

تولید ریشه‌های موئین در کاسنی با هدف افزایش متابولیت‌های ثانویه

Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production

رقیه فتحی، مهدی محب‌الدینی* و اسماعیل چمنی

Roghayeh Fathi, Mehdi Mohebodini*, Esmaeil Chamani

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohebodini@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۵)

چکیده

واژه‌های کلیدی

ژن *rolB*

سن ریزنمونه،

متابولیت ثانویه،

نفتالین استیک اسید،

ریشه‌های موئین

کشت ریشه‌های موئین روش موثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشد زیرا ریشه‌های موئین از پایداری ژنتیکی و بیولوژیکی برخوردارند و قادر به تولید متابولیت‌ها در زمان کوتاه و بدون نیاز به هورمون می‌باشند. کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. گیاهان دارویی ارزشمند بوده و شامل ترکیبات دارویی مهمی می‌باشد. در این تحقیق، القای ریشه‌های موئین توسط *Agrobacterium rhizogenes* سویه ATCC11325 انجام شد. در آزمایش اول تاثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر کارایی القای ریشه‌های موئین بررسی شد. در آزمایش دوم تاثیر لاین‌های مختلف ریشه‌های موئین بر میزان رشد ریشه‌ها بررسی شد. در آزمایش سوم تاثیر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (۱/۵ و ۰/۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز (۶ و ۵ و ۴ و ۳ درصد) بر میزان تجمع زیست‌توده بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های موئین (۷۵/۵۵ درصد) و تعداد ریشه (۷/۲۶ ریشه در هر ریزنمونه) مربوط به ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه است. همچنین معلوم شد که ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۳ و ۴ درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش وزن تر، خشک و شاخص رشد داشت. بیشترین محتوای فنول کل و همچنین فلاونوئید در طول موج ۲۷۰ نانومتر، در ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۴ درصد ساکارز مشاهده شد در حالی که بیشترین میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر، در ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۵ درصد ساکارز به دست آمد.

مقدمه

کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. و از تیره *Asteraceae* می باشد که بسته به مناطق مختلف، به صورت یکساله، دوساله و چندساله رشد می کند. تقریباً تمام قسمت های این گیاه مورد استفاده قرار می گیرد (Vahabinia et al., 2019). برگ کاسنی شامل ترکیب های شیکورین، سولفات و فسفات های سدیم، منیزیم، پتاسیم و نترات پتاسیم است. بعلاوه ریشه کاسنی دارای ۱۵-۱۱ درصد اینولین، قندهای مختلف از قبیل گلوکز، فروکتوز و ساکارز، شیکورین، پکتین، لوولین، سسکویی ترپن لاکتون (Cova et al., 2019)، اسید تارتاریک، ویتامین و ترکیبات فنولی می باشد (Jayswal et al., 2011). گل های کاسنی حاوی ماده شیکورین می باشد (Velayutam et al., 2006). از ریشه این گیاه در درمان بیماری های کبدی و صفراوی استفاده می شود (Yang, 2009). شیکوریک اسید به دلیل توانایی در مهار آنزیم HIV integrase فعالیت ضد ویروس HIV دارد (et al., 2019). ترکیب برگ و ریشه برای تقویت بنیه و تصفیه خون به ویژه در بیماری های عفونی استفاده می شود (Velayutam et al., 2006). ترکیبات فنولی موجود در کاسنی از جمله هیدروکسی سینامیک اسید، شیکوریک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کافتاریک اسید، آپیژنین، کوئرستین، بنزوئیک اسید، فلاونول، آنتوسیانین و گالیک اسید به عنوان آنتی اکسیدان های قوی عمل می کنند (Carazzone et al., 2009; Heimler et al., 2013).

یکی از روش های مؤثر برای افزایش تولید متابولیت ثانویه در سیستم کشت بافت و تراریخته نمودن گونه های گیاهی، استفاده از سیستم ناقل آگروباکتریوم رایزوزن می باشد (Nigutova et al., 2019). این باکتری جزو باکتری های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه ای و گاهی گیاهان تک لپه ای را آلوده می کند (Zafar et al., 2019) و منجر به تشکیل ریشه های موین می شود. سلول های ریشه های موین حامل قطعه ی T-DNA پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته ای خود می باشند (Hakkinen and Oksman-

Caldentey, 2018). عوامل متعددی در فرآیند تراریخت کردن گیاهان با آگروباکتریوم رایزوزن مؤثر است. این عوامل شامل ژنوتیپ گیاه، شرایط تلقیح، نوع و سن ریزنمونه ی گیاهی، نوع و ترکیبات محیط کشت می باشند (Gelvin, 2000). ریشه های موین توانایی بی نظیری در رشد در شرایط درون شیشه ای در غیاب تنظیم کننده های رشد گیاهی را دارند (Ramachandra & Ravishancar, 2007). از این ویژگی های رشدی می توان برای تولید متابولیت های ثانویه گیاهی و بررسی نقش ژن ها استفاده کرد (Parr, 2016). در تحقیقی میزان رشد و تولید متابولیت ثانویه در ریشه های موین حاصل از سویه LMG 150 آگروباکتریوم رایزوزن در گیاه کاسنی بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که این تیمار باعث افزایش ۱/۵۷ برابری رشد ریشه تراریخت نسبت به ریشه غیر تراریخت می شود. همچنین تولید متابولیت ثانویه ۴/۰۶ برابر ریشه غیر تراریخت گزارش شد (Bais et al., 2000). همچنین در مطالعه دیگری تأثیر تنظیم کننده های رشد را بر روی رشد و تولید متابولیت ثانویه ریشه های موین کاسنی بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که جیبرلین در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بهترین تنظیم کننده برای افزایش رشد ریشه ها و متابولیت ثانویه است (Bais et al., 2001). برای تعیین بهترین سویه ی آگروباکتریوم رایزوزن به منظور ایجاد ریشه موین در گیاه کاسنی و بهینه سازی محیط کشت، ریزنمونه ی کوتیلدون با سویه های A4، A13 و ATCC15834 آگروباکتریوم رایزوزن تلقیح شد. همچنین از سه نوع محیط کشت مختلف MS، LS و B5 به عنوان محیط هم کشتی استفاده کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که آگروباکتریوم قادر به القای ریشه موین بوده و در بین محیط های کشت مختلف، MS بالاترین کارایی را در رشد ریشه ها نشان داد. همچنین میزان ترکیبات فنولی در کلون های القاء شده توسط سویه های A4 و A13 افزایش معنی داری نسبت به شاهد داشته اند. اما در ریشه های القاء شده توسط سویه ATCC15834 کاهش ترکیبات فنولی مشاهده شد (Kabirnotaj et al., 2012). نتایج پژوهش های اخیر نشان داده است که استفاده از الیستورها می تواند نقش مؤثری در افزایش رشد ریشه های موین و تولید متابولیت های ثانویه داشته باشد (Park et al., 2017). الیستورهای هورمونی از جمله NAA و متیل جاسمونات در

مواد و روش ها

منبع گیاهی مورد استفاده: بذر گیاه کاسنی از شرکت پاکان اصفهان تهیه شد. برای استریل کردن بذرها از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۲ و سپس ۱۰ دقیقه و نهایتاً الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه استفاده شد. بعد از هر تیمار شستشو با آب استریل انجام گرفت. سپس بذرها در محیط کشت MS Murashige & Skoog (1962) کشت شده و در تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

القای ریشه های موین: به منظور القای ریشه های موین، از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه ATCC11325 و ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل در دو سن ۵ و ۱۲ روزه استفاده شد. تهیه ی سوسپانسیون باکتری به شرح زیر انجام شد. یک کلونی از باکتری در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین، کشت گردید. کشت باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد و با چرخش ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و سپس از سوسپانسیون حاصل به طور مستقیم برای تلقیح ریزنمونه ها استفاده شد. میزان OD₆₀₀ سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB، ۰/۶ در نظر گرفته شد. ریزنمونه ها پس از ایجاد زخم سطحی توسط اسکالپل، در شرایط استریل در محیط کشت LB حاوی سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شده و تکان داده شدند. ریزنمونه های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS جامد، کشت و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه های تلقیح نشده نیز به عنوان شاهد در شرایط مشابه با تیمارها کشت گردیدند. پس از سپری شدن مدت هم کشتی، ریز نمونه ها در آب استریل حاوی ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک شدن نسبی در روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی انتقال داده شدند. واکشت ریزنمونه ها هر هفته انجام

محیط کشت مایع باعث افزایش تولید زیست توده و ترکیبات دارویی ریشه های موین شده اند (Linh et al., 2019). در پژوهشی تاثیر اکسین ها به عنوان محرک رشد ریشه های موین گیاه کاسنی، مثبت و موثر ارزیابی شده و توانایی جذب هورمون توسط ریشه های موین تراریخت بیشتر از ریشه های غیر تراریخت گزارش شد (Fathi et al., 2018). در آزمایشی تاثیر تنظیم کننده های رشد را بر روی رشد ریشه های موین بررسی کرده و گزارش کردند که نفتالین استیک اسید (NAA) بیشترین تاثیر را در رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه های موین گیاه *Plumbago indica* نسبت به جیبرلیک اسید (GA₃)، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) داشته است (Gangopadhyay et al., 2011). به منظور تولید بیشینه ماده ی جنتیوپیکروساید (gentiopicroside) در ریشه های موین گیاه *Gentiana scabra* از انواع اکسین ها استفاده شد و نتایج پژوهش نشان داد بیشترین میزان این متابولیت در اثر افزودن یک میلی گرم در لیتر NAA به محیط کشت مایع حاصل شد (Huang et al., 2014). تاثیر غلظت ساکارز در بهینه سازی کشت ریشه های موین نیز توسط برخی پژوهشگران به اثبات رسیده است از جمله تولید زیست توده و تولید ساپونین در ریشه های موین گیاه *Talinum paniculatum* Gaertn در اثر استفاده از محیط کشت حاوی ۵ درصد ساکارز تایید شد (Manuhara et al., 2015). اما تا به حال پژوهشی با هدف بررسی تاثیر سن ریزنمونه و مدت هم کشتی در القای ریشه های موین توسط سویه ATCC11325 آگروباکتریوم رایزوزنز و بررسی تاثیر الیسیستور هورمونی و غلظت های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه انجام نشده است، به همین خاطر هدف از پژوهش حاضر بهینه سازی القای ریشه های موین با استفاده از سویه ATCC11325 آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه کاسنی، انتخاب لاین برتر ریشه های موین براساس میزان رشد ریشه ها و سپس بررسی تاثیر هورمون NAA و غلظت های مختلف ساکارز بر میزان تولید زیست توده و متابولیت های ثانویه می باشد.

تأثیر غلظت های مختلف NAA و منبع کربن بر روی رشد ریشه های موین و متابولیت های ثانویه: در این آزمایش ریشه های لاین C به دست آمده از کوتیلدون های ۵ روزه به دلیل اینکه بیشترین میزان رشد را داشتند، ۷ هفته پس از تلقیح، به عنوان ماده آزمایشی استفاده شدند. نوک ریشه ها به قطعاتی به طول دو سانتی متر برش داده شدند زیرا قطعات کوچک تر ریشه، هوادهی بهتری در شیکر داشته و رشد بیشتری خواهند داشت. در هر تکرار ۵۰ میلی گرم ریشه در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت MS مایع در ظروف شیشه مربا کشت شد. هورمون NAA در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و ساکارز به عنوان منبع کربن برای رشد ریشه های موین در چهار غلظت (۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت، شیشه ها در شیکر با دور rpm ۱۰۰ نگهداری شدند. بعد از چهار هفته، وزن تر و خشک ریشه ها اندازه گیری شد و شاخص رشد محاسبه گردید همچنین میزان فنول کل و فلاونوئید موجود در ریشه ها اندازه گیری شد.

محتوای ترکیبات فنولی کل ریشه های موین و ریشه های غیرتراریخت با استفاده از روش فولین- سیوکالتیو (Sonald & Laima, 2001) اندازه گیری شد. ۰/۰۱ گرم از بافت های خشک شدهی ریشه ها را که پودر شده، با ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۰۰ و دمای ۲۵ درجهی سانتی گراد در تاریکی نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، ۰/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی حاصل اضافه شده و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد سپس شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت فنول کل، با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید (شکل ۳-۱). اندازه گیری میزان فنول کل با سه تکرار انجام شد. میزان فلاونوئید ریشه های موین با استفاده از روش Krizek et al. (1998) اندازه گیری شد. برای این منظور، ۲ گرم بافت ریشه خشک شده، در هاون به همراه ۳

شد و هر بار غلظت سفوتاکسیم به نصف کاهش داده شد و در نهایت از محیط کشت حذف شد. پس از گذشت چهار هفته از ظهور ریشه ها، درصد القای ریشه موین، میانگین تعداد و طول ریشه ها و تعداد انشعابات ریشه اصلی محاسبه گردید.

تأیید مولکولی ریشه های موین: در تشخیص ریشه های موین از ریشه های نابجا علاوه بر استفاده از صفات مورفولوژیکی ریشه ها (از جمله زمان القاء، محل خروج ریشه، تعداد ریشه و میزان رشد ریشه ها)، از طریق تأیید مولکولی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد. استخراج DNA به روش CTAB (Khan et al., 2007) از ریشه های موین و ریشه های نابجای حاصل از ریزنمونه های تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) انجام شد. پلاسمید اگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC11325 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر، با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA استخراج شده انجام شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCTTCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCTTCTGGTTTACTGCAGCA-3' (آغازگر معکوس). برنامه ی RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجهی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجهی سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجهی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجهی سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهی سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

انتخاب لاین برتر ریشه های موین: برای انتخاب بهترین لاین ریشه های موین، لاین های مختلف حاصل از ریزنمونه ها، در ظروف جداگانه در محیط کشت MS مایع حاوی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم، در ظروف شیشه مربا کشت شدند سپس در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۲۰ و دمای ۲۶ درجهی سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند پس از سه هفته، لاینی از ریشه موین که بیشترین رشد (افزایش وزن تر) را داشت با استفاده از توزین ریشه ها انتخاب شد.

میانگین ۷/۲۶ عدد ریشه (جدول ۲) و ۷۲ ساعت هم‌کشتی با میانگین ۵/۹۵ عدد ریشه در هر ریزنمونه بیشترین تأثیر را در افزایش تعداد ریشه داشتند (جدول ۳). نتایج نشان داد که در بین ریزنمونه‌های مختلف، بیشترین میانگین طول (۷/۶۶ سانتی‌متر) و انشعاب ریشه (۱۰/۴۱) در ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه و در بین مدت زمان‌های هم‌کشتی مختلف، بیشترین میانگین طول (۷/۹۶ سانتی‌متر) و انشعاب ریشه (۸/۷۶) در تیمار ۷۲ ساعت هم‌کشتی مشاهده شد.

تأثیر اگروباتریوم ریزوژنز بر القای ریشه‌های موین علاوه بر سویه باکتری، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه، به نوع گیاه و مدت زمان هم‌کشتی گیاه با اگروباتریوم نیز بستگی دارد (Samadi et al. 2012). درصد القای ریشه‌های موین در ریزنمونه‌های با سن پایین‌تر بیشتر بود به‌طوری‌که در کوتیلدون‌های ۵ روزه ۷۵/۵۵ درصد اما در کوتیلدون‌های ۱۲ روزه ۳۵/۵۴ درصد مشاهده شد. مطابق با این نتایج، در گیاه *Gmelina arborea* Roxb. نیز درصد القای ریشه‌های موین در کوتیلدون ۵ روزه تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از کوتیلدون ۲۵ روزه گزارش شده است (Dhakulkar et al. 2005). از نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که ریزنمونه‌ی کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیل از توان تولید ریشه‌های موین بیشتری برخوردار است. لذا می‌توان گفت بسته به گونه‌ی گیاهی، نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های موین تأثیرگذار است. سن ریزنمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه موین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین‌کننده‌ی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است (Kabirmotaj et al. 2012). در تحقیق حاضر زمان القای ریشه‌های موین بسته به سن ریزنمونه‌ها متفاوت بود، در ریزنمونه‌های با سن ۵ روزه در کوتاه‌ترین زمان (پس از ۷ روز) ریشه‌ها در هر دو نوع ریزنمونه ظاهر شدند ولی در ریزنمونه‌های با سنین بالاتر ریشه‌های موین دیرتر (۱۵-۱۰ روز بعد از تلقیح) القاء شدند. هرچه تعداد روزهای لازم جهت ظهور ریشه‌های موین کمتر باشد از نظر صرفه‌جویی در وقت بسیار مطلوب می‌باشد (Weber et al, 2011). تأثیر نوع ریزنمونه در زمان القای ریشه موین در گیاهان دارویی دیگر نیز گزارش شده است، به‌عنوان مثال در ریزنمونه‌های برگ‌ی خرفه (Pirian and Piri, 2012) و گیاه کولوس (Coleus

میلی‌لیتر اتانول اسیدی کوبیده شد. مخلوط حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سرد شدن محلول حاصل، شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد و از فرمول ضریب خاموشی برای تعیین میزان فلاونوئید استفاده شد. اندازه‌گیری میزان فلاونوئید با سه تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تمام آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

تأثیر نوع ریزنمونه و مدت زمان هم‌کشتی بر القای ریشه‌های موین

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه و مدت زمان هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های موین و میانگین تعداد، طول و انشعاب ریشه معنی‌دار نبوده اما اثرات اصلی نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های موین در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که در بین ریزنمونه‌های مختلف، ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه با ۷۵/۵۵ درصد القای ریشه‌های موین پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی، بیشترین توانایی را در تولید ریشه‌های موین داشته‌اند و کمترین درصد القای ریشه‌های موین (۱۳/۳۳ درصد) در هیپوکوتیل ۱۲ روزه پس از ۲۴ ساعت هم‌کشتی بدست آمد (شکل ۱). از بین مدت زمان‌های هم‌کشتی، ۷۲ ساعت هم‌کشتی بیشترین (۴۸/۳۳ درصد)، و ۲۴ ساعت هم‌کشتی کمترین تأثیر (۲۱/۶۶) را در افزایش درصد القای ریشه‌های موین را داشته‌اند (شکل ۲). از لحاظ تعداد ریشه‌های موین، ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه با

forskohlii Briq) بهتر از سایر ریزنمونه‌ها القای ریشه‌های موین اتفاق افتاد (Reddy et al. 2012). شی و کنتزیوس (2003) تأثیر معنی‌دار نوع ریزنمونه‌های مختلف را در القای ریشه‌های موین در گیاه *Pueraria phaseoloides* گزارش کرده و ریزنمونه‌ی کوتیلدون را بهترین نوع ریزنمونه برای تولید ریشه موین دانستند. تراریخت‌سازی توسط آگروباکتریوم رایزوزنز از طریق انتقال و درج ناحیه‌ی T-DNA پلاسمید باکتری در داخل گیاه میزبان می‌باشد بنابراین مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، از عوامل مهم در تعیین درصد تراریختی می‌باشد. در این تحقیق از بین سه مدت زمان هم‌کشتی مختلف، بیشترین درصد القای ریشه‌های موین در ۷۲ ساعت هم‌کشتی حاصل شد که مطابق با کار پژوهشگران قبلی بود (Kodjo et al. 2013). Moradi et al.

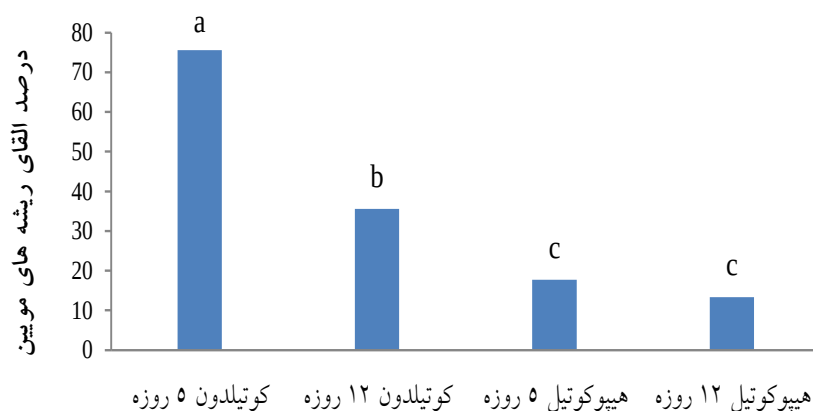
(2019) نیز از بین سه زمان هم‌کشتی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، بیشترین میزان تراریختی را در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی مشاهده کردند. آن‌ها همچنین تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری (۰/۶، ۰/۹، ۱/۲ و ۱/۵) و غلظت‌های مختلف ساکارز (۰، ۳ و ۶ درصد) را در بهینه‌سازی القای ریشه‌های موین در سیر (*Allium sativum*) بررسی کرده و بیشترین تأثیر را متعلق به غلظت ۰/۶ و ۰/۹ باکتری و ۶ درصد ساکارز دانستند. نتایج پژوهش Faizal (2019) and Sari نشان‌دادند که از بین مدت‌های مختلفی (۵، ۱۰ و ۲۰ روز) که ریشه‌ها در معرض هورمون‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید قرار گرفتند، متیل جاسمونات و ۱۵ روز در معرض‌گذاری باعث افزایش ۱/۵ برابری ساپونین‌ها در ریشه‌های موین گیاه *Talinum paniculatum* Gaertn شدند.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه و مدت زمان‌های هم‌کشتی مختلف بر القای ریشه‌های موین

Table 1- Analysis of variance for the effect of explant type and co-culture time on hairy roots induction

درجه آزادی	منابع تغییرات	میانگین مربعات		
		درصد القای ریشه	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه (سانتی‌متر)
انواع ریزنمونه	اصلی	۷۲۲۹/۶۳**	۶۹/۰۲**	۳۳/۷۱**
مدت هم‌کشتی	۱۰۹/۴۲**	۲۱۴۴/۴۴**	۵۶/۳۷**	۷۳/۶۱**
مدت هم‌کشتی × نوع ریزنمونه	۰/۹۸ ^{ns}	۱۲۹/۶۳ ^{ns}	۲/۵۰ ^{ns}	۱/۴۹ ^{ns}
اشتباه آزمایشی	۶/۹۶	۱۵۵/۵۵	۱/۵۱	۳/۹۵
ضرب تغییرات	۱۶/۳۶	۸/۶۳	۱۳/۲۸	۲۲/۸۶

ns and **: non-significant and significant at 1 probability levels, respectively/۱. به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح ۱



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه بر درصد القای ریشه‌های موین

Figure 1- Mean comparisons of the effects of explants type on hairy root induction



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان هم کشتی بر درصد القای ریشه های موین
Figure 2- Mean comparisons of the effects of co-culture time on hairy root induction

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر ریزنمونه بر روی صفات ریشه های موین

Table 2- Mean comparisons of the effects of explant on hairy root characteristics

ریزنمونه	درصد القای ریشه موین	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	انشعاب ریشه
کوتیلدون ۵ روزه	۷۵/۵۵ ^a	۷/۲۶ ^a	۷/۶۶ ^a	۱۰/۴۱ ^a
کوتیلدون ۱۲ روزه	۳۵/۵۵ ^b	۴/۷۵ ^b	۶/۱۲ ^{ab}	۹/۵۹ ^a
هیپوکوتیل ۵ روزه	۱۷/۷۶ ^c	۱/۶۶ ^c	۳/۲۵ ^c	۳/۴۲ ^b
هیپوکوتیل ۱۲ روزه	۱۳/۳۳ ^c	۱/۴۴ ^c	۴/۴۰ ^{bc}	۴/۶۸ ^b

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند

.Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان هم کشتی بر روی صفات ریشه های موین

Table 3- Mean comparisons of the effects of co-culture time on hairy root characteristics

مدت زمان هم کشتی (ساعت)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	انشعاب ریشه
۲۴	۳/۲۶ ^b	۳/۰۲ ^c	۴/۳۷ ^b
۴۸	۳/۷۵ ^{ab}	۵/۰۹ ^b	۷/۹۴ ^a
۷۲	۵/۹۵ ^a	۷/۹۶ ^a	۸/۷۶ ^a

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند

.Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

انتخاب لاین برتر ریشه های موین حاصل از انواع ریزنمونه

انتخاب بهترین لاین های ریشه های موین با استفاده از توزین ریشه ها انتخاب شد. نتایج حاصل از تجزیه ی واریانس داده ها نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه ی تولید کننده ی ریشه و انواع لاین بر وزن تر ریشه های موین در سطح ۱ درصد معنی دار

می باشد (جدول ۴). مقایسه ی میانگین داده ها نشان داد که بیشترین وزن تر (۰/۴۲ گرم در فلاسک) در ریشه های حاصل از کوتیلدون ۵ روزه و لاین C بوده و کمترین وزن تر (۰/۰۵ گرم در فلاسک) در ریشه های حاصل از کوتیلدون و لاین B بدست آمد (شکل ۳). انتقال و درج ناحیه ی T-DNA در سلول های گیاه

اما برخی دیگر از لاین ها رشد طولی کمتر اما انشعاب دهی زیادی داشتند برخی دیگر نیز رشد کمتر داشته و پوشش کالوسی پیدا کردند. همچنین در تحقیقی برای بررسی توان رشدی لاین های مختلف ریشه های موین حاصل از گیاه *Gentiana scabra*، ۲۴ لاین مختلف در محیط کشت مایع کشت شده بود و پس از ۸ هفته میزان وزن خشک لاین های مختلف تفاوت چشم گیری با یکدیگر داشتند به طوری که وزن خشک لاین پنج به میزان ۴۴ برابر افزایش یافت در حالی که لاین ۱۸ فقط به میزان تقریباً دو برابر افزایش نشان داده بود (Huang et al. 2014).

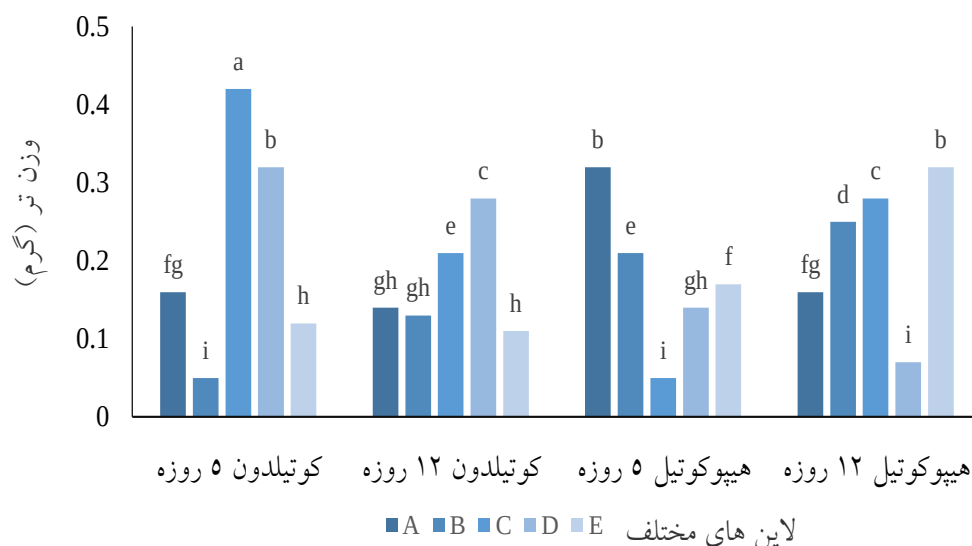
میزبان به صورت تصادفی اتفاق می افتد لذا تنوع رشدی و مورفولوژی زیادی بین هر لاین ریشه های موین که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده اند مشاهده می شود. در واقع تنوع در تعداد نسخه های درج شده از T-DNA و میزان بیان ژن های موجود در آن از جمله ژن *rolB* نقش بسزایی در تنوع رشدی لاین های مختلف ریشه های موین دارد (Fang et al., 2016). در این پژوهش، فنوتیپ رشدی لاین های تراریخت که به طور جداگانه در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۲۵۰ mg/l سفوتاکسیم کشت شده بودند تنوع مشهودی را در میزان رشد نشان دادند. برخی از لاین ها رشد طولی زیادی از خود نشان دادند

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه و لاین های ریشه های موین بر وزن تر ریشه ها

Table 4- Analysis of variance for the effect of different explant type and hairy root lines on fresh weight of roots

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
میانگین وزن تر		
۰/۰۰۴**	۳	نوع ریزنمونه
۰/۰۰۸**	۴	لاین های مختلف
۰/۰۴۸**	۱۲	نوع ریزنمونه × لاین های مختلف
۰/۰۰۰۲	۴۰	اشتباه آزمایشی
۷/۰۷		ضرب تغییرات

**: معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ** Significant at 1% probability levels



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه بر روی وزن تر لاین های ریشه های موین

Figure 3- Mean comparisons of the effects of explant on fresh weight of hairy roots lines

Plumbago indica نسبت به اکسین های دیگر داشته است (Gangopadhyay et al., 2010). همچنین در پژوهشی، انواعی از الیستورهای زیستی و غیر زیستی از جمله اکسین، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات، نیترات نقره و عصاره ی مخمر در میزان رشد ریشه های موین گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) بررسی شده و بیشترین تاثیر را در تیمار عصاره ی مخمر و اکسین مشاهده شد (Siahmansour et al., 2018). استفاده از منبع کربن مناسب در رشد و تولید متابولیت ثانویه در گیاه حائز اهمیت است. ساکارز به عنوان منبع کربن نقش بسزایی در رشد و افزایش انشعابات ریشه و تولید متابولیت ثانویه دارد (Malamy & Ryan, 2001). در سال های اخیر کشت ریشه های موین به منظور تولید متابولیت های با ارزش در تعدادی از گونه های گیاهان دارویی در مقیاس تجاری صورت گرفته است (Srivastava & Srivastava, 2007). میزان تولید ترکیبات ثانویه در ریشه های موین بالاتر از ریشه های طبیعی یا سایر بافت ها می باشد بنابراین ریشه های موین یک ابزار قدرتمند جهت انجام تحقیقات به منظور بالا بردن میزان تولید متابولیت های ثانویه و حتی آنزیم های آنتی اکسیدانی محسوب می شوند (Bulgakov et al. 2012).

بررسی تاثیر غلظت های مختلف NAA و منبع کربن بر رشد و مقدار متابولیت های ثانویه ی ریشه های موین

برطبق نتایج به دست آمده، اثر متقابل NAA و غلظت های مختلف ساکارز بر وزن تر و خشک، شاخص رشدی، فنول کل و فلاونوئید ریشه های موین معنی دار شد (جدول ۵). نتایج حاصل از مقایسه ی میانگین داده ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۱/۴ و ۰/۱۰۷ گرم در فلاسک) و بیشترین شاخص رشد (۲۱/۴۲) در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز به دست آمد (جدول ۶، شکل ۴). نتایج نشان داد که ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۴ درصد ساکارز بیشترین تاثیر را در افزایش محتوای فنول کل (۶/۷۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک ریشه) و فلاونوئید (۷۵/۰۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در طول موج ۲۷۰ نانومتر داشت. همچنین تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۵ درصد ساکارز بیشترین تاثیر را در افزایش فلاونوئید (به ترتیب ۹۷/۹۲ و ۱۱۱/۶۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر نشان داد (جدول ۷).

مطابق با نتایج حاصل، غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA بیشترین تاثیر را در تجمع زیست توده و تولید متابولیت ثانویه را در گیاه

جدول ۵- تجزیه واریانس تاثیر NAA و ساکارز بر روی صفات ریشه های موین

Table 5- Analysis of variance for the effects of NAA and sucrose on hairy root characteristics

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییرات
فلاونوئید	فلاونوئید	فلاونوئید	فنول	شاخص رشدی	میانگین وزن خشک	میانگین وزن تر		
۳۳۰ نانومتر	۳۰۰ نانومتر	۲۷۰ نانومتر						
۱۸۸۹/۵۶**	۱۸۹۰/۵۸**	۷۲۰/۶۷**	۱۴/۶۳**	۴۵/۵۱**	۰/۰۰۱**	۰/۲۵۶**	۳	NAA
۱۸۶۱/۰۱*	۱۹۸۲/۰۴**	۱۱۱۵/۲۶*	۳/۵۱**	۸۳/۹۲**	۰/۰۰۲**	۰/۳۲۲**	۳	ساکارز
۵۱۹/۸۵*	۴۰۵/۷۶*	۳۲۲/۱۶*	۰/۸۱**	۲۴۱/۸۱**	۰/۰۰۶**	۰/۶۹۹**	۹	NAA × ساکارز
۳۷۶/۲۶	۲۱۶/۶۶	۱۱۰/۰۷	۰/۲۵	۵/۸۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۱	۳۲	اشتباه آزمایشی

*, **: معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱٪

*, **: Significant at 5 and 1% probability levels

جدول ۶- مقایسه میانگین تأثیر NAA و ساکارز بر روی رشد ریشه های موین

Table 6- Mean comparisons of the effects of NAA and sucrose on hairy roots growth

هورمون (mg l ⁻¹) + ساکارز	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	شاخص رشد
(درصد)			
NAA ۳ + ۰	۰/۱ hi	۰/۰۰۸ fg	۰/۷۴ fg
NAA ۴ + ۰	۰/۵۸ ef	۰/۰۴۹ bc	۹/۲۷ bc
NAA ۵ + ۰	۰/۲۵ gh	۰/۰۲۳ efg	۳/۱۶ efg
NAA ۶ + ۰	۱ cd	۰/۰۹۹ a	۱۹/۶۹ a
NAA ۳ + ۰/۵	۰/۹۳ d	۰/۰۹۱ a	۱۷/۹۵ a
NAA ۴ + ۰/۵	۰/۷ e	۰/۰۶۳ b	۱۲/۲۶ b
NAA ۵ + ۰/۵	۰/۴۳ fg	۰/۰۴۰ cde	۷/۴۰ cde
NAA ۶ + ۰/۵	۰/۵۵ ef	۰/۰۵۴ bc	۱۰/۳۸ bc
NAA ۳ + ۱	۰/۰۶۷ i	۰/۰۰۵۷ g	۰/۱۹ g
NAA ۴ + ۱	۱/۰۴ cd	۰/۰۹۰ a	۱۷/۸۱ a
NAA ۵ + ۱	۱/۱۴ bc	۰/۱۰۴ a	۲۰/۶۶ a
NAA ۶ + ۱	۰/۵۵ ef	۰/۰۴۷ bcd	۸/۷۹ bcd
NAA ۳ + ۱/۵	۱/۴ a	۰/۱۰۷ a	۲۱/۴۲ a
NAA ۴ + ۱/۵	۱/۳ ab	۰/۱۰۰ a	۱۹/۹۶ a
NAA ۵ + ۱/۵	۰/۳ g	۰/۰۲۱ efg	۳/۳۷ efg
NAA ۶ + ۱/۵	۰/۳۵ g	۰/۰۲۸ def	۴/۸۳ def

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند

Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

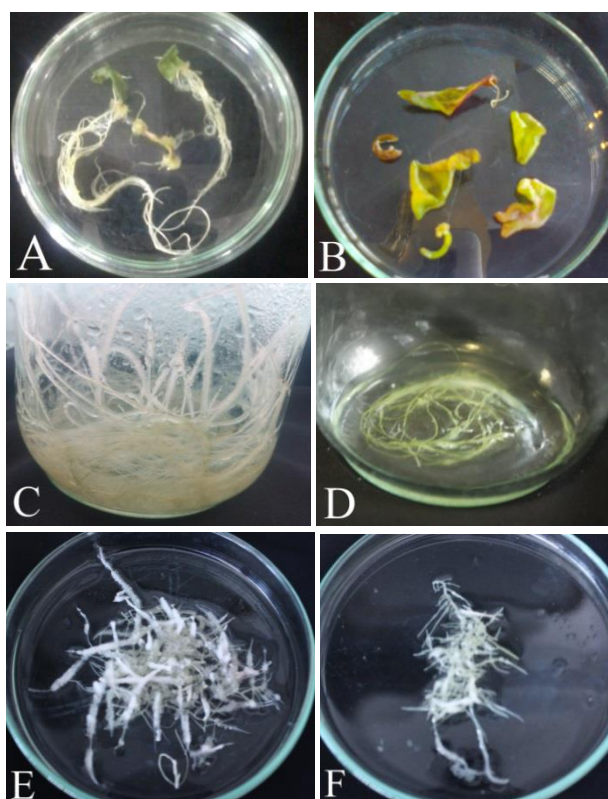
جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر NAA و ساکارز بر روی متابولیت ثانویه ریشه های موین

Table 7- Mean comparisons of the effects of NAA and sucrose on hairy roots secondary metabolites

هورمون (mg l ⁻¹) + ساکارز	فنول	فلاونونید ۲۷۰ نانومتر	فلاونونید ۳۰۰ نانومتر	فلاونونید ۳۳۰ نانومتر
(درصد)				
NAA ۳ + ۰	۲/۱۸ g	۲۸/۹۰ cde	۳۷/۴۸ d	۴۵/۱۷ cd
NAA ۴ + ۰	۳/۲۴ def	۳۲/۰۶ b-e	۵۴/۸۴ bcd	۵۷/۷۶ cd
NAA ۵ + ۰	۲/۶۱ fg	۲۵/۸۹ e	۳۶/۰۳ d	۴۴/۴۳ d
NAA ۶ + ۰	۲/۵۴ fg	۲۳/۹۴ e	۳۲/۶۱ d	۴۳/۹۶ d
NAA ۳ + ۰/۵	۳/۳۶ def	۳۶/۵۲ b-e	۵۵/۸۸ bcd	۷۰/۷۵ bc
NAA ۴ + ۰/۵	۳/۶۱ cde	۴۷/۷۹ bc	۶۹/۹۱ bc	۷۷/۴۴ bc
NAA ۵ + ۰/۵	۳/۴۵ def	۳۵/۷۶ b-e	۵۶/۳۵ bcd	۶۳/۴۰ cd
NAA ۶ + ۰/۵	۳/۱۶ def	۳۲/۱۳ b-e	۴۷/۶۴ cd	۴۹/۶۲ cd
NAA ۳ + ۱	۳/۷۹ cde	۲۴/۵۱ e	۳۹/۳۲ d	۴۶/۴۳ cd
NAA ۴ + ۱	۴/۰۲ cd	۴۷/۲۲ bcd	۷۱/۵۲ bc	۱۷/۸۱ a
NAA ۵ + ۱	۲/۹۶ efg	۵۱/۱۶ b	۵۹/۴۶ bcd	۷۶/۹۴ bc
NAA ۶ + ۱	۲/۸۹ efg	۲۷/۴۴ de	۴۳/۲۱ bc	۵۲/۷۹ cd
NAA ۳ + ۱/۵	۵/۵۸ b	۴۹/۵۷ b	۶۸/۶ bc	۷۰/۶۹ bc
NAA ۴ + ۱/۵	۶/۷۶ a	۷۵/۰۸ a	۷۹/۶۲ ab	۷۵/۰۱ bc
NAA ۵ + ۱/۵	۴/۵۱ c	۳۵/۸۲ b-e	۹۷/۹۲ a	۱۱۱/۶۲ a
NAA ۶ + ۱/۵	۴/۱۰ c	۲۶/۱۴ e	۳۶/۷۲ d	۴۸/۲۷ cd

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند

Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

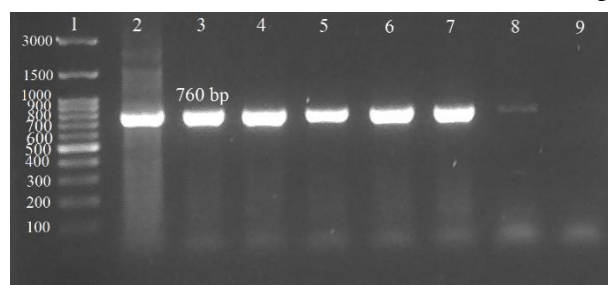


شکل ۴- القای ریشه های موپین توسط سویه *A. rhizogenes* ATCC11325 در گیاه کاسنی. A: ظهور ریشه های موپین در ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل، طی یک تا دو هفته پس از تلقیح، B: القای کم ریشه های غیر تراریخت در ریزنمونه های تلقیح نشده، C: افزایش رشد ریشه های موپین در محیط کشت مایع، D: رشد کم ریشه های غیر تراریخت در محیط کشت مایع، E: کشت ریشه های موپین در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز، F: کشت ریشه های موپین در محیط کشت حاوی صفر میلی گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز

Figure 4- Hairy roots induction by *A. rhizogenes* in Chicory, A: Hairy root induction one week after infection, B: Increase in hairy roots number three weeks after infection, C: Hairy root growth five weeks after infection D: Low non-transformed root induction on leaf explants as control (5 weeks after culture), E: Hairy root culture in 1.5 mg l⁻¹ NAA and 3% sucrose, F: Hairy root culture in 0 mg l⁻¹ NAA and 3% sucrose

حضور نواری ۷۶۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rolB* را نشان داد که با نواری حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم اندازه بود اما برای ریشه های حاصل از ریزنمونه های تلقیح نشده نواری تکثیر نشد (شکل ۵).

تأیید مولکولی ریشه های موپین: ژن های *rolB* نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه های موپین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن، ریشه موپین تولید نخواهد شد (El-Esawi et al., 2017). در این تحقیق بررسی ماهیت تراریختی ریشه های موپین با استفاده از ردیابی ژن *rolB* انجام شد. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز،



شکل ۵- تکثیر قطعه ی DNA به اندازه ی ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA ریشه های موپین. ۱: نشانگر اندازه ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، ۲: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* سویه ی ATCC11325 به عنوان کنترل مثبت، ۳-۸: ریشه های موپین، ۹: ریشه های نابجای حاصل از ریزنمونه های غیر تراریخت به عنوان شاهد منفی.

Figure 5- PCR amplified DNA fragments in size (760 bp) using specific primers for *rolB* gene on hairy roots DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2: *A. rhizogenes* plasmid ATCC11325 strain as positive control, 3-8: hairy roots, 9: Adventitious roots raised from non-transformed explant as negative control.

منابع

- Bais HP, Sudha G, Ravishankar, GA. 2000.** Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 6: 648-653.
- Bais HP, Sudha G, George J, Ravishankar GA. 2001.** Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root culture in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Journal* 37: 293-299.
- Bulgakov V, Gorpenchenko T, Veremeichik G, Shkryl Y, Tchernoded G, Bulgakov D. 2012.** The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiology* 158(3): 1371-1381.
- Carazzone C, Mascherpa D, Gazzani G, Papetti A. 2013.** Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 138(2-3): 1062-1071.
- Cova CM, Boffa L, Pistocchi M, Giorgini S, Luque R, Cravotto G. 2019.** Technology and Process Design for Phenols Recovery from Industrial Chicory (*Chicorium intybus*) Leftovers. *Molecules* 24(15): 2681.
- Dhakulkar S, Ganapathi T, Bhargava A, Bapat T. 2005.** Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169: 812-818.
- El-Esawi MA, Elkelish A, Elansary HO, Ali HM, Elshikh M, Witczak J, 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.
- Faizal A, Sari AV. 2019.** Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. *African Journal of Biotechnology* 18(6):130-135.
- Fang R, Wu F, Zou A, Zhu Y, Zhao H, Zhao H, Wang X. 2016.** Transgenic analysis reveals LeACS-1 as a positive regulator of ethylene-induced shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots. *Plant molecular biology* 90(4-5): 345-358.
- Fathi R, Mohebodini M, Chamani E. 2018.** Optimization of hairy roots induction in chicory (*Cichorium intybus* L.) and effects of auxin and carbon source on their growth. *Iranian Journal of Horticultural Science* 49(3): 657-667. (In Farsi with English abstract).
- Gangopadhyay M, Chakraborty D, Bhattacharyya S, Bhattacharya S. 2010.** Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102: 109-114.
- Gangopadhyaya M, Dewanjeeb S, Chakrabortyc D, Bhattacharya S. 2011.** Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Industrial Crops and Products* 33: 445-450.
- Gelvin SB. 2000.** *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and interaction. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223-256.
- Hakkinen ST, Oksman-Caldentey KM. 2018.** Progress and Prospects of Hairy Root Research. *Hairy Roots* 3-19.
- Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A. 2009.** Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* 114: 765-770.
- Henzelyova J, Cellarov A E. 2018.** Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived *Hypericum tomentosum* regenerants. *Acta physiologiae plantarum* 40(5): 82-90.
- Huang SH, Vishwakarma RK, Lee TT, Chan HS, Tsay HS. 2014.** Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. *Botanical Studies* 55: 1-17.
- Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. 2011.** Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry* 72: 781-790.
- Kabirnetaj S, Zolala J, Nematzadeh GA, 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 Farsi with English abstract).
- Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ. 2007.** Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology* 6: 175-178.
- Kodjo D, Atsou VA, Melin C, Band N, Oudin A, Courdavault V. 2013.** Optimized genetic transformation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of chelerythrine and skimmiamine in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences* 14: 95-99.
- Krizek DT, Mirecki RM, Britz SJ. 1998.** Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Journal of Plant Physiology* 103: 1-7.
- Linh NTN, Tam HT, Tung HT, Luan V Q, Hien VT, Loc NH, Nhut DT. 2019.** Improvement of bioactive saponin accumulation in adventitious root cultures of *Panax vietnamensis* via culture periods and elicitation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 137(1): 101-113.
- Malamy JE, Ryan KS. 2001.** Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 899-909.
- Manuhara YSW, Kristanti AN, Utami SW, Yachya A. 2015.** Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5(12): 1027-1032.

- Moradi F, Mehrjerdi MZ, Vahdati K, Hasanloo T. 2019.** Effect of different factors on induction of hairy roots in Iranian garlic. *Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture)* 41(4): 43-50.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum* 15: 473-476.
- Nigutova K, Kusari S, Sezgin S, Petijova L, Henzelyova J, Balintova M, Cellarova E. 2019.** Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured *Hypericum* species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 71(1): 46-57.
- Park IS, Kim HJ, Jeong YS, Kim WK, Kim JS. 2017.** Differential abilities of Korean soybean varieties to biosynthesize glyceollins by biotic and abiotic elicitors. *Food science and biotechnology* 26(1): 255-261.
- Parr AJ. 2016.** Secondary products from plant cell cultures—early experiences with *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Transgenesis and Secondary Metabolism* 1-13.
- Peng Y, Sun Q, Park Y. 2019.** Chicoric acid promotes glucose uptake and Akt phosphorylation via AMP-activated protein kinase α -dependent pathway. *Journal of Functional Foods* 59: 8-15.
- Pirian K, Piri K. 2012.** Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3: 213–218.
- Ramachandra RS, Ravishancar GA. 2002.** Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Reddy CS, Praveena CH, Veeresham C. 2012.** Strategies to improve the production of Forskolin from hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq. *Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 5: 1720-1726.
- Samadi A, Carapetian J, Heidary R, Jafari M, Hssanzadeh A. 2012.** Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. an anti-tumor lignans production plant. *Nothlae Botanicae Hortiagrobatanici Cluj- Napaca* 40(1): 125-131.
- Siahmansour Sh, Ismaili A, NazarianFirouzabadi F. 2018.** Effect of Different Elicitor Treatments on Hairy Root of Medicinal Plant Poppies (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture)* 41(1): 29-42.
- Shi HP, Kintzios S. 2003.** Genetic transformation of pueraria phaseoloides with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Reports*, 21: 1103-1107.
- Srivastava S, Srivastava AK. 2007.** Hairy root cultures for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 27: 29-43.
- Sonald SF, Laima SK. 2001.** Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Vahabinia F, Pirdashti H, Bakhshandeh E. 2019.** Environmental factors' effect on seed germination and seedling growth of chicory (*Cichorium intybus* L.) as an important medicinal plant. *Acta physiologiae plantarum*, 41(2): 27.
- Velayutham P, Ranjithakumari BD, Baskaran P. 2006.** An efficient in vitro plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. an important medicinal plant. *Journal Agricultural Technology* 2(2): 287-298.
- Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH. 2011.** Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 46: 1070-1075.
- Yang, Y. (2009).** Process Optimization of Extracting Phenols from *Cichorium intybus* cv. Puna with Response Surface Methodology. *Journal of Northwest Forestry University* 24: 118-120.
- Zafar S, Dilshad E, Ismail H, Rizvi CB, Mirza B. 2019.** Rol genes enhance content of artemisinin and other secondary metabolites in Shennong hybrid of *Artemisia annua*. *Chinese Herbal Medicines* 11(2): 209-215.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production

Roghayeh Fathi, Mehdi Mohebodini*, Esmaeil Chamani

Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran. *Corresponding Author Email: mohebodini@uma.ac.ir

Abstract

Hairy root cultures are an effective method for production of secondary metabolites, because the hairy roots are genetically and biologically stable and they are able to produce metabolite within a short time without needs to hormone. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is one of the important medicinal plants that contains a number of important medicinal compounds. In this research, hairy root induction was established through the mediation of the ATCC11325 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. In first experiment, the effects of type and age of explant and co-culture times on the efficiency of hairy root induction were investigated. In the second experiment, we studied the effect of different hairy root lines on growth rate. In third experiment, the effects of various concentration of NAA (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) and sucrose (3, 4, 5 and 6%) on biomass accumulation were investigated. Results showed that maximum hairy root induction (75.55 percent) and number of roots (7.26 roots per explant) obtained from 5-day-old cotyledons. The results revealed that 1.5 mg l⁻¹ NAA in combination with 3 and 4% sucrose were superior for highest fresh (1.4 and 1.3 g) and dry weight (0.107 and 0.100 g) productivity and growth index (21.42 and 19.96). The highest total phenolic content (6.76 mg g⁻¹ DW) and flavonoid content in 270 nm wavelengths was observed in hairy roots that were grown in medium supplemented with 1.5 mg l⁻¹ NAA and 4% sucrose while the maximum flavonoid content in 300 and 330 wavelengths was achieved in 1.5 mg l⁻¹ NAA and 5% sucrose.

Keywords: Explant age, NAA, *RoIB* gene, Secondary metabolites, Hairy root