مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۱۱-۱۰۳

بهینه سازی القاء ریشه های مویین به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز 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[۱*] و محمد مجدی[۲]

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 (Asteraseae) یک گیاه دارویی مهم می باشد که غنی از متابولیتهای ثانویه مانند فلاونها، سس کوی ترپن لاکتونها، مشتقات فنیل 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 فراورده های معطر نیز به کارمی رود. با توجه به اهمیت و کاربرد متابولیتهای ثانویه، کشت ریشه های مویین یک راهکار مناسب برای تولید بیشتر این مواد علاوه بر روشهای کاشت کلاسیک به شمار می رود. بدین منظور در این تحقیق بررسی القاء ریشه مویین در گیاه شاه اسپرم به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) مورد ارزیابی قرار گرفت. ریز نمونه-های مختلف عکس العملهای متفاوتی را نسبت به القاء ریشه توسط آگروباکتریوم رایزوژنز 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 رایزوژنز 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 مویین در گیاه شاه اسپرم توسط آگروباکتریوم رایزوژنز امکان پذیر بوده و می‌تواند در تحقیقات انتقال ژن و کشت ریشه‌های مویین به منظور تولید متابولیتهای ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم رایزوژنز
ریشه مویین
شاه اسپرم
گیاه دارویی
متابولیت ثانویه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

مقدمه

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 (Asteraseae) 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-کوی ترپن لاکتونها، مشتقات فنیل پروپان ها، تانن ها و اسانس می باشد (Marculescu *et al.* 2001). اسانس‌های استخراج شده از قسمتهای هوایی گیاه دارای استفاده‌های دارویی بوده و به عنوان طعم دهنده نیز در فراورده‌های غذائی به کار می‌رود (Hassanpouraghdam *et al.* 2009). همچنین گزارش‌هایی دال برخاصیت حشره‌کشی اسانس و نیز اثرات آللوپاتی ترکیبات سس‌کوی ترپن-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 سس‌کوی‌ترپن (۶۶/۶٪) می‌باشد، به طوری که مونوترپن‌های کارون (carvone) ، آلفاتوجون (α-thujone) ، بتاتوجون (β-thujone) و سینئول (1,8-cineole) ترکیبات اصلی اسانس می‌باشند (Hassanpouraghdam *et al.* 2009). همچنین یک سیستم تولید کالوس از 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 رایزوژنز (*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 بیوسنتزی 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 داروئی 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 می-شود. تاکنون تعدادی از گونه‌های مهم گیاهی از جمله گیاهان داروئی به وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز تراریخت شده و متابولیت‌های با ارزشی توسط ریشه‌های مویین تولید شده اند. به عنوان مثال از ریشه های مویین القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز 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 سزکوی‌ترپن بیشتری را تولید کردند (Souret *et al.* 2003). در ریشه های حاصل از القاء آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه *Rhamnus fallax*، آنتراکینون (Anthraquinone) بیشتری تولید می‌شود (Rosić *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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

Plumbago indica از تیره بهمنیان ریشه های حاصل از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوژنز 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 رایزوژنز 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 رایزوژنز در مقایسه با ریشه های نرمال تا حدود دوازده برابر افزایش داشت (Pirian *et al.* 2012). کرانول، یک نوع دی‌ترپن که در گونه گیاهی *Siegesbeckea orientalis* تنها در برگهای آن تجمع می یابد، در ریشه های مویین نیز تولید شد (Wang *et al.* 2012). همچنین در ریشه های تراریخته گیاه بِرِنجاسف (*Artemisia vulgaris*) از جنس درمنه‌ها مقادیر زیادی اسانس روغنی در مقایسه با ریشه-های غیر تراریخت تجمع پیدا کردند (Sujathaa *et al.* 2013). ریشه های مویین حاصل از آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه *Portulaca oleracea* نیز قادر بودند دوپامین تولید کنند (Ahmadi Moghadam *et al.* 2014). سطح تولید caffeoylquinic در ریشه‌های تراریخته در گیاه راپنتیکام کارتامویدس (*Rhaponticum carthamoides*) از تیره کاسنیان، خصوصا 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 مویین ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های مویین از طریق انتخاب ریز نمونه‌های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه شاه اسپرم به عنوان اولین گام موثر در کشت ریشه های مویین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

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 درهیپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) قرار گرفتند و نهایتا 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 ۲±۲۵ 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 رایزوژنز: جهت القای ریشه مویین 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 ۱۰۰ µM استوسیرینگون به صورت سوسپانسیون در آمد. غلظت سوسپانسیون بین ۱ –۰/۸ در OD_{600nm} تعیین شد. نهایتا این محلول جهت تلقیح ریز نمونه‌ها به کار گرفته شد.

هم کشتی و القای ریشه‌های موئین: 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. نهایتا ریز نمونه های تلقیح شده برای

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

هم کشتی بر روی محیط کشت MS جامد (۷ gr /l آگار) قرار گرفتند. برای تهیه نمونه‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. کشتها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ 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 ۴۰۰ mg/l سفوتاکسیم شستشو داده شدند تا از باکتری عاری شوند، سپس ریز نمونه ها به محیط کشت MS جامد حاوی ۴۰۰ mg/l سفوتاکسیم منتقل شدند و در اتاق رشد در تاریکی و دمای ۲±۲۵ سانتی گراد نگهداری شدند. تا حذف کامل باکتری و پدیدار شدن ریشه، ریز نمونه ها هر ۷ روز به محیط کشت مشابه واکشت 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 ریشه‌های تولید شده توسط ریزنمونه‌های متفاوت اندازه-گیری و با هم مقایسه شدند. بررسی داده ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شدند. میانگین‌ها نیز به روش دانکن با هم مقایسه شدند.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین القا شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز

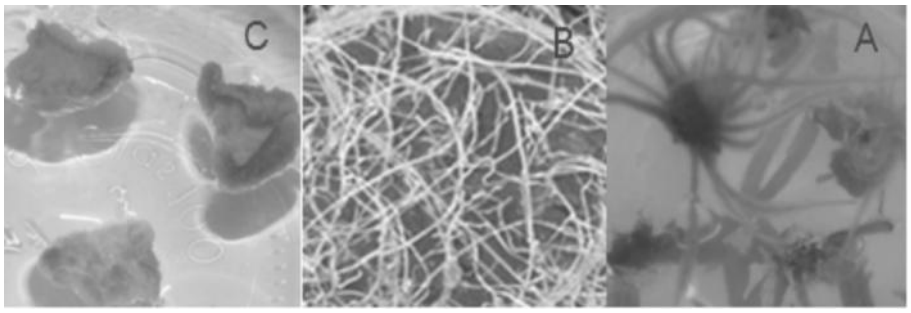
جهت تایید ریشه‌زایی ژنتیکی ریز نمونه‌ها، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* (Forward: /ATCCAACTCACATCACAATGG Reverse: TTCTAAATCAGGTTCCTCCG) واکنش PCR بر روی DNA نمونه‌های ریشه انجام گرفت. DNA با روش CTAB از ریشه‌های القاء شده استخراج شد (Doyle 1991). شرایط دمایی PCR شامل واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و ۳۵ چرخه به صورت واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه بود. محصولات تکثیر شده برای بررسی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ بارگزاری شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید زیر نورUV مشاهده شدند.

نتایج و بحث

در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های مویین از طریق انتخاب ریز نمونه‌های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز 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 رایزوژنز بعد از ۳ تا ۴ هفته ریشه تولید کنند (شکل ۱ A). محل ظهور ریشه‌ها، محلهای زخم ایجاد شده بر روی ریزنمونه‌ها بود، اینجا محلی است که باکتری می تواند با سلول گیاهی ارتباط ایجاد کرده و DNA خود را به درون ژنوم میزبان ملحق کند. ریشه‌ها به صورت متراکم با رشد پلاژیوتروپیک سریع و دارای انشعابات زیاد بوده و از نظر مورفولوژی با ریشه‌های معمولی در کشت بافت متمایزند (شکل ۱ B). در ریزنمونه‌های شاهد تلقیح نشده با باکتری هیچ ریشه‌ای 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 ریشه‌های تولید شده توسط ریزنمونه‌های متفاوت نیز اندازه گیری و تجزیه واریانس انجام شد (جدول ۲). نتایج حاصل نشان داد که وزن ریشه‌های القاء شده در کوتیلدون‌ها بیشتر از ریشه‌های حاصل از بقیه ریزنمونه‌ها بود و اختلاف معنی داری را نشان می-دهند (شکل ۳). اگر چه از نظر خصوصیات ظاهری ریشه‌های بدست آمده مانند ریشه‌های مویین بودند، اما جهت اطمینان و تایید آنها از تکنیک PCR برای بررسی ماهیت آنها استفاده شد.

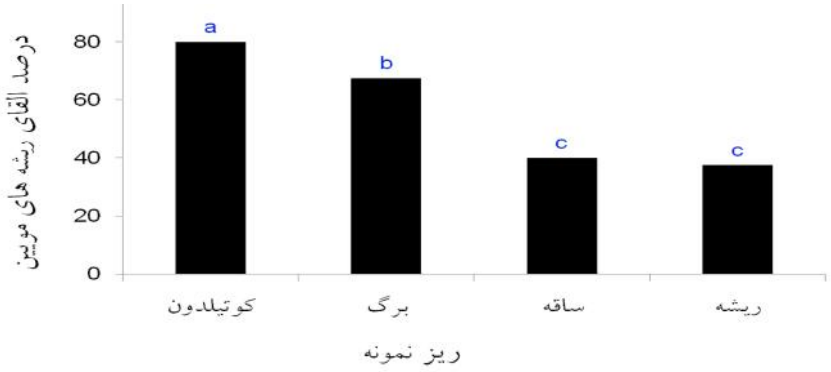
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]



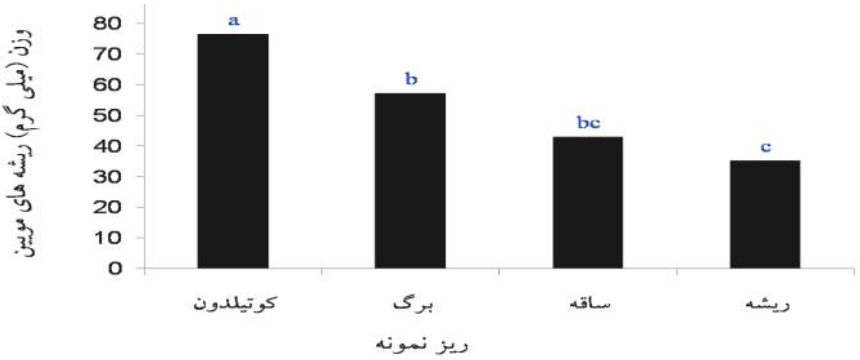
شکل ۱- مراحل مختلف القاء ریشه مویین به کمک اگروباکتریوم رایزوژنز. (A) ظهور ریشه‌های مویین بر روی ریزنمونه‌ها در نتیجه هم کشتی با اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4، (B) رشد ریشه‌های مویین القاء شده در محیط کشت، (C) عدم ظهور ریشه‌های مویین بر روی ریزنمونه‌های آلوده نشده به آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4.

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 ریشه‌های مویین در ریز نمونه‌های مختلف، تیمارهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

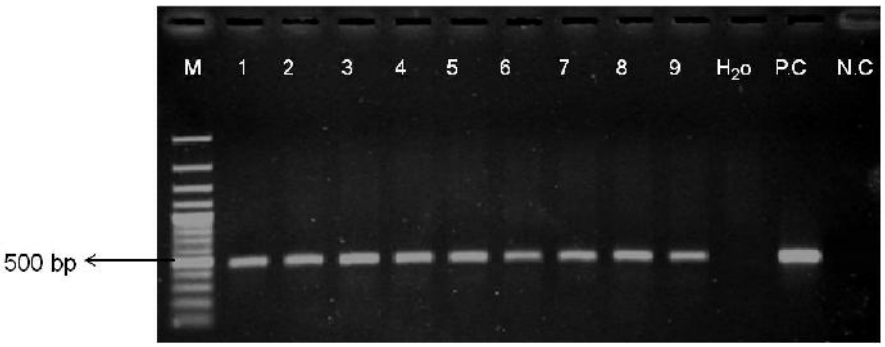
Figure 2- Mean comparison of hairy root induced on different explants, treatments that have at least one common letter are not significantly different from each other.



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن ریشه‌های القاء شده توسط ریزنمونه‌های مختلف، تیمارهایی که حداقل 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]



شکل۴- تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن rolB بر روی DNA حاصل از ریشه های مویین القا شده از ریز نمونه-های گیاه شاه اسپرم. M نشان دهنده سایز مارکر DNA، ردیف‌های ۹-۱ ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های متفاوت، P.C کنترل مثبت (پلاسمید آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4)، H_2o کنترل منفی آب (مخلوط واکنش PCR آب به جای DNA الگو) ، N.C کنترل منفی (محصول واکنشPCR با DNA ریز نمونه آلوده نشده به آگروباکتریوم رایزوژنز).

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_20 water negative control, N.C negative control (PCR product of DNA from un-infected explants with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain).

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

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 القاء 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

به کمک آغازگرهای طراحی شده PCR بر روی DNA ریشه‌های حاصل از القاء توسط آگروباکتریوم رایزوژنز 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 اگروباکتریوم باشد.

القاء ریشه های مویین 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 مویین 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 مویین 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 رایزوژنز نیز تولید شوند، از جمله ماده لاوسون (lawson) در گیاه *Lawsonnia inermis* که در حالت طبیعی فقط در اندامهای هوایی تولید می‌شود (Argolo *et al.* 2000). ثبات ژنتیکی ریشه های مویین یکی دیگر از ویژگی‌های مناسب آنهاست (Hasanloo 2007). بنابراین القا و کشت ریشه مویین ابزار مناسب و با ارزشی جهت استفاده در مطالعات بیولوژی مولکولی و همچنین افزایش تولید متابولیتهای ثانویه می باشد. تاکنون القاء و کشت ریشه‌های مویین 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) و *Opium poppy* ; *Papaver somnifera* (Park and Facchini, 2000) و *Panax ginseng* (Jeong *et al.* 2002) را نام برد.

در این تحقیق نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که القاء ریشه های مویین و تراریختی به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز 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 مویین را القاء کند. همچنین نتایج نشان داد که ریز نمونه های مختلف عکس العمل‌های یکسانی در تولید ریشه مویین نسبت به آگروباکتریوم رایزوژنز 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 رایزوژنز 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 مویین در گیاه دارویی شاه اسپرم است که با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز 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 مویین به کمک اگروباکتریوم رایزوژنز در ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های جوان فراهم می‌کند. این نتایج می‌تواند بویژه در تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش مانند کارون (carvone) ، آلفاتوجون (α-thujone)، بتاتوجون (β-thujone) و سینول (1,8-cineole) در گیاه شاه اسپرم از طریق کشت ریشه‌های مویین مفید واقع شود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

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 rhizoge*nes-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, Rahnama 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, Nazemiyeh 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 ginsenghairy 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 somniferuml*, 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

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. Dumkelehmann 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

Rosić 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 83:653-۶۵۷.

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. Kirenol production in hairy root culture of *Siegesbeckea orientalis* and its antimicrobial activity. Pharmacognosy Magazine 30:149-155.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

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

A B S T R A C T

Alecost (*Tanacetum balsamita* L.), belongs to the Asteraseae 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2]

Key Words

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

C