مقایسه توانایی ایجاد ریشه موئین توسط سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز در *Astragalus compactus*

صدیقه حبیبی، وحید نیکنام*، حسن ابراهیم‌زاده و مسعود میرمعصومی

تهران، دانشگاه تهران پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش علوم گیاهی و قطب تبارزائی موجودات زنده ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۳۰

چکیده

بذرهای *Astragalus compactus* از منطقه جاجرود جمع‌آوری شد. گیاهان در اتاق رشد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی رشد کردند. سپس ریزنمونه‌های برگ، ساقه، دمبرگ و برگهای لپه‌ای آن با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز شامل *۲۶۵۹*، *۱۵۸۳۴* و *WT* تلقیح شدند. قدرت تشکیل ریشه موئین توسط سویه‌های مذکور در حالت تلقیح با ایجاد زخم روی ریزنمونه‌ها موفق‌تر از حالت تلقیح سوسپانسیونی بود. آگروباکتریوم ریزوژنز سویه *WT* در این گونه موفق به تشکیل ریشه موئین نشد، در حالیکه سویه‌های *۲۶۵۹* و *۱۵۸۳۴* تشکیل ریشه موئین را در ریزنمونه‌های مشابه القا کردند؛ به‌طوری‌که درصد تشکیل ریشه موئین سویه *۲۶۵۹* از سویه *۱۵۸۳۴* بیشتر بود. افزایش برخی از اسیدهای فنلی و ایجاد ترکیبات جدید در ریشه های موئین امکان تولید وافزایش متابولیتهای ثانوی داروئی توسط کشت ریشه های موئین گون را نشان داد.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۶۳۷ ، پست الکترونیکی: vniknam@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات شیمیایی تولید شده توسط گیاهان که شامل آلکالوئیدها، آنتراکوئینون‌ها و فلاوونوئیدها هستند نقش مهمی را در صنایع داروسازی، لوازم آرایشی، عطرسازی، رنگرزی و طعم‌دهنده‌ها ایفا می‌کنند. گیاهان بسیاری از این ترکیبات را در مسیر متابولیسم ثانویه تولید می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه برای رشد سلول های گیاهی ضروری نیستند و در مقادیر اندک تولیدمی‌شوند(۷).

Srivastava و Srivastava کشت‌های ریشهٔ موئین شمار زیادی از گیاهان دو لپه‌ای و تک لپه‌ای را مورد مطالعه قرار دادند و تولید متابولیت‌های ثانویه مشابه را مانند ریشه‌های طبیعی مشاهده کردند . لذا سیستمی را برای تولید متابولیت ثانویه پیشنهاد کردند(۱۸). امتیاز بزرگ ریشه‌های موئین این است که آنها اغلب ظرفیت‌های بیوسنتزی بیشتری برای تولید متابولیت ثانویه در مقایسه با گیاه والدشان نشان می‌دهند(۴ و ۱۳). به علاوه، کشت‌های ریشه موئین برای تولید طیفی از متابولیت‌های ثانویه که در گیاه والد وجود ندارند، نیز شناخته شده‌اند. بنابراین یک سیستم ریشه‌ای تراژنی پتانسیل چشمگیری برای بیان ژن‌های اضافی همراه با پلاسمید Ri، مخصوصا با ژن‌های اصلاح شده، درون سلولهای گیاهی با سیستم‌های حامل آگروباکتریوم ریزوژنز ایجاد می‌کند (۳).

گیاهان سردهٔ گون (آستراگالوس) گیاهانی هستند یکساله یا چند ساله، علفی یا بوته‌ای یا درختچه‌ای، دارای تیغ یا فاقد آن، دارای ساقه یا فاقد آن، و برگ‌ها با برگچه‌های جفت یا فرد می‌باشد. ریشه‌های گونه‌های مختلف گون در پزشکی چین جهت جلوگیری از تصلب شرائین، ضد فشار خون، مدر و ضد سرطان استفاده می‌شود. البته از نظر شیمیایی، فلاوونوئیدها در سرده گون به طور وسیعی مطالعه شده‌اند (۱۶).

در این مطالعه، القا و رشد ریشه‌های موئین از *Astragalus compactus* با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز نشان داده شده است. هدف از این مطالعه مقایسه قدرت ایجاد ریشه موئین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز بر روی این گونه است تا برای مطالعات بعدی بهترین سویه انتخاب شود و محتوای متابولیت‌های ثانویه ازجمله اسیدهای فنلی در ریشه‌های تراریخت و ریشه‌های طبیعی مورد مقایسه قرار گیرند.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بعد از جمع‌آوری بذرها، به‌منظور شکستن خواب بذر با استفاده از کاغذ سمباده بر روی سطح آن خراشیدگی‌هایی ایجاد شد (۱۲ و۱۹). سپس بذرها طی مراحلی بشرح زیر ضدعفونی شدند: ۲-۳ بار شستشو با آب، قرار دادن آنها در اتانول ۷۰٪ به مدت ۶۰ ثانیه، ۲-۳ بار آبکشی با آب مقطر، قرار دادن آنها در هیپوکلریت سدیم ۵/۵ ٪ حاوی دو قطره tween 20 به مدت ۱۵ دقیقه و بعد ۴-۵ بار آبکشی با آب مقطر استریل (۶ و ۸).

سپس بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت MS نیمه غلظت بدون هورمونهای رشد با ۰/۸ ٪ آگار و ۳٪ ساکارز کشت داده شده و در تاریکی قرار گرفتند. به محض ظهور ریشه‌ها، آنها به اتاق رشد تحت دوره نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند (۱۴).

سویه‌های باکتریایی: سویه‌های *۱۵۸۳۴، ۲۶۵۹ و WT* آگروباکتریوم ریزوژنز برای تلقیح استفاده شدند. این سویه‌ها از دانشگاه گنت بلژیک تهیه شدند. این سویه‌ها روی محیط LB با ۱/۵ ٪ آگار در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت رشد کردند(۱۵).

القای ریشه موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز: آزمایش با چهار ریزنمونه برگی، ساقه، دمبرگ و برگ‌های لپه‌ای تهیه شده از دانه‌رست‌های ۳ هفته‌ای انجام شد. سطوح زخمی ریزنمونه‌ها با سویه‌های ۱۵۸۳۴، ۲۶۵۹ و WT آلوده شدند و بعد به محیط MS درون پتری‌دیش‌ها منتقل شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده پس از حدود ۶۰ ساعت از محیط MS خارج شده و در پتری‌دیش‌های محتوی محیط کشت MS با ۰/۸٪ آگار و ۳٪ ساکارز به اضافه آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند تا باکتریهای اضافی از محیط حذف گردند. عمل واکشت معمولا هر ۴۸ ساعت یا به محض مشاهده آلودگی انجام شد. ۵۰ نمونه در سه تکرار برای هر گونه استفاده شد. در هر پلیت ۵ عدد از ریزنمونه‌های تلقیح شده قرار داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. برای هر نوع ریزنمونه تعدادی ریزنمونه شاهد نیز در نظر گرفته شد. فراوانی تشکیل ریشه موئین توسط هر سویه متفاوت بود. ظهور ریشه‌های موئین در محل بریدگی‌های ریزنمونه‌های تلقیح شده مشاهده شد. زمانی که طول ریشه‌های موئین حداقل به ۲ سانتی‌متر رسید آنها به محیط نیمه غلظت B5 بدون هر گونه هورمون رشد (pH = ۵/۷۵) محتوی ۳٪ ساکارز منتقل گردیدند و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد روی دستگاه شیکر با ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفتند (۱۷). ریشه‌ها هر ۱۵ روز به محیط تازه واکشت شدند.

استخراج ترکیبات فنلی: به‌منظور استخراج ترکیبات فنلی، ۰/۴ گرم ماده خشک گیاهی توسط ۴ میلی لیتر متانل ۸۰٪ عصاره‌گیری شد و با استفاده از کاغذ صافی صاف گردید. روشناور حاصل را در پتری‌دیش ریخته، این عمل سه بار تکرار شد. مجموعه روشناورها در هوای آزاد تبخیر گردید. پس از تبخیر روشناورها، باقی مانده ته ظرف را با ۷ میلی لیتر استونیتریل شسته و در قیف دکانتور ریخته شد و حدود ۵ میلی لیتر n هگزان به دکانتور اضافه گردید و کمی تکان داده شد. بعد از مدتی دو فاز تشکیل شد. فاز فوقانی حاوی ناخالصی‌های فنلی از قبیل تری گلیسریدهایی بود که در n هگزان حل شد و فاز تحتانی حاوی اسیدهای فنلی بود که در استونیتریل حل گردید.

مشتق سازی اسیدهای فنلی: برای بررسی ترکیبات فنلی با روش کروماتوگرافی گاز– مایع (GLC)، ۱ میلی لیتر از معرف پیریدین را به ظرف محتوای ترکیبات فنلی خشک شده اضافه کرده و به خوبی تکان داده شد. محلول فوق به یک ظرف کوچک دربدار منتقل گردید. سپس به آن ۰/۲ میلی لیتر معرف هگزامتیل دی سیلازان و ۰/۱ میلی لیتر تری متیل کلروسیلان اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. از این پس عصاره‌ها جهت آنالیزGLC توسط دستگاه GC ساخت شرکت شیماتزو مورد استفاده قرار گرفتند (۵).

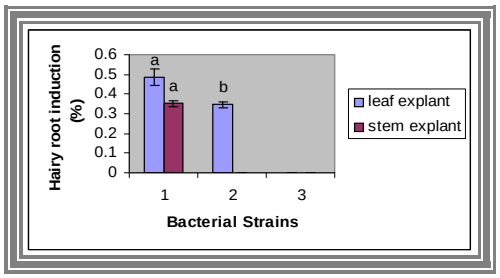
نتایج

در این تحقیق بطورکلی ریشه‌های موئین *Astragalus compactus* به‌منظور مقایسه توانایی القای ریشه موئین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز تولید شده‌اند.

القای ریشه موئین: هیچ ریشه موئینی روی سطوح بریده شده ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای و دمبرگ *Astragalus compactus* تشکیل نشد. در تعدادی از ریزنمونه‌های برگی ریشه‌های موئین ظاهر گردیدند. همچنین در هیچکدام از پلیت‌های شاهد نیز هیچ ریشه موئینی تشکیل نشد.

در گونه *Astragalus compactus* ۴۷٪ از ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با سویه ۲۶۵۹ پس از ۲۷ روز و ۳۶٪ از ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با سویه ۱۵۸۳۴ پس از ۳۵ روز ریشه موئین تشکیل دادند. همچنین در ۳۵٪ از ریزنمونه‌های ساقه تلقیح شده با سویه ۲۶۵۹ نیز ریشه موئین مشاهده شد (شکل ۱).

رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت تعلیقی: دو هفته پس از ظهور ریشه‌های موئین، طول آنها اندازه‌گیری شد. قطعات ۲ سانتی متری از ریشه‌های موئین را برش داده و هر کدام را در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری محتوی ۵۰ میلی لیتر محیط نیمه غلظت B5 محتوای ۳۸ میکروگرم در لیتر سفاتوکسیم قرار دادیم. هر ۱۵ روز طی هر واکشت طول ریشه‌ها اندازه‌گیری می‌شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که سرعت نسبی رشد ریشه‌های موئین در گونه *Astragalus compactus* تلقیح شده با سویه ۲۶۵۹ برابر با ۰/۱۴ گرم در روز بوده است. در صورتی‌که سرعت رشد ریشه کنترل ۰/۰۰۲ گرم در روزهای اول بود که در روزهای آینده رشدشان متوقف شد. ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح گونه‌ها با سویه *۱۵۸۳۴* بعد از چند روز قهوه‌ای رنگ شده و از بین رفتند.



شکل ۱– درصد تشکیل ریشه موئین در قطعات برگی و ساقه *A. compactus* در مجاورت سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز: ۱. سویه *۲۶۵۹*، ۲. سویه *۱۵۸۳۴* و ۳. سویه *wt*

در این تحقیق نشان داده شده است که همه سویه‌ها بجز *WT* سبب القای ریشه موئین در این گونه می‌شوند. ریشه‌های موئین توسط ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۹ القا شده بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فنلی: یک قلهٔ ناشناخته با ۱۰/۱۷ درصد بین هیدروکسی بنزوئیک اسید و سیرنژیک اسید در ریشه موئین دیده شد. درصد کوماریک اسید از ۰/۷۰۵ درصد در برگ و ۰/۲۰۷ درصد در ریشه تراریخت نشده به ۷/۷۴۹ درصد در ریشه موئین افزایش یافت. یک قلهٔ ناشناخته با ۱۷/۸۵ درصد بین سیرینژیک اسید و کوماریک اسید مشاهده می‌شد که در نمونه‌های دیگر وجود نداشت. درصد کافئیک اسید و نارنژینین نیز در ریشه‌های موئین افزایش یافته بود. قلهٔ ناشناخته دیگری با ۵۶/۲ درصد ترکیب فنلی بین دو استاندارد کافئیک اسید و نارنژینین تنها در ریشه‌های موئین دیده شده است (جدول

۲). بقیه قله‌هایی که درصد ترکیبات فنلی‌شان خیلی نزدیک بهم بود در تحقیق حاضر مورد توجه قرار نگرفته‌اند. به طور کلی بررسی ترکیبات فنلی به کمک GLC، روند کاهشی یا افزایشی منظمی را در نمونه‌های تراریخت شده و نمونه‌های غیرتراریخت نشان نداده است. در جدول ۱ انواع ترکیبات فنلی استاندارد و زمان بازداری آنها مشخص شده است.

جدول ۱- انواع ترکیبات فنلی استانده و زمان بازداری آنها

زمان بازداری	ترکیبات فنلی	زمان بازداری	ترکیبات فنلی
۱۴/۵۰۹	فرولیک اسید	۸/۱۲۸	وانیلین
۱۵/۰۸۷	کافئیک اسید	۸/۴۶۷	سینامیک اسید
۲۱/۳۸۱	نارنژینین	۱۱/۳۶۹	دی هیدروکسی بنزوئیک اسید
۲۷/۷۴۲	کلروژنیک اسید	۱۲/۵۰۳	سیرینژیک اسید
–	–	۱۳/۰۲۲	کوماریک اسید
		۱۳/۳۸۴	گالیک اسید

جدول ۲- درصد اسیدهای فنلی شناخته شده و ناشناخته (GLC%) در قطعات جداکشت گونه*A.compactus*

ریشه موئین	*ریشه*	*برگ*	*ترکیبات فنلی*
–	۰/۲۸۶	۱/۵۹۶	وانیلین
۰/۱۹۸	۰/۱۹	۰/۳	هیدروکسی بنزوئیک اسید
۱۰/۱۶۸	–	–	ناشناخته
–	۱۶/۱۹۴	۴۶/۷۸۲	سیرنژیک اسید
۷/۷۴۹	۰/۲۰۷	۱۷/۸۵۵	ناشناخته
۰/۲۹۸	۰/۱۶۴	–	کوماریک اسید
۶/۶۱۵	–	۱/۷۱۸	گالیک اسید
–	۱۰/۲۷۷	۱/۰۰۴۸	ناشناخته
۱/۰۷۵	۰/۵۴۱	۰/۰۹۸	ناشناخته
۱/۲۶۵	–	–	فرولیک اسید
۰/۷۸۵	–	۲/۲۸۱	کافئیک اسید
۵۶/۲۲۹	–	۰/۳۲	ناشناخته
۰/۷۱۱	۰/۱۳۵	۰/۵۶۳	نارینژنین

بحث

فرآیند تراریختی بافت های گیاهی با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز تحت تاثیر عوامل مختلفی شامل ژنوتیپ، ساختار قطعه ی جداکشت، سن قطعه ی جداکشت، نوع سویه های باکتریایی و عوامل شیمیایی و فیزیکی محیط کشت قرار می گیرد. قابلیت متفاوت سویه های مختلف این باکتری ها در انتقال T-DNA به قطعات جداکشت یک گونه ی خاص و متعاقباً القای تشکیل ریشه ی موئین در آن ها به خوبی در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که القای ریشه ی موئین در گونه های مورد بررسی تحت تاثیر سویه های آگروباکتریوم ریزوژنز و نوع قطعه ی جداکشت مورد استفاده قرار گرفت به نحوی که تقریباً در همه ی قطعات جداکشت برگی از گونه های مختلف، ریشه ی موئین تشکیل شد. اما از هیچ کدام از قطعات دمبرگ، محور زیر لپه و برگ های لپه ای تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز ریشه ی موئینی حاصل نشد.

ریشه های موئین که در اثر آلودگی گیاه با باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز تولید می شود دارای سرعت رشد بالا و پایداری ژنتیکی زیادی بوده و به عنوان منبعی برای تولید متابولیتهای ثانویه گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد (۱و ۲).

همانطوریه در قسمت نتایج ذکر شد دو سویه ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۹ توانستند باعث القای ریشه موئین در گونه مورد مطالعه از گون شوند. این نتایج نشان دادند که ژنوتیپ یک عامل مهم برای القای ریشه موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز است. نتایج ما با یافته‌های Dobigny و همکاران در رابطه با تشکیل ریشه‌های موئین در دو رقم از سیب زمینی تحت تاثیر سویه های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز همخوانی دارد (۳). Ionkovaو همکاران (۱۹۹۷) قبلاً تاثیر متفاوت سویه های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز در القای ریشه موئین در آستراگالوس مونگولیکوس را نشان داده اند (۱۰). اما تا کنون داده منتشر شده ای در مورد گونه مورد مطالعه در این تحقیق یافت نشده است.

نظر به افزایش و بروز برخی از اسیدهای فنلی در ریشه های موئین گونه مورد مطالعه در مقایسه با ریشه های شاهد غیر تراریخت (جدول ۲) امید به امکان افزایش متابولیتهای ثانوی منجمله ترکیبات فنلی با کشت ریشه های موئین وجود دارد. با اینحال تکرار پذیر بودن این نتایج از اهمیت زیادی برخوردار است. تحقیقات بیشتر و تکمیلی می تواند موفقیت این روش را بیشتر تضمین نماید.

در پایان لازم به ذکر است که تا کنون گزارش های محدودی در مورد القای ریشه موئین در گونه های مختلف گون منتشر شده است (۹، ۱۰ و ۱۱). همانطوریه می دانیم تکنیک کشت ریشه موئین از تکنیک های مفید برای تولید متابولیتهای ثانوی در گیاهان است و در مورد گونه های گون نیز از ریشه های موئین جهت استخراج متابولیتهای ثانوی مانند ساپونین ها (۹و ۱۰) و موسیلاژ (۱۱) استفاده شده است. نظر به اینکه گونه های مختلف گون از نظر خواص داروئی مورد توجه هستند (۱۰و ۲۱) و تاکنون بر روی گون های بومی ایران از نظر خواص داروئی و ترکیبات شیمیائی موجود در آنها تحقیقات زیادی انجام نشده است و با توجه به اهمیت کشت ریشه های موئین از نظر زیست فناوری (۲۰) بنابراین می توان به آینده کشت ریشه های موئین جهت تولید متابولیتهای ثانوی و ترکیبات داروئی امید وار بود.

سپاسگزاری:

این تحقیق با حمایت مالی **صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور** (طرح شماره ۹۰۰۰۳۹۴۴) انجام گرفته است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. آذرمهر بنت الهدی ، کریمی فرح، تقیزاده مسعود، موسوی گرگری سید لطیف (۱۳۹۲) مقایسه رشد و توان تولید متابولیتهای ثانویه در دودمانهای ریشه مویی تراریخت حاصل از کاسنی (*Cichorium intybus*). مجله پژوهش های گیاهی، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحه: ۴۷۶-۴۸۵.

۲. شیرازی زهرا ، پیری خسرو ، میرزایی اصل اصغر ، حسنلو طاهره، قیاسوند طیبه (۱۳۹۳) اثر محرکهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین در ریشه های مویین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.). جلد ۲۷، شماره ۳، صفحه: ۴۴۰-۴۴۹.

3. Dobigny, A., Ambros, A., Haicour, R., David, C., Rossignol, L and Sihachakr, D. (1995) Transformation of Potato Using Mannopine and Cucumpine Straina of *Agrobacterium rhizogenes*, Plant Cell Tissue and organ Culture 40, 225- 230.

4. Doran, P.M. (2002) Properties and applications of hairy- root cultures. In Plant biotechnology and transgenic plants, Eds., Okasman- Caldenty,

K.- M. and W.H. Barz. Marcel Dekker Inc., New York, pp: 143-162.

5. Ebrahimzadeh, H. and Niknam, V. (1999) A new derivatization method for the analysis of steroidal sapogenins by Gas-Liquid Chromatography. *Indian Drugs*, 36(6), 333-356.

6. Ercan, G., Yuce, S. and Turgut, K. (1997) Kokboya Bitkisinin (*Rubia tinctorum* L.) *In vitro* Kosullannda Rejenrrasyon Yeteneginin Arastirmasi. Tr. J. of Agriculture and forestry, 21: 487- 491.

7. Giri, A. and Narasu, M.L. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol. Adv., 18: 1-22.

8. Heijden, R., Verpoorte, R., Hoekstra, S. S and Hoge, H. C. (1994) Nordamnacanthal, a Major Anthraquinone from on *Agrobacterium rhizogenes* Induced root culture of *R. tinctorum*, Plant Physiol. Biochem., 32(3): 399- 404.

9. Hirotani M., Zhou Y., Rui H. And Furuya T. (1994) Cycloartane triterpene glycosides from the hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. Phytochemistry 37(5):1403-1407.

10. Ionkova I., Kartnig T., and Alfermann W.(1997) Cycloartane saponin production in hairy root cultures of *Astragalus mongholicus*. Phytochemistry, 45: 1597-1600.

11. Isa, T., Ogasawara, T. and Hiroko, K. (1989) Induction of hairy-Root Plant, and Mucilage Production by Hairy-Root. Plant Tissue Culture Letters, 6(3): 134-137.

12. Miklas, P.N., Townsend, C.E. and Ladd, S.L. (1987) Seed coat anatomy and the scarification of *Cicer milkvetch* seed. Crop Sci., 27: 766-772.

13. Mukundan, U., Dawda, HG. and Ratnaparkhi, S. (1997) Hairy root Culture and Secondary Metabolite Production. Agro Botanica, Mumbai, India.

14. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassayes with Yobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15: 473-497.

15. Park S. U. and Facchini P. J. (2000) *Agrobacterim rhizogenes*- mediated transformation of opium poppy,*Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. J. Exp. Bot.51: 1005-1016.

16. Polat, E., Caliskan- Alankus, O., Perrone, A., Piacente, S., Bedir, E. (2009) Cycloartane- type glycosides from *Astragalus amblolepis*. Phytochemistry, 70: 628-634.

17. Saito, K., Maitani, T., and Yoshihira, K. (1991) Uptake of Arsenic by Cultured Hairy roots of *Rubia tinctorum* from Liquid Medium. Journal of Food Hygienic Society of Japan. 32, 5, 414-415.

18. Srivastava, S. and Srivastava, A. K. (2007) Hairy root culture for mass-production of high value secondary metabolites. Crit. Rev. Biotechnol. 27: 29-43.

19. Townsend, C. E. and W. McGinnies (1972) Temperature requirements for seed germination of several forage legumes Agron. J. 64: 809-812 .

20. Veerasham, C. (2004) Medicinal Plant Biotechnology. CBS Pub., New Dehli, India.

21. Xie, P.S. and Leung, A. Y. (2009) Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of chineese material medica, Chromatography, A. 1216 (11): 1933- 1940.

Comparison of hairy root induction by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in *Astragalus compactus*

Habibi S., Niknam V., Ebrahimzadeh H. and Mirmasoumi M.

Plant Biology Dept. and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms in Iran, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Astragalus compactus L. seeds were collected from Jajrood in the province of Tehran from Iran. The seeds germinated and were grown in growth chamber under the phototoperiod of 16 h light and 8 h dark. Then the leaf, stem, pedicle and cotyledon explants from sterilized three-week-old seedlings were cutted and infected with *Agrobacterium rhizogenes* strains: *15834, 2659* and *WT*. The induction of hairy roots using wounded explants were more efficient comparing intact explants. Hairy roots were obtained from leaf and stem explants but no hairy roots were induced from cotyledon and pedicle explants of *Astragalus compactus*. The highest frequency of hairy roots induction was obtained by strain 2659. Strain *15834* was beneficial but not as effective as strain *2659*. In contrast, strain *WT* did not induced any hairy roots in the explants. Finally, results of this study could be useful for induction of hairy roots and extraction of important secondary metabolites in *Astragalus compactus.*

Key words: *Astragalus, Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root.