فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره۳، پیاپی ۷۳، پاییز ۱۴۰۱، ص ۱۴۲-۱۲۷
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Sering.72, Fall 2022, p. 127-142
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

اثر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بر القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه

الهه میرزایی دلبری[۱]، جعفر وطن‌دوست[۲]، متین جامی معینی*[۳]، عیسی کهن باغخیراتی[۴]

چکیده

مقدمه: *تراریخت‌سازی میانجی‌گری شده توسط آگروباکتریوم، یک فن آوری کارآمد برای القای ریشه های مویین است. در پژوهش حاضر، اثر سویه اگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه بر القای ریشه مویین در گیاه یونجه بررسی گردید.*

روش‌ها: *آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل سویه اگروباکتریوم رایزوژنز در چهار سطح A13، ۳۱۸، ۱۵۸۳۴ و A4 و نوع ریزنمونه در دو سطح برگ سه‌برگچه‌ای و هیپوکوتیل بودند.*

نتایج و بحث: *بیشترین درصد القای ریشه مویین، در ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بود. تلقیح با سویه باکتریایی ۳۱۸، باعث کمترین القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گردید. سویه‌های باکتریایی A13 و ۱۵۸۳۴ به ترتیب بیشترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل را تولید نمودند. کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ تولید گردید. بیشترین و کمترین طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، به ترتیب در شرایط تلقیح با سویه‌های باکتریایی A4 و ۳۱۸ مشاهده شد. در ریزنمونه های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در رابطه با تعداد و طول ریشه مویین وجود نداشت. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها، حضور ژن rolB*

۱ . دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
۲ . دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۳ . استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران (نویسنده مسئول: mat_jami@iaus.ac.ir)
٤ . استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین را تأیید نمود. با توجه به نتایج، استفاده از ریزنمونه برگ همراه با سویه A4اگروباکتریوم رایزوژنز جهت تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پلاسمید، تراریخت‌سازی، ریزنمونه، سویه باکتریایی، هیپوکوتیل

مقدمه

طی سال‌های اخیر تعداد زیادی از گیاهان و افزودنی‌های گیاهی غذایی مورد بررسی قرار گرفته اند که نه تنها در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های عصبی، قلب و عروق، روان و گوارشی بکار رفته‌اند، بلکه در برخی موارد به عنوان محافظ بافت های بدن مانند مغز و کبد مطرح شده‌اند (Moloudi *et al*., 2014). یکی از این گیاهان که دارای سابقه‌ای طولانی در استفاده‌های غذایی و دارویی در طب سنتی چین، هند و بسیاری از مناطق خاورمیانه است، گیاه یونجه زراعی با نام علمی *Medicago sativa* L. و نام عمومی Alfalfa است که در افزایش اشتها، هضم غذا و بهبود سوء تغذیه مؤثر است. در ایران، از قدیم‌الایام یونجه به علت اثرات سریع و قابل توجه در درمان بیماران مبتلا به کمبود ویتامین C، افزایش سرعت التیام بافتی و کاهش تورم استفاده شده است. در طب سنتی از یونجه به عنوان مکمل خون نام برده می‌شود. در مناطق کردنشین، از گیاه یونجه به منظور جلوگیری از خونریزی‌های پوستی و تسریع فرآیند انعقاد استفاده می‌گردد (Servatyari *et al*., 2017). یونجه یکی از گیاهان علوفه‌ای مهم در سرتاسر جهان است. گیاه یونجه، علوفه‌ای با کیفیت مناسب برای تمامی انواع دام تولید می‌کند و به تنهایی می‌تواند انرژی، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌های مورد نیاز دام‌ها را تامین کند (Monirifar et al., 2021).

تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی گیاه یونجه، وجود پروتئین ها، کربوهیدرات ها، ساپونین ها، لیگنین، ترکیبات فنلی، تانن ها، آلکالوئیدهای تری ترپن را نشان می‌دهد. بررسی فارماکولوژیک بیانگر آن است که یونجه دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد اضطراب، محافظ کبد، محافظت کننده قلبی و عصبی، ایمنی، ضد کم خونی، گزانتین اکسیداز و بسیاری از مهارکننده‌های دارویی دیگر است (Al-Snafi *et al*., 2021).

در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند بوده و مدت زمان زیادی برای تولید آن‌ها لازم است. از آنجایی که سنتز شیمیایی فرآورده‌های طبیعی گیاهی به آسانی امکان‌پذیر نیست، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می‌رسد. در این رابطه، معمولا تأکید بر کشت ریشه مویین به عنوان وسیله ای برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه برای کاربردهای تجاری است. این کشت ها معمولا ظرفیت بالاتری نسبت به کشت‌های سوسپانسیون سلولی یا حتی ریشه گیاهان دست نخورده برای سنتز متابولیت های ثانویه دارند (Ebrahimi *et al*., 2017; Raei *et al*., 2017).

برخی از متابولیت‌ها فقط در مرحله‌ی کشت ریشه تولید می‌شوند. کشت ریشه را می‌توان به‌صورت ریشه‌ی نابجا و ریشه‌ی تراریخته ایجاد نمود. سیستم کشت ریشه در گیاهان عالی معمولا سرعت رشد کمتری را نشان داده و نیاز به منبع فیتوهورمونی خارجی دارد که این امر منجر به سنتز بسیار کم متابولیت‌های ثانویه می‌شود. بیوتکنولوژی روش‌های جایگزینی برای تولید مواد دارویی با منشاء ریشه معرفی می‌کند. یکی از این راهکارها استفاده از یک ناقل طبیعی به‌نام اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) و طراحی سیستم کشت ریشه مویین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است (Soleimani *et al*., 2012).

القای ریشه‌های مویین نتیجه ترانسفورماسیون ژنتیکی باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز است که از طریق انتقال T-DNA پلاسمید Ri باکتری حاوی ژن های *rol* و*aux* به گیاه انجام می شود (Sharifi *et al.*, 2014). بنابراین به نظر می‌رسد که ژن *rolB* با افزایش حساسیت به اکسین و ژن‌های *aux1* و *aux2* از طریق بیوسنتز اکسین در سلول های تراریخت شده، سبب القای پاسخ اکسین و تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود (Majumdar *et al*., 2011).

ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز دارای رشد سریع، پایداری فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و انتقال پذیری بوده و اغلب میزان رشد آنها سریعتر از کشت سلول‌های گیاهی است. البته سیستم ریشه‌های مویین تراریخت، منبعی نویدبخش در تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان با ارزش دارویی بالا می‌باشند (Nourozi *et al*., 2014).

تراریخت‌سازی میانجی‌گری شده توسط اگروباکتریوم، به عنوان یک فن‌آوری زیستی کارآمد، برای القای ریشه‌های مویین در گیاه برازمبل (*Perovskia abrotanoides*) گزارش شده است. بر اساس نتایج این مطالعه، هر سه سویه باکتری مورد استفاده، موفق به القای ریشه مویین بر روی گره های تلقیح شده در گیاهچه های استریل شدند. بیشترین میزان تولید ریشه مویین پس از آلودگی با سویه ی ATCC15834 بدست آمد و پس از آن سویه ی R1000 در تولید ریشه ی مویین نسبت به TR105 مؤثرتر بود (Ebrahimi *et al*., 2017). در پژوهشی که به منظور بکارگیری سیستم تراریخت‌سازی ریشه مویین در گیاه یونجه انجام شد، استفاده از سویه باکتریایی LBA9402 منجر به تولید موفقیت‌آمیز ریشه‌های مویین در واریته WL-525HQ گیاه یونجه گردید (Zhao *et al*., 2022). بررسی القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های ساقه سه رقم یونجه در شرایط تلقیح با سویه A4T اگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد که درصد القای ریشه مویین در ارقام مختلف از ۴ تا ۹۴ درصد متغیر بود (Golds *et al*., 1991).

سویه و سن اگروباکتریوم رایزوژنز، نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت از عوامل مؤثر در القای ریشه مویین هستند. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که بافت‌های مختلف گیاهی پاسخ های متفاوتی به تراریخت‌سازی با سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز دارند (Pirian *et al*., 2012; Sharafi *et al*., 2013; Samadi *et al*., 2012). در پژوهشی، سه سویه اگروباکتریوم رایزوژنز جهت القای ریشه مویین در چهار ریزنمونه مختلف گیاه گل مکزیکی (*Agastache foeniculum*) مورد استفاده قرار گرفت.

بیشترین فراوانی تراریخت‌سازی با استفاده از سویه A4 و در ریزنمونه‌های برگ یک ماهه به دست آمد. وضعیت تراریختی ریشه‌های مویین با روش PCR مورد تأیید قرار گرفت (Nourozi *et al*., 2014).

با توجه به اهمیت گیاه یونجه به عنوان یک گیاه دارویی و همچنین نقش ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه، در پژوهش حاضر توانایی سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد.

طرح آزمایشی

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجراء گردید. فاکتورهای مورد بررسی شامل سویه باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز در چهار سطح A13، ۳۱۸، ۱۵۸۳۴ و A4 و نوع ریزنمونه در دو سطح ریزنمونه برگ سه‌برگچه‌ای و هیپوکوتیل بودند.

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذرهای گیاه یونجه همدانی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور ضدعفونی بذور، ابتدا بذور یونجه با آب معمولی شستشو داده شد تا آلودگی‌های سطحی تا حد امکان زدوده شود. سپس بذور به مدت ۱ دقیقه در الکل اتانل ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی شدند. سپس در زیر هود لامینار، بذور سه مرحله و در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

پس از ضدعفونی، بذور در محیط کشت MS جامد فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد کشت شدند. ظروف کشت به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل گردیدند. پس از جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه، قطعات هیپوکوتیل و اولین برگ سه‌برگچه‌ای به عنوان ریزنمونه استفاده شدند.

آماده سازی سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و تلقیح ریزنمونه‌ها

سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز از گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. از محیط کشت مایع و جامد LB برای کشت باکتری استفاده شد. برای نگهداری کوتاه مدت و واکشت باکتری‌ها از محیط کشت

LB جامد استفاده شد. برای کشت سوسپانسیون باکتری، از کشت‌های جامد تک‌کلونی گرفته شد و در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپیسین کشت گردید. برای تهیه یک لیتر محیط کشت LB، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم سدیم کلراید و ۱۰ گرم پپتون به ترکیبات اصلی محیط کشت اضافه شد. محیط کشت تهیه شده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید (Bertani, 1952).

برای تهیه کشت سوسپانسیون، در شرایط استریل، یک کلونی از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز کشت شده در محیط کشت LB جامد برداشته و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت گردید. محیط کشت LB مایع آغشته به باکتری به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و در دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت تا باکتری رشد کرده و فعال شود. باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند و رسوب باکتری همراه با ۱۰ میلی‌لیتر محیط MS ۱/۲ مایع برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی به روش غوطه‌وری مورد استفاده قرار گرفت (Khatodia & Biswas, 2014).

ریزنمونه‌های گیاهی به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند. بعد از حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی اطراف ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در اتاقک رشد، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری گردیدند. تعدادی ریزنمونه نیز به عنوان شاهد به همین روش آماده شد، با این تفاوت که به جای سوسپانسیون باکتری، به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند و سپس در شرایط یکسان با نمونه‌های تلقیحی کشت و نگهداری شدند.

۴۸ ساعت بعد از هم‌کشتی، برای حذف باکتری، ریزنمونه‌ها دو تا سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و جهت حذف آب اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) منتقل و در اتاقک رشد، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در روشنایی نگهداری شدند. در هر ظرف کشت، سه عدد ریزنمونه قرار گرفت. برای حذف کامل باکتری، در واکشت‌های بعدی از غلظت‌های پایین‌تر سفوتاکسیم (۴۰۰- ۳۰۰- ۲۰۰- ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. واکشت ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز انجام شد. تولید ریشه‌های مویین در این مرحله مشاهده گردید.

پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط دارای سفوتاکسیم، مشاهدات روزانه برای بررسی ظهور ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری انجام شد. بعد از رشد کافی و مطلوب ریشه‌ها (حدود ۴۵ روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت)، ویژگی‌هایی نظیر درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شد و تراریختی ریشه‌های ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین درصد القای ریشه مویین، تعداد ریزنمونه‌های دارای ریشه بر تعداد کل ریزنمونه‌های داخل هر ظرف کشت تقسیم و حاصل در ۱۰۰ ضرب گردید. تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، از

طریق شمارش تعداد ریشه‌های مویین القاء شده در هر ریزنمونه و تعیین متوسط تعداد آن در ریزنمونه‌های موجود در هر ظرف کشت محاسبه شد. طول ریشه‌های مویین در هر ریزنمونه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و میانگین آن در ریزنمونه‌های هر ظرف کشت به عنوان طول ریشه مویین گزارش گردید. جهت تعیین وزن خشک ریشه‌های مویین، ریشه‌های تولید شده در هر ظرف کشت به مدت ۲۴ به آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ساعت انتقال یافت و سپس با استفاده از ترازوی دقیق آزمایشگاهی توزین شد.

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین یونجه از طریق PCR

برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین، استخراج DNA از ریشه‌های مویین و طبیعی گیاه بر پایه روش Edwards و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت. ریشه‌های مویین، حاصل از انتقال T-DNA پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوژنز به سلول‌های گیاهی می‌باشند. تایید تراریختی ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود در T-DNA این باکتری انجام داد که مهم‌ترین آن‌ها ژن‌های *rol*A، *rol*B و *rol*C هستند. در این پژوهش، برای تایید مولکولی ریشه‌های مویین تراریخت، از تکنیک PCR بر روی ریشه‌های مویین با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *rol*B استفاده شد. DNA های استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B (**Error! Reference source not found.** ۱) تکثیر شدند (Kabirnetaj *et al*., 2012).

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B

Table 1. Sequence of specific primers of *rol*B gene

آغازگر	توالی آغازگر 5′ ..... 3′	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
آغازگر پیشرو	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	۵۵	۴۳۰ bp
آغازگر برگشتی	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC		

مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲/۵میکرولیتر Master mix PCR (dNTPs, $MgCl_2$, buffer, Taq DNA polymerase) و یک میکرولیتر DNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. به نمونه کنترل منفی، DNA استخراج شده از نمونه شاهد اضافه شد و کنترل مثبت هم DNA پلاسمید باکتری بود. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها

برای بررسی کیفیت DNA از نظر شکستگی رشته DNA، ۵ میکرولیتر از محصول استخراج DNA همراه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری در چاهک‌ها جداگانه تزریق شد. تانک به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۰ ولت متصل گردید. پس از یک ساعت، ژل در دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel Documentation System) قرار داده شد و تصویر آن مشاهده گردید.

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بر روی صفات درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه مویین با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، سویه باکتری و همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه باکتری بر درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه مویین در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه، سویه اگروباکتریوم رایزوژنز و اثر متقابل آنها

Table 2. Analysis of variance for explant type, *A. rhizogenes* strain and their interaction

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد القای ریشه مویین	تعداد ریشه مویین در ریزنمونه	طول ریشه مویین	وزن خشک ریشه مویین
نوع ریزنمونه	۱	۳۷۵۰/۲۵**	۳۰/۳۷**	۵۲۹/۲۲**	۰/۰۱۳۸**
سویه باکتری	۳	۷۸۷/۰۶**	۲/۸۲**	۸۰/۷۱**	۰/۰۱۰۹**
نوع ریزنمونه × سویه باکتری	۳	۱۶۹/۷۹**	۳/۲۶**	۸۲/۶۱**	۰/۰۱۱۹**
خطای آزمایشی	۱۶	۱۰/۵۸	۰/۱۱	۱/۳۱	۰/۰۰۰۰۴
ضریب تغییرات (٪)	-	۸/۶۷	۱۳/۳۲	۱۷/۲۲	۱۳/۳۰

بدون علامت، غیرمعنی‌دار. *،** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

درصد القای ریشه مویین

درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ (۵۰ درصد)، به طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۲۴/۹۹ درصد) بود (جدول ۳). هر چهار سویه اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده، ریشه مویین در

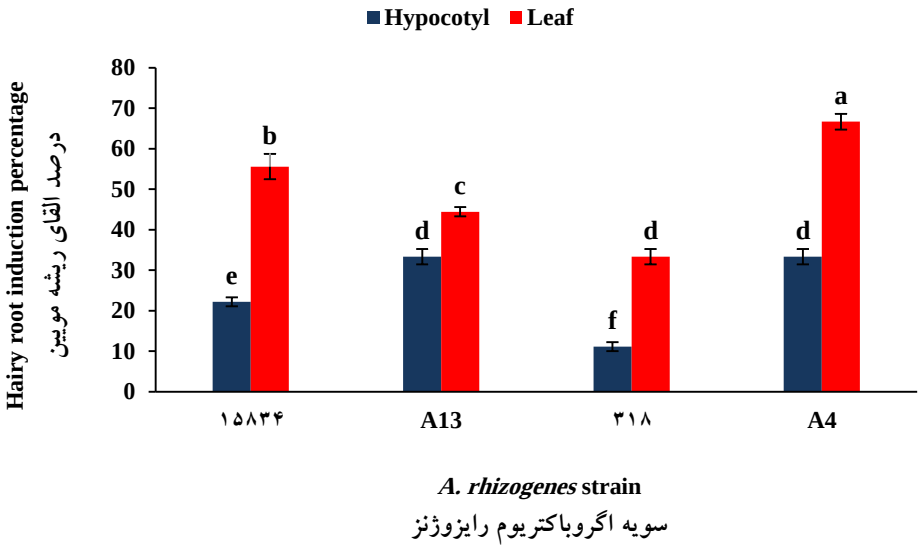
ریزنمونه‌های گیاه یونجه را القا نمودند. درصد القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه، از ۱۱/۱ تا ۶۶/۷ درصد متغیر بود. در ریزنمونه‌های برگ، بیشترین درصد القای ریشه مویین (۶۶/۷ درصد)، در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بود. این در حالی است که در رابطه با ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، سویه‌های A4 و A13 به طور مشترک بالاترین درصد القای ریشه مویین (۳۳/۳ درصد) را به خود اختصاص دادند. در هر دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل، کمترین درصد القای ریشه مویین در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی ۳۱۸ مشاهده گردید (شکل ۱).

جدول ۳- اثر نوع ریزنمونه بر تولید ریشه‌های مویین در یونجه

Table 2. Effect of explant type on hairy root production in Alfalfa

نوع ریزنمونه	میانگین ± خطای استاندارد			
	درصد القای ریشه مویین	تعداد ریشه مویین در ریزنمونه	طول ریشه مویین (سانتی‌متر)	وزن خشک ریشه مویین (گرم)
هیپوکوتیل	۲۴/۲±۹۹/۸۶ b	۱/۰±۴۲/۰۸ b	۱/۰±۹۴/۲۱ b	۰/۰±۰۲۲/۰۰۲ b
برگ	۵۰/۳±۰۰/۸۵ a	۳/۰±۶۷/۳۸ a	۱۱/۱±۳۳/۹۶ a	۰/۰±۰۷۰/۰۲۳ a

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک باشند، مطابق آزمون LSD (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوژنز بر درصد القای ریشه مویین

Figure 1. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots induction percentage

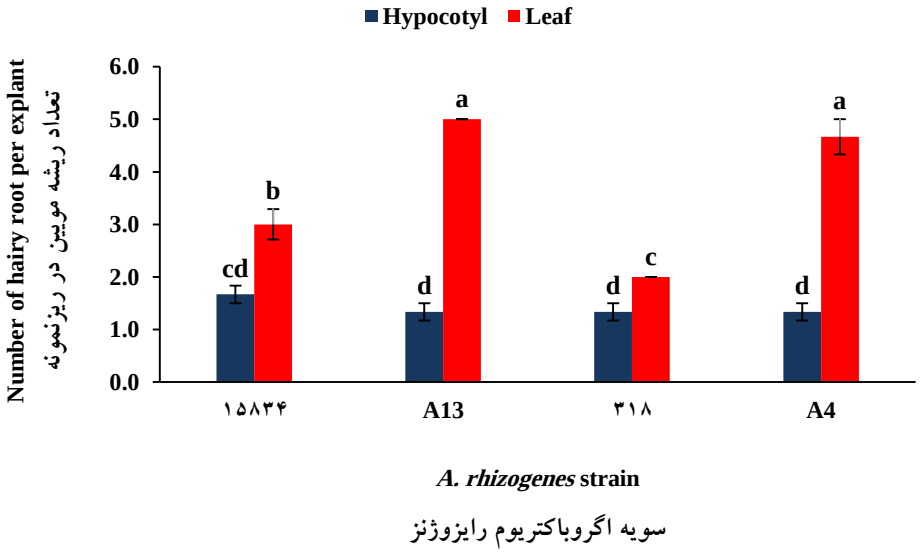
تعداد ریشه مویین در ریزنمونه

تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ به طور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بود (جدول ۳). سویه‌های باکتریایی A13 و A4 بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های برگ را تولید نمودند. کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های

برگ، در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ تولید گردید. تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در رابطه با تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل وجود نداشت. سویه باکتریایی ۱۵۸۳۴ بیشترین و سویه‌های A4، ۳۱۸ و A13 به طور مشترک کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه را دارا بودند (شکل ۲).

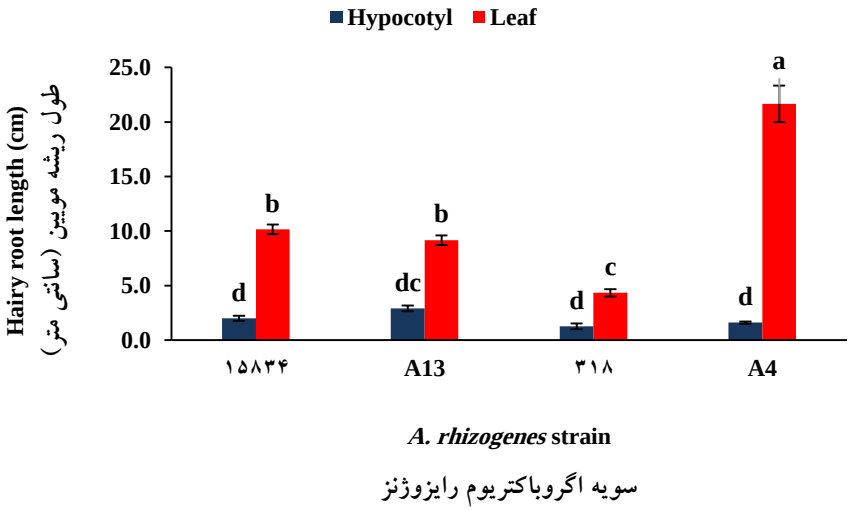
طول ریشه مویین

بر اساس نتایج مقایسات میانگین، طول ریشه‌های مویین تشکیل شده در ریزنمونه‌های برگ به طور قابل توجهی بیشتر از طول ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بود. میانگین طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل به ترتیب برابر با ۱۱/۳۳ و ۱/۹۴ سانتی‌متر ثبت گردید (جدول ۳). بیشترین طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بود. کمترین طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ مشاهده شد که با سایر سویه‌های باکتریایی مورد استفاده اختلاف معنی‌دار داشت. تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در رابطه با طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل وجود نداشت. سویه‌های باکتریایی A13 و ۳۱۸ به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین طول ریشه مویین را دارا بودند (شکل ۳).



شکل ۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوژنز بر تعداد ریشه مویین در ریزنمونه

Figure 2. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on number of hairy roots per explant

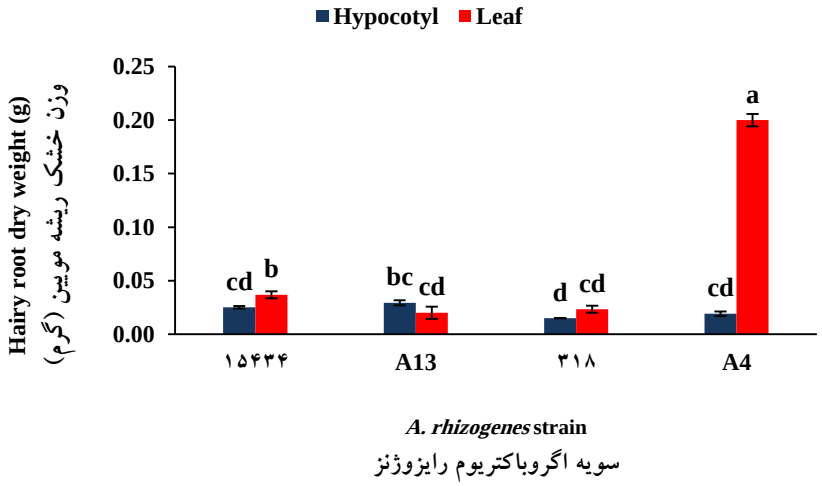


شکل ۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوژنز بر طول ریشه مویین

Figure 3. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots length

وزن خشک ریشه مویین

وزن خشک ریشه‌های مویین تولید شده در ریزنمونه‌های برگ، به طور معنی‌داری بیشتر از وزن خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بود (جدول ۳). بیشترین وزن خشک ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، در شرایط تلقیح با سویه A4 به دست آمد که به طور قابل‌توجهی بیشتر از سایر سویه‌های باکتریایی بود. کمترین وزن خشک ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه‌های باکتریایی A13 و ۳۱۸ تولید گردید. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، بیشترین وزن خشک ریشه در شرایط تلقیح با سویه A13 و کمترین آن در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ به دست آمد. تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های باکتریایی ۳۱۸، A4 و ۱۵۴۳۴ در رابطه با وزن خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل وجود نداشت (شکل ۴)



شکل ۴- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوژنز بر وزن خشک ریشه مویین

Figure 4. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots dry weight

کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین گیاه یونجه

نتایج ژل آگارز DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین و ریشه‌های غیرتراریخت گیاه یونجه برای نمونه تزریق شده در هر چاهک، یک تک باند را نشان داد. همچنین تأیید تراریختی ریشه‌های مویین گیاه یونجه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و از تکنیک PCR صورت گرفت. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها، حضور ژن *rol*B (تکثیر قطعه مورد انتظار 430 bp) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین را تأیید نمود (شکل ۵).

شکل ۵- الگوی الکتروفورز محصولات PCR (قطعه DNA به اندازه ۴۳۰bp) از ژن *rol*B اگروباکتریوم رایزوژنز

Figure 5. Electrophoresis pattern of PCR products (430 bp DNA fragment) of *Agrobacterium rhizogenes rol*B gene

M: نشانگر 1Kb DNA Ladder؛ چاهک‌های ۱، ۲ و ۳: تکرار کلون‌های ریشه مویین باکتری A4؛ چاهک ۴: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* سویه A4 به عنوان کنترل مثبت؛ C: کنترل منفی (ریشه غیرتراریخت گیاه)؛ DNA1: DNA ریشه طبیعی گیاه یونجه؛ DNA2: ژنوم استخراج شده از ریشه مویین

M: 1Kb DNA Ladder; 1, 2, 3: A4 strain hairy root clones; 4: *A. rhizogenes* plasmid A4 strain as positive control; C: Adventitious roots raised from non-transformed explant as negative control; DNA1: The natural root of the alfalfa plant; DNA2: Genome extracted from hairy roots

بحث

القای ریشه‌های مویین

موفقیت در القای ریشه مویین از طریق *A. rhizogenes* به عوامل مختلفی نظیر گونه، جنس و سن بافت گیاهی بستگی دارد (Bernousi *et al.*, 2016). در این پژوهش، ریزنمونه‌های مختلف پاسخ متفاوتی از نظر تولید ریشه مویین نشان دادند.

ریزنمونه‌های برگ در رابطه با درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه و میانگین طول ریشه مویین نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل برتر بودند. می‌توان اظهار داشت که بسته به گونه‌ی گیاهی، نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های مویین تأثیرگذار است (Kabirnetaj *et al*., 2012). در بررسی تولید ریشه‌های مویین در گیاه مریم نخودی طناز، برگ و گره ساقه به ترتیب بهترین ریزنمونه‌ها به منظور القای ریشه مویین با فراوانی بالا بودند (Bernousi *et al*., 2016). ارزیابی تولید ریشه های مویین با تلقیح ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون گیاهچه‌های تاتوره تماشایی توسط سویه‌های A4، A7 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوژنز، نشان داد که بیشترین و کم‌ترین ریشه مویین تراریخته به ترتیب مربوط به سویه A4 و ۱۵۸۳۴ بود. بهترین ریزنمونه جهت تولید ریشه مویین، با تلقیح برگ در سویه A4 و کوتیلدون در سویه A7 گزارش شد (Ghadermazi *et al*., 2016). وابستگی القای ریشه مویین به نوع ریزنمونه در گونه‌های دیگر گیاهی نیز گزارش شده است (Gupta *et al*., 2011; Samadi *et al*., 2012; Md Setamam *et al*., 2014). بررسی القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های ساقه سه رقم یونجه در شرایط تلقیح با سویه A4T اگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد که درصد القای ریشه مویین در ارقام مختلف از ۴ تا ۹۴ درصد متغیر بود (Golds *et al*., 1991).

سویه باکتری مورد استفاده و غلظت سوسپانسیون باکتری برای تلقیح از دیگر عوامل مؤثر در فرایند تراریختی است (Bernousi *et al*., 2016). در پژوهش حاضر، سویه باکتریایی A4 بالاترین درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل را به خود اختصاص داد. البته در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های A4 و A13 در رابطه با درصد القای ریشه مویین وجود نداشت. وجود تفاوت در سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز، در مورد توانایی انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های یک گونه خاص و متعاقبا القای ریشه‌های مویین، که در این پژوهش نشان داده شد، در مطالعات زیادی به خوبی به اثبات رسیده است. در پژوهشی، استفاده از سویه باکتریایی LBA9402 منجر به تولید موفقیت‌آمیز ریشه‌های مویین در واریته WL-525HQ گیاه یونجه شد (Zhao *et al*., 2022). بررسی القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه باریجه نشان داد که تنها سویه باکتریایی ۱۵۸۳۴ منجر به القای ریشه مویین گردید و تلقیح با سویه‌های A4، ۲۶۵۹ و ۱۷۲۴ حتی بعد از گذشت دو تا سه ماه پاسخ مناسبی نشان نداد (Montazeri *et al*., 2014). گزارش شده است که سویه GMI9534 موفق به القای ریشه مویین در هیچ یک از ریزنمونه‌های گیاه مریم نخودی طناز نشده است، در حالی که سویه A13 منجر به القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه گردیده است. وجود ۱۲ تکرار از توالی‌های القاء کننده T-DNA (T-DNA transfer stimulator sequences, TSS) در پلاسمید Ri سویه A13، دلیل قدرت تراریخت‌سازی بالای این سویه بیان شده است (Bernousi *et al*., 2016).

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین

ژن‌های *rol*B نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های مویین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن، ریشه مویین تولید نخواهد شد (El-Esawi *et al*., 2017). در این پژوهش، ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده از ردیابی ژن *rol*B مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز حضور نوار ۴۳۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rol*B را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود، اما برای ریشه‌های غیرتراریخت نواری تکثیر نشد (شکل ۵). مشابه با نتایج پژوهش حاضر، تراریختی ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه کاسنی از طریق ردیابی ژن *rol*B تأیید گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR حضور نوار مربوط به ژن *rol*B اگروباکتریوم رایزوژنز را آشکار کرد که با نوار حاصل از پلاسمید باکتری یکسان بود (Fathi *et al*., 2019).

نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوع ریزنمونه و سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. هر چهار سویه باکتریایی مورد استفاده منجر به القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه یونجه گردید. با این وجود، سویه باکتریایی A4 از کارآیی بیشتری در القای ریشه‌های مویین به ویژه در ریزنمونه برگ برخوردار بود. در شرایط استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های A13 و A4 در رابطه با درصد القای ریشه مویین وجود نداشت. سویه باکتریایی ۳۱۸ کمترین کارآیی تراریختی را در بین سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده دارا بود. با توجه به برتری قابل توجه ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل در رابطه با تولید ریشه‌های مویین، استفاده از ریزنمونه برگ همراه با سویه A4 اگروباکتریوم رایزوژنز جهت تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه قابل توصیه است.

سپاسگزاری

در پایان نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی و سپاس خود را از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد فارسی بابت همکاری صمیمانه ایشان در تأمین سویه‌های باکتریایی مورد استفاده اعلام دارند.

References

Al-Snafi, A.E., Khadem, H.S., Al-Saedy, H.A., Alqahtani, A.M., El-Saber Batiha, G. and Abolfazl, J.S. (2021). A review on *Medicago sativa*: A potential medicinal plant. International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive, 1(2): 22-33.

Bernousi, I., Jafari, M. and Ahmadi Dizaji, J. (2016). Optimization of induction and hairy root culture establishment of *Teucrium chamaedrys* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(2): 364-280. (In Persian)

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62(3): 293-300.

Ebrahimi, S., Zaker, A., Abrishamchi, P., Bahrami, A.R., Ganjeali, A. and Sodagar, N. (2017). Hairy root induction and secondary metabolite production in *Perovskia abrotanoides* Karel. Journal of Plant Process and Function, 6(20): 17-26.

Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.A. (1991). Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 19: 1349.

El-Esawi, M.A., Elkelish, A., Elansary, H.O., Ali, H.M., Elshikh, M., Witczak, J. and Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. Oxidative medicine and cellular longevity, 2: 10-17.

Fathi, R., Mohebodini, M. and Chamani, E. (2019). Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 8(1): 63-76. (In Persian)

Ghadermazi, S., Masoud Tohidfar, M. and Miri, S.M. 2016. The Production of Hairy Roots from (*Datura innoxia* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* and Effects of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Biological Elicitors on Atropine and Scopolamine Content. Journal of Medicinal Plants, 16(10): 141-156. (In Persian)

Golds, T.J., Lee, J.Y., Husnain, T., Ghose, T.K. and Davey, M.R. (1991). *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Transformation of the Forage Legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. Journal of Experimental Botany, 42(9): 1147-1157.

Gupta, S.K., Liu, R.B., Liaw, S.Y., Chan, H.S. and Tsay, H.S. (2011). Enhanced tanshinone production in hairy roots of '*Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture. Botanical Study, 52(4): 435-443.

Kabirnetaj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G.A. and Shokri, E. (2012). Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus* L.) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian journal of agricultural biotechnology 4: 61–75. (In Persian)

Khatodia, S. and Biswas, K. (2014). A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(5): 625-633.

Majumdar, S., Garai, S. and Jha, S. (2011). Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of *Bacopa saponins* in transformed calli and plants. Plant cell Reports, 30(5): 941-954.

Md Setamam, N., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, Z. and Che Mohd Zain, C.R., (2014). Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of Capsicum species explants. BMC Research Notes, 7: 414. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-414

Moloudi, M.R., Hassanzadeh, K., Rouhani, S., Zandi, F., Ahmadi, A., Khalwatian, P., Rostami, A., Sheikh Esmaeili, F. and Izadpanah, E. (2014). Effect of chloroformic extract of *Cichorium intybus* on liver function tests and serum level of TNF-α in obstructive cholestasis in rat. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 19(4): 10-19. (In Persian)

Monirifar, H., Moradiyan, P., Ahmadi, R. and Moghaddam, A. (2021). Identification of suitable alfalfa cultivars for deficit irrigation conditions in Tabriz plain. Journal of Agricultural Science, 30(4): 249-264. (In Persian)

Montazeri, F., Omidi, M., Khialparast, F. and Sabokdast, M. (2014). Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22(2): 251-260. (In Persian)

Nourozi, E., Hosseini, B. and Hassani, A. (2014). A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum*. Biologia, 69(7): 870-879.

Pirian, K., Piri, Kh. and Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Protulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradenaline, s production. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3(3): 642–649.

Raei, M., Esna-Ashari, M. and Khodayari, M. (2017). Abiotic Elicitors and Medicinal Plants Biotechnology. Journal of Cell & Tissue, 7(4): 333-343. (In Persian)

Samadi, A., Carapetian, J., Heidary, R., Gafari, M. and Hssanzadeh, A. (2012). Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. mucronatum, an anti-tumor lignans production plant. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(1): 125-131.

Servatyari, K., Ahmadi, A., Kashefi, H., Menbari, M.N., Rostami, A. and Moloudi M.R. (2017). The effect of hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* on liver function tests, blood biochemical factors and coagulation system in male rats. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 21: 16-26. (In Persian)

Sharafi, A., Hashemisohi, H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, Kh. and Otang Nuti, V. (2013). A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113: 1–9.

Sharifi, S., Nejad Sattari, T., Zebarjadi, A., Majd, A. and Ghasempour, H. (2014). The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and ß-carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L.. Physiology and molecular biology of plants, 20(1): 69-80.

Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K.H. and Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). Journal of Medicinal Plants, 4(44): 176-185. (In Persian)

Zhao, E.H., Xie, J.P., Zhang, Y.J., An, Y. and Zhou, P. (2022). Establishment and application of hairy root transformation system of alfalfa. Chinese Journal of Grassland, 44: 1-9.

Effect of *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction in Different Explants of Alfalfa

E. Mirzaie Delbari[1], J. Vatandoost[2], M. Jami Moeini[3*], E. Kohan-Baghkheirati[4]

Received: 2022.5.21
Accepted: 2022.7.24

Abstract

Introduction: *Agrobacterium-mediated transformation is an efficient technology for induction of hairy roots in plants. In the present study, the effect of Agrobacterium rhizogenes strains and explant type on hairy root induction in alfalfa was investigated.*

Methods: *A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in Islamic Azad University, Sabzevar Branch. The studied factors were Agrobacterium rhizogenes strains at four levels (A13, 318, 15834 and A4) and explant type at two levels (trifoliate leaf and hypocotyl).*

Results and discussion: *The highest percentage of hairy root induction was obtained in leaf explants inoculated with bacterial strain A4, which was significantly higher than other strains of Agrobacterium rhizogenes. Inoculation with bacterial strain 318 caused the least induction of hairy roots in leaf explants and hypocotyl. Bacterial strains A13 and 15834 produced the highest number of hairy roots per leaf and hypocotyl explants, respectively. The lowest number of hairy roots in leaf explants was produced under inoculation with 318 strain. The highest and lowest hairy root length in leaf explants, were observed under inoculation with bacterial strains A4 and 318, respectively. In hypocotyl explants, there was no significant difference between strains of Agrobacterium rhizogenes in terms of number and length of hairy roots. The results of separation of PCR products using gel electrophoresis, confirmed the presence of rolB gene in the genome of hairy root cells. According to the results, inoculation of leaf explants with A4 strain of Agrobacterium rhizogenes is recommended to produce hairy roots in alfalfa.*

Keywords: Bacterial strain, Explant, Hypocotyl, Plasmid, Transformation

---

1Ph.D. student in Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

2Associate Professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

3Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran (Corresponding author: mat_jami@iaus.ac.ir)

4Assistant professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran