Crop Biotech.
Summer (2020) 9(4): 15-29 DOI: 10.30473/CB.2020.53538.1809

مجله علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال نهم، شماره چهارم، پیاپی سی‌ام، تابستان ۱۳۹۹ (۲۹-۱۵)

بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های مویین گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni حاصل تلقیح *Agrobacterium rhizogenes*

رقیه شریف‌پور[۱]، محمدعلی اعظمی[۲*]، محمدباقر حسن‌پور اقدم[۳]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران و دانشیار پژوهشی مرکز پژوهشی مجلس شورای اسلامی، تهران، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۱)

Optimization of hairy root production for *Stevia rebaudiana* Bertoni through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*

Roghieh Sharifpour, Mohammadali Aazami[2*], Mohammad Bagher Hassanpouraghdam[3]
1, 2. M. Sc. Student & Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
3. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
and Research Associate Professor, Islamic Parliament Research Center, Tehran, Iran.
(Received: Jun. 13, 2020 - Accepted: Sep. 21, 2020)

Abstract

Stevia rebaudiana Bertoni is a perennial shrub from the Asteraceae; native of Brazil and Paraguai. This Plant is containing sweet steviosides; rebaudioside and isostevol. This experiment was conducted to study the effects of diverse factors on induction and growth of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*. The seeds were surface sterilized and then cultured on solid MS medium under 25^0C and 16:8 h photoperiod. After germination and development of seedlings, the root, stem and leaf explant of three different ages (30, 60 and 90 days) were placed on NYA and LB suspension media. *Agrobacterium rhizogenes* strains (ATTCC15834, R1000 and C58) and acetosyringone were treated on the plant sample by floating and spray method for 72 hrs at 27^0C. The incubated explants were treated to remove any bacteria and were transferred to 1/2MS media containing 400 mgl^{-1} cefotaxime. To optimize the growing media for hairy root induction and growth, 1/2 MS medium was enriched with 3% sucrose and 0.2 mgl^{-1} Indole-3-butyric acid. The results revealed that all the *Agrobacterium* strains were effective on hairy root induction from root and leaf explant. The highest hairy root induction was belonged to NYA suspension medium co-cultured with 1/2 MS. Furthermore, for the roots proliferation, 1/2MS medium containing 1/5% sucrose was the selected one. Leaf clone (C2LA) stevia lines obtained from ATCC15834 strain had the highest growth.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, medium, Stevia rebaudiana.

چکیده

گیاه دارویی استویا *Stevia rebaudiana* Bertoni درختچه چند ساله کوچکی از خانواده Asteraceae است که بومی جنوب آمریکا، به‌ویژه برزیل و پاراگوئه، می‌باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر عوامل مختلف در القا و رشد ریشه‌های مویین توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه استویا صورت گرفت. بذور استویا در شرایط درون‌شیشه‌ای کشت شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های قطعات ریشه، ساقه و برگ در سنین ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به‌دست آمد. سویه‌های ATCC15834، R1000 و C58 آگروباکتریوم رایزوژنز (حاوی صفر و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) در دو محیط کشت NYA و LB با روش غوطه‌وری و اسپری به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد هم‌کشت گردیدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده بعد از حذف باکتری اضافی به محیط 1/2MS و MS جامد حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل گردیدند. به‌منظور بهینه‌سازی محیط‌کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع، از محیط 1/2MS با غلظت‌های ۱/۵٪ و ۳ ٪ ساکارز و IBA ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد هر سه سویه آگروباکتریوم بر القای ریشه مویین در ریزنمونه برگ استویا مناسب بودند ولی، سویه ATCC15834 قابلیت بیشتری در القای ریشه‌های مویین داشت. بیشترین میزان فراوانی ریشه مویین در محیط سوسپانسیون NYA و محیط هم‌کشتی 1/2MS بود. همچنین در مرحله پرآوری ریشه‌های مویین محیط 1/2MS دارای ۱/۵درصد ساکارز مناسب‌ترین محیط شناخته شد. لاین‌های حاصل از سویه ATCC15834 استویا، کلون برگ (C_2 L_A) پررشدترین لاین بود.

واژه‌های کلیدی: *Stevia rebaudiana* Bertoni، آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌مویین، محیط کشت.

E-mail: Aazami58@gmail.com
* نویسنده مسئول: محمدعلی اعظمی

مقدمه

گیاهان دارویی گستره وسیعی از گیاهان می‌باشند که مواد مؤثره این گیاهان در پیشگیری یا درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kumar Srivastava, 2018). یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی تراریخت‌نمودن گیاهان برای اهداف خاص نظیر القای مقاومت یا القای صفتی خاص می‌باشد. چنین تحقیقاتی در مورد گیاهان دارویی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد زیرا با تولید و کشت ریشه‌های مویین می‌توان گیاهان دارویی با ارزش را حفظ نمود یا باززایی کرد (Bharati & Bansal, 2014). گیاه دارویی استویا *Stevia rebaudiana Bertoni* درختچه چندساله کوچکی از خانواده Asteraceae است که بومی جنوب آمریکا، به‌ویژه برزیل و پاراگوئه است. به‌عنوان "استویا" یا "برگ عسل" به‌دلیل شیرینی زیاد گیاه شناخته شده است (Aminha *et al.*, 2014). تکثیر استویا با بذر و یا قلمه ساقه می‌باشد. ازدیاد با بذر با توجه به پایین‌بودن قدرت جوانه‌زنی بذر (Tadhani & Subhash, 2006) و تفاوت در مقدار stevioside و مشتقات آن چندان معمول نمی‌باشد (Khalil *et al.*, 2014). امروزه از تکثیر غیرجنسی و کشت بافت به‌منظور غلبه بر مشکلات فوق استفاده می‌شود.

یکی از راه‌کارهای افزایش در تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده از تکنولوژی تولید ریشه‌های مویین در برخی گیاهان دارویی می‌باشد (Ionkova, 2007). ریشه‌های مویین که با استفاده از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) تولید می‌شوند، دارای رشد سریع در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشند. بزرگترین مزیت کشت ریشه‌های مویین تولید مقادیر بالای متابولیت ثانویه نسبت به گیاه مادری می‌باشد (Bourgaud *et al.*, 1997). باکتری *Agrobacterium rhizogenes* با انتقال قطعه T-DNA حاوی ژن اکسین به سلول‌های گیاهی آن‌ها را تراریخت می‌نماید. این باکتری با انتقال ژن‌های اکسین به سلول‌های گیاهی باعث افزایش میزان اکسین در سلول‌های تراریخته‌شده و بنابراین باعث القای ریشه‌های مویین در گیاه می‌شود (Chabaud *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2020; Gutierrez-valdes *et al.*, 2020). استفاده از ریشه‌های مویین تراریخت با آگروباکتریوم رایزوژنز برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقادیر بسیار بالا مناسب می‌باشد. ثبات ژنتیکی و رشد سریع ریشه در محیط ساده فاقد هورمون، آن‌ها را به‌طور خاصی برای مطالعات بیوشیمیایی مناسب می‌سازد (Roychowdhary *et al.*, 2017; Jouanin, 1984).

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد و تولید ریشه‌های مویین تأثیر گذارند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت دست‌یابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین ضروری می‌باشد (Nartop, 2018). نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، منبع کربن و غلظت آن، غلظت یون‌های موجود در محیط کشت، pH محیط کشت، نور، فیتوهورمون‌ها و دما همگی بر رشد و متابولیسم ثانویه ریشه‌های مویین مؤثر هستند (Morgan *et al.*, 2000; Vanhala *et al.*, 1998). استفاده از روش‌هایی نظیر الیسیتاسیون، تغذیه با پیش‌سازها، تراواسازی، به دام انداختن مولکول‌های آزادشده در محیط مایع و سیستم کشت توأم از جمله روش‌هایی هستند که به‌منظور بهبود تولید در کشت ریشه‌های مویین به‌کار گرفته شده‌اند (Wu, 2007).

کشت ریشه‌های مویین جایگزین مناسب کشت سلولی برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Shanks *et al.*, 1999). اخیراً استفاده از ناقلین بیان دوگانه برای انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم رایزوژنز به گیاهان مختلفی مانند سیب‌زمینی (Visser *et al.*, 1991)، بلادن (Saito *et al.*, 1992)، سیب‌زمینی شیرین (Otani *et al.*, 1993)، همیشه بهار

(Sohrabi *et al.*, 2017) و مریم گلی کوهی (Yan *et al.*, 2005)، و در گونه‌های *Striata* (Avish *et al.*, 2014) گزارش شده است. Abdy Liaei *et al.* (2016) تولید ریشه‌های مویین در گیاه دارویی استویا را مورد بررسی قرار دادند. در کشت ریشه موئین و برای تولید stevioside از *Stevia rebaudiana* Berton تلقیح‌شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز مطالعه‌ای صورت گرفته است که ریزنمونه‌ها با سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834 and R1000, GM, C58) در محیط کشت LB تلقیح شدند. همه سویه‌ها منجر به ریشه‌زایی مویین و همچنین باعث تشکیل کالوس تومورزا شدند و همچنین ریزنمونه برگ بر القای ریشه مویین موثرتر بود (Abdy liaei *et al.*, 2016).

این پژوهش به‌منظور القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه گیاه استویا توسط سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC15834, R1000, C58)، با دو نوع محیط کشت باکتری (LB, NYA)، تأثیر الیسیتور و بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌ها در محیط کشت MS مایع تکمیل شده با غلظت‌های مختلف ساکارز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها

بذور استویا از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به‌منظور تسریع جوانه‌زنی و شکستن خواب، بذرها ابتدا به‌مدت ۱۲ساعت زیر جریان آب قرار گرفتند و سپس به‌مدت ۳ ساعت در جیبرلین ۰/۰۲۵ درصد غوطه‌ور شدند. جهت ضدعفونی، بذور تیمار شده زیر هود لامینار در اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه قرار گرفتند و سپس با هیپوکلریدسدیم ۱۰٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند، در نهایت بذور پس از ۳ بار غوطه‌وری در آب مقطر به‌مدت ۵ دقیقه، ۱۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. بعد از استریل‌کردن، بذور به‌منظور جوانه‌زنی برروی محیط MS (Murashige & Skoog, 1968) جامد با pH=۵/۸ کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی تا زمان ظهور گیاهچه‌ها نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های قطعات ریشه، ساقه و برگ در سنین ۳۰،۶۰ و ۹۰ روزه به‌منظور تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی باکتری و القای ریشه‌های مویین

به‌منظور القای ریشه‌های مویین در استویا از سه سویه ATCC15834، R1000 و C58 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به دو روش اسپری و غوطه‌وری استفاده شد. در روش غوطه وری ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار از گیاهچه‌های مادری جدا شده و در داخل پتری‌دیش استریل به‌صورت جداگانه قرار گرفتند. در مرحله بعد جهت نفوذ بهتر باکتری به درون ریزنمونه‌ها، در سطح ریزنمونه‌ها به وسیله اسکالپل و به‌صورت تصادفی، زخم‌هایی ایجاد گردید. سوسپانسیون باکتری آماده‌شده برای هر سویه نیز به درون پتری‌دیش‌های جداگانه ریخته شده و ریزنمونه‌ها درون سوسپانسیون هر یک از سویه‌های باکتری به‌طور جداگانه و به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. در روش اسپری ریزنمونه‌ها بعد از ایجاد زخم‌های تصادفی با استفاده از سرنگ حاوی سوسپانسیون سویه‌های باکتری اسپری با فاصله نزدیک به سمت ریزنمونه‌ها صورت گرفت (Ebrahimi *et al.*, 2017). به‌منظور آماده‌سازی باکتری جهت انجام تلقیح، دو محیط کشت NYAو LB (Morton & Fuqua, 2012) تهیه و باکتری‌ها ابتدا به‌مدت ۴۸ ساعت کشت شده و سپس، به داخل محیط جدید NYA و LB حاوی استوسرینگون (۱۰۰ میکرولیتر) و بدون

استوسرینگون انتقال یافتند. غلظت بهینه باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) توسط دستگاه اسپکتوفتومتر بین ۰/۷ -۰/۶ قرائت گردید. این محلول‌ها به‌مدت ۶ ساعت بر روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. در همه محیط‌های کشت باکتری، ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین اضافه شد. سوسپانسیون باکتری با استوسرینگون و بدون استوسرینگون در هر محیط کشت ابتدا به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر محیط 1/2MS مایع بر روی رسوب حاصل، سانتریفیوژ این بار به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس مجدداً، بر روی رسوب حاصل ۲۰ میلی‌لیتر محیط 1/2MS مایع اضافه و خوب مخلوط گردید و از سوسپانسیون حاصل به دو روش غوطه‌وری (۱۵ دقیقه) و اسپری جهت تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. در مرحله بعد ریزنمونه‌ها بر روی محیط 1/2MS جامد به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد هم‌کشت شدند. ریزنمونه‌های تلقیح‌شده سپس جهت حذف باکتری اضافی، در لایه کاغذ صافی‌های استریل قرار گرفته و به محیط 1/2MS و MS جامد حاوی ۴۰۰ میلیگرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل گردیدند. عمل انتقال چند مرتبه تا حذف شدن کامل باکتری تکرار شد. بعد از دو الی سه هفته ریشه‌های مویین ظاهر شده و چهار هفته بعد از ظاهر شدن اولین ریشه‌های مویین، تعداد ریزنمونه دارای ریشه‌های القاشده و میانگین وزن‌تر آن‌ها برای محیط کشت NYA و LB و محیط‌های هم‌کشتی 1/2MS و MS اندازه-گیری و ثبت شد.

بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های مویین

بعد از دو الی سه هفته، ریشه‌های مویین از محل زخم ریزنمونه‌ها و حاشیه ریزنمونه‌های برگی ظاهر شدند. بعد از گذشت ۱۰ روز و برای بهبود رشد لاین‌های پررشد، ریشه‌های مویین به محیط 1/2MS مایع عاری از هورمون و حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم انتقال یافت و سپس نمونه‌ها روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت و هر ۱۰ روز یکبار واکشت گردیدند. در صورت مشاهده رشد آگروباکتریوم، از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم داخل محیط واکشت استفاده می‌شد. از پررشدترین کلون‌ها برای ادامه کشت استفاده گردید. فاکتورهای مورد بررسی شامل سه نوع سویه باکتری (R1000، C58 و ATCC15834)، سه نوع کلون از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ در سه فاکتور محیط کشت 1/2MS مایع با مقدار درصد متفاوت ساکارز و حاوی اکسین به‌منظور پرآوری بود. در این آزمایش از لاین‌های پررشد مرحله بهینه‌سازی ریشه‌های مویین استفاده شد، برای هر سویه سه لاین‌ها پررشد انتخاب شد.

از آنجا که هر ریشه مویین محصول یک سلول تراریخته در یک ریزنمونه (لاین) می‌باشد. بنابراین هر ریشه مویین را می‌توان یک کلون در نظر گرفت. بر این اساس در تحقیق حاضر سه کلون از هر ریزنمونه ریشه، ساقه و برگ انتخاب و به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر 1/2MS مایع منتقل شدند. ریشه‌های مویین حاصل از رشد کلون‌ها پس از ۴ مرحله واکشت، وزن شدند. به‌منظور بررسی اثرات هر کدام از محیط‌های کشت بر میزان افزایش زیست توده ریشه‌های مویین، سه نمونه از ریشه‌های ریزنمونه ریشه، ساقه و برگ انتخاب و از هر کدام به اندازه ۰/۵ میلی‌گرم برداشته و به سه محیط کشت (جدول ۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند، محیط‌های کشت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ ماه نگهداری شدند. نمونه‌ها هر ۱۰ روز یک‌بار واکشت شدند. پس از گذشت ۳ ماه وزن‌تر نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

جدول ۱. ترکیب محیط‌های کشت برای پرآوری کلون‌های ریشه‌های مویین القاشده

غلظت (ساکارز یا اکسین)	محیط کشت
1/2MS+% 1.5 sucrose	محیط کشت 1
1/2MS+ % 3 sucrose	محیط کشت 2
1/2MS+ 0.2 mg.l IBA	محیط کشت 3

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

جهت اثبات تراریخت بودن ریشه‌های مویین تولید شده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی هر یک از ریشه‌های مویین با استفاده از روش CTAB (Khan *et al*., 2007) استخراج گردید.

جهت تعیین کیفیت، ۶ میکرولیتر از DNA استخراج شده در داخل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه حل شده و حدود ۳ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی متیلن‌بلو به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل، درون چاهک‌های ایجادشده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید اضافه و به‌مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در دستگاه الکتروفورز افقی قرار گرفت. ژل آگارز توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل‌داک (KiAGEN, Model: CCD-5) آشکارسازی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌منظور تأیید حضور ژن *rol*B آگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های مویین انجام گردید. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود.
(آغازگر مستقیم)
5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCT TCCACGA-3'
و (آغازگر معکوس)
5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTA CTGCAGC- 3 '

به‌منظور تکثیر قطعات 780bp ژن *rol*B مورد استفاده قرار گرفتند. جهت آماده‌سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش، از ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (آغازگرهای مستقیم و معکوس) با غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت آماده PCR master mix شرکت Cinna Gen (حاوی بافر 10xPCR، آنزیم Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ (۴ میلی‌مول بر لیتر) و dNTPs (۱۰ میکرومول بر لیتر)، ۱ میکرولیتر (۲۵ نانوگرم) DNA ژنومی و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تهیه PCR mix تحت شرایط استریل زیر هود لامینار و بر روی یخ انجام گردید.

برنامه PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود که با دستگاه ترمال سایکلر (Bio-RAD Mj-mini) انجام شد. به‌منظور مشخص شدن اندازه قطعات حاصل، از DNA مارکر 1kb شرکت Cinna Gen استفاده گردید.

آنالیز آماری

آزمایش براساس طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار انجام گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (v 9.1) انجام گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (۲۰۱۶) ترسیم شدند.

نتایج و بحث

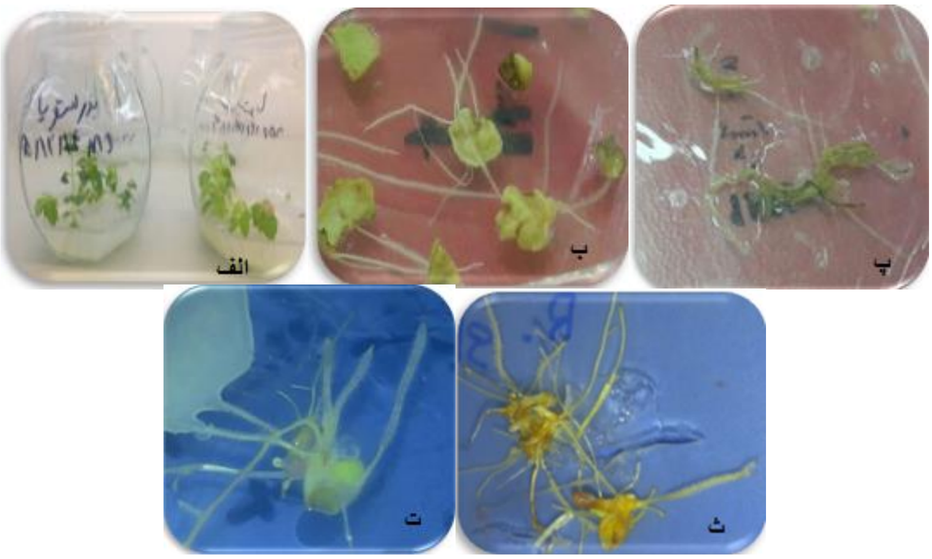
نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول۲) نشان داد که اثر چهار عامل، سویه

(ATCC15834، R1000 و C58)، سن (۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه)، نوع ریزنمونه (ریشه، ساقه و برگ) و روش اعمال (اسپری و غوطه‌وری) در صفت تعداد ریزنمونه دارای ریشه مویین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر سن بر نوع ریزنمونه و روش اعمال در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد ولی اثر سویه بر نوع ریزنمونه و روش اعمال غیر معنی‌دار بود. مقایسه میانگین درصد تلقیح ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ توسط سه سویه باکتری در دو روش غوطه‌وری و اسپری و سنین مختلف (۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه) نشان داد که هر سه سویه باکتری، موفق به القای ریشه مویین بر روی ریزنمونه‌های تلقیح شده استویا شدند. اثر متقابل داده‌ها، نشان داد که سویه‌های ATCC15834 و R1000 در سنین ۶۰ و ۹۰ روزه باعث القاء بیشترین ریشه‌های مویین گردیدند (شکل ۱). براساس نتایج به‌دست آمده سویه ATCC1583 در روش غوطه‌وری نسبت به دو سویه دیگر بر القای ریشه‌های مویین موثرتر بود و سویه R1000 در القای ریشه مویین نسبت به C58 موثرتر بود (شکل ۲). در روش غوطه‌وری بالاترین کارایی در انتقال T-DNA در ریزنمونه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه‌ها نشان داد که مناسب‌ترین سن ریزنمونه‌های گیاهی در پذیرش ژن بیگانه بسته به نوع ریزنمونه متفاوت می‌باشد. ریزنمونه‌های ریشه و برگ ۹۰ روزه بهترین درصد القای ریشه‌زایی را نشان داد. در حالی که در ریزنمونه‌های ساقه، سنین ۳۰ و ۶۰ روزه درصد القای ریشه بیشتری را داشتند. استفاده از استوسیرینگون در سویه‌های مختلف باکتری موجب تقویت تولید ریشه مویین گردید. بیشترین میانگین وزن‌تر ریشه‌های القاشده مربوط به ریزنمونه‌های ریشه و برگ تلقیح یافته به روش غوطه‌وری توسط سویه ATCC15834 بود (شکل ۳).

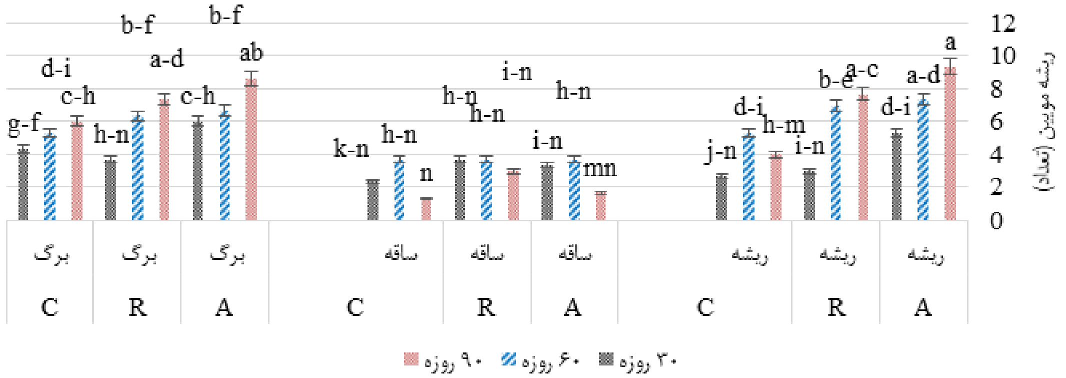
جدول ۲. جدول تجزیه واریانس اثر نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و سنین متفاوت سه ریزنمونه ریشه، برگ و ساقه *Stevia rebaudiana* با روش اعمال (غوطه‌وری و اسپری) بر روی صفات تعداد ریزنمونه دارای ریشه مویین

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریزنمونه دارای ریشه مویین
سویه	۲	۳۶/۲۴ **
سن	۲	۲۱/۹۶ **
نوع ریزنمونه	۲	۶۹/۶۵**
روش اعمال	۱	۸۸/۸۸**
سویه × سن	۴	۱/۸۴ ns
سویه × نوع ریزنمونه	۴	۸/۴۵**
سویه × روش اعمال	۲	۰/۹۶ns
سن × نوع ریزنمونه	۴	۱۷/۰۸**
سن × روش اعمال	۲	۵/۱۲*
نوع ریزنمونه × روش اعمال	۲	۱۸/۲۹**
سویه × سن × نوع ریزنمونه	۸	۲/۳۹ ns
سویه × سن × روش اعمال	۴	۳/۲۳ ns
سن × نوع ریزنمونه × روش اعمال	۴	۴/۳۴*
سویه × نوع ریزنمونه × روش اعمال	۴	۰/۳ ns
سویه × سن × نوع ریزنمونه × روش اعمال	۸	۰/۶**
ضریب تغییرات	–	۲۸/۳۹

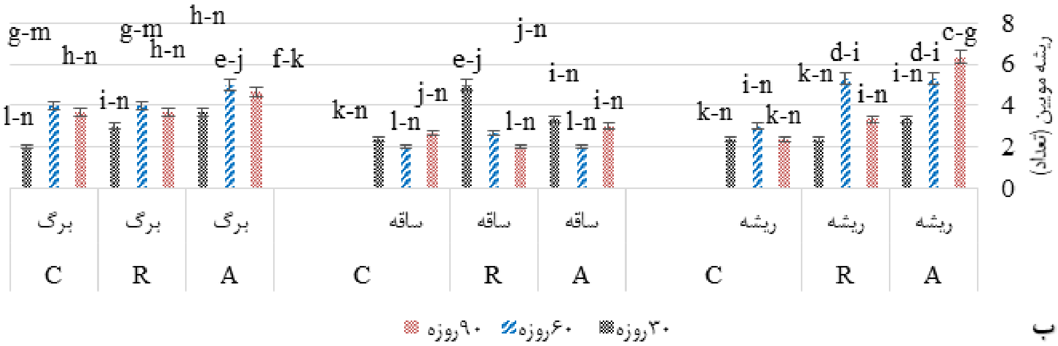
*،** و ns: به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۱. مراحل مختلف القای ریشه‌های موبین در ریزنمونه‌های گیاه استویا. الف) گیاهچه‌های استویا حاصل از بذور در شرایط درون شیشه‌ای، ب) ریزنمونه برگ گیاه استویا تلقیح‌شده با باکتری سویه ATCC15834 پس از گذشت سه هفته، پ) ظهور ریشه‌های موبین از ریزنمونه‌های ساقه ۶۰ روزه تلقیح‌شده با سویه ATCC15834 گیاه استویا در محیط کشت MS جامد، ت) ظهور ریشه‌های موبین از ریزنمونه‌های ریشه ۶۰ روزه تلقیح‌شده با سویه R1000 گیاه استویا در محیط کشت MS جامد، ث) ظهور ریشه‌های موبین از ریزنمونه‌های برگ ۶۰ روزه تلقیح شده با سویه C58 گیاه استویا در محیط کشت MS جامد



الف



ب

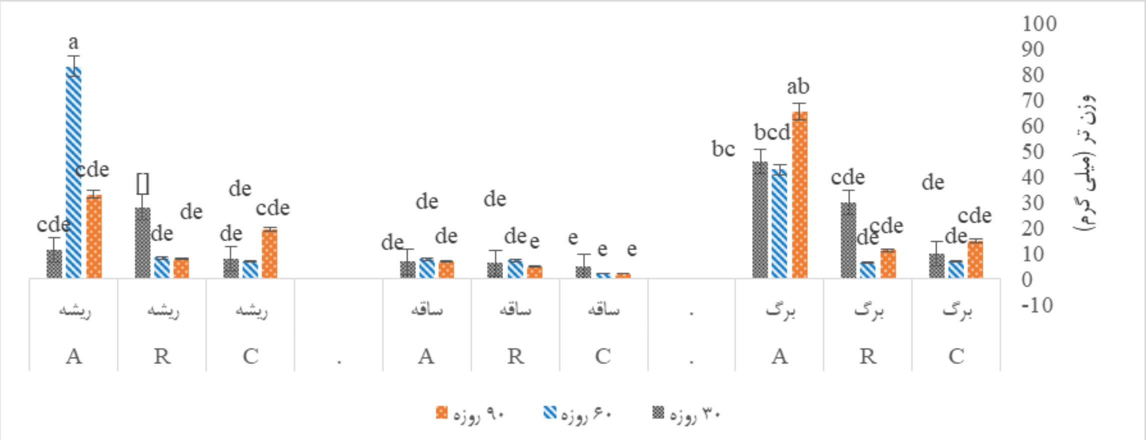
شکل ۲. اثر متقابل نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه در سنین مختلف به روش اعمال غوطه‌وری بر صفت تعداد ریزنمونه دارای ریشه موبین (الف). اثر متقابل نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه در سنین مختلف به روش اعمال اسپری بر صفت تعداد ریزنمونه دارای ریشه موبین (ب). (A=ATCC1583، R=R1000، C=C58). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

فرایند دستورزی ژنتیکی بافت‌های گیاهی و القا ریشه مویین در آن‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که شامل سن، گونه، نوع بافت گیاهی، نوع سویه آگروباکتریوم و غلظت سوسپانسیون باکتری بوده و به واسطه کاربرد برخی ترکیبات شیمیایی از قبیل استوسرینگون به عنوان یک الیسیتور می‌تواند تقویت گردد. براساس نتایج به‌دست‌آمده سویه ATCC1583 نسبت به دو سویه دیگر بر القای ریشه‌های مویین موثرتر بود، و سویه R1000 در القای ریشه‌ی مویین نسبت به C58 موثرتر بود. نتایج حاصل با یافته‌های Abdy liaei, و همکاران (۲۰۱۶) که برروی کشت ریشه مویین برای تولید استویوزید از *Stevia rebaudiana* Bertoni تلقیح‌شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز سویه‌های (C58, R1000, ATCC1583) انجام دادند مطابقت داشت. Wang و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) به‌طور چشمگیری تحت تأثیر نوع سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که درصد القای ریشه‌های مویین با سویه‌های R1000, (A4) به ترتیب ۸۰ و ۴۰ درصد بود.

روش‌های تلقیح ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری جهت القای ریشه مویین نیز از دیگر فاکتورهای مهم جهت دستیابی به ریشه مویین تراریخته با درصد بالاست. نتایج حاصل در این پژوهش نشان داد که روش غوطه‌وری از نظر درصد تولید ریشه مویین تراریخته از اهمیت بیشتری برخوردار بود. در روش اسپری، احتمال اینکه باکتری در محل زخم به دیواره سلولی گیاه متصل شود کمتر بوده و دیرتر وارد ژنوم گیاه می‌شود، ولی در روش غوطه‌وری که ریزنمونه بیشتر در معرض حمله باکتری قرار می‌گیرند روش مناسبی جهت القای ریشه مویین محسوب می‌شود (Ebrahimi *et al.*, 2017).

بررسی اثر تیمارهای مختلف بر میزان رشد ریشه‌های مویین

به‌منظور تعیین بهترین محیط برای کشت شبانه باکتری و تهیه سوسپانسیون تلقیح از دو محیط LB و NYA ، همچنین به‌منظور تعیین بهترین محیط هم‌کشتی در القای ریشه مویین از دو محیط هم‌کشتی MS و 1/2MS، استفاده شد. توانایی دو سویه ATCC15834 و R1000 در القای ریشه مویین در دو محیط کشت با شمارش تعداد ریشه‌های ظاهرشده در ریزنمونه‌ها پس از گذشت پنج هفته ثبت گردید.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری بر سن و نوع ریزنمونه‌های استویا روی صفت میانگین وزن‌تر ریشه‌های حاصل از هر ریزنمونه. (A=ATCC1583، R=R1000، C=C58). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

در شکل ۴ اثرات متقابل داده‌ها نشان داد که ریزنمونه‌های ریشه یک‌ماهه تلقیح‌یافته با سویه R1000 در محیط LB و NYA اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، ولی در ریزنمونه‌های ریشه یک ماهه سویه ATCC15834 اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین در سویه ATCC15834 ریزنمونه‌های ریشه سه ماهه، تلقیح‌یافته با دو سوسپانسیون LB و NYA اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. نتایج نشان داد که سویه ATCC15834 نسبت به نوع محیط مورد استفاده برای کشت شبانه باکتری و تهیه سوسپانسیون حساس‌تر بود. تمام ریزنمونه‌های تلقیح‌یافته با این سویه در دو محیط NYA و LB اختلاف معنی‌داری داشتند.

Sahandi Khalifeh-Kandy و همکاران (۲۰۱۶) برای تولید ریشه‌های موئین در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*) به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید کالوس و ریشه موئین در سویه ۱۰۲۶۶ و ریزنمونه برگ در شرایط درون‌شیشه‌ای بود. همچنین رشد باکتری در محیط کشت YMB+MS تأثیر بهتری در ظهور ریشه‌های موبین داشت.

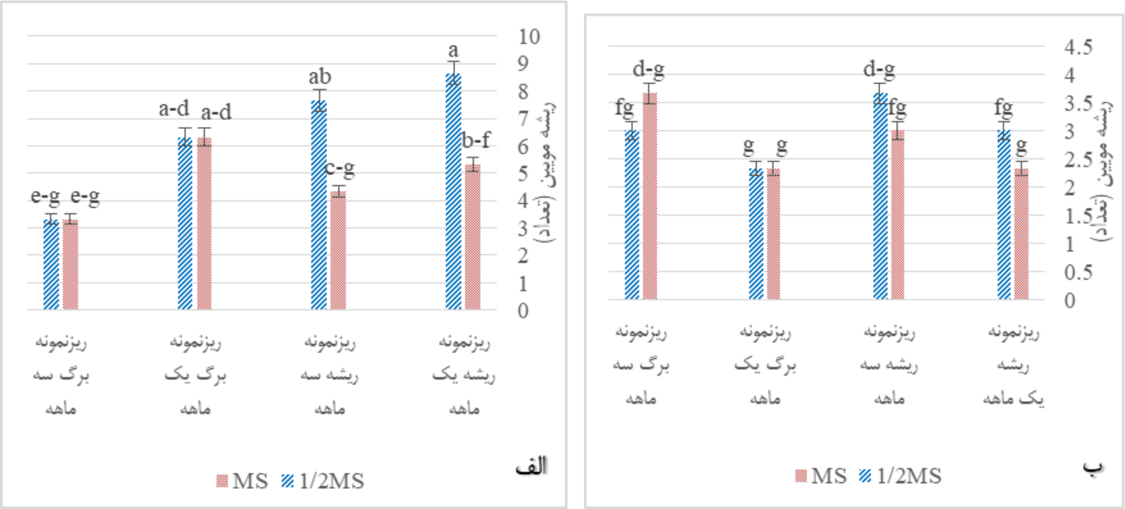
اثر متقابل دو محیط مختلف هم‌کشتی برای ریزنمونه‌های ریشه و برگ نشان داد که، ریشه‌های یک ماهه تلقیح یافته با سویه ATCC15834 در محیط هم‌کشتی 1/2MS دارای بیشترین تعداد ریشه موبین القا شده بود که با مقایسه همان ریزنمونه یک ماهه در محیط هم‌کشتی MS اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ریزنمونه‌های ریشه سه ماهه تلقیح یافته در محیط هم‌کشتی 1/2MS با همان ریزنمونه‌های تلقیح یافته توسط سویه ATCC15834 در محیط هم‌کشتی MS اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در مورد اثر متقابل بین ریشه‌های یک ماهه و سه ماهه تلقیح‌یافته با سویه ATCC15834 در محیط هم‌کشتی 1/2MS اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی بین دو سویه ATCC15834 و R1000 اختلاف معنی‌داری در تمام ریزنمونه‌ها مشاهده گردید. بیشترین تعداد ریشه موبین مربوط به محیط 1/2MS بود (شکل ۵). عوامل مختلفی توانایی آگروباکتریوم رایزوژنز را در القای ریشه موبین در نمونه‌های گیاهی تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیشترین میزان فراوانی ریشه موبین در محیط سوسپانسیون NYA و محیط هم‌کشتی 1/2MS بود.

شکل ۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری ATCC1583 حاصل از دو محیط کشت NYA و LB و سن ریزنمونه‌های ریشه و برگ استویا بر روی صفت میانگین تعداد ریشه‌های موبین القاشده (الف). مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری R1000 حاصل از دو محیط کشت NYA و LB و سن ریزنمونه‌های ریشه و برگ استویا بر روی صفت میانگین تعداد ریشه‌های موبین القاشده (ب). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

Hu و Du (۲۰۰۶) دریافتند که محیط MS تأثیر بسزایی بر رشد و تولید فنیل پروپانوئیدها در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Saussurea lappa* داشت. به‌طوری که در مقایسه با سایر محیط‌های مورد آزمون B5 ، N6 و وایت تغییر و افزایش میزان فنیل پروپانوئیدها بیشتر بوده و محیط کشت MS مناسب-تر بود. این محققین گزارش کردند که میزان تولید فنیل پروپانوئیدها در ریشه‌های مویین نسبت به آنچه که در بخش‌های هوایی گیاهان طبیعی دیده می‌شود ۴ یا ۳ برابر بیشتر بود.

به واسطه کاربرد برخی ترکیبات به سوسپانسیون تلقیح از قبیل استوسرینگون درصد القای ریشه‌زایی می‌تواند تقویت گردد (Hashemi & Naghavi, 2018). بر همین اساس در این پژوهش از دو سوسپانسیون با استوسرینگون و بدون استوسرینگون استفاده شد که آن دسته از ریزنمونه‌هایی که با سوسپانسیون دارای استوسرینگون تلقیح یافته بودند، در بازه زمانی کمتر ریشه القایی مشاهده شد و همچنین نتایج نشان داد که استفاده از استوسرینگون در سویه‌های مختلف باکتری موجب تقویت تولید ریشه مویین گردید. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج Bais و همکاران (2002) درباره وجود ترکیبات خاصی در محل زخم گیاه بواسطه عمل استوسرینگون که بیان ژن‌های vir را تحریک می‌نماید مطابقت داشت. طول و وزن‌تر ریشه‌های القا شده از ریزنمونه ریشه و برگ استویا مورد مطالعه در هر سه سویه باکتری بیشتر از ریزنمونه ساقه بود. در واقع ریشه‌های القایی حاصل از ریزنمونه‌های ساقه معمولاً دیرتر از ریزنمونه برگ و ریشه ظاهر می‌شوند و در نتیجه ریشه مویین آن‌ها هم نسبت به برگ و ریشه در هر سه سویه رشد کمتر و طول ریشه مویین کمتری داشتند.

Dehghan و همکاران (۲۰۱۲) همچنین به‌منظور القای ریشه‌های مویین در گونه *H. muticus* از دو سویه آگروباکتریوم رایزوژنز (A4 و LBA9402) استفاده کردند. نتایج نشان داد که قابلیت سویه A4 در تلقیح ریزنمونه گیاهان گونه‌های مذکور از سویه LBA9402 بیشتر بود. همچنین میان لاین‌های ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه‌های مختلف باکتری از نظر رشد و میزان تولید آلکالوئیدها تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده گردید.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتریATCC1583 بر سن ریزنمونه‌های ریشه و برگ استویا در محیط کشت MS و 1/2MS روی صفت میانگین تعداد ریشه‌های مویین القاشده. (الف) مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری R1000 بر سن ریزنمونه‌های ریشه و برگ استویا در محیط کشت MS و 1/2MS بر روی صفت میانگین تعداد ریشه‌های مویین القاشده، (ب) حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

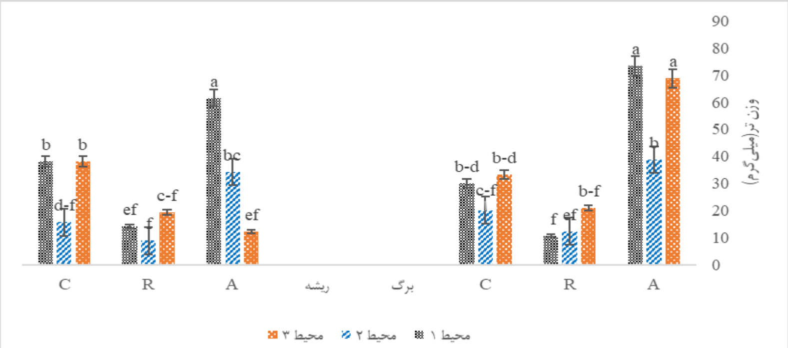
در مطالعه حاضر، درصد القای ریشه‌های مویین به‌طور معنی‌داری از سویه‌های باکتری تأثیر پذیرفته است. نتایج این پژوهش نشان داد که در ریزنمونه ریشه و برگ درصد القای ریشه مویین مناسب بوده که این امر می‌تواند به دلیل بالابودن سرعت تقسیم سلولی در این نواحی باشد. در این پژوهش ریزنمونه‌های ساقه در هر سه سویه باکتری نسبت به القای ریشه‌زایی ضعیف‌تر بودند، همچنین در این ریزنمونه، درصد القای ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های جوان‌تر بیشتر بود. مناسب‌ترین سن ریزنمونه‌های گیاهی در پذیرش ژن بیگانه بسته به نوع ریزنمونه متفاوت می‌باشد (Mehrotra *et al.*, 2008). نتایج حاصل با یافته‌های Ebrahimi و همکارانش (۲۰۱۷) که بر روی گیاه برازمبل (*Perovskia abrotanoides*) برای القا ریشه‌های مویین توسط سویه‌های ATCC15834، R1000 و TR105 انجام گرفت مطابقت داشت.

اثر نوع محیط کشت پرآوری بر میزان رشد ریشه‌های مویین

در شکل ۶ نتایج حاصل از اثر متقابل محیط کشت بر سویه و نوع کلون‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار وزن تر (۷۳/۳۳) میلی‌گرم در ریشه‌های حاصل از سویه ATCC15834 مربوط به کلون دو ریزنمونه برگ در محیط مایع 1/2 MS دارای ۱/۵ درصد ساکارز بود و بعد از آن کلون برگ همان سویه در محیط مایع 1/2 MS دارای 0.2 mg/l IBA با وزن ۶۸/۷۷ میلی‌گرم در سطح دوم قرار داشت. در سویه C58 بیشترین وزن تر (۳۸/۲۲) مربوط به ریزنمونه ریشه بود. کمترین مقدار وزن تر (۸/۸۳ میلی‌گرم) مربوط به کلون یک، حاصل از ریشه تلقیح یافته با سویه R1000 در محیط 1/2 MS دارای ۳٪ ساکارز بود.

در بررسی تأثیر محیط‌های مختلف سوسپانسیون بر القای ریشه‌زایی در پژوهش حاضر، سویه ATCC15834 به نوع محیط مورد استفاده برای کشت شبانه باکتری و تهیه سوسپانسیون، نسبت به سویه R1000 حساس‌تر بود. محیط کشت 1/2MS با ۱/۵٪ ساکارز با سویه ATCC15834 بیشترین مقدار زیست توده را ایجاد کرد.

Zárate (۱۹۹۹) با مطالعه تأثیر نوع محیط کشت پایه و غلظت قند بر رشد و میزان تروپان آلکالوئیدهای ریشه‌های مویین *Atropa baetica* گزارش نمود که اگر چه میزان رشد ریشه‌های مویین در محیط 1/2B5 حاوی ۳٪ درصد ساکارز نسبت به محیط B5 کمتر بود اما تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در این شرایط بهتر بود.



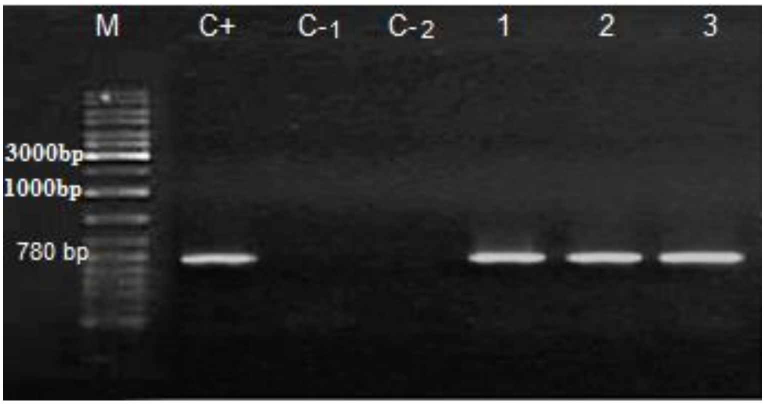
شکل ۶ مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری بر سن ریزنمونه‌های ریشه استویا در محیط کشت MS و 1/2MS بر روی صفت میانگین تعداد ریشه‌های مویین القاشده. (C=C58 ،R=R1000 ،A=ATCC1583). (محیط ۱: 1/2MS+1.5% Sucrose، محیط ۲: 1/2 MS+3% Sucrose، محیط ۳: 1/2 MS+0.2 mg/l IBA). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

در محیط‌های مختلف هم‌کشتی MS و 1/2MS در ریزنمونه‌های استویا، با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که ریزنمونه‌های استویا به غلظت‌های بالای نمک حساس بود. زیرا مشاهدات تجربی نشان داد که در غلظت بالای محیط کشت مانند MS، ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و دچار بافت مردگی می‌شدند. نتایج این آزمایش با یافته‌های Phuong و همکاران (۲۰۱۹) که روی گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) جهت القای ریشه مویین از سویه A4 و چهار محیط کشت MS، 1/2MS، B5 و 1/2B5 استفاده شده بود، نتایج نشان داد که در میط کشت MS ریشه‌های مویین کمتری تشکیل شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین محیط کشت بر سویه و نوع کلون‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار وزن تر در کلون ریشه و برگ حاصل از سویه ATCC15834 در محیط مایع 1/2 MS دارای ۱/۵٪ ساکارز بود. بر طبق تحقیقات صورت گرفته در استفاده از ساکارز به عنوان منبع کربن روی استویا، نتایج نشان داده که ساکارز تأثیر مثبتی بر روی رشد و نمو گیاه استویا دارد، ازآنجایی‌که این گیاه از کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای بالایی برخوردار است استفاده از غلظت بالای ساکارز (۳٪) نتیجه عکس خواهد داشت (Sanchéz-Cordova *et al*., 2019).

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین با واکنش PCR

نتایج الکتروفوز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه ۷۸۰ bp مربوط به ژن *rolB* را در ریشه‌های حاصل در ریزنمونه‌های مختلف توسط سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز به کار رفته، نشان داد. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (به عنوان کنترل منفی) هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰ bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol*B در ریشه‌های مویین بود (شکل ۷).

این نتایج با یافته‌های Banihashemi و همکاران (۲۰۱۵) در استخراج کومارین از ریشه‌های مویین گیاه دارویی شاهبیزک (*Atropa komarovii*) مطابقت دارد. همچنین یافته‌های پژوهش حاضر منطبق با مطالعات Pakdin-Parizi و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) تراریخت‌شده با باکتری ATCC15834 و Zebarjadi و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه سنبل‌الطیب توسط سویه‌های باکتریایی LBA9402 و AR15834 است.



شکل ۷. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت در گیاه استویا. M: DNA مارکر 10000 bp (Cinna Gen)، +C: باکتری آگروباکتریوم سویه ATCC1583 به‌عنوان کنترل مثبت، C-1: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی اول، C-2: واکنش PCR بدون الگوی DNA به عنوان کنترل منفی دوم لاین ۱ تا ۳: ریشه‌های مویین القاشده در ریزنمونه‌های برگ سه ماهه توسط سویه ATCC1583 آگروباکتریوم رایزوژنز.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این پژوهش، هر سه سویه (R1000، ATCC15834 و C58) قادر به القای ریشه‌زایی در هر سه ریزنمونه استویا، در سه سن مختلف به‌کار برده شده بودند. هرچند سویه ATCC15834 قابلیت بیشتری در القای ریشه‌زایی مویین را داشت. یکی از عوامل مهم، در القای ریشه‌های مویین نوع محیط کشت مورد استفاده می‌باشد. از دو نوع محیط (NYA و LB) و از دو محیط (MS و 1/2MS) برای هم‌کشتی ریزنمونه‌های تلقیح‌یافته استفاده شد. توانایی دو سویه ATCC15834 و R1000 در القای ریشه مویین در محیط‌های مختلف، با شمارش تعداد ریشه‌های ظاهرشده در ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۵ هفته از تلقیح ریزنمونه‌ها، نشان داد که بیشترین میزان فراوانی ریشه مویین در محیط سوسپانسیون NYA و محیط هم‌کشتی 1/2MS بود. در مورد اثر محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین از کلون پررشد استویا که در نتیجه تلقیح با سه سویه (ATCC15834، R1000 و C58) در ریزنمونه ریشه و برگ القاشده بود استفاده گردید، در میان لاین‌های مختلف، ریشه‌های مویین حاصل از سویه ATCC15834 استویا، کلون برگ (C_2 L_A) پررشدترین لاین بود و محیط 1/2MS دارای ۱/۵ درصد ساکارز مناسب‌ترین محیط جهت پرآوری ریشه‌های مویین استویا بود.

REFERENCES

Abdy liaei Z, Maleki M, Omidi M (2016) Production of stevioside by hairy root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. International Iranian Genetics congress. 23 May. Tehran. Iran.

Aminha S, Soumya AN, Raju VG, Goud BM, Irfath M, Quadri SAP (2014) Isolation and extraction of artificial sweetner (*Stevia*). World J. Pharm. Res. 3: 481-486.

Avish M, Jafari M, Maleki R (2014). Hairy root induction in the medicinal plant, *Scrophularia striata* Boiss. 1*P*st*P* International and 13*P*th*P* National Iranian Genetics Congress, May 24-26, Tehran, Iran.

Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant. Physiol. Biochem. 40(11): 983-995.

Banihashemi O, Khavari-Nejad RA, Yassa N, Najafi F (2015) Induction of hairy root in *Atropa komarovii* using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 5(4):22-31.

Bharati AJ, Bansal YK (2014) In vitro production of flavonoids: a review. W.J.P.P.S. 3(6): 508-533.

Bourgaud F, Bouque V, Gontier E, Guckert A (1997) Hairy root cultures for the production of secondary metabolites. C.A.B.I. 9: 205-208.

Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. The Medicago truncatula handbook, version November.

Dehghan E, Hakkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Shahriari Ahmadi F (2012) Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 110: 35-44.

Ebrahimi S, Zaker A, Abrishamchi P, Bahrami AR, Ganjeali A, Sodagar N (2017) Hairy root induction and secondary metabolite production in *Perovskia abrotanoides* Karel. J. Plant

Proc. Funct. 6(20): 17-26.

Gutierrez-valdes N, Hakkinen ST, Lemasson C, Guillet M, Marja K, Caldenty O, Ritala A, Cardon F (2020) Hairy root culture-A versatile tool with multiple applications. Front. Plant Sci. 3: 165-172.

Hashemi SM, Naghavi MR (2016). Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. Plant Cell Tissue Organ Cult. 125: 31-41.

Hu ZB, Du M (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. J. Integr. Plant Biol. 48(2): 121-127.

Ionkova I (2007) Biotechnological approaches for the production of Lignans. Pharmacogn. Rev. 1: 427-443.

Jouanin L (1984) Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. Plasmid 12(2): 91-102.

Khalil SA, Zamir R, Ahmad N (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi. J. Biol. Sci. 21(6): 566-573.

Khan S, Qureshi MI, Alam T, Abdin MZ (2007) Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. Afr. J. Biotechnol. 6(3): 175-183.

Kumar Srivastava A (2018) Synthesis of medicinal agents from Plants. Significance of medicinal plants in human life. Academic Press, pp 1-24.

Mehrotra S, Kumar Kukreja A, Singh Khanuja SP, Nath Mishra B (2008) Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electron. J. Biotechnol. 11(2): 69-75.

Mi Y, Zhu Z, Qian G, Li Y, Meng X, Xue J, Chen Q, Sun W, Shi Y (2020) Inducing Hairy Roots by *Agrobacterium rhizogenes*- Mediated Transformation in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). J. Vis. Exp. 157: 67-75.

Morgan J, Barney C, Penn A, Shanks J (2000) Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 262-265.

Morton EL, Fuqua C (2012) Unit3D.1 Laboratory maintenance of agrobacterium. Curr. Protoc. Microbiol. 6: 1-8.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nartop P (2018) Engineering of biomass accumulation and secondary metabolite production in plant cell and tissue cultures. Plant metabolites and regulation under environmental stress. Academic press, pp 169-194.

Otani M, Mii M, Handa T, Kamada H, Shimada T (1993) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant sci. 94(1-2): 151-159.

Pakdin-Parizi A, Farsi M, Nematzade GA, Mirshamci A (2015). Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L. Acta agri. Slovenica 103(2): 299-305.

Phuong VTB, Dai CM, Hong PTA, Phuong QND (2019) Biological activity and hairy roots induction of *Hibiscus sabdariffa* L. Nat. Sci. 2(6): 66-74.

Roychowdhary D, Majumder A, Jha S (2017) Biotechnology for medicinal plants. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. Springer. pp. 29-68.

Sahandi Khalifeh-Kandy A, Pazhouhandeh M, Mohajjel-Shoja H (2016) The effect of *rolC* gene on the medicinal plant *Catharanthus roseus*. Genet. Engin. Biosaf. J. 5(1): 41-50.

Saito K, Yamazaki M, Anzai H, Yoneyama K, Murakoshi I (1992)

Transgenic herbicide-resistant Atropa belladonna using an Ri binary vector and inheritance of the transgenic trait. Plant cell rep. 11(5-6): 219-224.

Sanchéz-Cordova AJ, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, López-Torres A, Sanchez-Ocampo PM, García-López E, Huerta-Heredia AA (2019) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances steviol glycosides production and growth in *Stevia rebaudiana* plantlets. Sugar Tech. 21: 398-406.

Shanks JV, Morgan J (1999) Plant hairy root culture. Curr. Opin. Biotech. 10(2): 151-155.

Sohrabi Nezhad Z, Marashi H, Moshtaghi, N (2017) Optimization of hairy root production in *Calendula officinalis* for production of oleanolic acid. J Plant Res. 3(31): 1-17.

Tadhani M, Subhash R (2006) Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. J. Med. Sci. 6(3): 321-326.

Vanhala L, Eeva M, Lapinjoki S, Hiltunen R, Oksman-Caldentey KM (1998) Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. J. Plant Physiol. 153: 75-81.

Visser RGF, Somhorst I, Kuipers GJ, Ruys NJ, Feenstra WJ, Jacobsen E (1991) Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. Mol. Gen. Genet. 225(2): 289-296.

Yan Q, Hu Z, Tan RX, Wu J (2005) Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. J. biotech. 119(4): 416-424.

Wang B, Zhang G, Zhu L, Chen L, Zhanga Y (2006) Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. Coll. Surfaces B: Biointerfaces 53: 101-104.

Wu X (2007) Establishment and chemical analysis of hairy roots of *Eucommia ulmoides* (Doctoral dissertation, Shanghai University).

Zebarjadi AR, Najafi Sh, Ghasempour HR, Motamedi J (2011) Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes*. J. Medicin. Plants Rese. 5(20): 345-355.

Zárate R (1999) Tropane alkaloid production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root cultures of *Atropa baetica* Willk. (Solanaceae). Plant Cell Rep. 18(5): 418-423.