

تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های موین حاصل از گیاه دارویی شاییزک (*Atropa belladonna*) در شرایط درون شیشه‌ای

نوع مقاله: پژوهشی

هانیه لطفی^۱، حسن مهدوی کیا^۲، فرزاد بنائی اصل^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- دانشیار گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ایران

۳- استادیار پژوهشی، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، بخش تحقیقات زیست‌فناوری، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

f.banaei@rifr-ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

صفحه ۲۰-۱

چکیده

شاییزک (*Atropa belladonna*) به دلیل وجود آلكالوئیدهای تروپانی برای درمان دردها و همچنین بیماری‌هایی با حملات انقباضی چون آسم و سیاه‌سرفه دارای عملکرد مثبتی است. در این پژوهش از ۵ سویه باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز A₄، ATCC، 1724، R1000 و MSU در سه ریز نمونه برگ، ساقه و ریشه به جهت القای ریشه موین استفاده شد و در نهایت پس از انتخاب لاین برتر در معرض شش غلظت و پنج تیمار زمانی تیمار متیل جاسمونات قرار گرفت و صفات مورفولوژیک بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، نوع ریز نمونه و سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز موفق شدند تا اثر معنی‌داری را بر درصد تولید ریشه موین داشته باشند، همچنین از بین سه ریز نمونه مورد استفاده در محیط کشت، تنها ریز نمونه برگ موفق به تولید ریشه موین شد و بیشترین درصد ریشه‌زایی (۴۵/۵٪) توسط تلقیح با سویه R1000 به دست آمد. به‌طور کلی محرک متیل جاسمونات در صورت افزایش غلظت و مدت‌زمان قرارگیری در معرض این تیمار دچار تنش و سمیت شده و آسیب و کاهش رشد در ریشه‌ها مشاهده خواهد شد. در صورتی‌که در صورت استفاده صحیح از غلظت و زمان مناسب باعث افزایش فعالیت‌های متابولیتی شده و به‌عنوان یک پیام‌رسان مولکولی قوی عمل خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم ریزوژنز، ریشه‌موئین، خانواده سولاناسه، کشت درون شیشه‌ای، متیل جاسمونات.

مقدمه

شابیزک یا *Atropa belladonna* یک گیاه علفی و چندساله بوده که در اروپا، شمال آفریقا و آسیای غربی رویش دارد. همچنین این گیاه گاهی به عنوان یک گیاه زینتی در ایالات متحده کشت می شود. شابیزک به خانواده سیب زمینیان (Solanaceae) تعلق دارد (Lacković. 2017). دارای برگ های بزرگ به صورت جفت؛ در دو طرف ساقه است. میوه ها به شکل گلاس های بنفش تیره/سیاه، آبدار بوده که حاوی دانه های بسیاری است و سمی ترین قسمت این گیاه هستند. به دلیل طعم شیرین و مطبوع میوه این گیاه سمی و خودرو در طبیعت و شباهت بسیار آن با توت های خوراکی دیگر باعث ایجاد خطر مسمومیت بالا برای کودکان و بزرگسالان در اروپا، آفریقا و آسیا شده است (Lacković. 2017). (Fattahi et al. 2021; Laffargue et al. 2011). به دلیل وجود آلکالوئید در این گیاه مسکنی برای از بین بردن درد، در بیماری هایی که همراه با حملات انقباضات عضلانی همچون: سیاه سرفه، آسم، صرع و برونشیت حاد بوده و همچنین عصاره شابیزک به کاهش درد قلب، درمان مشکلات کبدی و کیسه صفرا کمک شایانی می کند. به علاوه اینکه از این گیاه دارویی برای درمان نقرس و زخم نیز استفاده می شود (Lee. 2007).

به طور معمول تولید ترکیبات زیست فعال از گیاهان دارویی با ارزش از طریق انواع سیستم های کشت بافتی انجام می شود و به دلیل اینکه روشی ایده آل به جهت تکثیر برخی از گیاهان دشوار است؛ در سال های اخیر در سراسر جهان علاقه زیادی به این تکنیک پیدا شده است (George et al. 2018; Moradi et al. 2008). همچنین از دیگر توانایی این تکنیک کشت ریشه مویین بوده که این ریشه های مویین دارای ویژگی هایی بالقوه ای اعم از رشد در کمترین زمان ممکن، پایداری ژنتیکی بالا، افزایش تولید متابولیت ثانویه و همچنین حفاظت از گیاهان نادر بدون ریشه کن کردن آنها و استفاده مؤثر از آنها خواهد شد؛ در نتیجه یکی از راهکارهای مؤثر برای دستیابی به متابولیت های با ارزش گیاه دارویی مدنظر است (Faraz et al. 2020).

باکتری آگروباکتریوم رایزوترنز (*grobacterium rhizogenes*) ابزاری مؤثر و توانمند در القای ریشه مویین بوده و همچنین باعث افزایش تولید متابولیت های ثانویه شده و در صورت بهره مندی از محرک های مناسب باعث بهبود این هم افزایی نیز خواهد شد (Li and Wang, 2021). عوامل مختلفی چون نوع ژنوتیپ، گیاه، ریز نمونه و سویه باکتری مورد استفاده برای تلقیح بر میزان القای ریشه مویین تأثیرگذار خواهد بود؛ همچنین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی دیگری همچون

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های موین حاصل از..."

بالا تر از حدی با ایجاد سمیت نتیجه منفی را در بر خواهد داشت (Lorenzo et al. 2003). در این پژوهش اثر سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* بر القای ریشه موین در گیاه شاپیزک در سه ریز نمونه برگ، ساقه و ریشه بررسی شده و همچنین تأثیر تیمار متیل جاسمونات در غلظت‌های مختلف بر صفات مورفولوژیکی و شاخص رشد ریشه‌های موین حاصل از تلقیح توسط *A. rhizogenes* به‌طور مجزا در ریشه‌های موین تحت تیمار و بدون تیمار مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش

این پژوهش در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه بخش زیست‌فناوری واقع در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهران انجام شد.

طرح آزمایشی: بررسی القا ریشه موین در سه نوع ریز نمونه (برگ، ساقه و ریشه) توسط ۵ نوع سویه باکتری *A. rhizogenes* (ATCC, A₄, MSU) در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۱۷۲۴ و R1000) ۳ تکرار انجام شد.

در مرحله بعدی تیماردهی در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۱۵۰ میکرو مولار و ۵ در تیمار زمانی شامل ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در نهایت ویژگی‌های مورفولوژیکی آن اعم از طول ریشه و وزن

رشد و تولید ریشه‌های موین وابسته به این عوامل بوده و نتایج متفاوتی را در بر خواهد داشت. در نتیجه استفاده از محرک‌های مناسب جهت بهینه‌سازی ترکیبات محیط‌کشت باعث تحریک جریان محصولات درون سلولی برای انتقال ژن به گیاهان توسط *A. rhizogenes* شده و با توسعه بخشی این جریانات می‌تواند باعث کارایی بیشتر این امر شود (Kabirnotaj et al. 2013; Yadav et al. 2014).

متیل جاسمونات جزئی از مشتقات جاسمونیک اسید است و محصول نهایی مسیر اکتادکانوئید بوده که مسئول القا کردن فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای است که در نهایت باعث بیوسنتزی واکنش‌های مرتبط با تولید ترکیب‌های دفاعی خواهد شد و این واکنش‌های دفاعی شامل پلی فنل‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها بوده و باعث بروز پاسخ‌های دفاعی می‌شود و در نتیجه این مراحل؛ گیاه در برابر تنش‌های پیش‌آمده و عوامل فیزیولوژیکی چون رشد و پیری برگ تأثیرپذیر خواهد بود (Kozłowski et al. 1999 Qian et al. 2005; Choi et al. 2004).

به‌طور کلی با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص رابطه میزان غلظت مصرفی متیل جاسمونات و زمان مورد استفاده نتایج حاکی از آن بوده که غلظت‌های پایین‌تر در اکثر گونه‌های گیاهی اثر مثبتی داشته و در غلظت‌های

خشک‌ریشه‌های مویین، تحت تأثیر تیمار اعمال‌شده؛ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱. کشت بذرها به جهت تهیه ریز نمونه‌ها:

بذرهای گیاه دارویی *A. belladonna* از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهران تهیه شد. بذرها پس از خیسانده شدن در آب مقطر به مدت یک ساعت قرار گرفت. به جهت ضدعفونی بذور از الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم دو درصد به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه و ده دقیقه استفاده شد؛ در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (عمویی و همکاران، ۱۳۹۷؛ خطیب زاده و همکاران، ۱۳۹۲)؛ (Sedira et al. 2001). سپس در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با یک‌دوم غلظت حاوی ۶ گرم بر لیتر آگار کشت‌شده و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس برای جوانه‌زنی در اتاق رشد نگهداری شدند.

۲. القای ریشه‌موئین:

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول تأثیر نوع ریز نمونه (برگ، ساقه و ریشه) و فاکتور دوم ۵ نوع سویه (*A4*, *MSU*, *ATCC*, 1724 و R1000) در نظر گرفته شد. هر سویه به‌صورت تک کلون شده در محیط کشت مایع LB به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر در حالت غوطه‌ور، در دمای ۲۸ درجه

سانتی‌گراد در انکوباتور انتقال یافت. پس از رشد کافی باکتری‌ها؛ تراکم نوری آن‌ها توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد و مقدار بهینه غلظت باکتری (OD 600) بین ۰/۵ تا ۰/۶ برای هر سویه در نظر گرفته شد (Sathasivam et al. 2022). به جهت تلقیح ابتدا ریز نمونه‌های برگ، ساقه و ریشه‌های جوان‌تر و سالم‌تر انتخاب و به قطعات دو سانتی‌متری برش داده شدند. سپس زخم‌هایی بر سطح‌رویی ریز نمونه‌ها با استفاده از اسکالپل ایجاد شد و جهت تلقیح غوطه‌وری در محیط حاوی سوسپانسیون باکتری انجام شد. سپس برای حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی موجود در اطراف ریز نمونه‌ها، از کاغذ استریل استفاده شد. ریز نمونه‌های تلقیح شده جهت هم‌کشتی ابتدا به محیط کشت پایه MS فاقد هورمون و آنتی‌بیوتیک به مدت ۴۸ ساعت انتقال یافت.

پس از گذشت ۲ الی ۳ روز پس از تشکیل هاله موسیلاژی شکل لزجی در اطراف ریز نمونه‌های تلقیح یافته با باکتری، آلودگی نمایان گشت. برای حذف باکتری، ریز نمونه‌ها با آب استریل حاوی ۳۵۰ mg/L سفوتاکسیم شست‌و‌شو داده شدند و جهت حذف آب اضافی روی کاغذ استریل قرار گرفته شد؛ سپس به محیط کشت جامد MS حاوی ۲۵۰ mg/L سفوتاکسیم انتقال یافته و هر سه روز یک‌بار واکشت انجام شد؛ و این کار تا زمانی

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های موین حاصل از..."

که ریز نمونه‌ها عاری از باکتری شوند؛ ادامه یافت. در این مرحله ریشه موین رؤیت شد. پس از ظهور این ریشه‌های موین، درصد ریشه‌زایی برای هر سویه بررسی شده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳. استقرار ریشه‌های موین:

پس از گذشت دو هفته از رشد ریشه‌های موین حاصل از القای باکتری *A. rhizogenes*؛ ریشه‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری حاصل شد. حدود ۱-۲ سانتی‌متر از آن بریده شده و به محیط‌هایی حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با یک‌دوم غلظت در ظروف شیشه مربا کشت شد و در داخل شیکر انکوباتر با ۸۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند و هر دو هفته یک‌بار جهت رشد بهتر واکشت صورت گرفت. کلون‌های حاصل از ریشه‌موئین شابیزک رشد بسیار کندی داشته و بعد از حدود سه ماه با انتخاب لاین برتر و ریشه‌های رشد یافته جهت اعمال تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

۴. تأیید تراریختی ریشه‌های موئین القاشده توسط *A. rhizogenes* به روش مولکولی:

برای اطمینان از تأیید تراریخت بودن ریشه‌های موین حاصله، از روش مولکولی استفاده شد. استخراج دی.ان.ا به روش Cai و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد. در نهایت تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر روی ریشه‌های موین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن roIB، جهت تأیید تراریختی استفاده شد. چاهک‌ها حاوی ریشه‌های موئین حاصل از ریز نمونه تلقیح یافته و همچنین سویه باکتری *A. rhizogenes* استفاده شده بوده که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و ریشه‌های غیرتراریخت حاصل از جوانه‌زنی بذر نیز به عنوان کنترل منفی (شاهد) استفاده شد. در مرحله اول واسرشت در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس در مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و پس از آن ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت زمان ۳۵ ثانیه انجام شده و در مرحله بعدی، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه و سنتز رشته‌ی جدید در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در مرحله آخر بسط نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Sedira et al., 2001).

Forward Primer: 5'- CAGTTTCGCATCTTGACAG -3'
Reverse Primer: 5'- GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3'

۵. تیمار متیل جاسمونات:

پس از این که ریشه های مویین به حداکثر رشد خود رسیدند؛ بعد از اطمینان از تأیید تراریختی ریشه های مویین حاصل شده، ریز نمونه و سویه برتر جهت تکثیر و کشت انتخاب شد. ریشه های مویین حاصل از ریز نمونه برگ تلقیح شده توسط سویه R1000 انتخاب و جهت تکثیر به محیط کشت مایع انتقال یافت. پس از رشد کافی ریشه ها، تیمار متیل جاسمونات در غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۱۵۰ میکرو مولار و در ۵ تیمار زمانی شامل ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال شد. از مقادیر هم وزن ریشه های موئین در محیط کشت بدون هورمون استفاده شد و هریک از ریشه ها به طور جداگانه تحت تأثیر قرار گرفتند. سپس به داخل شیکر با سرعت ۶۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی انتقال یافتند (Moradi et al. 2020). پس از اتمام دوره تیمار به محیط کشت MS ۱/۲ مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت یک ماه، ریشه های مویین برداشت شده و پس از شستشو با آب مقطر و حذف آب اضافی توسط کاغذ صافی صفات مورفولوژیکی آن مورد اندازه گیری قرار گرفت.

۶. صفات مورد اندازه گیری: متغیرهای طول

ریشه مویین و وزن خشک پس از تیماردهی برای هر لاین از ریشه مویین اندازه گیری شد.

۷. تجزیه و تحلیل داده های آماری:

تمامی آزمایش ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون Duncan در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

۱. تأثیر نوع سویه و نوع ریز نمونه بر القای

ریشه مویین:

جوانه زنی بذور کشت شده در محیط کشت MS بعد از ۱۸ روز آغاز شد. پس از رشد گیاه مذکور القای ریشه مویین در ریز نمونه برگ، ریشه و ساقه انجام شد و بعد از حدود ۱۴ روز پس از تلقیح، اولین ریشه تراریخت در محل زخم از ریز نمونه برگ ظهور یافت. در ابتدا نقطه ای کالوس مانند تشکیل شد و پس از آن، از محل کالوس شکل؛ ریشه های مویین رشد یافتند. نتایج نشان داد از ریز نمونه های مورد نظر برگ و ریشه موفق به القای ریشه مویین شدند. محل ظهور ریشه های مویین حاصل شده نیز محل زخم ایجاد شده بوده که حاکی از محل ارتباط باکتری با سلول گیاهی میزبان می بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها (جدول ۱) حاکی از آن بوده که برهمکنش بین نوع ریز نمونه و ۵ سویه مورد استفاده در تشکیل ریشه

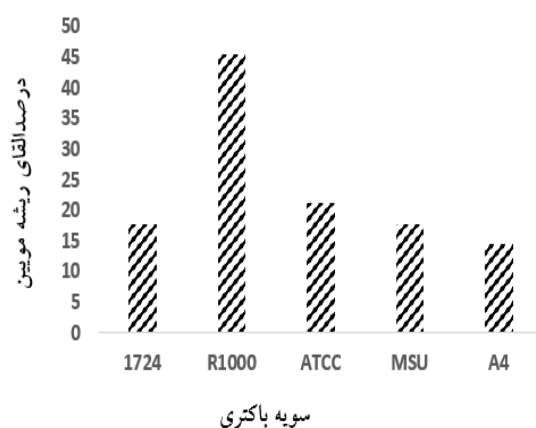
"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

مویین به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شده؛ درحالی‌که اثر متقابل نوع سویه و نوع ریز نمونه بر درصد القای ریشه مویین معنی‌دار نشد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که سویه R1000 بالاترین درصد تشکیل ریشه مویین (۴۵/۵ درصد) را داشت (شکل ۱ و ۴). همچنین بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر نوع ریز نمونه؛ بیشترین درصد القا ریشه مویین (۴۴ درصد) مربوط به ریز نمونه برگ (شکل ۲) بوده و در ریز نمونه ریشه و ساقه به ترتیب ۲۰/۶۷ درصد و ۵/۳۳ درصد (شکل ۲). به دست آمد که کمترین میزان، در ریز نمونه ساقه مشاهده شد؛ اما باین‌حال القای ریشه مویین در ریز نمونه‌های ساقه و ریشه قبل از رسیدن به فاز ریشه‌زایی و ظهور ریشه مویین به دلیل آلودگی‌های قارچی و نکروزه شدن کمترین میزان درصد القای ریشه مویین را در برداشت (شکل ۳).

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه و نوع ریز نمونه بر برخی صفات ریشه‌های مویین

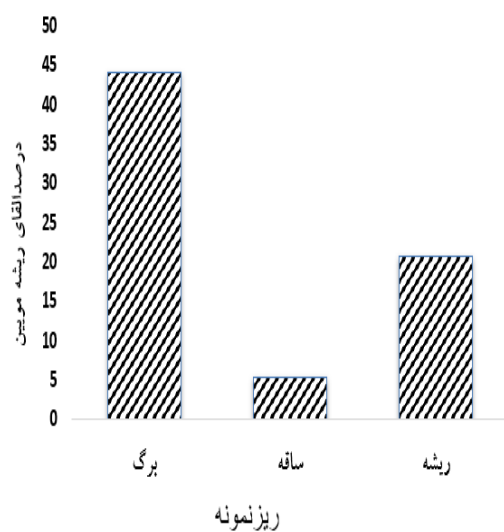
میانگین مربعات	df	درصد القای ریشه مویین
منابع تغییرات		
ریز نمونه	۲	۵۶۸۶/۷**
سویه	۴	۱۴۳۸/۹*
اثر متقابل	۸	۶۲۲/۵ ns
خطا	۳۰	۴۲۸/۸

***، * و ns به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری است.

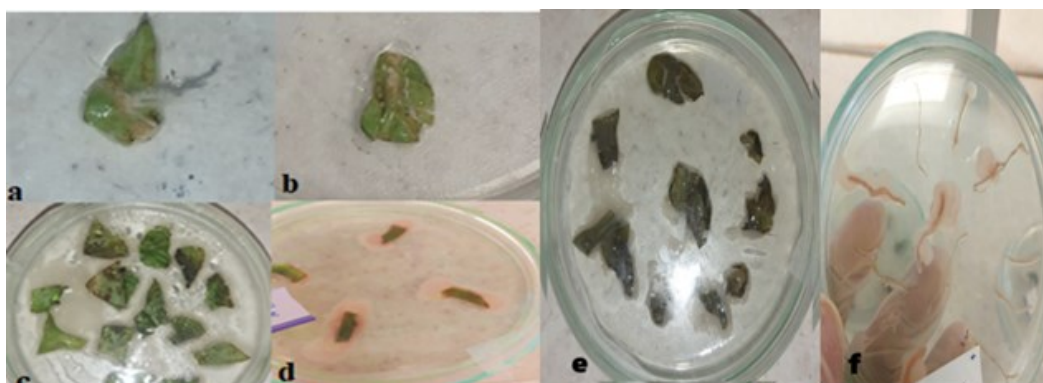


شکل ۱- تاثیر نوع سویه باکتری بر درصد القای ریشه مویین

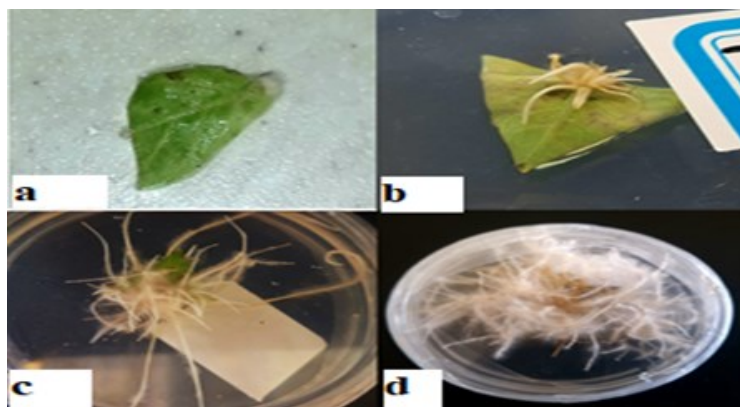
"مجله ایمنی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳"



شکل ۲- تأثیر ریز نمونه بر درصد القای ریشه موئین.



شکل ۳- ریشه موئین ظهور یافته از سویه ATCC که در ابتدا به شکل کالوس بود (a و b)، ریز نمونه برگ حاصل از سویه A4 آلوده شده (c)، ساقه، برگ و ریشه نکروزه شده قبل از رسیدن به فاز ریشه زایی و ظهور ریشه موئین (d، e و f)

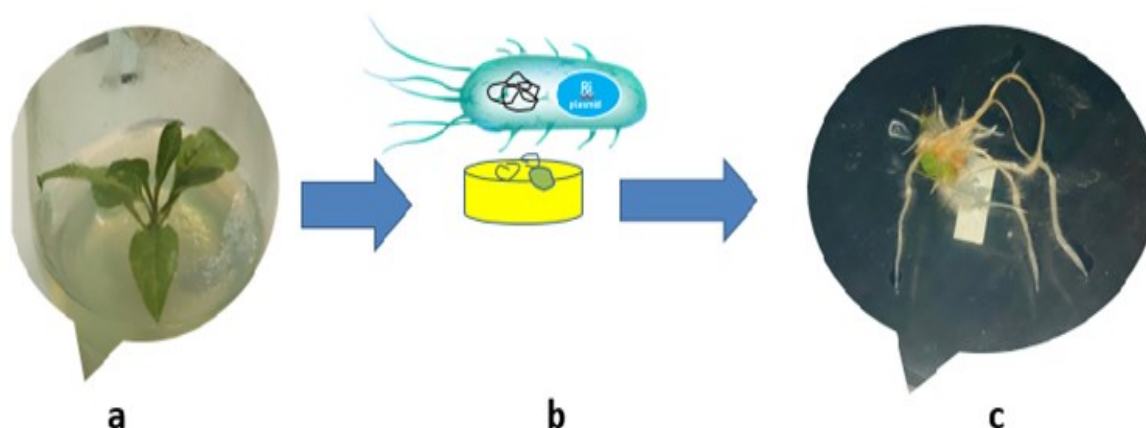


شکل ۴- مراحل رشدی ریشه های موئین حاصل از سویه R1000 به ترتیب ریشه موئین ظهور یافته از محل زخم (a و b)، ریشه های موئین رشد یافته (c و d)

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

ریشه مویین، ادامه پژوهش با تمرکز بر این سویه و ریز نمونه پیش رفت (شکل ۵). در نتیجه ریشه‌های مویین حاصل شده به محیط کشت مایع به جهت تکثیر و اعمال تیمار انتقال یافت.

با توجه به نتایج حاصل از اثر نوع ریز نمونه و نوع سویه باکتری، ریز نمونه برگ تلقیح شده توسط سویه R1000 به عنوان بهترین ریز نمونه و بهترین سویه باکتری برای گیاه شایبک در نظر گرفته شد و با توجه به تولید درصد بالایی از



شکل ۵- مراحل القاء ریشه موئین توسط سویه *A. rhizogenes* R1000 در ریز نمونه برگ شایبک گیاهچه مادری (a)، قطعات برگ بریده شده و آماده تلقیح (b)، ریشه مویین حاصل شده از القاء *A. rhizogenes* سویه R1000 بعد از ۱۴ روز (c)

۲-۳. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین به روش مولکولی:

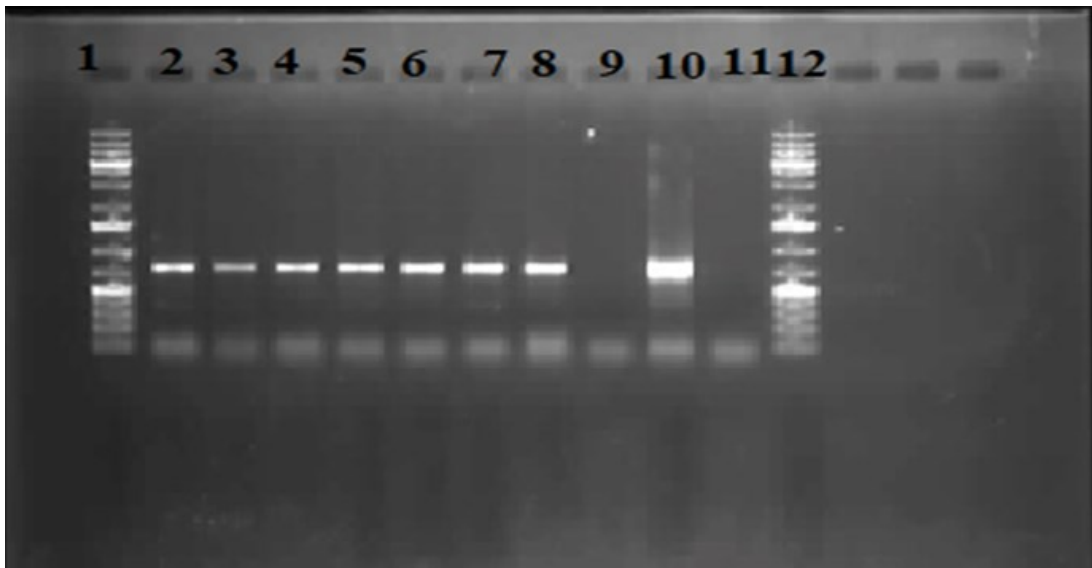
۲-۳. تأثیر متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی ریشه‌های موئین شایبک:

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل تیمار غلظت و مدت زمان قرار گرفتن ریز نمونه در معرض محرک متیل جاسمونات بر صفات مورد بررسی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار است. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار متیل جاسمونات بر طول ریشه مویین، بلندترین طول ریشه (۶۳/۶۵ میلی متر) در غلظت ۱۰ و ۲۵ میکرو

برای اطمینان از صحت القای سویه‌های *A. rhizogenes* مورد استفاده، سویه باکتری مورد نظر به جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol B* برای انجام pcr مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس نتایج به دست آمده وجود T_DNA تأیید شده و قطعه‌ای به طول ۳۳۸ bp در چاهک‌های ژل الکتروفورز و هم تراز با قطعه تکثیر شده به دست آمد (شکل ۶).

مولار متیل جاسمونات با تیمار زمانی ۲۴ ساعت و کمترین طول ریشه در غلظت ۵ میکرو مولار متیل جاسمونات با تیمار زمانی ۷۲ و ۲۴ ساعت حاصل شد (شکل ۷). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار متیل جاسمونات بر وزن خشک ریشه‌های موئین، بیشترین میزان وزن خشک نیز در غلظت ۱۰ میکرو مولار با تیمار زمانی ۲۴ ساعت (۰/۹۵ گرم) مشاهده شد (شکل ۸).



شکل ۶- نتیجه تأیید تراریختی ریشه‌های موئین حاصل شده. ۱- نشانگر دی.ان.ا. ۲-۸ ریشه‌های تراریخت، ۹ و ۱۱ ریشه‌های موئین غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی ۱۰- کنترل مثبت (سویه باکتری مورد استفاده)

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با متیل جاسمونات بر میزان طول رشد و وزن خشک ریشه موئین شایبک

میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه موئین	وزن خشک
مدت زمان تیمار	۴	۷۲۹/۴۳**	۰/۱۹۸**
غلظت متیل جاسمونات	۵	۵۰۶/۳**	۰/۱۴۱**
اثر متقابل	۲۰	۷۰۵/۷۳**	۰/۱۶۱**
خطای آزمایشی	۶۰	۶/۷	۰/۰۰۳

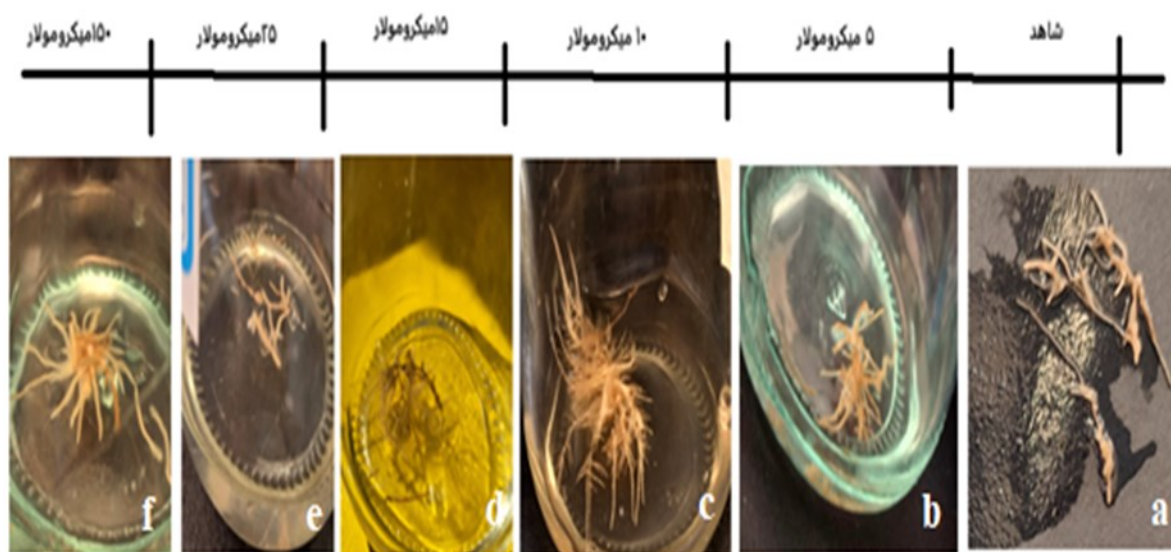
***، * و ns به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری است

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."



توجه به اثر مهارکنندگی این تیمار تحت شرایط تنش، رشد گیاه کاهش خواهد یافت؛ بنابراین می توان گفت افزودن الیستورها در کنار مزایایی که دارد (در صورت استفاده نامنطبق با گونه گیاهی موردنظر) باعث عدم رشد ریشه موین شده و اثرات منفی را به بار خواهد آورد. یکی از دلایل این تأثیر، تجمع تروپان آلکالوئیدها در محیط کشت است که باعث ایجاد صدمه در ریشه موین خواهد شد (Kai et al. 2012).

به دست آمده به نظر می رسد که در فرآیند کاهش صفات مورفولوژیک سه عامل اصلی دخیل باشد: دلیل اول، مدت زمان قرارگیری در معرض تیمار و دلیل دوم، غلظت تیمار مورد استفاده بوده و عامل سوم نیز تنش های محیطی پیش آمده را می توان احتمال داد؛ که در این بین، به نظر می رسد مدت زمان نسبت به غلظت برتری دارد، در نتیجه می توان گفت با افزایش مدت زمان تیماردهی و مقدار غلظت مورد استفاده، نتیجه معکوسی را در خصوص صفات مورفولوژیک خواهیم داشت. با



شکل ۹- تأثیر تیمار متیل جاسمونات بر رشد ریشه موین شابیزک

شاهد (a) ریشه موین تیمار شده به ترتیب با غلظت ۵-۱۰-۱۵-۲۵-۵۰ میکرو مولار (b, c, d, e, f)

بحث

تأثیر الیستور متیل جاسمونات بر ریشه های موین بر میزان رشد و صفات رشدی و مورفولوژیکی ریشه های موین حاصل از کشت بافت این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش، اثر سویه های مختلف باکتری *A. rhizogenes* بر القای ریشه موین در سه ریز نمونه مورد استفاده بررسی شده و در مرحله بعدی

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

همچنین تقسیم سلولی در بافت‌های مختلف است، بسته هر بافت گیاهی با توجه به گونه آن گیاه توانایی متفاوتی را در تولید ریشه مویین دارد (Pirian et al. 2012; Kabirnotaj et al. 2013). همچنین در پژوهشی دیگر بر روی تمامی ریز نمونه‌های برگ‌گی گونه هیوسياموس نایجر (*H. niger*) پس از تلقیح توسط سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* (AR15834, AR9543, A7, AR318, A4, AR9402) قهوه‌ای شده و این امر سبب عدم توانایی در تولید ریشه‌های مویین شد (Shakeran and Keyvanfar. 2017). القاء ریشه مویین در ریز نمونه ساقه و هیپوکوتیل دو گیاه دیگر از خانواده سولاناسه نیز؛ موفقیت‌آمیز نبود (Pawar and Maheshwari. 2004). با توجه به واکنش‌های افزایش حساسیت (hypersensitivity) که جزئی از پاسخ‌های دفاعی گیاه در تقابل با تنش‌ها است؛ به صورت موضعی در اطراف محل آلوده شده را فراگرفته و با علائمی چون مرگ سلولی و تجمع عوامل ضد میکروبی ظاهر خواهد شد (Richter and Ronald, 2000). در نهایت تمامی این عوامل منجر به نکروزه شدن و در نهایت تخریب و مرگ سلولی رخ خواهد داد؛ در نتیجه محل ورود T-DNA را با مشکل مواجه کرده و باعث کاهش کلون‌های حاوی سلول‌های تراریخت می‌شود. همچنین از دیگر پیامدهای نکروزه شدن عدم توانایی آزاد شدن سیگنال‌های

موفقیت در القای ریشه مویین از طریق *A. rhizogenes* وابسته به عوامل مختلفی نظیر گونه، جنس و سن بافت گیاهی است (Bernousi et al. 2016). همچنین نوع ریز نمونه، ژنوتیپ گیاه، شرایط محیط کشت و همچنین نوع سویه باکتری از عوامل مؤثر بر القای ریشه مویین است (Jaberi et al. 2018). بنابراین می‌توان گفت با مطالعه و بررسی تجربی می‌توان سویه مناسب با گونه گیاهی مورد نظر را بررسی کرده و از نتایج و مزایای مثبت آن استفاده کرد (Thwe et al. 2016). در این پژوهش نیز ریز نمونه‌های مختلف تأثیر متفاوتی را در سویه‌های متفاوت از *A. rhizogenes* مورد استفاده در برداشت. در پژوهشی بر روی گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) از خانواده سولاناسه، نتیجه تلقیح ریز نمونه برگ‌گی به وسیله *A. rhizogenes* نتیجه منفی در برداشته و تمامی برگ‌ها در اثر نکروزه شدن بافت‌ها از بین رفتند (Shakeran and Keyvanfar. 2017). بر اساس پژوهش‌های انجام شده به نظر می‌رسد ایجاد آلودگی، نوع بافت، گونه گیاهی و سویه باکتری رابطه مستقیمی با یکدیگر نداشته و بر اساس بافت گونه گیاهی عکس‌العمل متفاوتی را خواهد داشت. در گیاه شابیزک نیز به نظر می‌رسد مستعدترین ریز نمونه، بافت برگ‌گی است. بنابراین می‌توان اظهار داشت که با توجه به تفاوتی که در عواملی من جمله؛ سنتز DNA و

موفقیت آمیز ریشه های موپین در نظر گرفته شد. تأثیر متیل جاسمونات یا هر الیسیتور دیگر در گیاهان رابطه مستقیمی را با عواملی چون: ویژگی های الیسیتور مورد استفاده، غلظت و مدت زمان قرارگیری در الیسیتور و مرحله رشدی گیاه در ارتباط است. همچنین بر اساس پژوهش های صورت گرفته نتایج نشان می دهد بر اساس غلظت تروپان آلکالوئیدها و سایر متابولیت های ثانویه ارائه شده؛ غلظت بهینه ترکیب های سیگنالی بر اساس نوع گونه ها متفاوت عمل می کند (Namdeo. 2007). بنابراین یکی از راهبردهای مفید در راستای افزایش تولید متابولیت های ثانویه استفاده صحیح از میزان الیسیتورهای زنده و غیرزنده در دوز غلظتی و مدت زمان مناسب برای هرگونه گیاهی است.

در پژوهشی بر ریشه های جانبی گیاه *Scopolia parviflorato* تأثیر دو تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بررسی شده و نتیجه منفی بر رشد ریشه های حاصله توسط محرک سالیسیلیک اسید یافت نشد در حالیکه اثر منفی محرک متیل جاسمونات مشاهده شد، در این پژوهش گزارش شد که زمان قرارگیری در معرض الیسیتور فاکتوری مؤثر بوده و دلیل عدم تأثیر منفی سالیسیلیک اسید را کوتاه بودن مدت زمان محرک و هم زمان بودن تأثیر این محرک با فاز فعال رشدی ریشه های جانبی دانستند (Kang et al.

شیمیایی فعال شده و در نتیجه القاء ژن های *Vir* در *A. rhizogenes* مختل شده و سلول های نکروز شده و مرده توانایی خود را از دست می دهد و باعث کاهش کارآمدی فرآیند انتقال ژن خواهد شد (Kumria et al. 2001; Kuta and Tripathi. 2005).

در پژوهشی نتایج بررسی توانایی القاء ریشه موپین توسط سویه های مختلف *A. rhizogenes*، R1000، A4، ATCC 15834، ATCC 13333 و R1200 و R1601 در ریز نمونه برگ گیاه ریحان؛ سویه های متفاوت *A. rhizogenes* درصد بازده آلودگی، تعداد و طول ریشه موپین متفاوتی نیز در برداشت. بالاترین درصد تولید ریشه موپین از سویه R1601 (۹۴٪) مشاهده شد و کمترین درصد القای ریشه موپین برای سویه ATCC 15834 (۶۶٪) بود (Sathasivam et al. 2022). درواقع هر سویه آگروباکتریوم در پلاسמידهای القاء کننده ریشه؛ آرایش ژنی متفاوتی را دارد و این امر موجب می شود تا هر سویه توانایی متفاوتی را برای تولید ریشه موپین داشته باشد (Gutierrez-Valdes et al. 2020).

نتایج حاصل از این پژوهش ها با نتایج ما مطابقت دارند. در پژوهش حاضر سویه R1000، سویه مناسب به جهت القای ریشه موپین در گیاه شایبک بوده و در بین بافت های مورد استفاده، برگ به عنوان ریز نمونه ای مناسب جهت تولید

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

مویین مشهود بود. در نتیجه به نظر می‌رسد این بازدارندگی در رشد و همچنین بدرنگ شدن ریشه‌های مویین تحت تاثیر دو عامل تأثیرات مستقیم این تیمار و یا به دلیل پاسخی در پی تنش‌های محیطی بوده است؛ اما با این حال در غلظت و زمان‌های پایین مورداستفاده از این تیمار اثرات مثبتی یافت شد که حاکی از عملکرد سیگنالی این محرک بوده و نشان می‌دهد متیل جاسمونات در صورت استفاده نامناسب مقدار غلظت و زمان برحسب گونه گیاهی مورداستفاده اثرات سمی خود را برجای می‌گذارد؛ در حالی که در غلظت و مدت زمان پایین تر تیماردهی به عنوان یک پیام‌رسان مولکولی عمل خواهد کرد، همچنین به نظر می‌رسد زمان از عوامل برتر در نتیجه صفات رشدی است.

نتیجه‌گیری

هدف از این پژوهش، بررسی تراریختی گیاه شایبک و توانایی سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در ریز نمونه‌های مختلف بوده و در مرحله بعدی نیز تاثیر محرک متیل جاسمونات بر برخی صفات مورفولوژیکی ریشه‌های مویین حاصله در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در این راستا پس از تولید ریشه‌موئین با سویه‌های مختلف *A. rhizogenes*، اعمال تیمار محرک مذکور در محدوده‌های زمانی مشخص اعمال شد

2004). همچنین در پژوهش دیگری در کشت‌های سوسپانسیون سلولی *Lavandula vera*، نمونه‌هایی که به مدت ۴ ساعت در دوزهای متفاوتی از متیل جاسمونات قرار گرفتند، با بیشترین میزان افزایش زیست‌توده مواجه شد و نمونه‌هایی که در غلظت ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات قرار داشتند کمترین میزان زیست‌توده را در پی داشت (Georgiev et al. 2007). با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، نمونه‌هایی که تحت تاثیر این محرک در غلظت‌های بالای ۱۰۰ میکرو مولار قرار می‌گیرند با مرگ سلولی مواجه شده و در غلظت‌های بالا این اتفاق خواهد افتاد و در نتیجه کاهش تدریجی زیست‌توده سلولی رخ خواهد داد (Rijhwani and Shanks, 1998). در پی مطالعات انجام شده که در این زمینه نتایج حاکی از آن بوده که تنش‌های بیش‌ازحد، ریشه را دچار استرس کرده و در نتیجه تمامی این تنش‌ها، غشای سلولی آسیب‌دیده و میزان متابولیسم گیاه کاهش یافته و در نتیجه رشد نیز دچار اختلال خواهد شد و این پژوهش نیز با این نتایج تطابق دارد (Parsa and Zeinali, 2016).

در پژوهش حاضر اثرات متیل جاسمونات بر پارامترهای رشدی ریشه‌های مویین، در مقایسه با شاهد افزایش یافت اما با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض محرک، کاهش میزان رشد و صفات رشدی و همچنین قهوه‌ای شدن ریشه‌های

این محرک است؛ بنابراین به نظر می‌رسد این محرک هم باعث ایجاد سمیت شده و هم می‌تواند در غلظت و زمان مصرفی صحیح و کمتر به عنوان یک مولکول پیام‌رسان قوی عمل کرده و فعالیت متابولیسمی گیاه را افزایش دهد.

سپاسگزاری

در پایان بر خود لازم می‌دانیم که مراتب قدردانی و سپاس خود را از استاد ارجمند جناب آقای دکتر حامد صالحیان، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) کرج، بابت همکاری صمیمانه ایشان در تأمین سویه‌های باکتریایی مورد استفاده اعلام داریم.

و نتایج نشان داد که توانایی هر سویه وابسته به بافت، گونه گیاهی، ریز نمونه و پاسخ دفاعی گیاه، به‌طور متفاوت عمل می‌کند. بر اساس نتایج مندرج، به نظر می‌رسد سویه R1000 در نمونه برگی بهترین سویه *A. rhizogenes* برای گیاه شایبک بوده و در تولید ریشه موین موفقیت‌آمیز عمل خواهد کرد. همچنین محرک متیل جاسمونات به عنوان یک محرکی کمک‌کننده می‌تواند به عنوان یک سیگنالی مولکولی به‌طور مفیدی عمل کند. در صورت افزایش غلظت و زمان تأثیر الیسیتور گیاه با تنش روبرو خواهد شد و دچار آسیب می‌شود. که یکی از علت‌های آن اثر مهارکنندگی رشد بوده که جزئی از خصایص

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

References

فهرست منابع

- Bernousi I, Jafari M, Ahmadi Dizaji J. 2016.** Optimization of induction and hairy root culture establishment of *Teucrium chamaedrys* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 32: 264-280.
- Choi D-W, Jung J, Ha YI, Park H-W, In DS, Chung H-J, Liu JR. 2005.** Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. Plant Cell Reports. 23: 557-566.
- Faraz R, Gokhale M, Gothalwa R. 2020.** Hairy root culture through *Agrobacterium rhizogenes* for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A Review. JAM. 4: 45-58.
- Fattahi F, Shojaeiyan A, Palazon J, Moyano E, Torras-Claveria L. 2021.** Methyl- β -cyclodextrin and coronatine as new elicitors of tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa acuminata* and *Atropa belladonna* hairy root cultures. Physiologia Plantarum. 172(4): 2098-2111.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J. 2008.** Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Netherland, the Back Ground Springer.
- Georgiev MI, Kuzeva SL, Pavlov AI, Kovacheva EG, Ilieva MP. 2007.** Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 301-304.
- Gutierrez-Valdes N, Häkkinen ST, Lemasson C, Guillet M, Oksman-Caldentey K-M, Ritala A, Cardon F. 2020.** Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. Frontiers in plant Science. 11: 33.
- Jaberi M, Sharafi A, Sharafi AA, Azadi P, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Ahmadnia A. 2018.** Genetically transformed root-based culture technology in medicinal plant *Cosmos bipinnatus*. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 13.
- Kabirnotaj S, Zolalla J, Nematzadeh G, Shokri E. 2013.** Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Agricultural Biotechnology Journal. 4: 61-75.
- Kai G, Yang S, Zhang Y, Luo X, Fu X, Zhang A, Xiao J. 2012.** Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. Molecular Biology Reports. 39: 1721-1729.
- Kang S-M, Jung H-Y, Kang Y-M, Yun D-J, Bahk J-D, Yang J-K, Choi M-S. 2004.** Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science, 166, 745-751.
- Kozłowski G, Buchala A, Métraux J-P. 1999.** Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] Seedlings against *Pythium ultimum* trow. Physiological and Molecular Plant Pathology. 55: 53-58.
- Kumria R, Waie B, Rajam M. 2001.** Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 67: 63-71.
- Kuta DD and Tripathi L. 2005.** *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. African Journal of Biotechnology. 4: 752-757.

- Lacković Z. 2017.** "Bunanje": XX century abuse of *Atropa belladonna* halucinogenic berries in continental Croatia. *Psychiatria Danubina*. 29: 379-382.
- Laffargue F, Oudot C, Constanty A, Bedu A, Ketterer-Martinon S. 2011.** Un cas d'intoxication aiguë par la belladone (*Atropa belladonna*) chez une enfant de 2 ans. *Archives de pédiatrie*. 18: 186-188.
- Lee M. 2007.** Solanaceae IV: *Atropa belladonna*, deadly nightshade. *Journal-Royal College of Physicians of Edinburgh*. 37: 77.
- Li C and Wang M. 2021.** Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 22: 592-608.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003.** Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*. 15: 165-178.
- Moradi A, Sharifi M, Mousavi A. 2020.** Induced production of tropane alkaloids, and expression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase (h6h) and putrescine N-methyl transferase (pmt2) genes in hairy roots and propagated plantlets of *Atropa belladonna* L. elicited by methyl jasmonate. *South African Journal of Botany*. 131: 328-334.
- Moradi A, Zarinkamar F, Caretto S, Azadi P. 2018.** Influence of thidiazuron on callus induction and crocin production in corm and style explants of *Crocus sativus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40: 1-8.
- Murashige T and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Namdeo A. 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*. 1: 69-79.
- Pawar PK and Maheshwari VL. 2004.** Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. *Indian Journal of Biotechnology*. 3(3): 414-417.
- 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: 642-649.
- Parsa M and Zeinali A. 2016.** Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 32(4): 655-666.
- Qian ZG, Zhao ZJ, Xu Y, Qian X, Zhong JJ. 2004. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 86: 809-816.
- Richter TE and Ronald PC. 2000.** The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Evolution*. 195-204.
- Rijhwani SK and Shanks JV. 1998.** Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology Progress*. 14: 442-449.
- Sathasivam R, Choi M, Radhakrishnan R, Kwon H, Yoon J, Yang SH, Kim JK, Chung YS, Park SU. 2022.** Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از..."

primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*. 13: 983776.

Sedira M, Holefors A, Welander M. 2001. Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the *rol B* gene and its influence on rooting. *Plant Cell Reports*. 20: 517-524.

Shakeran Z and Keyvanfar M. 2017. Leaf explant browning of four species of Solanaceae family after induction by *Agrobacterium Rhizogenes* Species. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 30(3): 252-263.

Thwe A, Valan Arasu M, Li X, Park CH, Kim SJ, Al-Dhabi NA, Park SU. 2016. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Frontiers in Microbiology*. 7: 318.

Yadav S, Sharma P, Srivastava A, Desai P, Shrivastava N. 2014. Strain specific *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Bacopa monnieri*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 12: 89-94.

The Effect of Methyl Jasmonate on Some Physiological Traits of *Atropa belladonna* Hairy Roots

Hanieh Lotfi¹, Hassan Mahdavia², Farzad Banaei-Asl^{2*}

1- MSc. Student, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Higher Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia P.O. Box 57561-51818, Iran

2- Associate Professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Higher Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia P.O. Box 57561-51818, Iran.

3- Assistant Professor Biotechnology Research Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran P.O. Box 14968-13111, Iran.
f.banaei@rifr-ac.ir

Abstract

Atropa belladonna has positive medicinal values due to the presence of tropane alkaloids. In this study, 5 strains of *Agrobacterium rhizogenes* A4, ATCC, 1724, R1000, MSU were used in three explants of leaves, stems and roots to induce hairy roots, and finally, after selecting the superior line, it was exposed to six concentrations and five time treatments of methyl jasmonate treatment. According to the results obtained, the type of explants and different strains of *Agrobacterium rhizogenes* succeeded in having a significant effect on the percentage of hairy root production, also among the three explants used in the culture medium; only the leaf explant have produced hairy roots with the highest percentage of rooting (45.5%) was achieved by inoculation with the R1000 strain. In general, the methyl jasmonate elicitor will cause stress and toxicity if the concentration and duration of exposure to this treatment increases, and damage and reduced growth will be observed in the roots. However, if used correctly at the right concentration and time, it will increase metabolic activities and act as a strong molecular messenger.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy Roots, Solanaceae, in vitro Culture, Methyljasmonate.