مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
صفحه ۱۸۹-۱۸۰

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 13, Number 2, Pages: 180-189

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.13.2.2

بهینه‌سازی القای ریشه مویین در گیاه دارویی بیلهر (*Dorema aucheri*) با استفاده از *اگروباکتریوم رایزوژنز* به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه

Optimization of hairy root induction in the medicinal plant Bilhar (*Dorema aucheri*) using *Agrobacterium rhizogenes* for the production of secondary metabolites

فاطمه جودکی[۱]، سید احمد سادات نوری[۲*]، سید محمد مهدی مرتضویان[۳]، فاطمه امینی[۴]، مهدی محمودی[۵]

Fatemeh Jodaki[1], Seyed Ahmad Sadat-Noori*[2], Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian[3], Fatemeh Amini[4], Mahdi Mahmoudi[5]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد، ۲- استاد، ۳- دانشیار، ٤- استادیار، ۵- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد
گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

1. Master's student, 2- Professor, 3- Associate Professor, 4- Assistant Professor, 5- Master's graduate, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: noori@ut.ac.ir
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۵/۱۳)
Received: 2024/11/29 | Accepted: 2025/03/10 | Published: 2025/08/04

Abstract

Dorema aucheri, commonly known as Bilhar, is a perennial medicinal plant belonging to the *Apiaceae* family, known for its diverse and significant medicinal properties. The aim of this study is to investigate the induction of hairy roots in the medicinal plant Bilhar using *Agrobacterium rhizogenes* to optimize the production of secondary metabolites in in vitro conditions. This experiment was conducted factorially within a completely randomized design with three replications. The factors examined included explant type at three levels (hypocotyl, stem, and leaf) and bacterial strain at two levels (ATCC-15834 and A4). The results indicated that the interaction of the investigated factors significantly affected the traits of hairy root induction percentage, as well as the fresh and dry weights of the hairy roots after two months. The highest percentage of hairy root induction, along with the greatest fresh and dry weight, was achieved with the combination of the ATCC-15834 strain and hypocotyl explants, which was significantly higher than other treatment combinations. The transgenic nature of the hairy roots was confirmed by tracing a part of the *rolB* gene using PCR, while no corresponding band was amplified for natural (non-transgenic) roots. Overall, the findings of this study suggest that hairy root induction in Bilhar is influenced by both explant type and bacterial strain, and these results are an important prerequisite for experiments related to hairy root culture aimed at producing medicinal metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Bilhar, Hairy roots, Secondary metabolites.

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Jodaki F, Sadat Noori S A, Mortazavian S M M, Mahmoudi M. (2025). Optimization of hairy root induction in the medicinal plant Bilhar (*Dorema aucheri*) using Agrobacterium rhizogenes for the production of secondary metabolites.Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (2): 180-189. Doi: 10.61882/gebsj.13.2.2
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 2, 2025

خلاصه

بیلهر با نام علمی *Dorema aucheri*، یک گیاه دارویی چندساله از خانواده چتریان است که خواص دارویی زیاد و متنوعی دارد. هدف از این پژوهش، بررسی القای ریشه موئین در گیاه دارویی بیلهر با استفاده از *اگروباکتریوم ریزوژنز* به منظور بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای است. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با سه سطح (هیپوکوتیل، ساقه و برگ) و سویه باکتری با دو سطح (ATCC-15834 و A4) بود. نتایج نشان داد که اثر متقابل عوامل مورد بررسی بر روی صفت‌های درصد القای ریشه مویین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه به طور معنی‌داری بوده است. بیشترین درصد القای ریشه مویین، وزن تر و خشک آن در ترکیب تیماری سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است. ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* با به کارگیری واکنش PCRتایید شد در حالی که برای ریشه‌های طبیعی (غیرتراریخته) نوار مربوطه تکثیر نشد. بطور کلی نتایج این مطالعه دال بر آن بود که القای ریشه‌های موئین در گیاه بیلهر متاثر از ریزنمونه و سویه باکتری بوده و نتایج این مطالعه یک پیش نیاز مهم برای آزمایشات مربوط به کشت ریشه مویین با هدف تولید متابولیت‌های دارویی است.

کلیدواژه‌ها: *اگروباکتریوم رایزوژنز*، بیلهر، ریشه مویین، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه
Introduction

بیلهر با نام علمی *Dorema aucheri*، یک گیاه دارویی چندساله از خانواده چتریان (*Apiaceae*) است (Yazdi et al., 2015). این گیاه بومی ایران بوده و عمدتاً در خاک‌های شنی یا در زیستگاه‌هایی از شیبدار تا مناطق مسطح رشد کرده و در اوایل فصل بهار در مناطق سردسیر کوهستانی استان‌های اصفهان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد ایران می‌روید (Ajani & Bockhoff–Claβen, 2021). بیلهر گیاهی دیپلوئید با تعداد کروموزوم 2n=22 است(Akhavan Roofigar et al., 2023). گیاه بیلهر به نام‌های کندل کوهی و زو نیز شناخته می‌شود.

خواص متعدد و زیادی برای این گیاه ذکر شده که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اثر محافظتی بر روی کبد، خلط‌آور، ضد اسپاسم (گرفتگی عضلات)، محافظت کننده عصبی، ضد فشارخون، ضد دیابت، کاهش‌دهنده چربی خون و ضد کلسترول اشاره کرد. همچنین برگ‌های این گیاه به عنوان یک عامل ضد انگلی برای دستگاه گوارش استفاده می‌شوند و ریشه‌ی آن برای درمان سوختگی به کار می‌رود(Ahangarpour et al., 2014). اجزای فعال عصاره‌ی گیاه بیلهر شامل اسانس، رزین، کومارین‌ها، فورانوکومارین‌ها، انواع ترپن‌ها و فلاونوئیدها است. همچنین مقدار کمی آلکالوئید نیز در این گیاه وجود دارد (Etebari et al., 2016). یکی از اصلی‌ترین مواد مؤثره این گیاه، ماده‌ی کومارین است که ترکیبات شیمیایی در کلاس بنزوپیرون از ترکیبات آلی هستند و دارای خواص بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد دیابتی هستند. کومارین به عنوان یک دارو برای درمان لنف ادم (Lymphedema) با پروتئین بالا و بهبود گردش خون وریدی استفاده می‌شود و در آزمایشات بالینی به عنوان یک ضد نئوپلاستیک مورد استفاده قرار گرفته است (Zibaee et al., 2020).

به دلیل رشد جمعیت، ناپایداری شرایط اقلیمی و کاهش مساحت‌های اکوسیستم‌های طبیعی، لازم است که از رویکردهای مدرن بیوتکنولوژیکی برای به‌دست آوردن متابولیت‌های ثانویه با بهره‌وری بالا استفاده شود (Stepanova et al., 2022). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت بافت گیاهی امکان‌پذیر است. به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله کومارین، کشت

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

ریشه مویین یک گزینه مناسب می‌باشد (Kubica et al., 2020). ریشه‌های مویین از طریق آلوده کردن سلول‌های گیاهی توسط *اگروباکتریوم رایزوژنز* (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) تشکیل می‌شوند. این آنکوژن‌ها فرآیندهای سلولی گیاه را مانند تعادل فیتوهورمون‌ها، متابولیسم اکسین و سیتوکینین و سیگنال‌دهی تعدیل می‌کنند. این ریشه‌ها قادراند ترکیباتی که حتی در گیاه وجود ندارند را سنتز کنند (Paolis et al., 2019). ریشه‌های موئین دارای پایداری ژنتیکی بالایی در طول دوره کشت هستند و از طرفی رشد سریع، نگهداری آسان و توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی را دارا می‌باشند که این ویژگی‌ها آن‌ها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل کرده است. ریشه‌های مویین برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی ارزشمند می‌باشند. ریشه‌های مویین سازوکارهای بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی را تقلید کرده و حتی مقادیر بالاتری از آن‌ها را نشان می‌دهند. بنابراین، این ریشه‌ها ابزار قدرتمندی برای انجام تحقیقات به منظور افزایش میزان تولید متابولیت‌های دارویی با ارزش محسوب می‌شوند (Stepanova et al., 2022). با توجه به بررسی‌های صورت گرفته، تاکنون در ایران و جوامع بین‌المللی مطالعاتی درباره القای ریشه مویین در گیاه دارویی بیلهر گزارش نشده است. در این تحقیق، القای ریشه مویین در گیاه دارویی بیلهر (*Dorema aucheri*)، با دو سویه باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* انجام شد که در آن صفت‌های درصد القا، وزن تر و وزن خشک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

بذر بیلهر از شرکت پوپونیک تهران خریداری شد. به منظور ضدعفونی کردن بذرها از محلول اتانول ۷۰ ٪ به مدت یک دقیقه و محلول ۱/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن، در زیر هود استریل استفاده شد. پس از ضدعفونی، بذرهای استریل را به منظور تولید گیاهچه‌های سترون جهت تهیه‌ی ریزنمونه، در محیط کشت MS از عناصر میکرو و ماکرو به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۸ گرم در لیتر آگار، pH= ۵.۸ و بدون هورمون کشت شدند. ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲٤±۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور LUX ۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از ٤۰ روز بذرها جوانه زدند و بعد از گذشت یک ماه برای انجام تلقیح از قسمت‌های مختلف گیاهچه‌های سترون (هیپوکوتیل، ساقه و برگ)، ریز نمونه تهیه شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها

در این تحقیق، دو سویه‌ی باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* (ATCC-15834 و A4) مورد مطالعه قرار گرفت. کشت باکتری در محیط‌های LB مایع حاوی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین انجام و در دمای ۲۸ درجه و دور ۱۸۰ در دقیقه داخل شیکر انکوباتور قرار گرفتند. OD_{600} محلول باکتری به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری و این پارامتر بین ۰/٦ تا ۰/۸ تنظیم و با این محلول ریزنمونه‌ها تلقیح شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون، ساقه و برگ با اندازه تقریبی یک سانتی‌متر پس از زخم سطحی به مدت ۸ دقیقه داخل سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به منظور دفع رطوبت اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شده و سپس به محیط همکشتی منتقل و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ٤۸ ساعت، ریزنمونه‌ها از محیط همکشتی خارج و به محیط‌های MS دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر انتقال داده شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه‌ها صورت گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد، تعدادی ریزنمونه به مدت زمان مشابه در آب مقطر استریل قرار گرفته و سپس در شرایط کاملاً مشابه کشت و نگهداری شدند. در هر پلیت، ۱۰ ریزنمونه کشت شد و سه تکرار (پلیت) برای هر ترکیب تیماری در نظر گرفته شد. ظروف کشت در اتاق رشد با دمای ۲٤±۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور LUX۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

استقرار و نگهداری ریشه‌های مویین درون شیکر انکوباتور

زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود ٤-٣ سانتی متری رسید، در هر ترکیب تیماری و در هر تکرار، ٥ کلون برتر که رشد بیشتری داشتند، جدا و به درون ارلن‌های ٥٠٠ میلی‌لیتری حاوی ١٠٠ میلی لیترمحیط کشت MS/2 مایع منتقل و در تاریکی و دمای ٢٤±٢ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با دور ٩٠rpm قرار گرفته و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از گذشت حدود دو ماه، وزن‌تر و خشک ریشه‌ها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. بازدهی تولید ریشه به صورت میزان تولید ماده خشک بر حسب گرم در هر تیمار محاسبه شد.

استخراج DNA و آنالیز PCR

به منظور تعیین هویت ژنتیکی، DNA ژنومی از ریشه‌های مویین (تراریخت) و ریشه‌های غیرمویین (طبیعی) با روش CTAB استخراج شد (Cheng et al., 2021). به منظور تایید تراریختی ریشه‌های موئین باید حضور ژن‌های *rol* در آنها بررسی شود. در میان ژن‌های *rol*، ژن *rolB* نقش حیاتی در بیماری‌زایی و تراریختی دارد، در حالی که سایر ژن‌های *rol* در القای ریشه‌های موئین نقش دارند (Bose et al., 2022). پلاسمید باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* استخراج و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به منظور تایید حضور این ژن انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به صورت زیر بود:

Forward ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA و Reverse TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC

چرخه‌ی PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر شامل واسرشت سازی اولیه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ٥ دقیقه)، واسرشت سازی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد (٣٥ چرخه به مدت ١ دقیقه)، اتصال در ٥٦ درجه سانتی‌گراد (به مدت ١ دقیقه)، گسترش در ٧٢ درجه سانتی‌گراد (به مدت ١ دقیقه) و تکثیر نهایی در ٧٢ درجه سانتی‌گراد (به مدت ٧ دقیقه) بود. جهت الکتروفورز محصولات PCR، ژل آگارز ٠/٩درصد با استفاده از بافر TAE تهیه شد. دستگاه الکتروفورز مدل RAD-BIO با ولتاژ ثابت ٨٥ به مدت ١/٥ ساعت استفاده شد. جهت مشاهده باندها از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ٠/٠١ درصد استفاده و برای ثبت نتایج توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار (١٠ ریزنمونه در هر تکرار) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با سه سطح (هیپوکوتیل، ساقه و برگ) و سویه باکتری با دو سطح (ATCC-15834 و A4) بودند. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار R نسخه‌ی ٤.٢.١ استفاده شد و گروه‌بندی میانگین‌ها با روش LSD انجام گرفت.

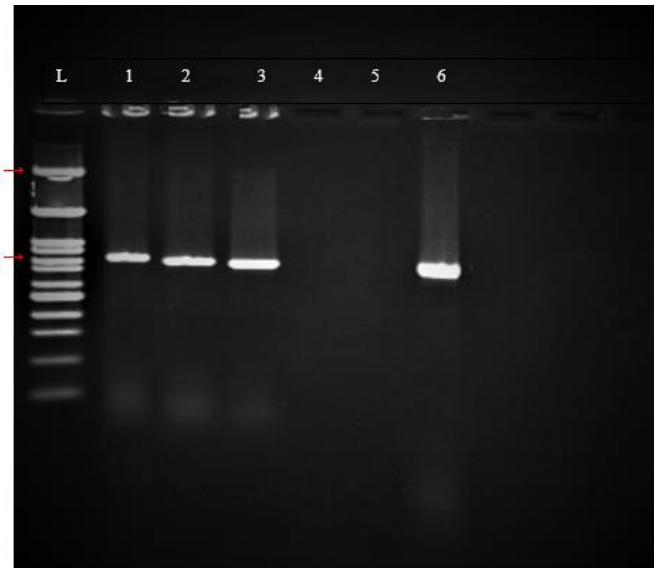
نتایج و بحث Results and Discussion

تایید تراریختی ریشه‌های موئین

در این مطالعه، نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به تکثیر قطعاتی با طول حدود ٧٨٠bp شده بود که تقریباً با باند کنترل مثبت (باکتری) هم اندازه بود، اما برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته نواری تکثیر نشد (شکل ١). بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین در گیاه دارویی بیلهر با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* تایید شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]



شکل ۱- تجزیه و تحلیل PCR قطعه ۷۸۰bp ژن *rolB* تهیه شده از شرکت سیناژن کرج. نوارهای ۱، ۲ و ۳ مربوط به سه نمونه از ریشه‌های مویین القا شده، نوارهای ٤ و ٥ به ترتیب مربوط به آب و ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ٦ مربوط به پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، نوار L مربوط به لدر ۱۰۰bp.

Figure 2. PCR analysis of the bp780 fragment of the *rolB* gene. Bands 1, 2, and 3 correspond to three samples from induced root hairs, bands 4 and 5 correspond to water and normal root (negative control), band 6 corresponds to the bacterial plasmid (positive control), and band L corresponds to the bp100 ladder.

محققان بر این عقیده‌اند که در میان ژن‌های *rol* موجود در *اگروباکتریوم ریزوژنز*، *rolB* نقش ضروری در القای ریشه مویین دارد در حالی که ژن‌های *rolC*، *rolA* و *rolD* در القای ریشه‌های مویین نقش جانبی دارند (Sujatha et al., 2013). ژن *rolB* برای القای ریشه موئین کاملاً ضروری بوده و حتی زمانی که این ژن به تنهایی بیان شود، می‌تواند تولید ریشه موئین قابل توجهی داشته باشد (Georgiev et al., 2007). بر اساس مطالعات انجام شده، توانایی بیوسنتز متابولیت‌های دارویی در ریشه‌های مویین با فراوانی نسخه‌های mRNA از *rolB* همبستگی دارد (Kiselev et al., 2007). با توجه به اینکه در ریشه‌ی طبیعی گیاه بیلهر که در محیط گلخانه حاصل شد، باندی از حضور ژن *rolB* در آزمایش PCR تکثیر نشد، در نتیجه *اگروباکتریوم رایزوژنز* در این گیاه وجود ندارد، یا ژن‌های *rol* که باعث ایجاد ریشه‌های مویین می‌شوند را به ژنوم گیاه منتقل نکرده است.

القای ریشه مویین

در مطالعه حاضر، دو سویه *اگروباکتریوم* رایزوژنز (ATCC-15834 و A4) برای القای ریشه‌های موئین در گیاه دارویی بیلهر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که در محل زخم و نزدیکی آن، ریشه‌های موئین ظاهر شدند (شکل ۲). در این مطالعه، ریشه‌های مویین القا شده توسط هر دو سویه باکتری دارای انشعابات زیاد و رشد سریع بودند و تفاوت مورفولوژیکی اندکی بین آن‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که در نمونه‌های شاهد، در محل زخم و نزدیکی آن، هیچ‌گونه ریشه‌ای ظاهر نشد و تنها در برخی از نمونه‌های شاهد، ریشه‌های کوچک به ندرت ظاهر شدند که پس از مدتی نکروزه و قهوه‌ای شده و از بین رفتند. به منظور مقایسه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی بیلهر، برخی خصوصیات این ریشه‌ها از جمله درصد القای ریشه موئین، وزن تر و خشک آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

پژوهشگران بر این باورند که وقتی یک سلول گیاهی زخمی می‌شود، ترکیبات فنلی آن به محیط اطراف منتشر می‌شوند و این ترکیبات توسط *اگروباکتریوم* دریافت و به سمت محل زخم جذب می‌گردند. همچنین، این ترکیبات می‌توانند بیان ژن‌های بیماریزا را در باکتری‌ها تحریک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

کنند که این موضوع در فرآیند تراریختی و انتقال ژن به سلول هدف بسیار مؤثر است. البته، پژوهشگران اذعان کردند که این قابلیت در بین ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بوده و پاسخ‌های متفاوتی به زخم نشان می‌دهند (Potrykus et al., 1990; Oksman-Caldentey and Hiltunen, 1996). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه دارویی *پریلا* انجام شد نتایج نشان داد که ترکیب تیماری سویه باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* ATCC-15834و ریزنمونه کوتیلدون بیشترین درصد القا، وزن تر و وزن خشک را ریشه‌های مویین ایجاد کرد (Mahmoudi et al., 2023). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه زنیان انجام شد، بهترین سویه‌ها برای القای ریشه مویین به ترتیب سویه‌های ATCC-15834 (۵۰ درصد) و A4 (۱۰ درصد) بودند (Moradi et al., 2022). در مطالعه‌ای که بر روی جنسینگ هندی (*Withania somnifera*) انجام شد حداکثر زیست توده ریشه-های مویین توسط سویه A4 مشاهده شد (Soltaninezhad et al., 2024). در گزارش ماجامدار و همکاران، مشخص شده است که در گونه *Bacopa monnieri*از خانواده بارهنگیان، ریشه‌های مویین تولید شده به واسطه باکتری *Agrobacterium rhizogenes*، پنج برابر بیشتر از گیاهان غیرتراریخت ساپونین تولید کردند. این یافته نشان‌دهنده تأثیر مثبت استفاده از این باکتری در افزایش تولید ترکیبات مفید در گیاهان دارویی است (Majumdar et al., 2011). پژوهشگران بر تأثیر عوامل مختلف، از جمله سویه باکتری و نوع ریزنمونه، بر القای ریشه مویین تأکید کرده‌اند. این عوامل به طور قابل توجهی بر روی فرآیند القای ریشه مویین تأثیر می‌گذارند و درک بهتر این برهمکنش‌ها می‌تواند به بهینه‌سازی روش‌های تولید ریشه‌های مویین کمک کند (Aziz Khajeh et al., 2018).

درصد القا ریشه مویین

نتایج نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بر روی درصد القای ریشه موئین معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاکی از آن بود که بیشترین درصد القای ریشه مویین در ترکیب تیماری ریز نمونه هیپوکوتیل و سویه ATCC-15834 و کمترین درصد مربوط به ترکیب تیماری ریز نمونه ساقه و سویه A4 مشاهده شد. بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر درصد القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در حالی که در برش‌دهی اثر متقابل که بین سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری است، نتایج نشان داد که بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر درصد القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤). در جدول تجزیه واریانس، اختلاف معناداری بین سویه باکتری و نوع ریزنمونه مشاهده شد (جدول شماره ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر متقابل سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی صفات اندازه گیری شده

Table 1. Mean comparison of the treatment combinations resulting from the interaction of bacterial strain and explant type on the measured traits

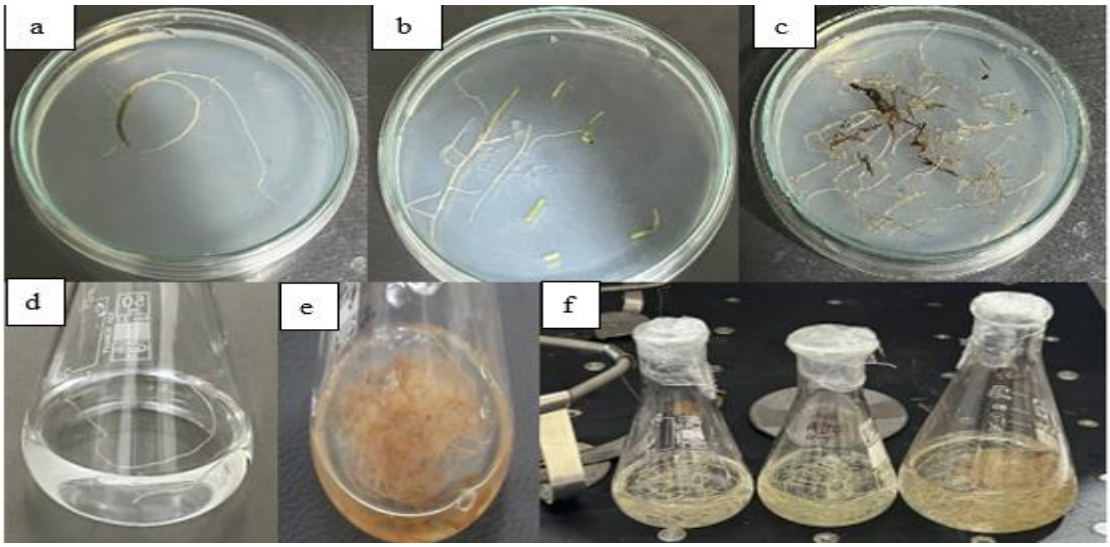
Treatment Combinations (Bacteria Strains*Explants)	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy roots	Dry weight of hairy roots
ATCC-15834*Hypocotyl	0.68 a	2.77 a	1.38 a
ATCC-15834*Stem	0/47 b	1.33 b	0.79 b
ATCC-15834*Leaf	0.25 c	0.85 c	0.30 c
A4*Hypocotyl	0.39 a	1.11 a	0.65 a
A4*Stem	0.21 b	0.91 b	0.40 b
A4*Leaf	0.27 b	1.05 b	0.49 b

حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Columns with at least one common letter are not significant at 0.05 probability levels by LSD test

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]



شکل ۲- مراحل رشد و توسعه ریشه‌های موئین در ترکیب تیماری ATCC-15834*Hypocotyl در گیاه دارویی بیلهر: ریشه‌های موئین در محیط MS جامد(a و b وc)، توسعه ریشه‌های موئین پس از گذشت ۳ روز از انتقال آن‌ها به ارلن حاوی محیط MS/2 مایع درون شیکر انکوباتور (d)، رشد و توسعه ریشه‌های موئین پس از گذشت ۲ ماه از انتقال آن‌ها به ارلن حاوی محیط MS/2 مایع درون شیکر انکوباتور(e و f).

Figure 2. Stages of growth and development of hairy roots in the ATCC-15834 Hypocotyl combination in the medicinal plant Bilahr: hairy roots in solid MS medium (a, b, and c), development of hairy roots after 3 days of transfer to Erlenmeyer flasks containing MS/2 liquid medium in an incubator shaker (d), growth and development of hairy roots after 2 months of transfer to Erlenmeyer flasks containing MS/2 liquid medium in an incubator shaker (e and f).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی درصد القای ریشه مویین

Table 2. Analysis of variance table for the effect of bacterial strain and type of explant on the percentage of hairy root induction

Sources of change	Degree of freedom	Variance	F
Bacterial strain	1	0.139	0.003145**
Explant	2	0.296	0.0007891**
Bacterial strain* explant	2	0.133	0.011394*
Test error	12	0.128	-

ns،* و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and ** non-significant, significant at 5 and 1 probability levels, respectively.

وزن تر و خشک ریشه مویین

نتایج نشان داد که وزن تر ریشه‌های موئین پس از دو ماه، به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. مقایسات میانگین حاکی از آن بود که که بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه از نظر وزن تر ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود داشته به طوری که بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین در ترکیب سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول ۱). بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن تر ریشه مویین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در حالی که در برش‌دهی اثر متقابل که بین سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری است، نتایج حاکی بر آن بود که بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن تر ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤). پژوهشگران معتقدند که اختلاف در میزان رشد ریشه‌های موئین و بیوماس آن‌ها مربوط به تنوع پلاسمیدهای وارد شده توسط سویه‌های مختلف باکتری است که به چگونگی تاثیر ژن‌های *rol* مربوط می‌شود. بیان این ژن‌ها سطح هورمون‌های اکسین و سیتوکینین گیاه میزبان و نیز میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطح هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهند (Tiwari et al., 2007). در آزمایشی که بر روی گیاه *Justicia*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

gendarussa انجام شد نتایج نشان داد که ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن تر ریشه مویین را دارد (Wahyuni et al., 2015).

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی وزن تر ریشه مویین

Table 3. Analysis of variance table for the effect of bacterial strain and type of explant on the fresh weight of hairy root

Sources of change	Degree of freedom	Variance	F
Bacterial strain	1	3.197	8.94e-06 **
Explant	2	2.091	1.08e-05 **
Bacterial strain* explant	2	1.185	0.000161 **
Test error	12	0.058	-

ns ،* و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and ** non-significant, significant at 5 and 1 probability levels, respectively.

وزن خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه، نیز به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. مشابه وزن تر ریشه مویین، از نظر وزن خشک نیز تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه مشاهده شد، به طوری که بیشترین میزان آن در ترکیب تیماری سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول ۱). بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن خشک ریشه مویین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در حالی که در برش‌دهی اثر متقابل که بین سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری است، نتایج دال بر آن بود که بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن خشک ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). بر خلاف ریشه‌های معمولی، ریشه‌های موئین به دلیل فقدان پلاستیدهای مختلف از جمله آمیلوپلاست، پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین‌گرایی) نشان داده و در قیاس با ریشه‌های معمولی انشعابات بیشتر، رشد سریع‌تر و بیوماس بیشتری داشته و در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توانند کشت شوند (Georgiev et al., 2007). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه یونجه انجام شد، نتایج نشان داد که وزن خشک ریشه‌های القا شده در ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به سایر ریزنمونه‌های ارزیابی شده بیشتر بود (Mirzaie Delbari et al., 2022). در این مطالعه، بهترین ریزنمونه و بهترین سویه *اگروباکتریوم رایزوژنز* برای القای ریشه مویین و در نهایت بایومس تولیدی، سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل می‌باشد. و لذا پیشنهاد می‌شود برای مطالعات بعدی در ریشه‌های مویین گیاه بیلهر، استفاده از این ترکیب تیماری برای رسیدن به حجم بالایی از ریشه موئین به خصوص در بیوراکتور مناسب می‌باشد.

جدول ٤- مقایسه میانگین حاصل ازبرش دهی اثر ریزنمونه در سطوح مختلف سویه باکتری بر روی صفات اندازه گیری شده

Table 4. The mean comparison obtained from the sliced explant effect at different levels of the bacterial strain for the measured traits.

Bacterial Strain	Explants	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy	Dry weight of hairy
ATCC-15834	Hypocotyl	0.68 a	2.77 a	1.38 a
	Stem	0/47 b	1.33 b	0.79 b
	Leaf	0.25 c	0.85 c	0.30 c
A4	Hypocotyl	0.39 a	1.11 a	0.65 a
	Stem	0.21 c	0.91 c	0.40 c
	Leaf	0.27 b	1.05 b	0.49 b

حداقل یک حرف مشترک در ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Columns with at least one common letter are not significant at 0.05 probability levels by LSD test

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی وزن خشک ریشه مویین

Table 5. Analysis of variance table for the effect of bacterial strain and type of explant on the dry weight of hairy roots.

Sources of change	Degree of freedom	Variance	F
Bacterial strain	1	1.5609	0.000510 **
Explant	2	1.2459	0.000334 **
Bacterial strain* explant	2	0.6297	0.004998 **
Test error	12	0.0684	-

ns،* و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and ** non-significant, significant at 5 and 1 probability levels, respectively.

نتیجه‌گیری کلی: در این مطالعه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی بیلهر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج دال بر آن بود که صفت‌های درصد القای ریشه مویین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل عوامل مورد بررسی بوده است. القا ریشه‌های مویین در ترکیب تیماری ریزنمونه هیپوکوتیل تلقیح شده با ATCC-15834 سریع‌تر از سایر ترکیبات تیماری مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه موئین در ترکیب تیماری سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است. نتایج برش‌دهی اثر متقابل سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری نشان داد که در سویه ATCC-15834 ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین را تولید کرده است. در حالی که در بین ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه A4 دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه مویین را تولید کرده که دال بر اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری است. ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* با به کارگیری واکنش PCR تایید شد در حالی که برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته نوار مربوطه تکثیر نشد. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که رشد و عملکرد ریشه‌های موئین متاثر از ریزنمونه و سویه باکتری است و در مطالعات آینده کشت ریشه‌های موئین گیاه دارویی بیلهر می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تولید سریع متابولیت‌های دارویی در آن تحت شرایط درون شیشه‌ای محسوب شود.

منابع

References

Ajani, Y., & Claβen–Bockhoff, R. (2021). The unique inflorescence structure of Dorema aucheri (Apiaceae): an adaptation to the arid environment. *Journal of Arid Environments*, *184*, 104-194. **doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104194**

Ahangarpour, A., Zamaneh, H. T., Jabari, A., Nia, H. M., & Heidari, H. (2014). Antidiabetic and hypolipidemic effects of Dorema aucheri hydroalcoholic leave extract in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes in male rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, *17*(10), 808.14 **doi.org/10.22038/ijbms.2014.1428 [In Persian]**

Akhavan Roofigar, A., Khazaei, Z., Asadi-Corom, F., & Jalili, A. (2023). Chromosome numbers and karyotype features of eight species of Apiaceae in Iran. *The Iranian Journal of Botany*, *29*(1), 73-77. **doi.org/10.22092/ijb.2023.362115.1408 [In Persian]**

Dorani, E., & Aharizad, S. (2018). Effects of Agrobacterium rhizogenes strains and explants on induction of hair root in Physalis alkekengi. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *7*(1), 33-40. **dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.1.2.1 [In Persian]**

Cheng, Y., Wang, X., Cao, L., Ji, J., Liu, T., & Duan, K. (2021). Highly efficient Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods*, *17*, 1-12. **doi.org/10.1186/s13007-021-00778-7**

Etebari, M., Sajjadi, S. E., Jafarian-Dehkordi, A., & Nazmakanipour, S. (2016). Genotoxicity evaluation of hydroalcoholic and aqueous extracts of Dorema aucheri by the comet assay. *Advanced biomedical research*, *27*(5), 199. **PMID: 28217637. doi.org/10.4103/2277-9175.194830**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]

Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied microbiology and biotechnology*, *74*, 1175-1185. **doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5**

Kubica, P., Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Miceli, N., Taviano, M. F., Maugeri, A., ... & Ekiert, H. (2020). Production of verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids in callus, suspension, and bioreactor cultures of Verbena officinalis and biological properties of biomass extracts. *Molecules*, *25*(23), 5609. **doi.org/10.3390/molecules25235609**

Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in Vitis amurensis transformed cells. *Journal of biotechnology*, *128*(3), 681-692. **doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.008**

Soltaninezhad, N., Sadat-Noori, S. A., Izady-Darbandi, A., Amini, F., & Mirjalili, M. H. (2023). Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using Agrobacterium rhizogenes. *Genetic* Engineering and Biosafety Journal, 12(2), 184-194. **dor: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8 [In Persian]**

Mahmoudi, M., Sadat-Noori, S.A., Ebrahimi, M., & Bahmankar, M. (2023). Optimization of induction of hairy roots in Perilla. Genetic Engineering and Biosafety Journal; 12 (1) : 17-27. **dor: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8**

Majumdar, S., Garai, S., & Jha, S. (2011). RETRACTED ARTICLE: 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. **doi:10.1007/s00299-011-1035-9**

Mirzaie Delbari, E., Vatandoost, J., Jami Moeini, M., & Kohan-Baghkheirati, E. (2022). Effect of Agrobacterium rhizogenes Strains on Hairy Root Induction in Different Explants of Alfalfa. *Applied Biology*, *35*(3), 127-142. **Doi: 10.22051/JAB.2021.34309.1398**

Moradi, N., Sadat Noori, S. A., Fadavi, A., Mortazavian, S. M. M., & Pakdin Parizi, A. (2021). Analysis efficiency of Iranian Ajowan ecotypes on hairy root production mediated by different Agrobacterium rhizogenesis strains. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *10*(1), 117-127. **doi: 10.30479/IJGPB.2022.17488.1325.**

Oksman-Caldentey, K. M., & Hiltunen, R. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field crops research*, *45*(1-3), 57-69. **doi: 10.1016/0378-4290(95)00059-3**

Paolis, A. D., Frugis, G., Giannino, D., Iannelli, M. A., Mele, G., Rugini, E., ... & Caretto, S. (2019). Plant cellular and molecular biotechnology: following Mariotti's steps. *Plants*, 8(1), 18. **doi: 10.3390/plants8010018**

Potrykus, I. (1990). Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, *79*(1), 125-134. **doi.org/10.1111/j.1399-3054. 1990.tb 04573.x**

Stepanova, A. Y., Malunova, M. V., Gladkov, E. A., Evsyukov, S. V., Tereshonok, D. V., & Solov'eva, A. I. (2022). Collection of hairy roots as a basis for fundamental and applied research. *Molecules*, *27*(22), 8040. **doi.org/10.3390/molecules27228040**

Soltaninezhad, N., Sadat-Noori, S. A., Izady-Darbandi, A., Amini, F., & Mirjalili, M. H. (2023). Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using Agrobacterium rhizogenes. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *12*(2), 184-194. **dx.doi.org/10.61186/gebsj.12.2.184 [In Persian]**

Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Ćalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. (2013). High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation in Artemisia vulgaris: hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, *44*, 643-652. **doi: 10.1016/j.indcrop.2012.09.007**

Tiwari, R. K., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G. Q., & Zheng, G. C. (2007). Genetic transformation of Gentiana macrophylla with Agrobacterium rhizogenes: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, *26*(2), 199-210. **doi: 10.1007/s00299-006-0236-0**

Wahyuni, D. K., Vidianti, F., Purnobasuki, H., Ermayanti, T. M., Prajoga, B., & Utami, E. S. W. (2015). Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in Justicia gendarussa Burm. *f. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, *5*(4), 87-93. **doi:10.1186/s13007-021-00778-7**

Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of Dorema aucheri (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, *6*(1), 58-64. **doi: 10.22037/jps-v6i1.37295 [In Persian]**

Zibaee, E., Amiri, M. S., Boghrati, Z., Farhadi, F., Ramezani, M., Emami, S. A., & Sahebkar, A. (2020). Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Dorema species (Apiaceae): A review. *Journal of Pharmacopuncture*, *23*(3), 91-123. **doi: 10.3831/KPI.2020.23.3.91**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-09]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.2]