مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۷-۱۷

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8

DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, pages 17-27
2023

http://gebsj.ir/

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

بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی پریلا

Optimization of induction of hairy roots in Perilla

مهدی محمودی[۱]، سید احمد سادات نوری[۲*]، محسن ابراهیمی[۳]، مسلم بهمن‌کار[٤*]

Mahdi Mahmoudi[1], Seyed Ahmad Sadat Noori[2*], Mohsen Ebrahimi[3], Moslem Bahmankar[4*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و بهنژادی گیاهی، ۲- استاد و ۳- دانشیار
گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فن‌آوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
٤- استادیار پژوهش بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، دزفول، ایران

1. MSc student of Genetic and Plant Breeding, 2. Professor and 3. Associate Professor of Genetic and Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Aburihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Iran
4. Assistant Professor of Seed and Plant Improvement Research Department, Safiabad Agricultural Research and Education and Natural Resources Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Dezful, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۴)

چکیده

پریلا با نام علمی *Perilla ferutescens* (L.) Britton گیاهی است دارویی که در درمان بیماری کرونا موثر است. هدف از این مطالعه، بررسی القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا با استفاده از *آگروباکتریوم رایزوژنز* به منظور بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای است. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با چهار سطح (هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و میان گره ساقه) و سویه باکتری با دو سطح (ATCC-15834 و A4) بود. نتایج نشان داد که اثر متقابل عوامل مورد بررسی بر روی صفات روز تا القای ریشه مویین، درصد القای ریشه مویین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه، معنی‌دار بوده است. ظهور ریشه‌های مویین در ترکیب تیماری ریزنمونه کوتیلدون تلقیح شده با ATCC18534 سریعتر از سایر ترکیبات تیماری مورد مطالعه بود. بیشترین درصد القا و ظهور ریشه مویین، وزن تر و خشک آن در ترکیب تیماری سویه ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون 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* بوسیله PCR تایید شد در حالی که برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته محصول مربوطه تکثیر نشد. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که القای ریشه‌های موئین در پریلا متاثر از ریزنمونه و سویه باکتری بوده و این نتایج یک پیش نیاز مهم برای آزمایشات مربوط به کشت ریشه مویین با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه است.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز،
پریلا،
تراریخته،
ریشه مویین

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract

Perilla (*Perilla ferutescens* L. Britton) is a medicinal plant that treats corona disease. The aim of the present study is to optimize the induction of hairy roots in the medicinal plant Perilla using *Agrobacterium rhizogenes*. The present experiment was conducted as a factorial in the form of a completely randomized design with three replications. The investigated factors included explant with four levels (hypocotyl, cotyledon, leaf, and stem internode) and bacterial strain with two levels (ATCC-15834 and A4). The results indicated that the interaction effect of the studied factors on the traits of day to induction of hairy roots, percentage of hairy root induction, and fresh and dry weight of hairy roots after two months was significant. The emergence of hairy roots in the treatment combination of cotyledon explant inoculated with ATCC18534 was faster than in other studied treatment combinations. The highest percentage of hairy root induction and emergence, fresh and dry weight was obtained in the treatment combination of ATCC15834 strain and cotyledon explant and it was significantly higher than other treatment combinations. The transgenic nature of the hairy roots was confirmed by tracking a part of the rolB gene using the PCR reaction, while the corresponding band was not amplified for the natural and non-transgenic roots. In general, the results of the present study showed that the induction of hairy roots in Perilla was affected by explant and bacterial strain, and these results are an important prerequisite for hairy root culture experiments with the aim of producing secondary metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Transformed, Perilla, Hairy root.

مقدمه

تأکید سازمان بهداشت جهانی بر استفاده از داروهایی با منشأ گیاهی به علت عوارض جانبی داروهای شیمیایی سبب شده تا کشورهای مختلف جهان نسبت به سرمایه‌گذاری و تولید انبوه گیاهان دارویی جهت استفاده از آنها در صنایع بهداشتی، غذایی و دارویی اقدام کنند (Bahmankar et al., 2017). از آنجایی که دارو های گیاهی غالباً بدون اثرها جانبی بوده، علاقه به مصرف محصولات گیاهی در جهان به طور وسیعی افزایش یافته است (Bahmankar et al., 2018). ویژگی دارویی بودن برخی از گیاهان به علّت وجود ترکیبات متنوعی است که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (Chaudhuri et al., 2005; Wu et al., 2007). پریلا با نام علمی *Perilla ferutescens* (L.) Britton گیاهی دارویی یکساله علفی، خودگشن و روز کوتاه از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) با تعداد کروموزوم 2n=40 می‌باشد (Nitta et al., 2003). این گیاه بومی شرق آسیاست و به طور گسترده‌ای در چین، ژاپن، هند، و کره کشت می‌شود و سازگار با آب و هوای گرم و مرطوب می‌باشد (Brenner, 1993). پریلا دارای دو واریته اصلی است که عبارتند از: *P. frutescens var.* crispa با برگ‌های قرمز و بنفش بوده و علت این رنگ‌ها به خاطر مقدار زیاد رنگدانه‌های آنتوسیانین از جمله malonyl shikonin است و این واریته به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meng et al., 2006; Nitta et al., 2003). دیگر واریته آن به نام *P.frutescens var. frutescens* که دارای برگ‌های سبز رنگی بوده و حاوی مقادیر ناچیزی آنتوسیانین است که عمدتاً به عنوان یک گیاه روغنی کشت شده و دارای درصد بالایی از روغن‌های چرب است (Min et al., 1995). پریلا علاوه بر خواص دارویی، به دلیل وجود تنوع رنگ و ظاهر برگ‌ها به عنوان یک گیاه زینتی کشت شده و در محصولات آرایشی و بهداشتی از جمله کرم‌های پوست، صابون و داروهای پوستی بسیار کاربرد دارد (Meng et al., 2009; Pandey, 2008). شیکونین یکی از مهمترین متابولیت‌های دارویی موجود در پریلا است. خصوصیات متعددی برای پریلا ذکر شده که از جمله آنها می‌توان به خواص ضد سرطانی، ضد عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی، ضد آسم، ضد گرفتگی عضلات، ضد سرفه و تب‌بر اشاره نمود (Sut

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

(and Pavela, 2017; Yu et al., 2017; Yeh et al., 2015). پژوهشگران در آزمایشاتی که انجام داده‌اند به این نتیجه رسیده‌اند که عصاره برگ و سایر متابولیت‌های دارویی موجود در پریلا در درمان بیماری ویروس کرونا به شدت موثر است (Tang et al., 2021; Ali et al., 2022). متابولیت‌های ثانویه‌ای که در گیاهان دارویی و در طبیعت ساخته می‌شوند غالباً محدود می‌باشند (Verpoorte and Memelink, 2002; Roy, 2021). همچنین سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید آن لازم است، بنابراین میزان آن اقتصادی نبوده و ضروری است که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود (Tripathi and Tripathi, 2005). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت بافت گیاهی امکان‌پذیر است. این روش، مستلزم دست ورزی ژنتیکی گونه‌های مولد ترکیبات هدف با استفاده از سیستم ناقل طبیعی به نام *آگروباکتریوم رایزوژنز* (*Agrobacterium rhizogenes*) است. این سویه دارای پلاسمیدهای Ri (القاکننده ریشه) بوده که ورود بخش T-DNA آن به درون ژنوم گیاهان باعث ایجاد ریشه‌های تراریخته از قسمت آلوده گیاه شده که ریشه‌های مویین نامیده می‌شوند. ریشه‌های مویین حاصل از *آگروباکتریوم رایزوژنز* دارای رشد بسیار سریع‌تر از بافت‌های مجاور خود بوده و توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند (Riker et al., 1930; Kim et al., 2013). بررسی‌ها نشان داد که ریشه‌های مویین جداشده از گیاهان تراریخته شده با پلاسمید Ri توانایی رشد درون شیشه در شرایط استریل را دارند و توانایی سنتز فراوان متابولیت‌هایی که به صورت نرمال در ریشه‌ها و اندام‌های گیاهی یافت می‌شوند را دارا می‌باشند (Tao et al., 2006). پژوهشگران القای ریشه‌های مویین در یکی از گونه‌های جنس ریحان به نام ریحان مقدس (*Ocimum tenuiflorum*) را با *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه ATCC-15834 مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که بیشترین میزان القای ریشه مویین در ریزنمونه برگ بوده و در فرم‌های سبز رنگ ریحان مقدس نسبت به فرم قرمز آن، القای بهتری صورت گرفته است. حضور ژن *rolB* در این مطالعه به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) نیز تشخیص داده شد (Vyas and Mukhopadhyay, 2014). در مطالعه‌ی القای ریشه مویین در گیاه دارویی ریحان شیرین گزارش شد که القای ریشه‌های مویین به کمک *آگروباکتریوم رایزوژنز* در ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) به منظور تولید رزمارینیک اسید و آنتی‌اکسیدان‌ها با موفقیت صورت پذیرفته است (Srivastava et al., 2016). در مطالعه القای ریشه موئین در گیاه ریحان، گزارش دیگری نشان داد که ریشه موئین در ریزنمونه گره تولید و در سایر ریزنمونه‌ها از جمله برگ و ساقه هیچگونه ریشه موئینی مشاهده نگردید (Zare Hasan Abadi et al., 2020). پژوهشگران در تنها مطالعه انجام شده بر روی القای ریشه مویین در گیاه دارویی پریلا با سویه ATCC-15834 از *آگروباکتریوم رایزوژنز* گزارش کردند که ریزنمونه برگ بیشترین درصد تولید ریشه‌های مویین را ایجاد نموده است (Phuong et al., 2021). با توجه به بررسی‌های صورت گرفته تاکنون در ایران مطالعات القای ریشه مویین بر روی گیاه دارویی پریلا گزارش نشده و در جوامع بین المللی نیز مطالعات محدودی صورت پذیرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا با استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز جهت استفاده در مطالعات آینده از جمله کاربرد در تولید متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی بذور و تهیه ریزنمونه: در آزمایش حاضر واریته بنفش پریلا مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور ضدعفونی بذور از محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن، در زیر هود لامینار ایر فلو و تحت شرایط استریل استفاده شد. پس از ضدعفونی، بذور استریل به منظور تولید گیاهچه‌های سترون جهت تهیه‌ی ریزنمونه، در محیط کشت MS/2 از عناصر میکرو و ماکرو به همراه سه درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار (pH=5.8) و عاری از هورمون کشت شدند. ظروف کشت در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور LUX ۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

نگهداری شدند (Bahmankar et al., 2017). پس از دستیابی به گیاهچه‌های سترون قوی با بنیه‌ی مناسب (حدود یک ماهه) از قسمت‌های مختلف آن انواع ریز نمونه‌ها از جمله هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و میان گره ساقه تهیه شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: دو سویه‌ی باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* (ATCC-15834 و A4) در این آزمایش مورد استفاده 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 به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. OD_{600} محلول باکتری توسط دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری و این پارامتر بین ۰/٦ تا ۰/۸ تنظیم و با این محلول ریزنمونه‌ها تلقیح شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ و میان گره ساقه با اندازه تقریبی یک سانتی‌متر پس از زخم سطحی به مدت ۱۰ 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 (محیط MS فاقد هورمون) منتقل و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ٤۸ ساعت، ریزنمونه‌ها به محیط‌های MS دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انتقال داده شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه‌ها صورت گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد تعدادی ریزنمونه در مدت زمان مشابه درون آب مقطر استریل منتقل شد و سپس در شرایط به طور کامل مشابه کشت و نگهداری شدند. در هر پتریدیش ۸ ریزنمونه کشت گردید و سه تکرار (پتری دیش) برای هر ترکیب تیماری در نظر گرفته شد. ظروف کشت در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲٤ درجه سانتی‌گراد و شدت نور LUX ۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از ظهور ریشه‌های موئین، سرعت القای ریشه‌های موئین بر مبنای تعداد روز تا ظهور ریشه موئین در هر ترکیب تیماری یادداشت گردید. درصد القای ریشه موئین نیز به صورت تعداد ریزنمونه‌های مولد ریشه موئین نسبت به تعداد کل ریزنمونه کشت شده در هر پتری محاسبه گردید.

استقرار و نگهداری ریشه‌های موئین درون شیکر انکورباتور:

هنگامی که طول ریشه‌ها به حدود ۳-۲ سانتی‌متری رسید، در هر ترکیب تیماری و در هر تکرار، ۵ کلون برتر که رشد بیشتری نشان داشته جدا شدند. قطعات جداشده به درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیترمحیط کشت MS/2 مایع منتقل و در تاریکی و دمای ۲ ± ۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر چرخشی با دور rpm ۹۰ 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 گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (۸ ریزنمونه در هر تکرار) صورت پذیرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با چهار سطح (هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ و میان گره ساقه) و سویه باکتری با دو سطح (ATCC-15834 و A4) بود. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار R نسخه‌ی ٤,۲,۱ استفاده شد و گروه‌بندی میانگین‌ها با روش LSD صورت پذیرفت.

تایید تراریختی با استفاده از PCR: به منظور تایید تراریختی ریشه‌های موئین باید حضور ژن‌های *rol* در آنها بررسی گردد. 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). از ریشه‌های مویین (تراریخته) و همچنین ریشه‌های غیرمویین (طبیعی) پریلا به عنوان کنترل منفی، DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد (Yousefian et al., 2020; Cheng et al., 2021). پلاسمید باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* نیز استخراج و به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به منظور تایید حضور این ژن انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به صورت زیر بود:

Forward -5′ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3′
Reverse -5′TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3′

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

چرخه‌ی PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر شامل واسرشت سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ۵ دقیقه)، واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳۵ چرخه به مدت ۱ دقیقه)، اتصال در ٥٦ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه)، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه) و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۷ دقیقه) بود. جهت مشاهده محصولات PCR، ژل آگارز یک و نیم درصد مورد استفاده و ژل حاصل با استفاده از نور UV در دستگاه ژل‌داک مورد بررسی قرار گرفت (Alizadeh et al., 2016).

نتایج و بحث

سویه‌های آگروپینی *آگروباکتریوم رایزوژنز* توانایی بیشتری در تراریختی سلول‌ها دارند، ازین رو در مطالعه حاضر دو سویه آگروپینی ATCC-15834 و A4 جهت القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا استفاده گردید. مشاهدات حاکی از آن بود که ریشه‌های مویین بر روی محل زخم و نزدیک به آن بر روی ریزنمونه‌ها ظاهر شدند (شکل ۱). پژوهشگران بر این باورند که زمانی که یک سلول گیاهی زخمی می‌شود، ترکیبات فنلی آن به محیط اطراف منتشر و این ترکیبات توسط *آگروباکتریوم رایزوژنز* دریافت شده و بنابراین به طرف محل زخمی جذب می‌شوند (Potrykus et al., 1990; Oksman-Caldentey and Hiltunen, 1996). همچنین این ترکیبات بیان ژن‌های بیماری‌زا را در باکتری‌ها تحریک نموده که این موضوع در فرآیند تراریختی و انتقال ژن به سلول هدف خیلی موثر است. البته این پژوهشگران اذعان کردند که قابلیت تراریختی در بین ریزنمونه‌های مختلف، متفاوت بوده و آنها به زخم پاسخ متفاوتی نشان می‌دهند (Potrykus et al., 1990; Oksman-Caldentey and Hiltunen, 1996). در مطالعه حاضر، ریشه‌های القا شده توسط هر دو سویه باکتری، انشعابات زیاد و رشد سریع داشتند و تفاوت مورفولوژیکی اندکی بین آنها مشاهده شد. نتایج نشان داد که در نمونه‌های شاهد، در محل زخم و نزدیک به آن‌ها، هیچگونه ریشه‌ای ظاهر نشد. در مطالعه حاضر به منظور مقایسه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا، برخی خصوصیات از قبیل درصد القای ریشه موئین، روز تا القا ریشه موئین، وزن تر و خشک آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روز تا القای ریشه موئین

نتایج حاکی از آن بود که صفت روز تا القای ریشه موئین بطور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. خصوصیت روز تا القای ریشه مویین (سرعت القای ریشه) سویه ATCC15834 در ریزنمونه‌های مورد مطالعه نسبت به سویه A4 بیشتر بوده است (جدول۱). نتایج برش‌دهی اثر متقابل سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از باکتری (جدول ۲) نشان داد که بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه از نظر سرعت القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به طوری که سریعترین تظاهر ریشه‌های مویین در ترکیب تیماری ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون (تقریباً ۷ روز) مشاهده شد (جدول۳). قابل ذکر است که در تراریختی ریزنمونه‌ها با سویه A4 نیز سرعت تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه کوتیلدون نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها سریعتر بوده که دال بر پذیرش سریعتر DNA *آگروباکتریوم ریزوژنز* توسط سلول‌های ریزنمونه کوتیلدون نسبت به سایر ریزنمونه‌های این مطالعه است. علاوه بر سایر عوامل موثر و میزان بیان ژن‌های درگیر در این رخداد، ممکن است بتوان گفت ترکیبات فنلی موجود در کوتیلدون که با زخمی کردن بافت آن ترشح شده میزان واکنش‌پذیری آن را با باکتری ATCC15834 تحت تاثیر قرار داده و بنابراین منجر به ظهور سریع‌تر ریشه‌های موئین در آن شده است. پژوهشگران معتقدند که مدت زمان لازم جهت ظهور ریشه موئین حایز اهمیت است، به طوری که هر چه این زمان کمتر باشد، روند رشد ریشه، تولید و استخراج متابولیت‌ها کوتاه‌تر و مقرون به صرفه خواهد بود (Dehghan et al., 2012).

درصد القای ریشه موئین

نتایج حاکی از آن بود که اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بر روی درصد القای ریشه موئین معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین ترکیبات تیماری در نگاه اول نشان داد که بین این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

ترکیبات از نظر درصد القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است (جدول۱). در حالی که در برش‌دهی اثر متقابل نتایج متفاوتی حاصل شد. نتایج برش‌دهی اثر متقابل سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری (جدول ۲) نشان داد که در سویه ATCC15834، بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه از نظر درصد القا ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه کوتیلدون با میانگین ٦٦ درصد مشاهده شد (جدول۳). این در حالی است که در سطح سویه A4 بین ریز نمونه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. باید اشاره نمود از آنجایی که هیچگونه تفاوت معنی‌داری از نظر صفت درصد القای ریشه مویین در بین ترکیبات تیماری درج شده در جدول ۱ مشاهده نشد، اما پس از برش‌دهی نتایج متفاوتی مشاهده شد، لذا می‌توان به ضرورت و اهمیت برش‌دهی اثر متقابل در تفسیر نتایج این آزمایش پی برد تا در راستای تصمیم‌گیری درست نتایج از آن بهره جست. پژوهشگران دیگری در مطالعه بر روی القای ریشه مویین با *آگروباکتریوم ریزوژنز* سویه ATCC-15834 در پریلا گزارش نمودند که ریزنمونه برگ بیشترین درصد تولید ریشه‌های مویین را ایجاد کرده است (Phuong et al, 2021). ماهیت برهمکنش میان آگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی هنوز به طور کامل درک نشده، بنابراین به منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتری بایستی بر روی ژنوتیپ هدف آزمون گردد. علاوه بر ژنوتیپ گیاهی، عوامل دیگری از جمله سن، نوع و وضعیت فیزیولوژی ریزنمونه می‌توانند در تعیین سازگاری ژنوتیپ و سویه باکتری حائز اهمیت باشند (Tiwari et al., 2007; Srivastava et al., 2016). دیگر پژوهشگران نیز بر تاثیر عوامل مختلف از جمله سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی القای ریشه مویین تاکید نموده‌اند (Aziz Khajeh et al., 2018).

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر متقابل سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی صفات اندازه‌گیری 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)	Day to induction of hairy roots	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy roots (gr)	Dry weight of hairy roots (gr)
ATCC15834 * Cotyledon	7.33 ± 0.57 d	0.66 ± 0.07 a	3.38 ± 0.82 a	2.2 ± 0.66 a
ATCC15834 * Hypocotyl	14 ± 1 b	0.2 ± 0.07 a	1.12 ± 0.18 e	0.7 ± 0.13 cd
ATCC15834 * Leaf	8.66 ± 0.57 cd	0.41 ± 0.07 a	2.52 ± 0.47 b	1.5 ± 0.34 b
ATCC15834 * Stem Internode	9.33 ± 0.57 cd	0.29 ± 0.14 a	1.11 ± 0.13 e	0.65 ± 0.07 d
A4 * Cotyledon	12.33 ± 1.52 b	0.29 ± 0.07 a	1.27 ± 0.16 de	0.75 ± 0.11 cd
A4 * Hypocotyl	16.33 ± 2.08 a	0.37 ± 0.12 a	1.88 ± 0.32 c	1.1 ± 0.2 bc
A4 * Leaf	10 ± 1.01 c	0.25 ± 0.12 a	1.11 ± 0.19 e	0.66 ± 0.13 d
A4 * Stem Internode	14.33 ± 1.15 ab	0.33 ± 0.14 a	1.67 ± 0.35 cd	0.96 ± 0.17 cd

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.

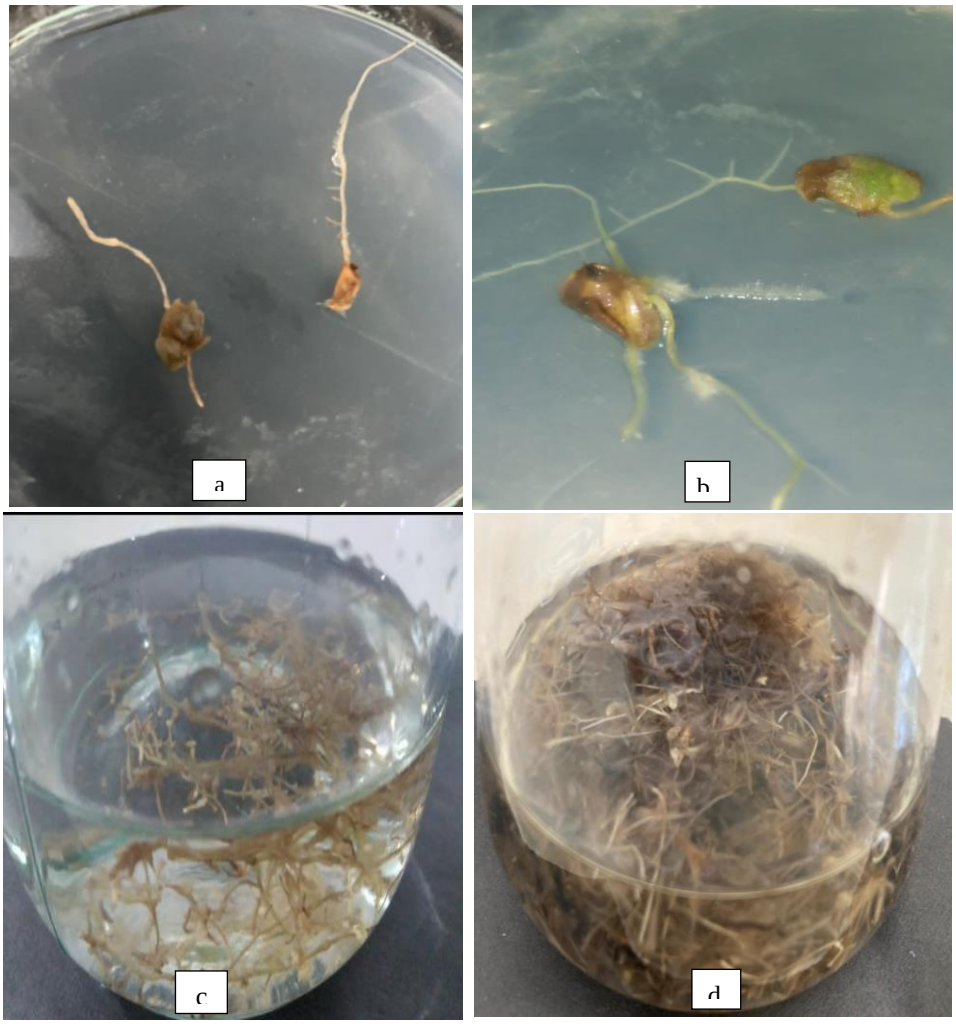
جدول۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس برش‌دهی اثر ریزنمونه در سطوح مختلف سویه باکتری برای صفات مورد مطالعه

Table 2. The mean square obtained from the variance analysis of the sliced explant effect at different levels of the bacterial strain for the measured traits.

Source of Variance	Degree of Freedom	Day to induction of hairy roots	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy roots	Dry weight of hairy roots
ATCC15834	3	25.22 **	0.11**	3.72**	1.61**
A4	3	22.08**	0.008^{ns}	0.37*	0.12*

^{ns}، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.
ns, * and ** non-significant, significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]



شکل۱- مراحل رشد و توسعه ریشه‌های موئین در ترکیب تیماری Cotyledon * ATCC15834 در گیاه دارویی پریلا: ریشه‌های موئین در محیط MS جامد (a و b)، توسعه ریشه‌های موئین پس از گذشت یک ماه از انتقال آن‌ها به ارلن حاوی محیط MS/2 مایع درون شیکر انکوباتور (c)، رشد و توسعه ریشه‌های موئین پس از گذشت ۲ ماه از انتقال آن‌ها به ارلن حاوی محیط MS/2 مایع درون شیکر انکوباتور(d).

Fig 1. Stages of growth and development of hairy roots in the treatment combination of Cotyledon*ATCC15834 in Perilla. Hairy roots in solid MS medium (a and b), The development of hairy roots after one month of transferring them to Erlenmeyer flask containing liquid MS/2 medium in the incubator shaker (c), Growth and development of hairy roots after 2 months of transferring them to Erlenmeyer flask containing liquid MS/2 medium inside the incubator shaker (d).

وزن تر ریشه موئین

نتایج حاکی از آن بود 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 نیز نشان داد که بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه از نظر وزن‌تر ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود داشته به طوری که بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین (۳/۳۸ گرم) در ترکیب سویه ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (شکل ۱، جدول۱). نتایج برش‌دهی اثر متقابل سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری (جدول ۲) نشان داد که در هر دو سویه باکتری، بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه از نظر وزن تر ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به طوری که سویه ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن تر (۳/۳۸ گرم) را تولید نمود (جدول۳). در حالی که بیشترین میزان وزن تر ریشه مویین در بین ریزنمونه‌های تلقیح شده با

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

سویه A4 در دو ریزنمونه هیپوکوتیل (۱/۸۸ گرم) و میانگره ساقه (۱/٦۷ گرم) مشاهده گردید که دال بر اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری است. 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).

وزن خشک ریشه موئین

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 موئین، از نظر وزن خشک نیز تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه مشاهده گردید، به طوری که بیشترین میزان آن (۲/۲ گرم) در ترکیب تیماری سویه ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول۱). نتایج برش‌دهی اثر متقابل ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری (جدول ۲) نشان داد که در هر دو سطح آن، بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه از نظر وزن خشک ریشه موئین تفاوت معنی‌داری وجود دارد به طوری که در سویه ATCC15834 ریزنمونه کوتیلدون نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن خشک ریشه‌های موئین (۲/۲ گرم) را تولید کرده است (جدول۳). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک ریشه موئین در بین ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه A4 در دو ریزنمونه هیپوکوتیل (۱/۱ گرم) و میانگره ساقه (۰/۹٦ گرم)، تولید شده که این رخداد دال بر تایید اثر متقابل بین سویه باکتری و ریزنمونه است. 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). پژوهشگران در مطالعه خود در القای ریشه موئین در گیاه دارویی شاه اسپرم نیز گزارش نمودند که وزن ریشه‌های القا شده در کوتیلدون‌ها نسبت به سایر ریزنمونه‌های ارزیابی شده بیشتر بود (Maroufi and Majdi, 2015).

جدول ۳- مقایسه میانگین حاصل از برش‌دهی اثر ریزنمونه در سطوح مختلف سویه باکتری بر روی صفات اندازه‌گیری شده

Table 3. The mean comparison obtained from the sliced explant effect at different levels of the bacterial strain for the measured traits.

Bacterial Strain	Explants	Day to induction of hairy roots	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy	Dry weight of hairy
ATCC15384	Cotyledon	7.33 ± 0.51 c	0.66 ± 0.064 a	3.38 ± 0.73 a	2.2 ± 0.59 a
	Hypocotyl	14.0 ± 0.89 a	0.20 ± 0.208 c	1.12 ± 0.16c	0.7 ± 0.12 c
	Leaf	8.66 ± 0.51 b	0.41 ± 0.064 b	2.52 ± 0.42 b	1.5 ± 0.3 b
	Stem Internode	9.33 ± 0.51 b	0.29 ± 0.13 bc	1.11 ± 0.12 c	0.65 ± 0.07 c
A4	Cotyledon	12.33 ± 1.36 c	0.29 ± 0.06 a	1.27 ± 0.14 b	0.75 ± 0.1 bc
	Hypocotyl	16.33 ± 1.86 a	0.37 ± 0.11 a	1.88 ± 0.29 a	1.1 ± 0.18 a
	Leaf	10.0 ± 0.89 d	0.25 ± 0.11 a	1.11 ± 0.17 b	0.66 ± 0.11 c
	Stem Internode	14.33 ± 1.03 b	0.33 ± 0.12 a	1.67 ± 0.31 a	0.96 ± 0.16 ab

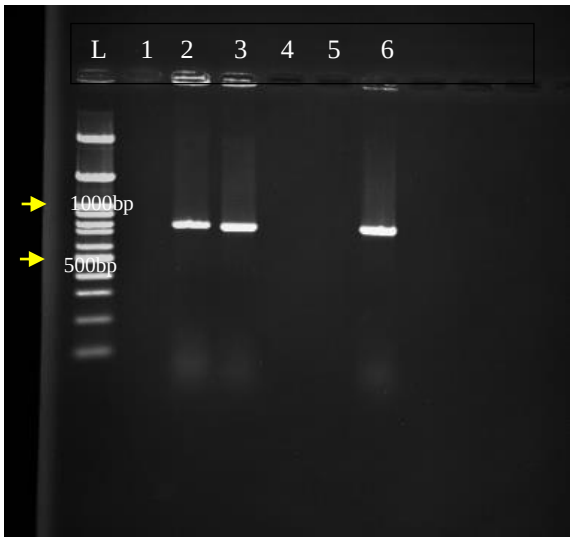
حداقل یک حرف مشترک در ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

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

تایید تراریختی ریشه‌های موئین

اگرچه مورفولوژی خاص و رشد ریشه‌های مویین القا شده توسط *آگروباکتریوم ریزوژنز* در محیط کشت فاقد هورمون، تا حدی نشان دهنده‌ی نفوذ T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی و تراریختی آنها می‌باشد، با این وجود بررسی ماهیت تراریختی ریشه‌ها با روش PCR لازم است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]



شکل۲- تجزیه و تحلیل PCR قطعه ۷۸۰bp ژن *rolB* ریشه‌های موئین در پریلا. نوار ۱ مربوط به آب، نوارهای (۲ و ۳) به مربوط به دو نمونه از ریشه‌های موئین القا شده، نوار ٤ و ٥ مربوط به ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ٦ مربوط به پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، نوار L مربوط به لدر ۱۰۰ bp.

Fig 2. PCR analysis of rolB gene (780 bp) of hairy roots in Perilla. Band 1 is related to water, bands (2 and 3) are related to two samples of induced hairy roots, bands 4 and 5 are related to normal roots (negative control), band 6 is related to bacterial plasmid (positive control), band L is related to Ladder 100 bp.

پژوهشگران بر این باورند که در میان ژن‌های *rol* موجود در *آگروباکتریوم 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). در این مطالعه، نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به تکثیر قطعاتی با طول حدود (۷۸۰bp) شده بود که تقریباً با نوار کنترل مثبت (باکتری) هم اندازه بود، اما برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته نواری تکثیر نشد (شکل۲). بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین در گیاه دارویی پریلا با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB*تایید شد. تایید تراریختی ریشه‌های موئین ریحان (*O. basilicum*) با استفاده از آغازگرهای *rolB* انجام شد (Srivastava et al., 2016). همچنین پژوهشگران در دیگر مطالعات با مشاهده باند مربوط به آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* در ریشه‌های موئین گیاهان دارویی باباآدم (*Arctium lappa* و *L.*) و *Gmelina arborea Roxb.* تراریختی آن را تایید کردند (Soleimani et al., 2012; Dhakulkar et al., 2005). ژن *rolB* برای القای ریشه موئین به طور کامل ضروری بوده و حتی زمانی که این ژن به تنهایی بیان شود، می‌تواند تولید ریشه موئین قابل توجهی داشته باشد (Georgiev et al., 2007). پژوهشگران بر این باورند که توانایی بیوسنتز متابولیت‌های دارویی در ریشه‌های موئین با فراوانی نسخه‌های mRNA از *rolB* همبستگی دارد (Kiselev et al., 2007).

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج دال بر آن بود که صفات روز تا القای ریشه مویین، 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 کوتیلدون و ATCC18534 سریعتر از سایر ترکیبات تیماری مورد مطالعه بود. بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه موئین در ترکیب تیماری سویه ATCC15834 و ریزنمونه کوتیلدون 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 باکتری نشان داد که در سویه ATCC15834 ریزنمونه کوتیلدون 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 میانگره ساقه 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 پریلا می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تولید سریع متابولیت‌های دارویی در آن تحت شرایط درون شیشه‌ای محسوب گردد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

منابع

Ali, S., Alam, M., Khatoon, F., Fatima, U., Elasbali, AM., Adnan, M., & et al. (2022). Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights. Biomed Pharmacother.147:112658:1-11. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112658

Alizadeh, Z., Ahmadi, DN., Mohammadi, M., Karimizadeh, RA., Memari, HR., & Bahmankar, M. (2016). Assessment of molecular variation in pea germplasm using RAPD markers." Electronic Journal of Biology. 12- 22. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:54720435

Aziz Khajeh, A., 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: 33-40. (In Persian with English abstract). http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.1.2.1

Bahmankar, M., Mortazavian, SMM., Tohidfar, M., Noori, SAS., Darbandi, AI., Corrado, G., & et al . (2017). Chemical compositions, somatic embryogenesis, and somaclonal variation in cumin. BioMed Research International. 1–15. https://doi.org/10.1155/2017/7283806

Bahmankar, M., Mortazavian, SMM., Tohidfar, M., Noori, SAS., Darbandi, AI., Salehi, M., & et al. (2018). Physio-biochemical characters, embryo regeneration and limonene synthase gene expression in cumin. Industrial Crops and Products, 121: 195-205. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.006

Bose, R., Sengupta, M., Basu, D., & Jha, S. (2022). The rolB-transgenic Nicotiana tabacum plants exhibit upregulated ARF7 and ARF19 gene expression. *Plant Direct*, *6*(6), e414.https://doi.org/10.1002/pld3.414

Brenner, D. M. (1993). Perilla: Botany, uses and genetic resources. J. Janick and JE, 677. https://doi.org/10.9787/PBB.2019.7.3.237

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. Dehghan E, Hakkinen KM, Oksman-Caldentey, Ahm https://doi.org/10.1186/s13007-021-00778-7

Dhakulkar, S., Ganapathi, TR., Bhargava, S., Bapat, VA. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. Plant Science 169: 812–818. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.014

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. https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5

Kim, S. J., Park, W. T., Uddin, M. R., Kim, Y. B., Nam, S. Y., Jho, K. H., & Park, S. U. (2013). Glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (Brassica oleracea var. italica). *Natural Product Communications*, *8*(2), 1934578X1300800222. http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1300800222

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. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.008

Meng, L., Lozano, Y., Bombarda, I., Gaydou, E., & Li, B. (2006). Anthocyanin and flavonoid production from Perilla frutescens: pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration and reverse osmosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(12), 4297-4303. https://doi.org/10.1021/jf0604079

Maroufi, A., & Majdi, M. (2015). Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant Alecost (Tanacetum balsamita L.) using Agrobacterium rhizogenes. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *4*(2), 103-111. http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2

Meng, L., Lozano, Y., Bombarda, I., Gaydou, E. M., & Li, B. (2009). Polyphenol extraction from eight Perilla frutescens cultivars. Comptes Rendus Chimie, 12(5), 602-611. https://doi.org/10.1016/j.crci.2008.04.011

Chung, I. M., Yun, S. J., Kim, J. T., Gwag, J. G., Sung, J. D., & Suh, H. S. (1995). Test of superoxide dismutase characteristics and antioxidant activity in Perilla leaves. Korean Journal of Crop Science, 40(4), 504-511. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82520397

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

Pandey, A., & Bhatt, K. C. (2008). Diversity distribution and collection of genetic resources of cultivated and weedy type in Perilla frutescens (L.) Britton var. frutescens and their uses in Indian Himalaya. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *55*, 883-892. https://doi.org/10.1007/s10722-007-9293-7

PHUONG, T. D., LE THI MONG, V. U. O. N. G., & PHUONG, Q. N. D. (2021). Antioxidant, anti-bacterial activity of Perilla frutescens ethanol extract and induction of hairy roots by Agrobacterium rhizogenes. VNUHCM Journal of Natural Sciences, 5(1), 975-983. https://doi.org/https://doi.org/10.32508/stdjns.v5i1.917

Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., & Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. Journal of Agricultural Research, 41(7). https://handle.nal.usda.gov/10113/IND43967883

Roy, A. (2021). Hairy root culture an alternative for bioactive compound production from medicinal plants. Current pharmaceutical biotechnology, 22(1), 136-149. https://doi.org/10.2174/1389201021666201229110625

Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K. H., & Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (Arctium lappa L.). Journal of medicinal plants, 11(44). http://dorl.net/dor/20.1001.1.2717204.2012.11.44.17.9

Srivastava, S., Conlan, X. A., Adholeya, A., & Cahill, D. M. (2016). Elite hairy roots of Ocimum basilicum as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. Plant Cell,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]

Tissue and Organ Culture (PCTOC), 126, 19-32. doi 10.1007/s11240-016-0973-x

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.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.007

Sut, S., Pavela, R., Kolarčik, V., Cappellacci, L., Petrelli, R., Maggi, F., ... & Benelli, G. (2017). Identification of Onosma visianii roots extract and purified shikonin derivatives as potential acaricidal agents against Tetranychus urticae. Molecules, 22(6), 1002. doi.org/10.3390/molecules22061002

Tang, W. F., Tsai, H. P., Chang, Y. H., Chang, T. Y., Hsieh, C. F., Lin, C. Y., ... & Horng, J. T. (2021). Perilla (Perilla frutescens) leaf extract inhibits SARS-CoV-2 via direct virus inactivation. biomedical journal, 44(3), 293-303. doi.org/10.1016/j.bj.2021.01.005

Tao, J., & Li, L. (2006). Genetic transformation of Torenia fournieri L. mediated by Agrobacterium rhizogenes. South African journal of botany, 72(2), 211-216. doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.010

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.org/10.1007/s00299-006-0236-0

Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical journal of pharmaceutical research, 2(2), 243-253. doi.org/10.4314/tjpr.v2i2.14607

Verpoorte, R., & Memelink, J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. Current opinion in biotechnology, 13(2), 181-187. doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00308-7

Vyas, P., & Mukhopadhyay, K. (2014). Development of a rapid and high frequency Agrobacterium rhizogenes mediated transformation protocol for Ocimum tenuiflorum. Biologia, 69(6), 765-770. doi: 10.2478/s11756-014-0375-7

Wu, J. Y., Ng, J., Shi, M., & Wu, S. J. (2007). Enhanced secondary metabolite (tanshinone) production of Salvia miltiorrhiza hairy roots in a novel root–bacteria coculture process. Applied microbiology and biotechnology, 77, 543-550. doi.org/10.1007/s00253-007-1192-5

Yeh, Y. C., Liu, T. J., & Lai, H. C. (2015). Shikonin induces apoptosis, necrosis, and premature senescence of human A549 lung cancer cells through upregulation of p53 expression. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. doi.org/10.1155/2015/620383

Yousefian, S., Ahmadi Nik, F., Lohrasebi, T., Mirshahvalad, S., Gharanjik, S., & Esfahani, K. (2021). Investigation of Nitrogen and Phosphate Effect on Growth and Rosmarinic Acid Production in Transgenic Mentha aquatica Hairy Root Induction. Journal of Medicinal plants and By-product, 10(2), 199-207.

doi.org/10.22092/jmpb.2020.351569.1249.

Yu, H., Qiu, J. F., Ma, L. J., Hu, Y. J., Li, P., & Wan, J. B. (2017). Phytochemical and phytopharmacological review of Perilla frutescens L.(Labiatae), a traditional edible-medicinal herb in China. Food and Chemical Toxicology, 108, 375-391. doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.023

Zare Hasan Abadi, M., Ganjeali. M,, Lahouti. M., & Moshtaghi. N. (2020). Influence of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Roots Induction and Secondary Metabolites Production in *Ocimum basilicum* L. 34: 273-284. (In Persian with English abstract). doi.org/10.22067/jhorts4.v34i2.82167

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8]