

## بهینه سازی القاء ریشه های موین به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه دارویی شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita*)

### Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant *Alecost* (*Tanacetum balsamita* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*

اسعد معروفی<sup>۱\*</sup> و محمد مجدی<sup>۲</sup>

Asad Maroufi\*, Mohammad Majdi

۱- استادیار ۲- دانشیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

1-Assistant Professor and 2- Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.maroufi@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

#### چکیده

گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita*) از خانواده کاسنی (Asteraceae) یک گیاه دارویی مهم می باشد که غنی از متابولیت های ثانویه مانند فلاونها، سس کوی ترین لاکتونها، مشتقات فیل پروپان ها، تانن ها و همچنین اسانس ها می باشد. گیاه شاه اسپرم به عنوان طعم دهنده و افزودنی چه به صورت تازه و چه خشک شده استفاده شده است، همچنین دارای فواید دارویی بوده و در فرآورده های معطر نیز به کار می رود. با توجه به اهمیت و کاربرد متابولیت های ثانویه، کشت ریشه های موین یک راهکار مناسب برای تولید بیشتر این مواد علاوه بر روش های کاشت کلاسیک به شمار می رود. بدین منظور در این تحقیق بررسی القاء ریشه موین در گیاه شاه اسپرم به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) مورد ارزیابی قرار گرفت. ریز نمونه های مختلف عکس عمل های متفاوتی را نسبت به القاء ریشه توسط آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 نشان دادند. همچنین فراوانی تولید ریشه های القاء شده نیز برای هر نوع ریز نمونه به صورت معنی داری متفاوت بود. صحت ریشه های القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز به کمک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* نیز تایید شد. نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان می دهد که تراریختی و القاء ریشه های موین در گیاه شاه اسپرم توسط آگروباکتریوم رایزوزنز امکان پذیر بوده و می تواند در تحقیقات انتقال ژن و کشت ریشه های موین به منظور تولید متابولیت های ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

#### واژه های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوزنز  
ریشه موین  
شاه اسپرم  
گیاه دارویی  
متابولیت ثانویه

قسمتهای مختلف گیاه شامل قطعات برگ، بین گره ها و دمبرگ در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) و نیز ارزیابی تنوع سوماکلون در کشت های کالوس گزارش شده است (Mohajjel shoja *et al.* 2010). با توجه به اهمیت و نیاز به افزایش متابولیت‌های ثانویه به دلایل کاربرد های دارویی و غذایی، به نظر می رسد که روشهای بیوتکنولوژی در کنار روشهای کلاسیک، که در بسیاری از موارد جوابگوی نیازهای مصرف نیستند، می توانند در به ثمر رسیدن این اهداف مفید باشند (Verpoorte *et al.* 2002). کشت سلولی و کشت ریشه مویین القا شده به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) از مهمترین روشهای بیوتکنولوژی گیاهی هستند که در تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار می‌گیرند (Berlin 1986; Alfermann and Petersen 1995). هر چند کشت سلولی دارای مزایای زیادی است، اما در برخی از موارد سلولهای تمایز نیافته توان بیوستتزی فراورده‌های ثانویه را از دست می‌دهند (Hasanloo *et al.* 2008). بعلاوه آنها دارای ثبات ژنتیکی نبوده که منجر به کاهش تولید متابولیتها می‌شود (Giri and Narasu 2000). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی که اکثرا دارای ارزش دارویی و صنعتی هستند از طریق کشت ریشه های مویین بسیار گسترده است (Giri and Narasu 2000) و به عنوان یک روش موثر به کار گرفته می‌شود. تاکنون تعدادی از گونه‌های مهم گیاهی از جمله گیاهان دارویی به وسیله آگروباکتریوم رایزوزنز تراریخت شده و متابولیت‌های با ارزشی توسط ریشه‌های مویین تولید شده اند. به عنوان مثال از ریشه های مویین القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه شاه بیزک (*Atropa belladonna*) آلکالوئید تروپاتی تولید شده است (Bonhomme *et al.* 2000). همچنین ریشه‌های مویین تراریخت نسبت به گیاه کامل در درمنه (*Artemisia annua*) مقدار سزکوی‌ترین بیشتری را تولید کردند (Souret *et al.* 2003). در ریشه های حاصل از القاء آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه *Rhamnus fallax*، آنتراکینون (Anthraquinone) بیشتری تولید می‌شود (Rosi *et al.* 2006). در گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) تولید ریشه‌های مویین به عنوان منبعی برای تولید سیلی مارین گزارش شده است (Rahnama 2007). در گونه

شاه اسپرم یا شاه اسپرغم با نام علمی *Tanacetum balsamita* L. و نام‌های انگلیسی Alecost یا Costmary گیاهی است چند ساله که متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) و تبار Anthemideae می‌باشد. این گیاه توسط ریزوم و بذر تکثیر یافته و دارای گل‌های لوله ای شکل زرد رنگ است که در تابستان مشاهده می‌شود. منشاء آن مدیترانه بوده (Culpepers 1950) و در اروپا و آسیا می‌روید (Pérez-Alonso *et al.* 1992). شاه اسپرم در ایران به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است و در شمال غربی کشور کشت می‌شود (Hassanpouraghdam *et al.* 2008). شاه اسپرم یک گیاه غنی از متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونها، سس-کوی‌ترین لاکتونها، مشتقات فنیل پروپان ها، تانن ها و اسانس می‌باشد (Marculescu *et al.* 2001). اسانس‌های استخراج شده از قسمتهای هوایی گیاه دارای استفاده‌های دارویی بوده و به عنوان طعم دهنده نیز در فراورده‌های غذایی به کار می‌رود (Hassanpouraghdam *et al.* 2009). همچنین گزارش‌هایی دال بر خاصیت حشره‌کشی اسانس و نیز اثرات آللوپاتی ترکیبات سس‌کوی‌ترین-های این گیاه وجود دارد (Teixeira da Silva 2004; Bylaite *et al.* 2000). تاکنون تحقیقات بسیار محدودی در ایران و در دنیا بر روی افزایش و بهره‌گیری از متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روشهای ژنتیکی و بیوتکنولوژی بر روی گیاه شاه اسپرم انجام شده است. در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف محلول غذایی هوگلند تغییر یافته بر روی ویژگی‌های رویشی، محتوا و عملکرد اسانس شاه اسپرم نتیجه گیری شد که شاه اسپرم یک گیاه کم توقع از لحاظ عناصر غذایی بوده و می‌تواند با حداقل عناصر غذایی بیشترین عملکرد اسانس را داشته باشد (Hassanpouraghdam *et al.* 2008). در بررسی ترکیبات اسانس این گیاه در مناطق شمال غرب ایران ۲۳ ترکیب شناسایی شده‌اند که عمده ترین آنها مونوترپن‌های اکسیژنه شده (۹۳/۸۷٪) و سس‌کوی‌ترین (۶۶/۶٪) می‌باشد، به طوری که مونوترپن‌های کارون (carvone)، آلفاتوجون (-thujone)، بتاتوجون (-thujone) و سینئول (1,8-cineole) ترکیبات اصلی اسانس می‌باشند (Hassanpouraghdam *et al.* 2009). همچنین یک سیستم تولید کالوس از

## مواد و روش ها

**مواد گیاهی:** بذور شاه اسپرم ازپاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تهیه ریز نمونه‌ها (جداکشت) بذور به شرح زیر استریل شدند. ابتدا بذرها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه غوطه ور شده و بلافاصله با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۷/۷) قرار گرفتند و نهایتاً سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور استریل در محیط MS (موراشیک و اسکوگ) استریل حاوی ۲ درصد شکر و ۰/۷ درصد آگار کشت شدند. کشتها در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۳۰۰۰ LUX) در شبانه روز قرار گرفتند. از قسمتهای مختلف (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) گیاهچه های بدست آمده بعد از بیست روز تا یک ماه از کشت بذور، ریز نمونه تهیه شد.

**تهیه آگروباکتریوم رایزوزنز:** جهت القای ریشه موین گیاه شاه اسپرم از سویه A4 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* حاوی پلاسمید (pRiA4) استفاده شد. باکتری ها در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ mg/l آنتی بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی شیکر چرخشی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی و به مدت ۲۴ ساعت تکثیر شدند. باکتریها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به کمک سانتریفیوژ رسوب داده شدند. پلت بدست آمده در محیط کشت MS مایع ۱/۲ حاوی  $100 \mu\text{M}$  استوسیرینگون به صورت سوسپانسیون در آمد. غلظت سوسپانسیون بین ۱-۰/۸ در  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  تعیین شد. نهایتاً این محلول جهت تلقیح ریز نمونه‌ها به کار گرفته شد.

**هم کشتی و القای ریشه‌های موین:** ابتدا ریز نمونه ها از گیاهچه جدا شده و به مدت دو ساعت در محیط MS مایع نگهداری شدند. زخمهایی در سطوح ریز نمونه ها ایجاد شد و در سوسپانسیون باکتری آماده شده جهت تلقیح به مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور شدند. سپس بر روی کاغذ صافی استریل سوسپانسیون باکتری اضافی خشک شد. نهایتاً ریز نمونه های تلقیح شده برای

*Plumbago indica* از تیره بهمنیان ریشه های حاصل از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت مقادیر بیشتری از پلامباگین (Plumbagin) تولید کردند (Gangopadhyay et al. 2010). همچنین در گونه *Bacopa monnieri* متعلق به تیره بارهنگیان، ریشه‌های تراریخته به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز تا پنج برابر مقادیر ساپونین بیشتری نسبت به گیاهان غیرتراریخت تولید کردند (Majumdar et al. 2011). پیریان وهمکاران نیز نشان دادند که غلظت نورآدرنالین (Noradrenalin) در ریشه‌های گونه خرفه پرپهن (*Portulaca oleracea*) القاء شده به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در مقایسه با ریشه های نرمال تا حدود دوازده برابر افزایش داشت (Pirian et al. 2012). کرانول، یک نوع دی‌ترپن که در گونه گیاهی *Siegesbeckia orientalis* تنها در برگهای آن تجمع می یابد، در ریشه های موین نیز تولید شد (Wang et al. 2012). همچنین ریشه های تراریخته گیاه برنجاسف (*Artemisia vulgaris*) از جنس درمنه‌ها مقادیر زیادی اسانس روغنی در مقایسه با ریشه‌های غیر تراریخت تجمع پیدا کردند (Sujatha et al. 2013). ریشه های موین حاصل از آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه *Portulaca oleracea* نیز قادر بودند دوپامین تولید کنند (Ahmadi Moghadam et al. 2014). سطح تولید caffeoylquinic در ریشه‌های تراریخته در گیاه راپتیکام کارتامویدس (*Rhaponticum carthamoides*) از تیره کاسنیان، خصوصاً در معرض نور به مقدار بالایی افزایش نشان داد (Skala et al. 2015). با توجه به اهمیت گیاه شاه اسپرم به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه با ارزش، یافتن راهی برای تولید ارزان و سریع آنها از طریق ریشه های موین ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های موین از طریق انتخاب ریز نمونه‌های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه شاه اسپرم به عنوان اولین گام موثر در کشت ریشه های موین مورد بررسی قرار گرفت.

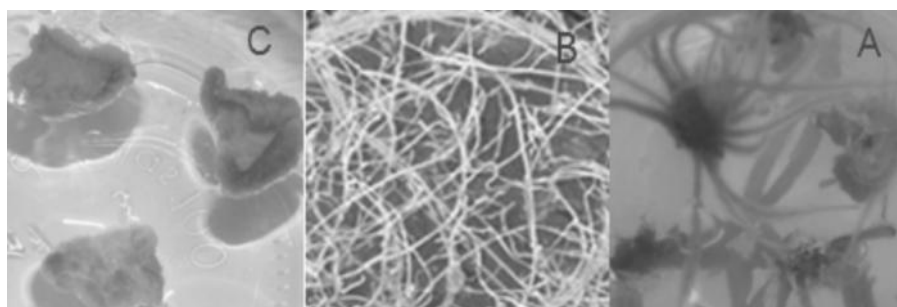
## نتایج و بحث

در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های مویین از طریق انتخاب ریز نمونه های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه شاه اسپرم بررسی شد. همه انواع ریز نمونه های به کار گرفته شده (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) توانستند پس از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز بعد از ۳ تا ۴ هفته ریشه تولید کنند (شکل ۱ A). محل ظهور ریشه ها، محل های زخم ایجاد شده بر روی ریزنمونه ها بود، اینجا محلی است که باکتری می تواند با سلول گیاهی ارتباط ایجاد کرده و DNA خود را به درون ژنوم میزبان ملحق کند. ریشه ها به صورت متراکم با رشد پلاژیوتروپیک سریع و دارای انشعابات زیاد بوده و از نظر مورفولوژی با ریشه های معمولی در کشت بافت متمایزند (شکل ۱ B). در ریزنمونه های شاهد تلقیح نشده با باکتری هیچ ریشه ای مشاهده نشد و یا در آنها کالوس مشاهده شد (شکل ۱ C). اختلاف بسیار معنی داری بین چهار نوع ریز نمونه از نظر القاء ریشه های مویین بدست آمد (جدول ۱). فراوانی القاء ریشه در کوتیلدونها از بقیه ریز نمونه ها بیشتر بود و تجزیه آماری داده های بدست آمده نیز آن را تایید کرد (شکل ۲). وزن خشک ریشه های تولید شده توسط ریزنمونه های متفاوت نیز اندازه گیری و تجزیه واریانس انجام شد (جدول ۲). نتایج حاصل نشان داد که وزن ریشه های القاء شده در کوتیلدونها بیشتر از ریشه های حاصل از بقیه ریزنمونه ها بود و اختلاف معنی داری را نشان می دهد (شکل ۳). اگر چه از نظر خصوصیات ظاهری ریشه های بدست آمده مانند ریشه های مویین بودند، اما جهت اطمینان و تایید آنها از تکنیک PCR برای بررسی ماهیت آنها استفاده شد.

هم کشتی بر روی محیط کشت MS جامد (۷ gr/l آگار) قرار گرفتند. برای تهیه نمونه های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. کشتها در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  سانتی گراد و در تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. پس از دو روز هم کشتی ریز نمونه ها ابتدا در محیط کشت MS مایع حاوی  $400 \text{ mg/l}$  سفوتاکسیم شستشو داده شدند تا از باکتری عاری شوند، سپس ریز نمونه ها به محیط کشت MS جامد حاوی  $400 \text{ mg/l}$  سفوتاکسیم منتقل شدند و در اتاق رشد در تاریکی و دمای  $25 \pm 2$  سانتی گراد نگهداری شدند. تا حذف کامل باکتری و پدیدار شدن ریشه، ریز نمونه ها هر ۷ روز به محیط کشت مشابه واگشت می شدند. بررسی القاء ریشه زایی برای چهار نوع ریز نمونه (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تعداد ریشه های القا شده و وزن تر ریشه های تولید شده توسط ریزنمونه های متفاوت اندازه گیری و با هم مقایسه شدند. بررسی داده ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شدند. میانگین ها نیز به روش دانکن با هم مقایسه شدند.

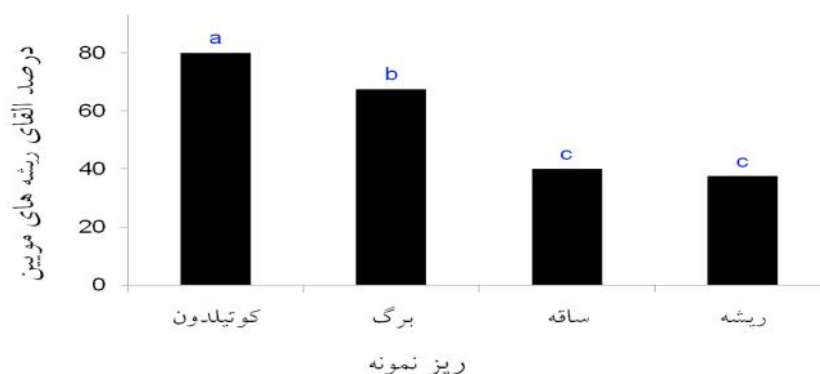
## تایید مولکولی ریشه های مویین القا شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز

جهت تایید ریشه زایی ژنتیکی ریز نمونه ها، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* (Forward: ) Reverse: /ATCCAACCTCACATCACAATGG) و واکنش PCR بر روی DNA نمونه های ریشه انجام گرفت. DNA با روش CTAB از ریشه های القاء شده استخراج شد (Doyle 1991). شرایط دمایی PCR شامل واسرشتگی اولیه در  $94^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و  $35^\circ\text{C}$  چرخه به صورت واسرشتگی در  $94^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد  $30^\circ\text{C}$  ثانیه، اتصال آغازگرها در  $53^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد  $30^\circ\text{C}$  ثانیه و بسط در  $72^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه بود. محصولات تکثیر شده برای بررسی بر روی ژل آگارز  $1/5$  درصد با ولتاژ ۸۵ بارگزاری شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید زیر نور UV مشاهده شدند.



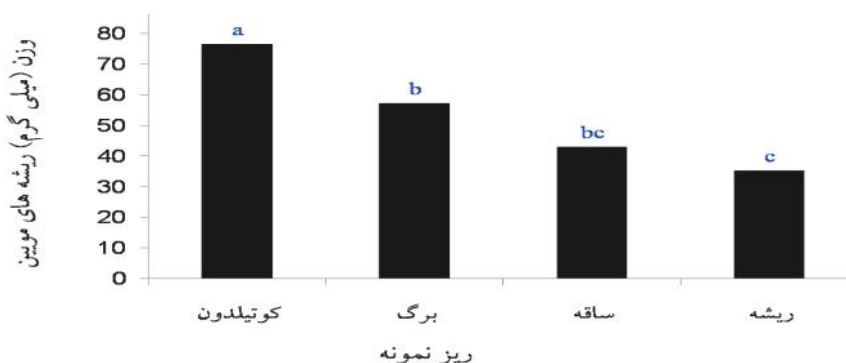
شکل ۱- مراحل مختلف القاء ریشه موین به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز. (A) ظهور ریشه های موین بر روی ریزنمونه ها در نتیجه هم کشتی با آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4، (B) رشد ریشه های موین القاء شده در محیط کشت، (C) عدم ظهور ریشه های موین بر روی ریزنمونه های آلوده نشده به آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4.

**Figure 1-** Different steps of root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. (A) Hairy roots appeared on explants co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain, (B) Hairy root growth on medium, (C) Absence of hairy root on explants not infected with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain.



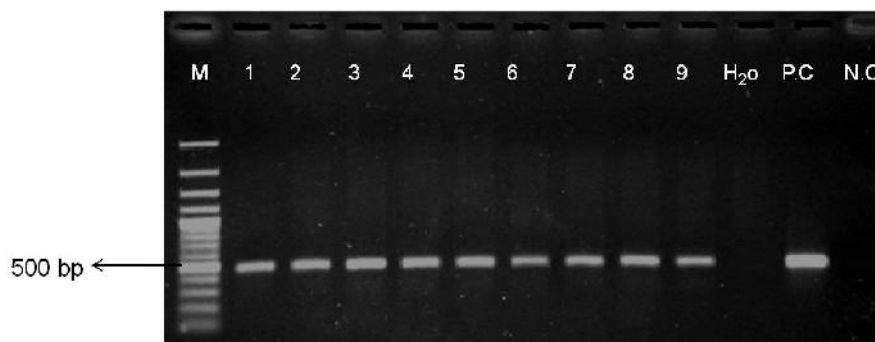
شکل ۲- مقایسه میانگین القاء ریشه های موین در ریز نمونه های مختلف، تیمارهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

**Figure 2-** Mean comparison of hairy root induced on different explants, treatments that have at least one common letter are not significantly different from each other.



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن ریشه های القاء شده توسط ریزنمونه های مختلف، تیمارهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

**Figure 3-** Comparison of mean of induced roots weight on different explants, treatments that have at least one common letter are not significantly different from each other.



شکل ۴- تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA حاصل از ریشه های موئین القا شده از ریز نمونه های گیاه شاه اسپرم. M نشان دهنده سایز مارکر DNA. ردیف های ۱-۹ ریشه های حاصل از ریزنمونه های متفاوت، P.C کنترل مثبت (پلاسمید آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4)، H<sub>2</sub>O کنترل منفی آب (مخلوط واکنش PCR آب به جای DNA الگو)، N.C کنترل منفی (محصول واکنش PCR با DNA ریز نمونه آلوده نشده به آگروباکتریوم رایزوزنز).

**Figure 4-** 500 bp fragment amplified using PCR with *rolB* primers on DNA of induced hairy roots of alecost plant. M indicating DNA size marker, lines 1-9 are root samples from different explants, P.C positive control (Plasmid from *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain), H<sub>2</sub>O water negative control, N.C negative control (PCR product of DNA from uninfected explants with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain).

جدول ۱- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه بر القاء ریشه های موئین.

**Table 1-** Analysis of variance of explants type on root induction.

منابع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تیمار (Treatment)	3	0.2**
خطا (Error)	12	0.01
کل (Total)	15	

\*\* معنی دار در سطح یک درصد

جدول ۲- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه بر وزن ریشه های القا شده.

**Table 2-** Analysis of variance of explants type on induced root weight.

منابع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تیمار (Treatment)	3	1313.8**
خطا (Error)	12	25.2
کل (Total)	15	

\*\* معنی دار در سطح یک درصد

(Facchini, 2000) و (Jeong et al. 2002) *Panax ginseng* را نام برد.

در این تحقیق نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که القاء ریشه های موئین و تراریختی به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 در گیاه شاه اسپرم امکان پذیر است. دلیل انتخاب سویه A4 این است که یک سویه دارای طیف میزبانی وسیع است و در بیشتر گزارشات در گیاهان مختلف این سویه توانسته است ریشه‌های موئین را القاء کند. همچنین نتایج نشان داد که ریز نمونه های مختلف عکس العمل‌های یکسانی در تولید ریشه موئین نسبت به آگروباکتریوم رایزوزنز نشان ندادند، به نظر می‌رسد که کوتیلدون در مقایسه با بقیه ریز نمونه‌ها قابلیت بیشتری نسبت به انتقال ژن از خود نشان می‌دهد. این موضوع بیان می‌دارد که حساسیت ریز نمونه‌ها نسبت به آگروباکتریوم رایزوزنز ممکن است مرتبط با مرحله فیزیولوژیکی بافت در گیاه باشد (Shahabzadeh et al. 2013). همه کلونهای ریشه تولید شده خصوصیات ریشه‌های تراریختی را نشان دادند و بررسی مولکولی به کمک PCR نیز آن را تایید کرد. همچنین وزن ریشه‌های تولید شده حاصل از کوتیلدون‌ها بیشتر از ریشه‌های بدست آمده از بقیه ریزنمونه‌ها بود که به نظر می‌رسد این امر نیز مرتبط با مرحله فیزیولوژیکی بافت در گیاه باشد (Shahabzadeh et al. 2013).

در خاتمه نتایج بدست آمده اولین گزارش القاء ریشه‌های موئین در گیاه دارویی شاه اسپرم است که با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4، به عنوان یک ناقل طبیعی و نیز القاء کننده ریشه در گیاهان، به طور موفقیت آمیز به انجام رسیده است. نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات پایه مناسبی را جهت انتقال ژن و القاء ریشه موئین به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های جوان فراهم می‌کند. این نتایج می‌تواند بویژه در تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش مانند کارون (carvone)، آلفاتوجون (-thujone)، بتاتوجون (-thujone) و سینول (1,8-cineole) در گیاه شاه اسپرم از طریق کشت ریشه‌های موئین مفید واقع شود.

به کمک آغازگرهای طراحی شده PCR بر روی DNA ریشه‌های حاصل از القاء توسط آگروباکتریوم رایزوزنز انجام گرفت و قطعه مورد نظر تکثیر شد (شکل ۴). این می‌تواند دلیل خوبی از الحاق موفق ژن های القا کننده ریشه از پلاسمید Ri توسط آگروباکتریوم باشد.

القاء ریشه های موئین و کشت آنها علاوه بر کاربردهای آن در بیولوژی مولکولی (آنالیز ژنها، بیان پروتئینهای خارجی، باززائی گیاه کامل و ...) یکی از ابزارهای مناسب فن آوری زیستی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می باشد (Rao Mulabagal and Tsay 2004;and Ravishankar 2002). اگرچه تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه با ارزش در گیاهان از طریق روش ریشه‌های موئین زیاد موفق نبوده و با مشکلاتی همراه است (Bensaddek et al. 2008; Stiles and Liu 2013)، اما با توجه به اهمیت آن روز به روز در حال بهبود و توسعه می باشد. به عنوان مثال تولید تجاری ساپونین از طریق کشت ریشه موئین در جین سینگ امکان پذیر شده است (Jeong et al. 2002). به علاوه در بسیاری از گیاهان که متابولیت‌های ثانویه در حالت طبیعی فقط در اندامهای هوایی تولید می شوند، ممکن است در ریشه‌های القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز نیز تولید شوند، از جمله ماده لوسون (lawson) در گیاه *Lawsonia inermis* که در حالت طبیعی فقط در اندامهای هوایی تولید می‌شود (Argolo et al. 2000). ثبات ژنتیکی ریشه های موئین یکی دیگر از ویژگی‌های مناسب آنهاست (Hasanloo 2007). بنابراین القا و کشت ریشه موئین ابزار مناسب و با ارزشی جهت استفاده در مطالعات بیولوژی مولکولی و همچنین افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می باشد. تاکنون القاء و کشت ریشه‌های موئین برای برخی از گونه های مهم دارویی بهینه و توسعه یافته است که به عنوان مثال می توان *Artemisia annua* (Maldonado-Mendoza et al. 1993); *Datura stramonium* Cai et al. 1997); *Digitalis lanata* (Pradel et al. 1997); *Solanum aviculare* (Argolo et al. 2000); *Opium poppy* (Park and Papaver somnifera) و

## منابع

- Ahmadi Moghadam Y, Piri K, Bahramnejad B, Ghiasvand T. 2014.** Dopamine Production in Hairy Root Cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) Using *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Agricultural Science and Technology 16:409-420.
- Alfermann AW, Petersen M. 1995.** Natural product formation by plant cell biotechnology -Results and perspectives. Plant Cell Tissue Organ 43:199-205.
- Argolo AC, Charlwood BV, Pletsch M. 2000.** The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*. Planta Medica 66:448-451.
- Bensaddek L, Villarreal ML, Fliniaux MA. 2008.** Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Bioscience 3(1):2-9.
- Berlin J. 1986.** Secondary products from plant cell cultures. In: Rehm H.J. Reed G. (Eds.). Biotechnology a comprehensive treatise. Verlag Chemie, Weinheim 630-658.
- Bonhomme V, Laurain-Matter D, Lacoux J, Fliniaux MA, Jacquin-Dubreuil A. 2000.** Tropan alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rolA, B, C genes only. Journal of Biotechnology 81:151-158.
- Bylaite E, Venscutonis R, Roozen JP, Posthumus MA. 2000.** Composition of essential oil of costmary [Balsamita major (L.) desf.] at different growth phases. Journal of Agriculture Food Chemistry 48(6):2409-2414.
- Cai G, Li G, Ye H, Li G. 1995.** Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. Chinese Journal of Biotechnology 11:227-235.
- Culpepers N. 1950.** Culpeper's Complete Herbal. W. Foulsham, London, 454.
- Doyle JJ. 1991.** DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM. Johnston A. (Eds). Molecular techniques in taxonomy. Springer, Berlin, 283-293.
- Gangopadhyay M, Chakraborty D, Bhattacharyya S, Bhattacharya S. 2010.** Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. Plant Cell Tissue Organ Culture 102:109-114.
- Giri A, Lakshmi Narasu M. 2000.** Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances 18:1-22.
- Hasanloo T, Rezazadeh Sh, Rahnema H. 2008.** Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. Journal of Medicinal Plants 29:1-17. (In Farsi).
- Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemyieh H, Aflatuni A. 2008.** Effects of Different Concentrations of Nutrient Solution on Vegetative Growth and Essential Oil of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.). Danesh Keshavarzi 18(1):27-38. (In Farsi).
- Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemyieh H, Vojodi L. 2009.** Volatile oil constituents of alecost [*Tanacetum balsamita* L. ssp. balsamitoides (Schultz-Bip.)] growing wild in North-West of Iran. Herba Polonica 55(1):53-59.
- Jeong G, Park D, Hwang B, Park K, Kim S, Woo JC. 2002.** Studies on mass production of transformed Panax ginseng hairy roots in bioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology 98:1115-1127.
- Majumdar S, Garai S, Jha S. 2011.** Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant Cell Reports 30(5):941-954.
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, LoyolaVargas VM. 1993.** Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:321-329.
- Marculescu A, Sand C, Barbu CH, Bobit D, Hanganu D. 2001.** Possibilities of influencing the biosynthesis and accumulation of the active principles in *Chrysanthemum balsamita* L. species. Romanian Biotechnological Letters 7(1):577-584.
- Mohajjel shoji A, Hassanpouraghdam MB, Khosrowshahli M, Movafeghi A. 2010.** Callogenesis Capability and Calli Somaclonal Variation of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.). Romanian Biotechnological Letters 15(2):5120-5124.
- Mulabagal V, Tsay HS. 2004.** Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2:29-48.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Park SU, Facchini PJ. 2000.** *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* cham. root cultures. Journal of Experimental Botany 51:1005-1016.
- Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Burzaco A. 1992.** *Tanacetum balsamita* L. A medicinal plant from Guadalajara (Spain). Acta Horticulturae 306:188-193.

- Pirian K, Piri K, Ghiyasvand T. 2012.** Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(3): 642-649.
- Pradel H, Dumkelehmman U, Diettrich B, Luckner M. 1997.** Hairy root cultures of *Digitalis lanata*, Secondary metabolism and plant regeneration. Journal Plant Physiology 151: 209-215.
- Rahnama H. 2007.** Silimarin production using hairy root culture of *Silybum marianum*. In: Proceedings of Symposium of Medicinal Plants. Iran, Shahed University, 554-573. (In Farsi).
- Rao SR, Ravishankar GA. 2002.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101-153
- Rosi N, Momcilovic I, Kovacevic N, Grubisic D. 2006.** Genetic transformation of *Rhamnus fallax* and hairy roots as a source of anthraquinones. Biologia Plantarum 50 (4):514-518.
- Shahabzadeh Z, Heidari B, Faramarzi Hafez R. 2013.** Induction of Transgenic Hairy Roots in *Trigonella foenumgraceum* Co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* Harboring a GFP Gene. Journal of Crop Science Biotechnology 16(4):263-268.
- Skala E, Kicel A, Olszewska MA, Kiss AK, Wysokinska H. 2015.** Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. BioMedical Research International ID article:181098. doi:10.1155/2015/181098.
- Souret FF, Yoojeong K, Barbara EW, Kristin KW, Pamela JW. 2003.** Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. Biotechnology and Bioengineering 83:653- .
- Stiles AR, Liu CZ. 2013.** Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology 134:91-114.
- Sujathaa G, Zdravkovic-Kora S, Cali D, Flamini G, Ranjitha Kumari B.D. 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.
- Teixeira da Silva JA. 2004.** Mining the essential oils of the Anthemideae. Afric Journal of Biotechnology 3(12):706-720.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002.** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1:13-25.
- Wang JP, Zhou YM, Zhang YH. 2012.** Kireinol production in hairy root culture of *Siegesbeckia orientalis* and its antimicrobial activity. Pharmacognosy Magazine 30:149-155.

## Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant Alecost (*Tanacetum balsamita* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*

Asad Maroufi\*, Mohammad Majdi

Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

\* Corresponding Author, Email: a.maroufi@uok.ac.ir

### ABSTRACT

**A**lecost (*Tanacetum balsamita* L.), belongs to the Asteraceae family, is a pharmacologically important species rich in important secondary metabolites including flavones, sesquiterpene lactones, phenylpropane compounds and derivatives, tannins and essential oils. Alecost has been used both fresh or dried as flavouring or food additive. Additionally, it has medicinal properties and is applied in aromatic products. In addition to traditional farming, in vitro hairy root culture has been found to be suitable for the production of secondary metabolites. Therefore, in order to establish a protocol for hairy root culture of alecost, root induction by co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* (strain A4) was assessed in this study. Different explants (cotyledon, young leaf, stem and root) showed different responses to hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. Moreover, the frequencies of hairy root induction for different types of explants were considerably different. The induced roots were shown to be transformed by PCR using primers specific for *rolB*. This is the first report of hairy root induction in alecost and the results may be useful in genetic manipulation of *Tanacetum balsamita* and use of hairy root culture to produce high-value secondary metabolites.

### Key Words

*Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, Medicinal plant, Secondary metabolites, *Tanacetum balsamita*