

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



نوع مقاله: پژوهشی 20.1001.1.27170632.1403.17.2.1.1

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، 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، 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 ۱۹-۱

چکیده

شاییزک (*Atropa belladonna*) به دلیل وجود آکالوئیدهای 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 *Agrobacterium rhizogenes* به نام‌های A₄، ATCC، 1724، R1000 و MSU و سه ریزنمونه برگ، ساقه و ریشه به منظور القای ریشه موین استفاده شد. در نهایت لاین برتر در معرض شش غلظت متیل جاسمونات و پنج تیمار زمانی قرار گرفت و صفات مورفولوژیک بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده، نوع ریزنمونه و سویه‌های مختلف آگروباکتریوم موفق شدند تا اثر معنی‌داری را بر درصد تولید ریشه موین داشته باشند، همچنین از بین سه ریزنمونه مورد استفاده در محیط‌کشت، تنها ریزنمونه برگ موفق به تولید ریشه موین شد و بیشترین درصد ریشه‌زایی (۴۵/۵٪) توسط تلقیح با سویه R1000 به دست آمد. به‌طورکلی محرک متیل جاسمونات در صورت افزایش غلظت و مدت‌زمان قرارگیری ریزنمونه 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، خانواده سولاناسه، ریشه موین، کشت درون شیشه‌ای، متیل جاسمونات

مقدمه

شابیزک با نام علمی *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 سببزمینیان (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 (Laffargue et al. 2011; Lacković. 2017;) (Fattahi et al. 2021).

به دلیل وجود آکالوئید 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 (Khodadadi et al. 2024) 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. 2008; Moradi et al. 2018). همچنین از دیگر توانایی این تکنیک کشت ریشه موین بوده که این ریشه های موین 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 آن ها و استفاده مؤثر از آن ها خواهد شد؛ در نتیجه یکی از راهکارهای مؤثر برای دستیابی به متابولیت های با ارزش گیاه دارویی مدنظر است (Faraz et al. 2020).

باکتری *Agrobacterium rhizogenes* ابزاری موثر و توانمند در القای ریشه موین 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

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

از آن بوده که غلظت‌های پایین‌تر در اکثر گونه‌های گیاهی اثر مثبتی داشته و در غلظت‌های بالاتر 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 مویین در گیاه شاپیزک در سه ریز نمونه برگ، ساقه و ریشه بررسی شده و همچنین تاثیر تیمار متیل جاسمونات در غلظت‌های مختلف بر صفات مورفولوژیک و شاخص رشد ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح توسط *A. rhizogenes* به‌طور مجزا در ریشه‌های مویین 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 مویین 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 در ۳ تکرار انجام شد.

در مرحله بعدی تیماردهی در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۱۵۰ میکرو مولار و ۵ تیمار زمانی شامل ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد

تلقیح بر میزان القای ریشه مویین تاثیرگذار خواهد بود؛ همچنین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی دیگری همچون رشد و تولید ریشه‌های مویین وابسته به این عوامل بوده و نتایج متفاوتی را در بر خواهد داشت. در نتیجه استفاده از محرک‌های مناسب جهت بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت 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. 2014; Yadav et al. 2013).

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 فیزیولوژیک چون رشد و پیری برگ تاثیرپذیر 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

بررسی قرار گرفت. همچنین در نهایت ویژگی‌های مورفولوژیک آن اعم از طول ریشه و وزن خشک ریشه‌های مویین، تحت تأثیر تیمار اعمال شده؛ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱. کشت بذرها برای تهیه ریزنمونه‌ها:

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 منظور 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 (Sedira et al. 2001). بذرهای استریل شده در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با یک‌دوم غلظت حاوی ۶ گرم بر لیتر آگار کشت شده و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس برای جوانه‌زنی در اتاق رشد نگهداری شدند.

۲. القای ریشه‌موتین: این آزمایش به صورت

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

انکوباتور انتقال یافت. پس از رشد کافی باکتری‌ها؛ تراکم نوری آن‌ها توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد و مقدار بهینه غلظت باکتری (OD₆₀₀) بین ۵/۰ تا ۶/۰ برای هر سویه در نظر گرفته شد (Sathasivam et al. 2022). برای تلقیح ابتدا ریز نمونه‌های برگ، ساقه و ریشه‌های جوان‌تر و سالم‌تر انتخاب و به قطعات دو سانتی‌متری برش داده شدند. سپس زخم‌هایی بر سطح رویی 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 برای 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

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

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

۳. **استقرار ریشه‌های موئین:** پس از گذشت دو هفته از رشد ریشه‌های موئین حاصل از القای باکتری *A. rhizogenes*؛ ریشه‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری حاصل شد. حدود ۱-۲ سانتی‌متر از آن بریده‌شده 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 شاییزک 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 تراریخته بودن ریشه‌های موئین

حاصله، از روش مولکولی استفاده شد. استخراج دی‌ان‌ا به روش Cheng و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. در نهایت تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر روی ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* جهت تأیید تراریختی استفاده شد. چاهک‌ها حاوی ریشه‌های موئین حاصل از ریز نمونه تلقیح‌یافته و همچنین سویه باکتری *A. rhizogenes* استفاده شده بوده که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و ریشه‌های غیرتراریخته 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 پس‌از آن ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت زمان ۳۵ ثانیه انجام‌شده 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 ۴۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال شد. از مقادیر هم وزن ریشه های مویین 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 یک دوم 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 مورفولوژیک 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

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 تراریخته 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 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 اثرمتقابل 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 (۵/۴۵ 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 ۶۷/۲۰ درصد و ۳۳/۵ درصد (شکل ۲). به دست آمد که کمترین میزان، در ریز نمونه ساقه مشاهده شد؛ اما باین حال 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).

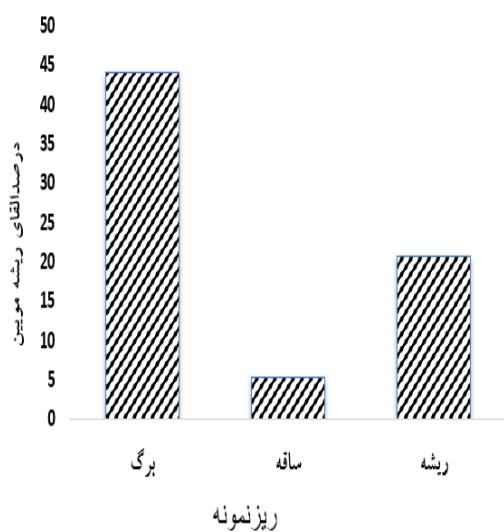
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه و نوع ریز نمونه بر برخی صفات ریشه‌های مویین

میانگین مربعات	df	منابع تغییرات
۵۶۸۶/۷**	۲	ریز نمونه
۱۴۳۸/۹*	۴	سویه
۶۲۲/۵ ^{ns}	۸	اثر متقابل
۴۲۸/۸	۳۰	خطا

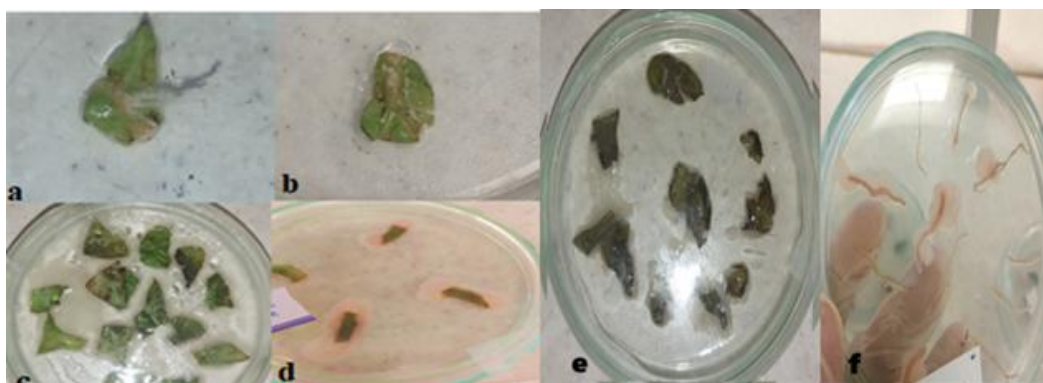
***، * و ns به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری است



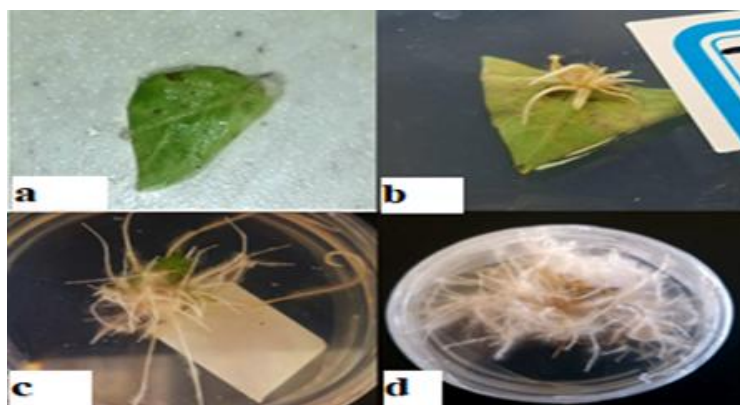
شکل ۱- تاثیر نوع سویه باکتری بر درصد القای ریشه مویین



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 ریشه‌زایی و ظهور ریشه موئین (d و e) و (f)

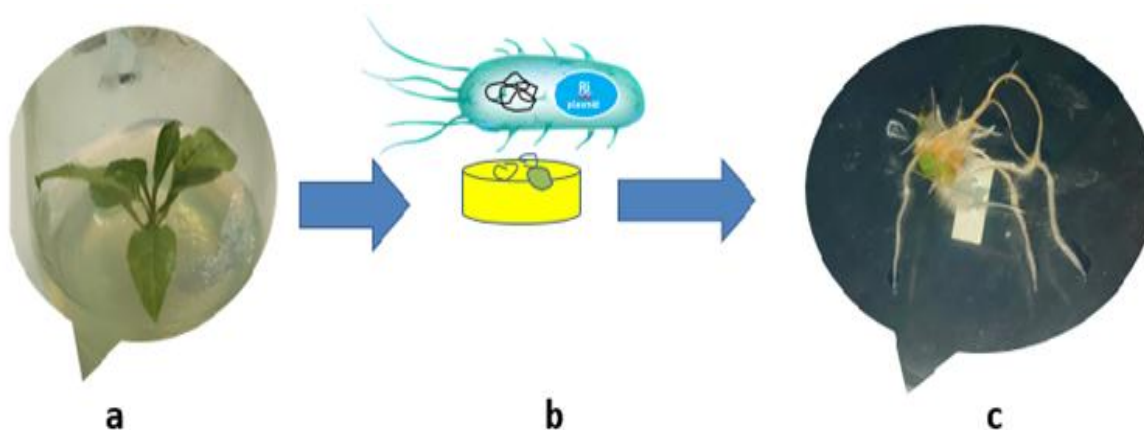


شکل ۴- مراحل رشدی ریشه‌های موئین حاصل از سویه R1000 به ترتیب ریشه موئین ظهور یافته از محل زخم (a و b)، ریشه‌های موئین رشد یافته (c و d)

"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 شابیزک 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 شابیزک 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)

تأثیر متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیک ریشه‌های موئین شابیزک

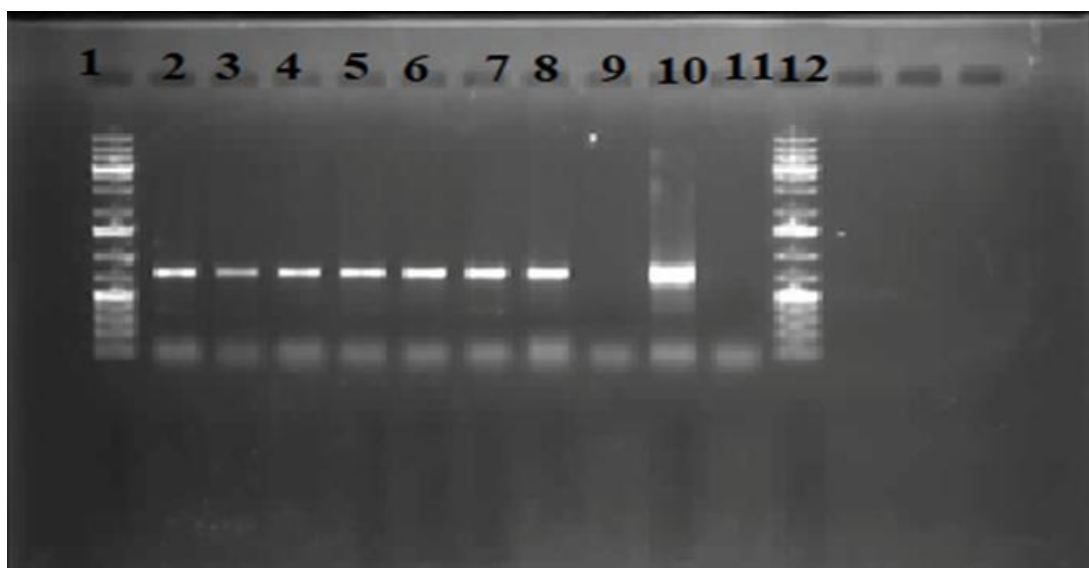
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل تیمار غلظت و مدت زمان قرار گرفتن ریز نمونه در معرض محرک متیل جاسمونات بر صفات مورد بررسی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار است. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار متیل جاسمونات بر طول ریشه مویین، بلندترین طول ریشه (۶۵/۶۳ میلی متر) در غلظت ۱۰ و ۲۵ میکرو مولار متیل جاسمونات با تیمار زمانی ۲۴ ساعت و

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین به روش مولکولی

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).

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 (۹۵/۰ گرم) مشاهده شد (شکل ۸).



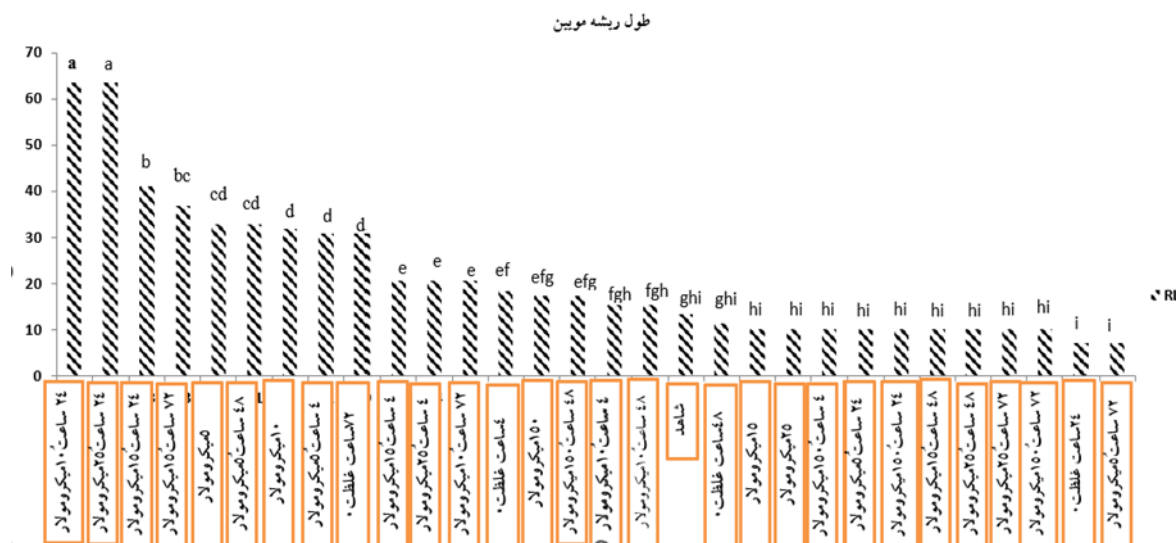
شکل ۶- نتیجه تأیید تراریختی ریشه‌های موئین حاصل شده. ۱- نشانگر دی‌ان‌ا. ۲-۸ ریشه‌های تراریخته، ۹ و ۱۱ ریشه‌های موئین غیر تراریخته به عنوان کنترل منفی ۱۰-کنترل مثبت (سویه باکتری مورد استفاده)

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

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 نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری است

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



شکل ۷- تاثیر غلظت و مدت زمان تیمار بر میزان طول ریشه مویین شایبزیک



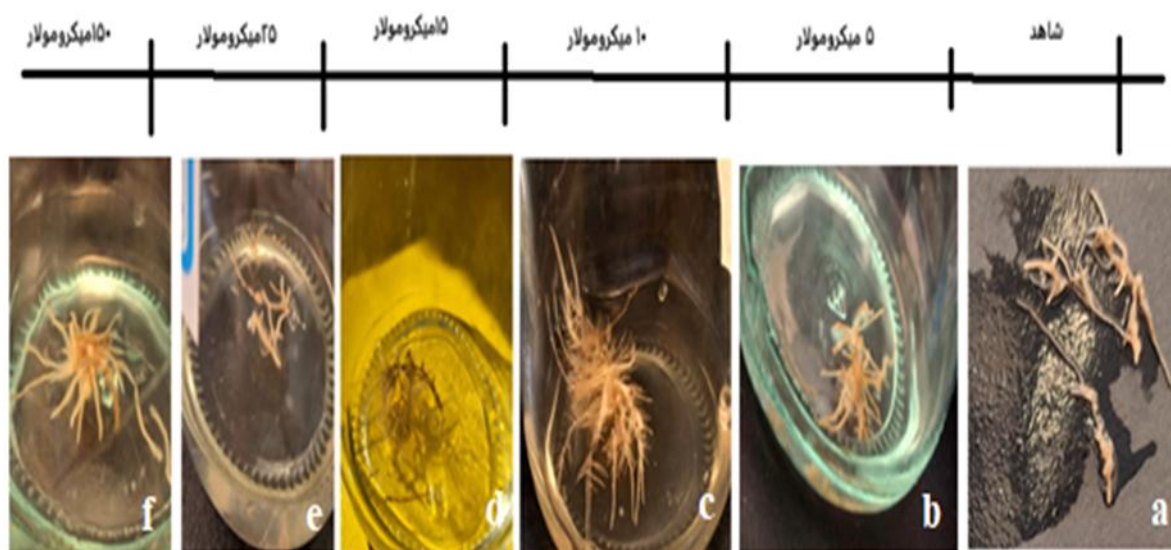
شکل ۸- تاثیر غلظت و مدت زمان تیمار بر میزان وزن خشک ریشه مویین شایبزیک

محیط کشت حاوی ۱۰ میکرو مولار متیل جاسمونات و پس از گذشت ۲۴ ساعت تیماردهی نسبت به شاهد افزایش چشمگیری را در پی داشت. درحالی که کمترین میزان رشد در غلظت پایین ۵ میکرو مولار با مدت زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۹)؛ بر اساس نتایج

نتایج بررسی اثر متیل جاسمونات بر شاخص رشد ریشه‌های مویین حاصل از کشت بافت در نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تیمار متیل جاسمونات، میزان رشد در طول ریشه مویین و وزن خشک ریشه‌های مویین کاهش می‌یابد. رشد طولی و وزن خشک ریشه‌های مویین در

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

بحث

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

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

"لطفی و همکاران، تاثیر متیل جاسمونات بر برخی صفات فیزیولوژیکی ریشه‌های موین 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 موین دارد (Pirian et al. 2012; Kabirnotaj et al. 2013). همچنین در پژوهشی دیگر بر روی تمامی ریز نمونه‌های برگگی گونه بذرالبنج پس از تلقیح توسط سبوسویه‌های مختلف *A. rhizogenes* (AR15834, AR9543, A7, AR318, A4, AR9402) قهوه‌ای شده و این امر سبب عدم توانایی در تولید ریشه‌های موین شد (Shakeran and Keyvanfar. 2017). القاء ریشه موین 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؛ به‌صورت موضعی در اطراف محل آلوده‌شده را فراگرفته و با علائمی چون مرگ سلولی و تجمع عوامل ضدمیکروبی ظاهر خواهد شد (Richter and Ronald, 2000). درنهایت تمامی این عوامل منجر به نکروزه شدن و درنهایت تخریب و مرگ سلولی رخ خواهد داد؛ درنتیجه محل ورود T-DNA را با مشکل مواجه کرده و باعث کاهش کلون‌های حاوی سلول‌های تراریخته می‌شود. همچنین از دیگر پیامدهای نکروزه شدن عدم توانایی آزاد شدن سیگنال‌های

موفقیت در القای ریشه موین 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 محیط‌کشت و همچنین نوع سویه باکتری از عوامل مؤثر بر القای ریشه موین است (Jaberi et al. 2018). بنابراین می‌توان گفت با مطالعه و بررسی تجربی می‌توان سویه مناسب با گونه گیاهی موردنظر 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 سبوسویه‌های متفاوت از *A. rhizogenes* مورد استفاده در برداشت. در پژوهشی بر روی گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) از خانواده سولاناسه، نتیجه تلقیح ریز نمونه برگگی به‌وسیله *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 دی‌ان‌ا و

موفقیت آمیز ریشه های موین در نظر گرفته شد. تأثیر متیل جاسمونات یا هر الیسیاتور دیگر در گیاهان رابطه مستقیمی را با عواملی چون: ویژگی های الیسیاتور مورد استفاده، غلظت و مدت زمان قرارگیری در الیسیاتور 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 الیسیاتورهای 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 الیسیاتور 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 موین توسط سویه های مختلف *A. rhizogenes* ATCC 13333، ATCC 15834، A4، R1000، R1200 و R1601 در ریز نمونه برگ گیاه ریحان؛ سویه های متفاوت *A. rhizogenes* درصد بازده آلودگی، تعداد و طول ریشه موین متفاوتی نیز در برداشت. بالاترین درصد تولید ریشه موین از سویه R1601 (۹۴٪) مشاهده شد و کمترین درصد القای ریشه موین 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 موین 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 موین در گیاه شابیزک 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 سبویه‌های مختلف *A. rhizogenes* در ریز نمونه‌های مختلف بوده و در مرحله بعدی نیز تاثیر محرک متیل جاسمونات بر برخی صفات مورفولوژیک ریشه‌های مویین حاصله در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در این راستا پس از تولید ریشه‌موئین با سبویه‌های 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 تنش کرده و در نتیجه تمامی این تنش‌ها، غشاء 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

محرک است؛ بنابراین به نظر می‌رسد این محرک هم باعث ایجاد سمیت شده و هم می‌تواند در غلظت و زمان مصرفی صحیح و کمتر به‌عنوان 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 شابیزک بوده و در تولید ریشه موئین موفقیت‌آمیز عمل خواهد کرد. همچنین محرک متیل جاسمونات به‌عنوان یک محرکی کمک‌کننده می‌تواند به‌عنوان یک سیگنالی مولکولی به‌طور مفیدی عمل کند. در صورت افزایش غلظت و زمان تأثیر الیسیاتور گیاه با تنش روبرو خواهد شد و دچار آسیب می‌شود. که یکی از علت‌های آن اثر مهارکنندگی رشد بوده که جزئی از خصایص این

References

- 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. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106561>.
- Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. Plant Molecular Biology Reports. 21: 177-178. <https://doi.org/10.1007/BF02774246>.
- Choi DW, Jung J, Ha YI, Park HW, In DS, Chung HJ, 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0845-4>.
- Faraz R, Gokhale M, Gothalwa R. 2020. Hairy root culture through *Agrobacterium rhizogenes* for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A Review. Journal of Advanced Microbiology. 4: 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. <https://doi.org/10.1111/ppl.13444>.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ. 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. the Back Ground Springer, The Netherland.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9214-5>.

فهرست منابع

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

- Gutierrez-Valdes N, Häkkinen ST, Lemasson C, Guillet M, Oksman-Caldentey KM, Ritala A, Cardon F. 2020.** Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in Plant Science*. 11: 33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>.
- 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(1): e67182.
- 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. <https://doi.org/10.22103/JAB.2012.474>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0912-1>.
- Kang SM, Jung HY, Kang YM, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK, Choi MS. 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.022>.
- Khodadadi Z, Moudi M, Mousavi Kouhi SM, Hosseinzadeh MS. 2024.** A review of phytoremediation using some medicinal and dramatic plant species. *Journal of Biosafety*. 17(1): 17-36.
- Kozłowski G, Buchala A, Métraux JP. 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. <https://doi.org/10.1023/A:1011645315304>.
- Kuta DD, 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. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i8.15199>.
- Lacković Z. 2017.** "BUNANJE": XX century abuse of *Atropa belladonna* halucinogenic berries in continental Croatia. *Psychiatria Danubina*. 29(3): 379-382. <https://doi.org/10.24869/psyd.2017.379>.
- 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 MR. 2007.** Solanaceae IV: *Atropa belladonna*, deadly nightshade. *Journal-Royal College of Physicians of Edinburgh*. 37(1): 77-84. <https://doi.org/10.1177/147827152007370102>.
- Li C, Wang M. 2021.** Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 22: 592-608. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200516155146>.
- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>.
- 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: 185. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2760-2>.
- 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.
- Murashige T, 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 Reviews*. 1: 69-79.
- Parsa M, 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. <http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.107137>.
- Pawar PK, 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.
- 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. <https://doi.org/10.1002/bit.20092>.
- Richter TE, Ronald PC. 2000.** The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*. 42: 195-204. <https://doi.org/10.1023/A:1006388223475>.
- Rijhwani SK, 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. <https://doi.org/10.1021/bp980029v>.
- 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 primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*. 13: 983776. <https://doi.org/10.1007/s002990100357>.
- Sedira M, Holfors 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. <https://doi.org/10.1007/s002990100357>.
- Shakeran Z, 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. <https://doi.org/10.1001.1.23832738.1396.30.3.4.7>.
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00318>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.11.003>.

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

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

Hanieh Lotfi¹, Hassan Mahdavia², Farzad Banaei-Asl^{3*}

1- MSc. Student, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Higher Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

2- Associate Professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Higher Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

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

Abstract

Atropa belladonna has positive medicinal values due to the presence of tropane alkaloids. In this study, five strains of *Agrobacterium rhizogenes*, A4, ATCC, 1724, R1000, and MSU, were used to induce hairy roots in three types of explants: leaves, stems and roots. After selecting the superior line, it was exposed to six concentrations and five treatments durations of methyl jasmonate. According to the results, both the type of explant and the strain of *Agrobacterium rhizogenes* had a significant effect on the percentage of hairy root production. Among the three explants, only the leaf explant produced hairy roots, with the highest rooting percentage (4505%) achieved by inoculation with the R1000 strain. In general, the methyl jasmonate elicitor can cause stress and toxicity when the concentration and exposure duration are increased, leading to damage and reduced root growth. However, if applied correctly at the appropriate concentration and duration, it can increase metabolic activities and act as a potent molecular messenger.

Keywords: *Agrobacterium*, Solanaceae family, Hairy Roots, *in vitro* Culture, Methyl jasmonate