogenes* تلقیح و به محیط کشت برای القای ریشه موپین منتقل شدند. در نهایت ویژگی‌های مورفولوژیکی از جمله طول ریشه اصلی و فرعی، تعداد ریشه‌های موپین، وزن تر و خشک و درصد القای ریشه موپین به مدت دو ماه ارزیابی گردید. با توجه به اینکه در *A. rhizogenes* ژن *rolB* نقش اصلی در القای ریشه موپین دارد، به همین دلیل برای تأیید حضور ژن *rolB* در سویه‌های آگروباکتریوم، DNA ژنومی

از ریشه‌های موئین به روش CTAB استخراج شد. چاهک‌های حاوی ریشه‌های موئین حاصل از ریزنمونه تلقیح شده به‌عنوان کنترل مثبت و ریشه‌های تلقیح نشده نیز به‌عنوان نمونه‌های کنترل منفی استفاده شد. با استفاده از الکتروفورز، قطعات با طول‌های مختلف DNA از یکدیگر تشخیص داده شدند. داده‌های مورفولوژی ریشه‌های موئین تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. از نرم‌افزار SPSS برای تجزیه آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

### نتایج

در مقایسه بین ریزنمونه‌ها، بیشترین درصد القای ریشه موئین (۲۴/۴۴ درصد)، بیشترین وزن تر (۷/۵۴ گرم) و وزن خشک (۴/۴۶ گرم) در ریزنمونه برگ تلقیح شده با سویه باکتریایی R1000 به‌دست آمد که به‌طور معنی‌داری از سایر سویه‌های *A. rhizogenes* و ریزنمونه شاهد بیشتر بود. کمترین میزان درصد القای ریشه موئین (۱۷/۷۷ درصد) در سویه باکتری 1724 در ریزنمونه برگ و کمترین درصد القای ریشه موئین (۸/۸۸ درصد) در سویه باکتری ATCC در ریزنمونه ساقه مشاهده شد. در ریزنمونه‌های ریشه به‌جز سویه‌های باکتریایی A4 و Mus، سایر سویه‌های باکتری موفق به القای ریشه موئین نشدند. در نهایت لاین‌های ریشه موئین تراریخته با حضور ژن *rolB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* تأیید شدند.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که نوع ریزنمونه، نوع سویه‌های *A. rhizogenes* و نوع محیط کشت در تولید یا عدم تولید ریشه‌های موئین تراریخت در گل‌راعی موثر هستند. در ریزنمونه‌های برگ و ساقه، سویه باکتریایی R1000 از لحاظ تولید ریشه‌های موئین، درصد القای ریشه موئین و افزایش وزن تر و خشک نسبت به سایر سویه‌ها برتری داشت. در ریزنمونه ریشه، سویه باکتریایی A4 بیشترین تأثیر را در القای ریشه موئین و درصد القای ریشه موئین داشت. در نهایت با توجه به برتری سویه باکتریایی R1000 در ریزنمونه برگ نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی برای تولید ریشه‌های موئین در گیاه گل‌راعی توصیه گردید  
واژه‌های کلیدی: متابولیت ثانویه، تراریختی، سویه‌های باکتریایی، ریشه موئین

### مقدمه

گلبرگ‌ها به‌طور پراکنده قابل مشاهده بوده و محل تجمع اسانس می‌باشد. نقاط تیره در حاشیه برگ‌ها و گلبرگ‌ها وجود دارند و محل تجمع هایپریسین می‌باشند. این گیاه بومی اروپا، غرب آسیا و شمال آفریقا است (Zhang et al., 2020). گل‌راعی دارای ترکیبات فیتوشیمیایی شامل نفتودیانترون<sup>۱</sup> (به ویژه هایپریسین<sup>۲</sup> و سودوهاپریسین<sup>۳</sup>)، هایپرفورین<sup>۴</sup>،

گل‌راعی (*Hypericum perforatum*) در ایران با نام‌های هوفاریقون، علف چای، علف کوهی، گل هزار چشم و گل شهنواز شناخته می‌شود و سابقه درمانی آن به بیش از ۲۰۰۰ سال می‌رسد (Crompton, 1988). این گیاه متعلق به خانواده *Hypericaceae* می‌باشد که شامل ۱۶۰۰۰ گونه گیاهی چند ساله با برگ‌های متقابل، بدون دم‌برگ، کشیده با انتهای گرد و بدون بریدگی بوده و در بیشتر گونه‌ها دارای دو نوع نقاط تیره و روشن است. نقاط روشن در تمام سطح برگ‌ها و

<sup>4</sup> Hyperforin

<sup>1</sup>Naphthodianthrone

<sup>2</sup>Hypericin

<sup>3</sup>Pseudohypericin

القای ریشه مویین اولین بار در گیاه تک‌لپه‌ای *Pinus halepensis* به وسیله *A. rhizogenes* انجام شد و چند سال بعد در سایر گیاهان تک‌لپه‌ای از جمله ذرت و سوسن پرویی نیز انجام گردید (Bathoju et al., 2017; Dispute et al., 2019). علاوه بر این، ریشه مویین قادر به تولید متابولیت‌هایی است که در گیاه مادر تولید می‌شود، به‌عنوان مثال، تولید ویندولین غیر از ریشه در اندام‌های هوایی گیاه *Catharanthus roseus* انجام می‌شود، اما این ماده را می‌توان با رشد ریشه‌های مویین به‌دست آورد. همچنین، مطالعه ریشه‌های مویین به محققان در زمینه بررسی مسیرهای مربوط به تولید این متابولیت‌ها در گیاهان کمک کرده است (Rawat et al., 2019; Huang et al., 2014). آگروباکتریوم شامل گونه‌های مختلفی مانند *A. vitis*، *A. tumefaciens*، *rubi* و *A. rhizogenes* می‌باشد. دو گونه *A. tumefaciens* و *A. rhizogenes* به ترتیب باعث ایجاد تومور و ریشه‌های مویین در گیاه میزبان می‌شوند. این فرایند به دلیل انتقال (T-DNA) از پلاسمید بزرگ باکتری مذکور به ساختار ماده ژنتیکی سلول میزبان رخ می‌دهد. ژن‌های روی (T-DNA) باعث تغییرات فنوتیپی و تولید اپین‌ها (اسیدهای آمینه مخصوص رشد باکتری) در گیاه میزبان می‌شوند. سایر ژن‌های موجود در دو پلاسمید القای ریشه/تومور، باکتری‌ها را قادر می‌سازند تا اپین‌های تولید شده در سلول گیاهی را جذب و استفاده کنند (Chen and Otten, 2017). القای ریشه مویین توسط *A. rhizogenes* به عوامل مختلفی مانند گونه، جنس و سن بافت گیاهی بستگی دارد (Bansal et al., 2014). از موارد مهم دیگر در القای ریشه مویین، انتخاب سویه باکتری متناسب با نوع گیاه است (Sharafi et al., 2013; Sharma et al., 2013). علاوه بر این، بیان ژن‌های T-DNA باکتری و تلفیق T-DNA در ژنوم میزبان از عوامل مؤثر در درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌ها می‌باشد (Sujatha et al., 2013).

پروآنتوسیانین‌ها<sup>۵</sup>، فلاونوئیدها<sup>۶</sup>، بی‌فلاونوئیدها<sup>۷</sup>، گزانتون‌ها<sup>۸</sup>، فنیل پرویان<sup>۹</sup>، اسیدهای فنولیک و فرار است (Belwal et al., 2019). از گل‌راعی به‌طور گسترده در بسیاری از کشورها به‌عنوان داروهای ضدباکتری، ضدویروسی و ضد درد استفاده می‌شود (Galeotti et al., 2017). خواص ضد فیبروبلاستیک و آنتی‌اکسیدانی دارد (Yilmaz et al., 2019; Kandilarov et al., 2018). کاربرد گل‌راعی برای معالجه سوختگی، مشکلات پوستی، بریدگی‌های عمیق، درد معده و زخم معده گزارش شده است (Dogan et al., 2019). از میان ترکیبات فعال زیستی گل‌راعی، هایپرفورین فلوروگلوکوسینول پرنیله<sup>۱۰</sup> و هایپرینسین نفتودیانترون برای صنعت داروسازی دارای اهمیت بیشتری است. اولی به‌عنوان یک ضدافسردگی طبیعی عمل می‌کند، در حالی که دومی به‌عنوان داروی قوی ضدسرطان و به‌عنوان یک ترکیب مفید برای درمان بیماری آلزایمر در نظر گرفته می‌شود (Paride et al., 2020).

استخراج متابولیت‌های ثانویه از بافت‌های مختلف گیاهی معمولاً با استفاده از حلال‌ها و فشار بخار انجام می‌شود. با پیشرفت دانش بیوتکنولوژی، امروزه با استفاده از فناوری‌های کشت سلول، کشت بافت گیاهی، تولید ریشه‌های مویین، استفاده از تخمیرکننده‌ها و استفاده از آنزیم‌ها، تولید این مولکول‌های آلی تسهیل شده و کارایی و مقدار محصول نیز بهبود می‌یابد (Sharma et al., 2013).

کشت ریشه مویین حاصل از القای باکتری *A. rhizogenes* یکی از روش‌های بیوتکنولوژی بوده که به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی مانند ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی بالا برای رشد، برخلاف کشت سایر بافت‌های گیاهی، نیازی به هورمون رشد گیاهی ندارد. جداسازی ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان دارویی به دلیل تأثیر شرایط محیطی مختلف (نور، رطوبت و مواد مغذی بستر کشت) با محدودیت‌هایی روبه‌رو است (Panda et al., 2017; Tzfira et al., 1996).

<sup>9</sup> Phenylpropane

<sup>10</sup> Prenylated phloroglucinol

<sup>5</sup> Proanthocyanins

<sup>6</sup> Flavonoids

<sup>7</sup> Biflavonoids

<sup>8</sup> Xanthenes

به‌طور کلی، پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که از میان ژن‌های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* موجود در *A. rhizogenes* تنها ژن *rolB* نقش اصلی در القای ریشه موئین دارد و بقیه ژن‌ها نقش کمتری در این موضوع ایفا می‌کنند (Sujatha et al., 2013).

هدف از این پژوهش، تولید و بهینه‌سازی شرایط القاء ریشه‌های موئین حاصل از گیاه گل راعی، با استفاده از سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes* در سه ریزنمونه برگ، ساقه و ریشه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

بذر گل‌راعی (*Hypericum perforatum*) از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در تهران تهیه شد. بهترین گیاهچه‌ها برای تهیه ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه انتخاب شده و با استفاده از پنج سویه *A. rhizogenes* (ATCC، Mus، A4 و R1000) در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار برای القای ریشه موئین تلقیح شدند. آزمایش در بخش زیست‌فناوری مؤسسه در سال ۱۴۰۱ انجام شد. در نهایت ویژگی‌های مورفولوژیکی از جمله طول ریشه اصلی و فرعی، تعداد ریشه موئین، وزن تر و خشک و درصد القای ریشه موئین به مدت دو ماه ارزیابی گردید.

#### کشت بذرها و تهیه ریزنمونه‌های استریل:

بذرها ابتدا با آب مقطر شستشو شدند. برای ضدعفونی بذرها از الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد، در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس در محیط‌کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی شش گرم بر لیتر آگار کشت شده و بعد ویال‌های حاوی بذر به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه، قطعات برگ، ساقه و ریشه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد (Paponov et al., 2021).

#### تهیه مایه تلقیح باکتری:

سویه‌های (ATCC، Mus، A4 و R1000) باکتری *A. rhizogenes* از جهاد دانشگاهی کرج تهیه شدند. برای کشت باکتری از دو محیط کشت مایع و جامد LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین استفاده شد. تک کلون کردن سویه‌های *A. rhizogenes* به روش خطی در پتری‌دیش‌ها انجام گردید. پس از مشاهده باکتری‌های تک کلون شده، پتری‌دیش‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سویه‌های تک کلون شده را در فالكون حاوی محیط‌کشت مایع LB به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت بر روی شیکر به صورت افقی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه منتقل شدند. پس از به تراکم رسیدن باکتری‌ها، بوسیله دستگاه اسپکتوفوتومتر جذب نوری (OD) با طول موج ۶۰۰ نانومتر و غلظت بهینه باکتری بین ۰/۵ تا ۰/۶ برای هر سویه سنجیده شد (Sathasivam et al., 2022).

#### القای ریشه موئین:

ابتدا ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه از گیاهچه‌های پررشد انتخاب شدند. ریزنمونه ساقه و ریشه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و برگ‌ها از ناحیه متصل به دم‌برگ بریده شدند. سپس با استفاده از اسکالپل زخم‌هایی بر روی ریزنمونه‌ها ایجاد گردید و بعد به منظور تلقیح سویه‌ها، به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد، برای خشک کردن ریزنمونه‌های آغشته در سوسپانسیون باکتری از کاغذ استریل استفاده شد. ریزنمونه‌های تلقیح شده برای هم‌کشتی با سویه‌های باکتریایی و ایجاد آلودگی، ابتدا به محیط‌کشت پایه MS یک‌دوم غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت منتقل شدند. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت اطراف ریزنمونه‌ها تلقیح شده با سویه‌های باکتریایی، توده‌های لزج به رنگ قهوه‌ای روشن که نشانه آلودگی باکتریایی است، مشاهده شد. برای زدودن سویه‌های باکتریایی، ریزنمونه‌ها با آب استریل حاوی ۳۵۰ mg/L

مایع و جامد پایه MS با یک‌دوم غلظت منتقل شده و ریزنمونه‌های منتقل شده به محیط‌کشت مایع در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۹۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ماه قرار گرفتند و ریزنمونه‌های موجود هر دو محیط جامد و مایع هر دو هفته یکبار به دلیل تحلیل مواد مغذی محیط‌کشت واکشت شدند.

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین به روش مولکولی:

برای تأیید حضور ژن *rolB* هر پنج سویه آگروباکتریوم (ATCC, R1000, 1724, A4 و MUS)، استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های موئین حاصل شده، به روش CTAB انجام شد (Khan *et al.*, 2007). طراحی پرایمرها در سایت NCBI و با نرم افزار Primer Blast انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به شرح زیر بود:

Forward -5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3'

Reverse -5' TTAGGCTTCTTTCTTCTGGTTTACTGCAGCA-3'

صفات مورد اندازه‌گیری: شامل طول ریشه اصلی و فرعی، تعداد ریشه‌های موئین، وزن تر و خشک و درصد القای ریشه موئین بودند که به مدت دو ماه اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری:

تجزیه آماری آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور A نوع ریزنمونه‌های (برگ، ساقه و ریشه) و B پنج سویه *A. rhizogenes* شامل (ATCC, R1000, 1724, A4 و MUS) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برخی از واحدهای آزمایشی رشدی نداشته و در محاسبات دخالت داده نشدند. به همین دلیل آنالیز آماری به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی نامتعادل انجام شده است. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای Duncan با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

سفوتاکسیم شستشو شدند، علاوه بر این هر سه روز یک مرتبه در محیط‌کشت پایه MS یک‌دوم غلظت واکشت گردیدند. ریزنمونه‌های آلوده شده در دفعات اول در محیط‌کشت حاوی ۵۰۰ mg/L و بعد در دفعات بعدی در محیط‌کشت‌های حاوی ۲۵۰ mg/L و ۳۵۰ mg/L سفوتاکسیم واکشت شدند. واکشت تا زمانی که اطراف ریزنمونه‌ها عاری از باکتری بود ادامه یافت. پس از این مرحله، در ریزنمونه‌هایی که تحت تأثیر باکتری قرار گرفته بودند، ریشه موئین مشاهده شد (Montazeri *et al.*, 2019).

استقرار ریشه‌های موئین:

پس از گذشت ۲۱ روز از رشد ریشه‌های موئین حاصل شده از تلقیح باکتری *A. rhizogenes* و رشد کافی ریشه‌های موئین، حدود یک سانتی‌متر از آن را بریده و درون شیشه‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت

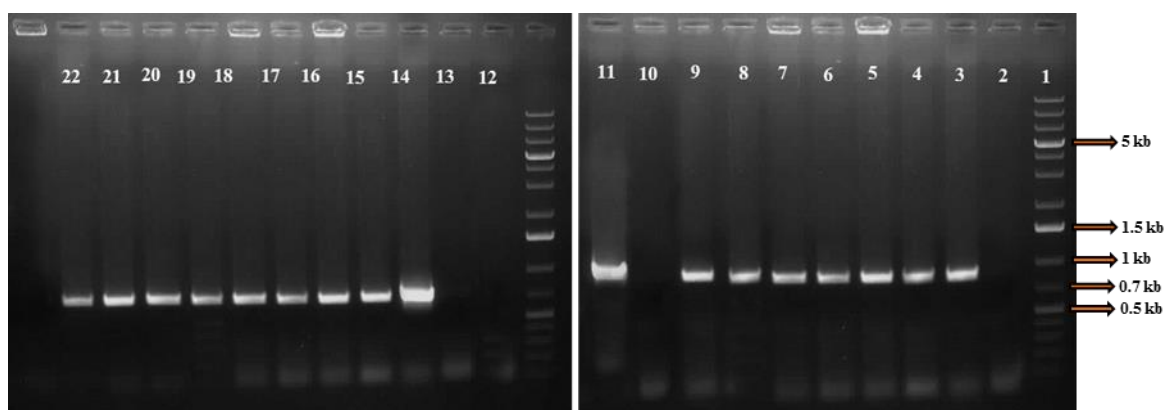
برنامه PCR شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در مدت پنج دقیقه انجام شد و در مرحله بعد، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام و سنتز رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و در مرحله آخر بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. ژل آگارز یک درصد حاوی سیف استین (Safe Stain) تزریق شد. به دلیل تعیین اندازه قطعات حاصل شده، پس از رویت باندهای تشکیل شده از DNA مارکر استفاده شد. برای مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز یک درصد به مدت یک ساعت با ولتاژ ۸۰ استفاده شد و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مورد ریشه‌های تراریخت، قطعاتی به طول ۷۸۰ bp به دست آمد و پس از آن توسط دستگاه (BioRad, USA) مجهز به پرتو اشعه X باندها رویت گردید (Ebrahimi *et al.*, 2017).

## نتایج

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین به روش مولکولی:

برای تأیید حضور ژن *rolB* از هر پنج سویه *A. rhizogenes* شامل (MUS و A4، 1724، R1000، ATCC) استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های موئین حاصل شده، به روش CTAB با کمی تغییرات انجام شد، ابتدا چاهک‌های حاوی ریشه‌های موئین حاصل از ریزنمونه تلقیح شده به عنوان کنترل مثبت و ریشه‌های تلقیح نشده نیز به عنوان نمونه‌های کنترل منفی استفاده شد. با توجه به نتایج ژل‌گذاری PCR، باندهای تشکیل شده نشان‌دهنده حضور DNA استخراج شده از پلاسמיד *A. rhizogenes* در ریزنمونه بوده و ایجاد باندهایی یکسان حضور T-DNA موجود در ژنوم ریشه‌های موئین را تأیید می‌کند (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه فقط برای تعداد ریشه‌های موئین معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ). اثر سویه باکتری بری کلیه صفات بجز طول ریشه موئین فرعی و تعداد ریشه‌های موئین اصلی و فرعی معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ). اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای صفات درصد القای ریشه موئین، طول ریشه موئین فرعی ( $P < 0.05$ )، طول ریشه موئین اصلی و تعداد ریشه‌های موئین ( $P < 0.01$ ) معنی‌دار بود (جدول ۱).



شکل ۱- نتیجه تأیید تراریختی ریشه‌های موئین گل‌راعی حاصل شده: DNA مارکر به اندازه ۷۸۰ bp (۱)، ریشه‌های موئین غیر تراریخت (۲، ۱۰، ۱۲ و ۱۳)

۱۲ و ۱۳)، ریشه‌های تراریخت (۳ تا ۹ و ۱۵ تا ۲۲)، کنترل مثبت (۱۱ و ۱۴)

**Figure 1 - Result of confirmation of transgenic hairy roots of the obtained *H. perforatum*: DNA marker with a size of 780 bp (1), non-transgenic hairy roots (2, 10, 12 and 13), transgenic roots (3 to 9 and 15 to 22), positive control (11 and 14).**

جدول ۱- تجزیه واریانس فاکتوری نوع ریزنمونه گل‌راعی و سویه *A. rhizogenes*

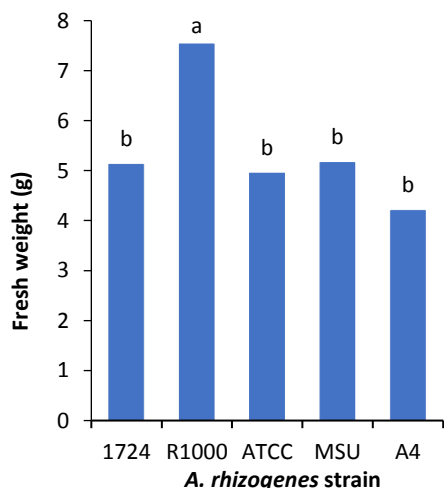
**Table 1- Factorial Analysis of variance for explant type and *A. rhizogenes* strain.**

SOV	df	MS						
		Fresh weight of hairy roots	Dry weight of hairy roots	Hairy root induction	Main hairy Roots length	Secondary hairy roots length	Hairy roots number	Secondary hairy roots number
Explant (E)	2	0.096	0.93	138.3	2.27	0.925	40.34 **	25.88
Strain (S)	4	12.23 **	6.49 **	161.6 *	21.27 **	1.739	28.83 **	31.67
E x S	5	4.02	1.79	173.1 *	13.605 **	2.762 *	17.99 **	34.37
Error	26	2.74	1.23	49.99	1.486	0.776	5.9	20.7

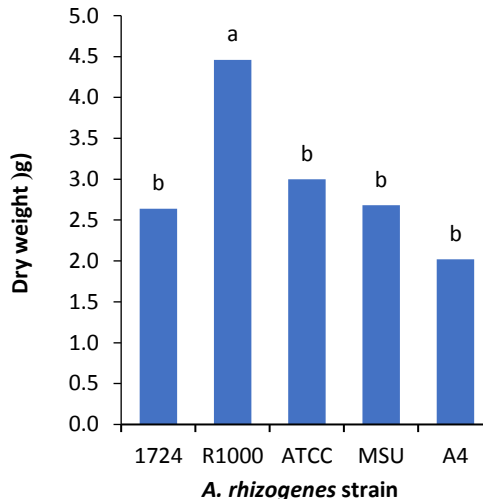
\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد.

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

کردند. بین سویه‌های باکتریایی 1724، A4، ATCC، MUS و R1000 از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار نبود و هر ۴ سویه برای صفت وزن تر (۴/۲۱ تا ۵/۱۶ گرم) و وزن خشک (۲/۰۲ تا ۳ گرم) در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲).



مقایسه میانگین اثر اصلی نوع سویه باکتری: اثر سویه باکتری برای وزن خشک و وزن تر در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. سویه باکتریایی R1000 با ۷/۵۴ و ۴/۴۶ به ترتیب بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های مویین را تولید

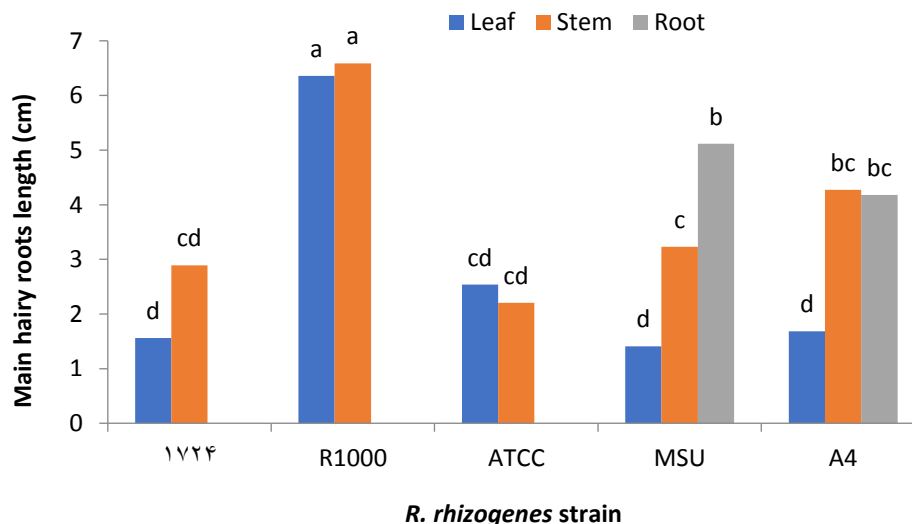


شکل ۲- اثر اصلی سویه‌های *A. rhizogenes* بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین گل راعی

Figure 2. Main effect *A. rhizogenes* strain on fresh and dry weight of *H. perforatum* hairy roots.

میانگین سویه‌ها (ستون‌ها) که دارای حروف مشابهی هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means of columns (strains) followed by the same letters are not significantly different by DMRT method ( $\alpha = 0.05$ ).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع ریزنمونه و سویه *A. rhizogenes* بر طول ریشه اصلی مویین در گل راعی

Figure 3. Means of *A. rhizogenes* strain by explant type interaction effects on the length of the main hairy roots of *H. perforatum*.

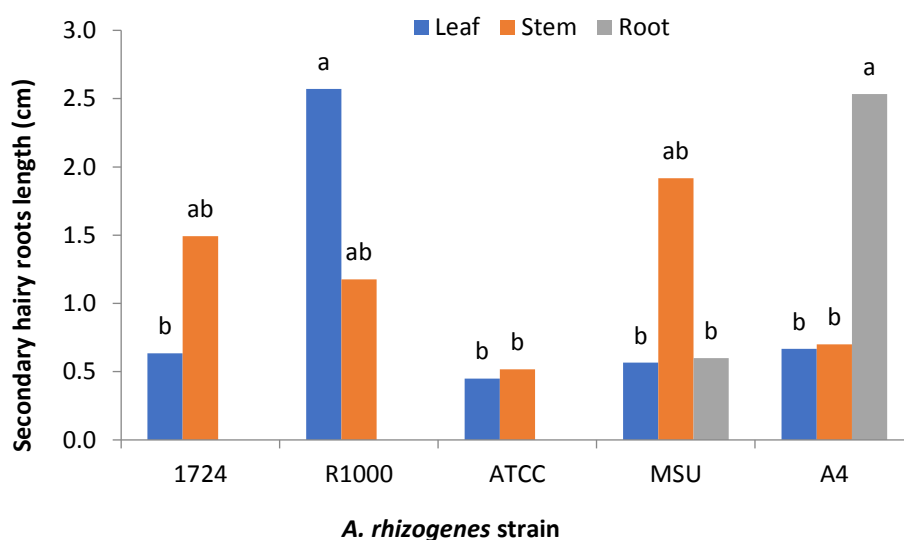
میانگین سویه‌ها (ستون‌ها) که دارای حروف مشابهی هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means of columns (strains) followed by the same letters are not significantly different by DMRT method ( $\alpha = 0.05$ ).



مویین در ریزنمونه‌های برگ، در شرایط تلقیح با سویه‌های Mus، 1724 و A4 بدست آمد. تفاوت بین سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در رابطه با طول ریشه مویین اصلی در ریزنمونه‌های ساقه معنی‌دار بود. سویه باکتریایی R1000 با ۶/۵۸ سانتی‌متر بیشترین و سویه‌های 1724، Mus، A4 و ATCC به‌طور مشترک کمترین طول ریشه مویین اصلی را در ریزنمونه‌های ساقه داشتند. ریزنمونه‌های ریشه تنها سویه‌های باکتریایی Mus و A4 موفق به القای ریشه مویین شدند. بنابراین سویه‌های باکتریایی Mus و A4 با ۵/۱۱ و ۴/۱۸ سانتی‌متر به ترتیب بیشترین و کمترین طول ریشه مویین اصلی را در ریزنمونه ریشه تولید کردند (شکل ۳).

مقایسه میانگین اثر متقابل نوع سویه در نوع ریزنمونه: با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای صفات درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه‌های مویین، طول ریشه مویین فرعی، طول ریشه مویین اصلی (جدول ۱). از مقایسه میانگین اثرهای اصلی این صفات صرف‌نظر شد و فقط به مقایسه اثرهای متقابل بین آنها پرداخته شد. اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای طول ریشه مویین اصلی معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ) که نشان‌دهنده این است که سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes* واکنش متفاوتی در ریزنمونه‌ها داشته‌اند (جدول ۱ و شکل ۳). نتایج نشان داد سویه‌های R1000 و ATCC به ترتیب با ۶/۳۶ و ۲/۵۳ سانتی‌متر بیشترین طول ریشه مویین اصلی را در ریزنمونه‌های برگ تولید کردند. کمترین طول ریشه



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع ریزنمونه و سویه *A. rhizogenes* بر طول ریشه مویین فرعی در گل راعی

**Figure 4. Means of *A. rhizogenes* strain by explant type interaction effects on the length of the secondary hairy roots of *H. perforatum*.**

میانگین سویه‌ها (ستون‌ها) که دارای حروف مشابهی هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means of columns (strains) followed by the same letters are not significantly different by DMRT method ( $\alpha = 0.05$ ).

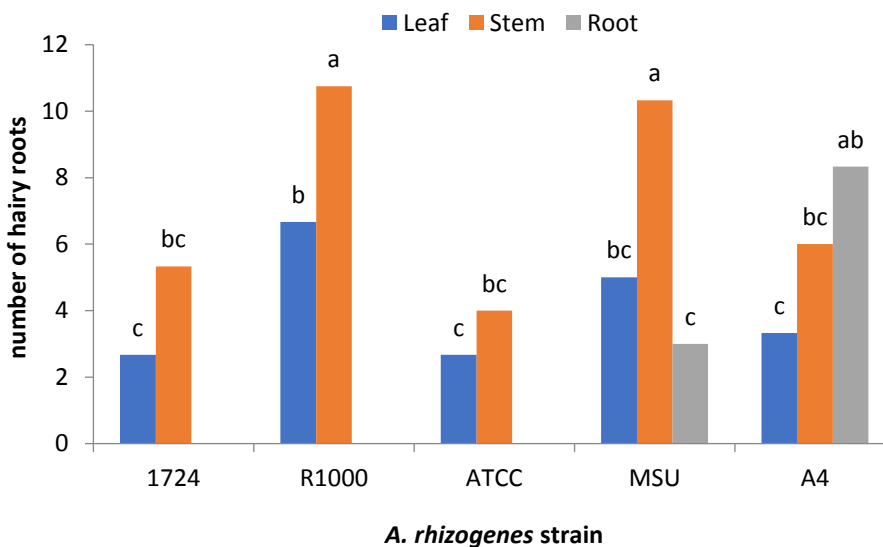
ریزنمونه‌های برگ، در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی R1000 به‌دست آمد که تقریباً ۵ برابر بیشتر از سایر سویه‌های *A. rhizogenes* بود. سویه‌های باکتریایی 1724، MUS، A4 و ATCC به‌طور مشترک با دامنه ۰/۴۵ تا ۰/۶۶ سانتی‌متر کمترین

اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای طول ریشه مویین فرعی معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) که نشان‌دهنده این است که سویه‌های مختلف واکنش متفاوتی در ریزنمونه‌ها داشته‌اند (جدول ۱ و شکل ۴). بیشترین طول ریشه مویین فرعی (۲/۵۷ سانتی‌متر) در

۱۰/۳۳ عدد بیشترین و کمترین تعداد ریشه موین را در ریزنمونه‌های ساقه تولید کردند. تفاوت بین سویه‌های باکتریایی A4، 1724 و ATCC در رابطه با تعداد ریشه موین معنی‌دار نبود. در ریزنمونه‌های برگ، سویه باکتریایی R1000 با ۶/۶۷ عدد بیشترین تعداد ریشه موین را تولید کردند. سویه‌های باکتریایی 1724، ATCC و A4 کمترین تعداد ریشه موین در ریزنمونه برگ تولید کردند و از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند. سویه‌های باکتریایی A4 و MUS به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد ریشه موین را در ریزنمونه ریشه تولید کردند و تنها این دو سویه موفق به القای ریشه موین شدند. به‌طورکلی سویه‌های باکتریایی R1000 و MUS در ریزنمونه‌های برگ و ساقه بیشترین تعداد ریشه موین را داشتند (شکل ۵). طبق تحقیقات انجام‌شده، گزارش شده است هر چه سرعت ریشه موین بیشتر باشد تولید متابولیت‌های ثانویه مقرون‌به‌صرفه خواهد بود (شکل ۵).

طول ریشه موین فرعی را در ریزنمونه‌های برگ تولید کردند. در رابطه با طول ریشه موین فرعی در ریزنمونه‌های ساقه تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* مشاهده نشد. به‌عبارتی، سویه‌های باکتریایی R1000، 1724 و MUS به‌طور مشترک بیشترین طول ریشه موین فرعی در ریزنمونه‌های ساقه تولید کرده و سویه‌های باکتریایی ATCC و A4 به‌طور مشترک کمترین طول ریشه موین فرعی را در ریزنمونه‌های ساقه تولید کردند. در ریزنمونه‌های ریشه، تنها سویه موفق به القای ریشه موین، سویه‌های باکتریایی A4 و MUS بودند که با ۲/۵۳ و ۰/۶ سانتی‌متر، به‌ترتیب بیشترین و کمترین طول ریشه موین فرعی را تولید کردند (شکل ۴).

اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای تعداد ریشه موین معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ) که نشان‌دهنده این است که سویه‌های مختلف واکنش متفاوتی در ریزنمونه‌ها داشته‌اند (جدول ۱ و شکل ۵). سویه‌های باکتریایی R1000 و MUS به ترتیب با ۱۰/۷۵ و



شکل ۵- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع ریزنمونه و سویه *A. rhizogenes* بر تعداد ریشه موین در گل راعی

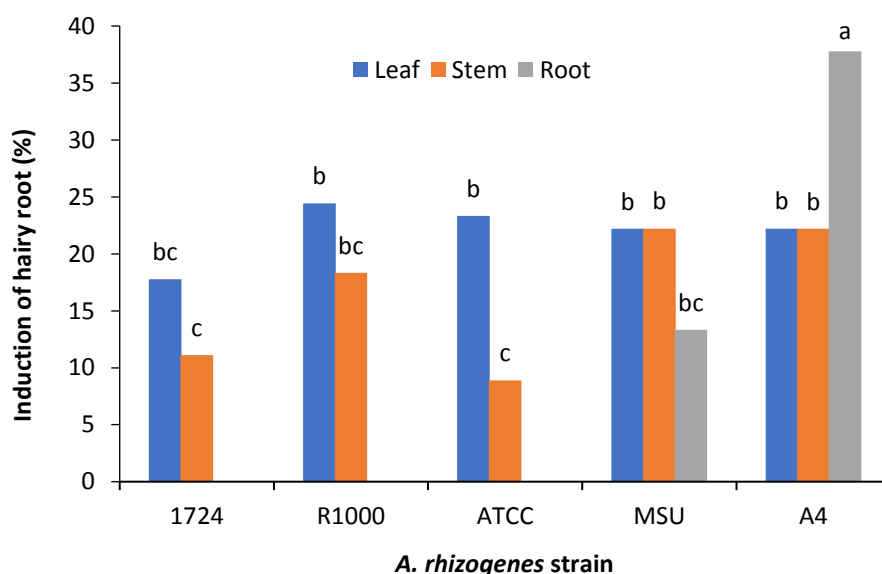
Figure 5. Means of *A. rhizogenes* strain by explant type interaction effects on the number of hairy roots of *H. perforatum*.

میانگین سویه‌ها (ستون‌ها) که دارای حروف مشابهی هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means of columns (strains) followed by the same letters are not significantly different by DMRT method ( $\alpha = 0.05$ ).

را در ریزنمونه برگ داشتند. در ریزنمونه‌های ساقه، سویه‌های باکتریایی 1724، MUS، A4 و R1000 تفاوت معنی‌داری باهم نداشته و به‌طور مشترک باعث بیشترین درصد القای ریشه موین شدند. سویه‌های باکتریایی A4 و MUS با ۳۷/۷۷ و ۱۳/۳۳ درصد، به ترتیب بیشترین و کمترین درصد القای ریشه موین را در ریزنمونه ریشه داشتند (شکل ۶).

اثر متقابل سویه در ریزنمونه برای القای ریشه موین معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) که نشان‌دهنده این است که سویه‌های مختلف واکنش متفاوتی در ریزنمونه‌ها داشته‌اند (جدول ۱ و شکل ۶). در ریزنمونه برگ، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های باکتریایی ATCC، MUS و A4 مشاهده نشد. با این حال، سویه‌های باکتریایی R1000 و 1724 با ۲۴/۴۴ و ۱۷/۷۷ درصد، به ترتیب بیشترین و کمترین درصد القای ریشه موین



شکل ۶- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع ریزنمونه و سویه *A. rhizogenes* بر درصد القای ریشه موین در گل راعی

**Figure 6.** Means of *A. rhizogenes* strain by explant type interaction effects on induction of hairy root of *H. perforatum*.

میانگین سویه‌ها (ستون‌ها) که دارای حروف مشابهی هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means of columns (strains) followed by the same letters are not significantly different by DMRT method ( $\alpha = 0.05$ ).

## بحث

باکتری آگروباکتریوم رشد زیاد در مدت زمان کوتاه، انشعابات فرعی و ثبات ژنتیکی را نشان می‌دهند (El-Esawi *et al.*, 2017). در مطالعه Gupta و Thwe (۲۰۱۶) القای ریشه موین در ریزنمونه‌های گیاهی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر میزان تکثیر، صفات ظاهری و تولید ترکیبات شیمیایی متفاوت بودند. ژن‌های (T-DNA) موجود در سویه‌های مختلف باکتری باعث ظهور ریشه‌های موین و ایجاد متابولیت‌های ثانویه مهم در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری می‌شوند (Nemoto *et al.*, 2009). از آنجایی که توانایی ریشه‌زایی سویه‌های باکتری متفاوت است، انتخاب نوع

در این پژوهش، ابتدا القای ریشه‌های موین در سه ریزنمونه (ساقه، برگ و ریشه) با استفاده از سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes* بررسی شد و بعد تأیید تراریختی در جهت تراریخت و غیرتراریخت ریشه‌های موین انجام گردید. طبق تحقیقات انجام شده، برای القای ریشه موین در ریزنمونه‌های گیاهی به دلیل افزایش تکثیر در ریشه‌های موین و سنتز متابولیت‌های ثانویه مهم در محیط‌های فاقد فیتوهورمون معرفی شده است (Tian, 2015). همچنین ریشه‌های موین حاصل شده از تلقیح ریزنمونه‌ها با

بakterی نقش مهمی ایفا کرده، در نتیجه هرچه غلظت سوسپانسیون bakterی بالاتر برود آلودگی bakterیایی شدیدتر خواهد شد. علاوه بر این، این آلودگی سبب قهوه‌ای شدن ریزنمونه و کاهش بازسازی آسیب‌های وارده توسط بافت گیاهی شده و سرانجام ریزنمونه تلقیح شده با bakterی به‌طور کامل از بین می‌رود (Phan *et al.*, 2016). همچنین یکی از علل آلوده نشدن ریزنمونه‌ها با bakterی *A. rhizogenes* خاصیت آنتی‌بakterیال گل‌راعی بیان شد و گزارش شده است که این گیاه، توانسته bakterی را به‌عنوان عامل بیماری تشخیص داده و سبب حذف bakterی گرم منفی شود (Bivadi *et al.*, 2014). به‌همین دلیل با افزایش مدت زمان آلودگی، میزان تراریختی ریزنمونه‌ها افزایش یافته و کوتاهی مدت زمان تلقیح bakterی برای آلودگی ریزنمونه سبب عدم تأثیر bakterی در القای ریشه موئین می‌شود. بنابراین طبق گزارش‌های انجام شده، مدت زمان غوطه‌وری بافت گیاهی در سوسپانسیون bakterی برای انتقال ژن از bakterی به سلول‌های گیاهی ۳۰ دقیقه گزارش شده است (Petrova *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019). در مرحله بعدی آزمایش، ابتدا کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده با bakterی در محیط‌کشت پایه MS یک‌دوم غلظت با آنتی‌بیوتیک ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد و بعد در مراحل بعدی واکشت ریزنمونه‌ها در آنتی‌بیوتیک ۳۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر انجام گردید. این فرایند موجب افزایش القای ریشه موئین شده و علاوه بر این گذاشتن پتری حاوی ریشه‌های موئین در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شرایط بهتری برای رشد ریشه‌های موئین فراهم کرد. پس از ظهور ریشه‌های موئین تراریخت تعداد کمی از پتری‌دیش‌ها مستقیماً در مجاورت نور سفید و بقیه پتری‌دیش‌ها در انکوباتور قرار گرفتند. نتایج نشان داد ریشه‌های موئین تراریخت در مجاورت نور سفید باعث کاهش سرعت رشد، کاهش کرکی بودن ریشه‌های موئین و در تعداد کمی موجب ظهور کالوس گردید. پژوهش‌های Silva-Navas و همکاران (۲۰۱۵) و Hoeksema و همکاران (۲۰۱۹) نتایج ذکر شده را تأیید می‌کند (شکل‌های ۷ و ۸).

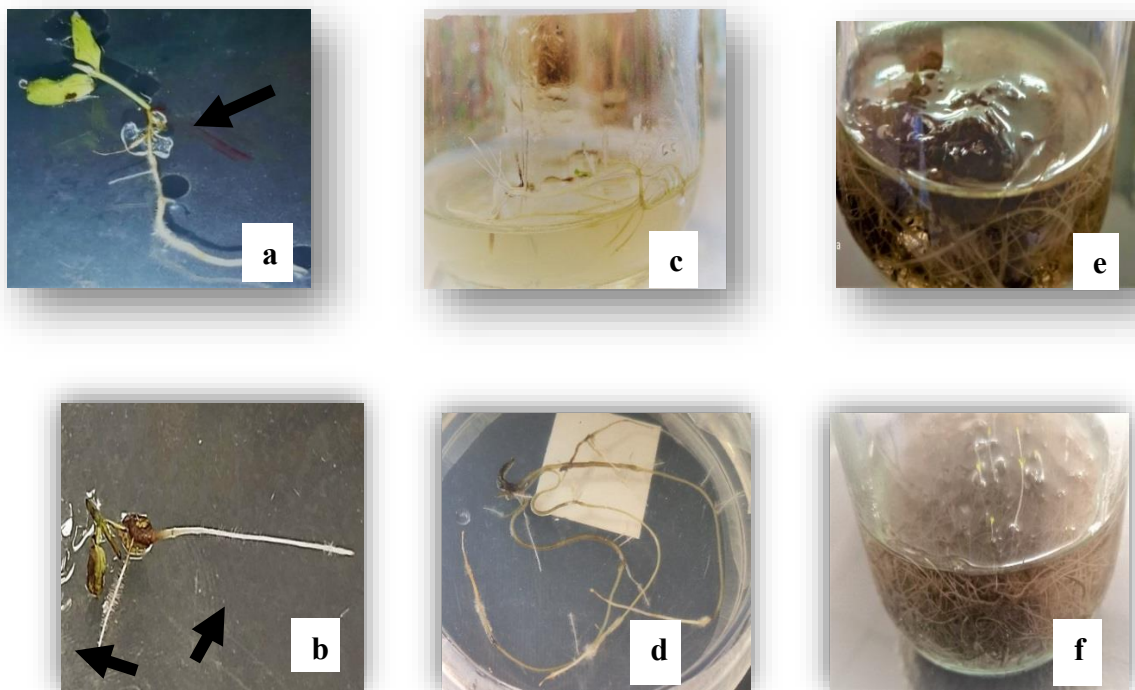
ریزنمونه گیاهی و نوع سویه‌های bakterی در ایجاد ریشه موئین اهمیت زیادی دارد (Nourozi *et al.*, 2019). علاوه بر این، جوان بودن ریزنمونه، نوع ریزنمونه، مدت زمان آلودگی با bakterی و تراکم bakterی نیز از عوامل مهم در القای ریشه موئین هستند (Tram and Quach., 2022). تغییرات ایجاد شده در میزان رشد ریشه‌های موئین تحت تأثیر بیان متفاوت ژن‌ها و تلقیح در ژنوم ریزنمونه گیاهی قرار دارد (Vinterhalter *et al.*, 2015). در این راستا، دگرگونی ژنتیکی موفق نتیجه انتقال مناسب T-DNA از bakterی و قرارگیری مناسب در میزبان گیاهی می‌شود که در ادامه باعث افزایش سرعت رشد، پایداری ژنتیکی و تولید متابولیت ثانویه با کیفیت می‌شود (Häkkinen and Oksman-Caldentey, 2018). همچنین انتقال T-DNA توسط bakterی به محل ایجاد زخم برای القای ریشه موئین به عوامل مختلفی مانند نوع سویه bakterی، تراکم سوسپانسیون bakterی، هم‌کشتی bakterی، نوع ریزنمونه، ترکیبات موجود در بافت گیاهی و ترکیبات محیط‌کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده با bakterی بستگی دارد (Moehninsi and Navarre, 2018). علاوه بر این، در بیشتر گزارش‌ها ژن *rolB* نقش مهمی در بروز خصوصیات ظاهری ریشه‌های موئین دارد و در صورت عدم وجود ژن *rolB*، ریشه موئین تولید نخواهد شد (El-Esawi *et al.*, 2017). یکی از مهمترین مزایای کشت ریشه موئین نسبت به کشت مرزعه‌ای در گل‌راعی، متأثر نبودن متابولیت‌های ثانویه در شرایط آب و هوایی، مرحله رشدی و فیزیولوژی گیاه بوده، بنابراین تحت شرایط کنترل شده تکثیر و استخراج متابولیت‌ها انجام می‌شود (Faraz *et al.*, 2020).

در این پژوهش افزایش غلظت bakterی از ۴۰۰ تا OD=۶۰۰ باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گیاهی شده و پس از گذشت دو هفته ریزنمونه‌های گیاهی به‌طور کامل از بین رفتند و علاوه بر این در برخی از ریزنمونه‌ها نیز هیچ علائمی از آلودگی bakterیایی مشاهده نشد. در این راستا، تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت بهینه سوسپانسیون bakterی بر سرعت القای ریشه موئین و آلودگی ریزنمونه‌های گیاهی به‌وسیله



شکل ۷- مراحل القاء ریشه موئین توسط سویه باکتریایی R1000: تشکیل تک کلون در سویه *A. rhizogenes* (a)، تشکیل هاله باکتریایی ۳ روز پس از تلقیح باکتری با ریزنمونه برگ (b) و ظهور ریشه موئین پس از گذشت ۲۱ روز از تلقیح باکتری با ریزنمونه‌های ساقه (c)، برگ (d) و ریشه (e) در گل راعی

**Figure 7- Stages of hairy root induction by the bacterial strain R1000: Clone formation in the *A. rhizogenes* strain (a), bacterial areola formation 3 days after bacterial inoculation with leaf explants (b), and hairy root emergence 21 days after bacterial inoculation with stem (c), leaf (d), and root (e) explants in the *H. perforatum*.**



شکل ۸- مراحل رشد و توسعه ریشه‌های موئین تحت تأثیر تیمار ATCC در گل راعی: القاء ریشه موئین در محیط کشت جامد پایه MS یک‌دوم غلظت در ریزنمونه ساقه و برگ پس از گذشت ۲۱ روز از تلقیح با باکتری (a و b)، تکثیر ریشه‌های موئین ساقه و برگ در محیط کشت جامد پایه MS یک‌دوم غلظت (c و d)، رشد و توسعه ریشه‌های موئین ساقه و برگ پس از گذشت ۳ ماه از انتقال آنها به محیط کشت مایع پایه MS یک‌دوم غلظت بر روی شیکر انکوباتور (e و f)

**Figure 8- Stages of growth and development of hairy roots under the influence of ATCC treatment in *H. perforatum*: Hairy root induction in solid culture medium based on MS one-half concentration in stem and leaf explants after 21 days of inoculation with bacteria (b and a), growth of stem and leaf hairy roots in solid culture medium based on MS one-half concentration (c and d), growth and development of stem and leaf hairy roots after 3 months of their transfer to liquid culture medium based on MS one-half concentration on a shaker (f and e).**

سویه ATCC15834 و محیط‌کشت MS یک دوم غلظت، بهترین شرایط را برای القای ریشه موئین داشتند. در پژوهشی توسط Sharafi و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه دارویی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy*)، بهترین سویه باکتری *A. rhizogenes* سویه ATCC15834 و مناسب‌ترین ریزنمونه، برگ معرفی شد. SafipourAfshar و Tavassoli (۲۰۱۸) گزارش کردند، از بین سه سویه آگروباکتریوم، سویه ATCC15834 و ریزنمونه شاخساره پس از پنج روز هم‌کشتی با باکتری باعث ۸۳ درصد ریشه‌زایی ختمی (*Althaea officinalis*) شد. در نتیجه، گزارش‌های بیان شده با نتایج این پژوهش تطابق دارد.

مشابه این تحقیق، Zhao و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کرد که از بین چهار سویه باکتری *A. rhizogenes* (R1601، LBA9402، R1000 و A4) در گیاه دارویی (*Saussurea medusa*) تنها سویه R1000 موفق به القای ریشه موئین شد. در گیاه (*Cucumis anguria L.*) ریزنمونه مناسب برای تشکیل ریشه موئین، هیپوکوتیل معرفی شد و از بین چهار سویه مورد آزمایش، سویه R1000 مؤثرترین سویه در القای ریشه موئین گزارش شد. Sahayarayan *et al.*, (2020). در پژوهشی توسط Sujatha و همکاران (۲۰۱۲) اثر القای ریشه موئین در گیاه باریجه (*Anethum graveolens*)، تأثیر سن ریزنمونه، نوع محیط‌کشت و استفاده از بین چهار سویه باکتری *A. rhizogenes* مشاهده شد. سن کم ریزنمونه،

شده و از بین رفته است اما در ریزنمونه ساقه و ریشه اکثریت به مرحله ظهور ریشه موئین رسیدند اما برخلاف گزارش‌ها، در این پژوهش از ریزنمونه برگ و سویه باکتریایی R1000 نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی و ریزنمونه‌های گیاهی در بیشتر صفات رشدی نتایج بهتری حاصل شد. علت عدم تطابق این نتایج با سایر مطالعات را می‌توان به سن ریزنمونه‌ها، چگونگی تهیه سوسپانسیون باکتری و مدت زمان آلودگی ریزنمونه‌ها با سویه‌های باکتریایی نسبت داد.

#### نتیجه‌گیری کلی:

نتایج این پژوهش نشان داد که نوع ریزنمونه، سویه‌های *A. rhizogenes* و نوع محیط کشت در تولید یا عدم تولید ریشه‌های موئین تراریخت در گل‌راعی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. هر پنج سویه باکتریایی مورد استفاده منجر به القای ریشه موئین در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه در گل‌راعی شدند. همچنین در ریزنمونه ریشه، سویه باکتریایی A4 بیشترین تأثیر را در القای ریشه موئین و درصد القای ریشه موئین داشتند. در نهایت سویه باکتریایی R1000 و ریزنمونه برگ در صفات رشدی به دلیل اینکه با مسیر بیوسنتزی گیاه واکنش بیشتری نشان داده است، باعث افزایش تولید و سرعت رشد ریشه موئین نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی و نوع ریزنمونه شده است.

Montazeri و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که بیشترین درصد القای ریشه موئین در ساقه و کمترین درصد القای ریشه موئین در جوانه انتهایی و برگ رخ داد و استفاده از محیط کشت MS یک‌دوم غلظت بهترین شرایط برای القای ریشه موئین گل‌راعی بود. Vinterhalter و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که ریزنمونه گره ساقه مناسب‌ترین ریزنمونه برای القای ریشه موئین در گل‌راعی می‌باشد. Khlifa و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر تلقیح سه سویه *A. rhizogenes* (A4, A4T, LBA1334) با ریزنمونه (ساقه، برگ و ریشه) در گیاه (*Hypericum sinaicum*) تحت شرایط آزمایشگاهی گزارش کردند که سویه A4 با (۷۲ درصد) القای ریشه موئین در ریزنمونه ساقه نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی داشته و ریزنمونه ساقه با (۸۳/۶ درصد) تقریباً ۴۵ برابر بیشتر از سایر ریزنمونه‌ها سبب تولید ریشه موئین شد. در مطالعه دیگر توسط Naderian و همکاران (۲۰۲۲)، سویه *A. rhizogenes* A4 با (۸۶/۶ درصد) القای ریشه موئین بهترین سویه نسبت به سایر سویه‌ها (R1000, MUS, 15834, 2656, A4, A13 و I1325) در گل‌راعی گزارش شد. Komarovska و همکاران (۲۰۰۹) در گل‌راعی نشان دادند که از بین سویه‌های باکتری (A4 و ATCC15834) سویه ATCC15834 بیشترین القای ریشه موئین را در ریزنمونه گره ساقه تولید کردند. بنابراین، نتایج گزارش‌های دیگران در گل‌راعی نشان می‌دهد که ریزنمونه برگ نسبت به سایر ریزنمونه‌ها نکروزه

## References

- Bansal, M., Kumar, A., & Sudhakara Reddy, M. 2014. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and 'bacoside A' production from *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Acta physiologiae plantarum*, 36, 2793-2801.
- Bathoju, G., Rao, K., & Giri, A. 2017. Production of sapogenins (stigmaterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum boliviano* (Safed muslin). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, 369-376.
- Belwal, T., Devkota, H.P., Singh, M.K., Sharma, R., Upadhayay, S., Joshi, C., and Pande, V. 2019. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*; Academic Press: London, UK; pp. 415-432.
- Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N. & Yazdani, B. 2014. Effects of different tissue culture conditions in Hairy Root Induction in *Hypericum perforatum* L. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, 7, 646-653.
- Chen, K., & Otten, L. 2017. Natural *Agrobacterium* transformants: recent results and some theoretical considerations. *Frontiers in plant science*, 8, 1600.
- Crompton, C. W., Hall, I. V., Jensen, K. I. N., & Hildebrand, P. D. 1988. *The biology of Canadian*

- weeds. 83. *Hypericum perforatum* L. Canadian Journal of Plant Science, 68(1), 149-162.
- Dispute, A. A., Yuxuan, X., Gu, M., Kobayashi, Y., Wagh, S., Pancha, A., & Koyama, H. 2019. *Agrobacterium rhizogenic* mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function. Future Science, 5(3), FSO364.
- Dogan, S., Gokal sin, B., Seawards, I., Dogan, A., and Sesal, N.C. 2019. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Ethnopharmacol. 235: 293–300.
- Ebrahimi, S., Zaker, A., Abrishamchi, P., Bahrami, A. R., Ganjeali, A., & Sodagar, N. 2017. Hairy root induction and secondary metabolite production in *Perovskia abrotanoides* Karel. Journal Plant Process and Function, 6(20), 17-26.
- El-ESawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witzcak, J., & Ahmad, M. 2017. Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. Oxidative medicine and cellular longevity, 1, 5604746.
- Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. 2020. Hairy root culture through *agrobacterium rhizogenes* for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A review. Journal of Advanced Microbiology, 4(1), 45-58.
- Galeotti, N. 2017. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. Journal. Ethnopharmacol. 200: 136–146.
- Gupta, R., Pandey, P., Singh, S., Singh, D. K., Saxena, A., Luqman, S., Bawankule, D.U., & Banerjee, S. 2016. Advances in *Boerhaavia diffusa* hairy root technology: a valuable pursuit for identifying strain sensitivity and up-scaling factors to refine metabolite yield and bioactivity potentials. Protoplasma, 253, 1145-1158.
- Häkkinen, S. T., & Oksman-Caldentey, K. M. 2018. Progress and prospects of hairy root research. In the book, Hairy Roots: an effective tool of Plant Biotechnology, Eds. Srivastava V., Mehrotra S., Mishra S. Springer. pp. 3-19.
- Hoeksema, M., Jonker, M. J., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. 2019. Effects of a previously selected antibiotic resistance on mutations acquired during development of a second resistance in *Escherichia coli*. BMC Genomics, 20, 1-14.
- Huang, S. H., Vishwakarma, R. K., Lee, T. T., Chan, H. S., & Tsay, H. S. 2014. Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. Botanical Studies, 55, 1-8.
- Kandilarov, I.K., Zlatanova, H.I., Georgieva-Kotetarova, M.T., Kostadinova, I.I., Katsarova, M.N., Dimitrova, S.Z., and Lukanov, L.K. 2018. Antidepressant effect and recognition memory improvement of two novel plant extract combinations Anti-stress I and anti-stress II on rats subjected to a model of mild chronic stress. Folia Medicinal. 60: 110–116.
- Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Ki, K. S., Hur, T. Y., Suh, G. H., Kang, S. J., & Choi, Y. J. 2007. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. Journal Dairy Science, 90(7), 3376-3387.
- Khlifa, H. D., Klimek-Chodacka, M., Baranski, R., Combik, M., & Taha, H. S. 2020. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Hypericum sinaicum* L. for development of hairy roots containing hypericin. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, e18327.
- Komarovská, H., Giovannini, A., Košuth, J., & Čellárová, E. 2009. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fries. Zeitschrift für Naturforschung C, 64(11-12), 864-868.
- Kumar, R., Mamrutha, H. M., Kaur, A., Venkatesh, K., Sharma, D., & Singh, G. P. 2019. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. Molecular biology reports, 46(2), 1845-1853.
- Moehninsi, & Navarre, D. A. 2018. Optimization of hairy root induction in *Solanum tuberosum*. American Journal of Potato Research, 95, 650-658.
- Montazeri, M., Azadbakht, M., Najafi Zarrini, H., NematZadeh, G., Pakdin Parizi, A., & Davoodi, A. 2018. Hairy root cultures of *Hypericum perforatum* L.; A promising method for the high scale production of hypericin. Scientific Journal of Medicinal Plants, 17(67), 55-67.
- Montazeri, M., Pakdin-Parizi, A., Najafi-Zarrini, H., Azadbakht, M., Nematzadeh, G., & Gholami, Z. 2019. A comparative analysis of the hairy root induction methods in *Hypericum perforatum*. Journal of Plant Molecular Breeding, 7(1), 67-76.
- Naderian, P., Moshtaghi, N., Bagheri, A., & Malekzadeh-Shafaroudi, S. 2022. Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction and secondary metabolites production



- in *Datura innoxia* Mill. Journal of Medicinal Plants, 21(84), 50-64.
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., & Mano, Y. 2009. Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division *in vitro*. Plant Signaling & Behavior, 4(12), 1145-1147.
  - Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., & Mandoulakani, B. A. 2019. Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschyi* hairy roots elicited by SiO<sub>2</sub> nanoparticles. Industrial Crops and Products, 133, 435-446.
  - Panda, B. M., Mehta, U. J., & Hazra, S. 2017. Optimizing culture conditions for the establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L. 3 Biotech, 7, 1-10.
  - Paponov, M., Antonyan, M., Slimstad, R., & Paponov, I. A. 2021. Decoupling of plant growth and accumulation of biologically active compounds in leaves, roots, and root exudates of *Hypericum perforatum* L. by the combination of jasmonate and far-red lighting. Biomolecules, 11(9), 1283.
  - Paride, R., Lothar, A. and Beena, M.R. 2020. The Biochemical and Genetic Basis for the Biosynthesis of Bioactive. Compounds in *Hypericum perforatum* L., One of the Largest Medicinal Crops in Europe. Genes. 11, 1210.
  - Petrova, M., Zayova, E., & Vlahova, M. 2013. Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. Central European Journal of Biology, 8, 470-479.
  - Phan, H. T., Quach, P. N. D., & Nguyen, N. N. 2016. Hairy induction from *Impatiens balsamina* L. using fourteen *Agrobacterium rhizogenes* strains. Science and Technology Development Journal, 19(2), 38-47.
  - Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., & Rawat, B. 2019. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root cultures: a promising approach for production of useful metabolites. In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Eds. Gupta V. K., Pandey A. Pp. 103-118. Elsevier.
  - Sahayarayan, J. J., Udayakumar, R., Arun, M., Ganapathi, A., Alwahibi, M. S., Aldosari, N. S., & Morgan, A. M. 2020. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for in-vitro hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents, antibacterial and antioxidant activity of (*Cucumis anguria* L.). Saudi Journal of Biological Sciences, 27(11), 2972-2979.
  - Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., Kim, J. K., Chung, Y. S., & Park, S. U. 2022. Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. Frontiers in Plant Science, 13, 983776.
  - Silva- Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero- Baena, M., Navarro- Neila, S., Téllez- Robledo, B., & del Pozo, J. C. 2015. Root: a system for cultivating plants with roots in darkness or under different light conditions. The Plant Journal, 84(1), 244-255.
  - Sivanandhan, G., Kapil Dev, G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M., & Ganapathi, A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 114, 121-129.
  - Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, K., & Ntui, V. O. 2013. A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113, 1-9.
  - Sharafi, A., Sohi, H. H., Azadi, P., & Sharafi, A. A. 2014. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. Physiology and Molecular Biology of Plants, 20, 257-262.
  - Sharma, P., Padh, H. and Shrivastava, N. 2013. Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. Engineering in Life Sciences, 13(1), 62-75.
  - Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. 2013. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential oil analysis. Industrial Crops and Products, 44, 643-652.
  - Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. 2018. Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). 3 Biotech, 8(8), 351.
  - Tian, L. 2015. Using hairy roots for the production of valuable plant secondary metabolites. Filaments in bioprocesses, 275-324.
  - Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C. H., Kim, S. J., Al-Dhabi, N. A., & Park, S. U. 2016. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Frontiers in microbiology, 7, 318.
  - Tram, T. M., & Quach, P. N. 2022. Investigation of factors in improving *Agrobacterium*-mediated gene transfer in *Ruellia tuberosa* L. and evaluation of  $\alpha$ -

- glucosidase inhibitory activity in established hairy roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(3), 12588-12588.
- Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A., & Altman, A. 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. *Plant Cell Reports*, 16, 26-31.
- Vinterhalter, B., Ninković, S., Cingel, A., & Vinterhalter, D. 2006. Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia plantarum*, 50, 767-770.
- Vinterhalter, B., Krstić-Milošević, D., Janković, T., Pljevljakušić, D., Ninković, S., Smigocki, A., & Vinterhalter, D. 2015. *Gentiana dinarica* Beck. Hairy root cultures and evaluation of factors affecting growth and xanthone production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(3), 667-679.
- Yilmaz, U., Kaya, H., Turan, M., Bir, F., and. Sahin, B. 2019. Investigation of the effect of *Hypericum perforatum* on cornea alkali burns. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 38, 356-359.
- Zhang, R., Ji, Y., Zhang, X., Kennelly, E.J., and. Long, C. 2020. Ethnopharmacology of *Hypericum species* in China: A comprehensive review on ethnobotany phytochemistry and pharmacology. *Journal Ethnopharmacol.* 254, 112686.
- Zhao, D., Fu, C., Chen, Y., & Ma, F. 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant cell reports*, 23, 468-474.