مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۹۴-۱۸۴

10.61186/gebsj.12.2.184

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 184-194

http://gebsj.ir/

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

القا و مطالعه الگوی رشد ریشه مویین در گیاه دارویی جنسینگ هندی با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز

Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using *Agrobacterium rhizogenes*

نسیبه سلطانی نژاد[۱*]، سید احمد سادات نوری[۲]، علی ایزدی دربندی[۳] ، فاطمه امینی[٤]، محمد حسین میر جلیلی[٥]

Soltaninejad, N[*1], Sadat- Noori, S.A[2], Izadi-Darbandi, A[3], Amini, F[4], Mirjalili, M.H[5].

۱، ۲، ۳و٤- گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران.

۵- استاد گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

1, 2, 3, 4. Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran:
5. Professor of the Department, Research Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۷)
Received: 2023/06/8 | Accepted: 2023/09/8 | Published: 2024/03/14

چکیده

جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* یک گیاه سازگار به شرایط آب و هوایی مناطق جنوبی کشور ایران است که به دلیل دارا بودن ماده مؤثره ویتانولید دارای خاصیت ضد سرطانی بوده و برای بهبود سلامت بدن و افزایش طول عمر استفاده می‌شود. یکی از روش‌های مهم برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی کشت ریشه مویین است. ریشه‌های مویین از نظر ژنتیکی پایدار بوده و قادر به افزایش متابولیت‌ها بدون استفاده از هورمون می‌باشند. به منظور افزایش تولید ریشه مویین از سه سویه مختلف از باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز (A4, Attc-15834, R318) استفاده شد. درصد القای تشکیل ریشه مویین به ترتیب ٦٦ درصد در سویه A4، ۷۲ درصد در سویه Atcc-15834 و ۸۳ درصد در سویه R318 تعیین شد. الگوی رشد سویه‌ها ترسیم شد و اوج رشد سویه‌ها در هفته پنجم به دست آمد. زمان دو برابر شدن ریشه مویین، برای سویه A4 در روز پنجم، سویه Atcc-15834 در روز نهم و برای سویه R318 در روز بیستم تعیین شد. حداکثر زیست توده تولید شده توسط سویه A4 (٤/۲۹ گرم)، Atcc-15834 (۲/۳۸ گرم) و R318 (۱/۳۵ گرم) به دست آمد. نتایج تجزیه واریانس وزن زیست توده تر و خشک ریشه‌های مویین نشان داد بین سویه‌های مورد بررسی از نظر میزان القای ریشه مویین در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بهترین سویه برای القای تشکیل ریشه مویین در گیاه دارویی جنسینگ هندی سویه A4 تعیین شد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم رایزوژنز،
الگوی رشد،
Withania somnifera،
ویتانولید

Soltaninezhad N, Sadat-Noori S A, Izady-Darbandi A, Amini F, Mirjalili M H. Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using Agrobacterium rhizogenes. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :184-194. Doi: 10.61186/gebsj.12.2.184
URL: http://gebsj.ir/article-1-461-fa.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Indian ginseng *(Withania somnifera)* is a plant adapted to the climatic conditions of the southern regions of Iran. One of the important methods to increase secondary metabolites in medicinal plants is hairy root culture. Hairy roots are genetically stable and able to increase metabolites without using hormones. In order to increase hair root production, three different strains of *Agrobacterium rhizogenes* (A4, Attc-15834, R318) were used. The percentage of hair root formation induction was determined as 66% in A4 strain, 72% in Atcc-15834 strain and 83% in R318 strain. The growth pattern of the strains was drawn and the peak growth of the strains was obtained in the fifth week. The doubling time of root hairs was determined for the A4 strain on the fifth day, the Atcc-15834 strain on the ninth day, and the R318 strain on the 20th day. The maximum biomass produced by strain A4 (4.29 g), Atcc-15834 (2.38 g) and R318 (1.35 g) was obtained. The results of analyzing the variance of wet and dry biomass weight of hairy roots showed that there is a significant difference between the studied strains in terms of hairy root induction at different times. The best strain for inducing the formation of hairy roots in Indian ginseng was determined as strain A4.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, growth pattern, *Withania somnifera*, withanolide.

مقدمه

جنسینگ هندی *(Withania somnifera)*، درختچه‌ای با ارتفاع ۱۷۰ سانتی‌متر، ریشه آن ضخیم، یک شاخه منشعب یا دو شاخه و طول آن یک متر و قطر آن در ناحیه یقه گیاه تا ۱۰ سانتی متر می-رسد. پوست خارجی ریشه به رنگ زرد و طعم آن کمی شیرین می‌باشد. برگ‌های آن مرکب از ۵ تا ۷ برگچه و به صورت گروهی با دمبرگ‌های خود از یک نقطه خارج شده‌اند. میوه آن قرمز تیره شبیه دانه‌های کوچک توت می‌باشد (Estaki and davazdah emami, 2012). این گیاه بومی هند، شمال آفریقا و خاورمیانه است و می توان آن را در دماهای خاصی در سراسر جهان پرورش داد. جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* گیاهی سازگار است که برای بهبود سلامت بدن و افزایش طول عمر استفاده می شود. این گیاه چند ساله و تعداد کروموزوم های آن 2n=2x=48 می‌باشد. جنسینگ هندی، به دلیل دارا بودن تعداد زیادی از لاکتون‌ها و آلکالوئیدهای استروئیدی، که به عنوان ویتانولیدها شناخته می‌شود، اهمیت زیادی دارد. تاکنون ۱۲ نوع آلکالوئید، ۳۵ نوع ویتانولید و تعدادی گلیکوویتانولید (Glycowithanolide) به نام سیتوئیندوزید (Sitoindoside) از اندام هوایی، ریشه و میوهٔ گونه‌های مختلف *(Withania somnifera)*، جداسازی، شناسایی و اثرات ضد میکروبی، ضد تشنجی، ضد التهابی، ضد پیری و آلزایمر برای آنها گزارش شده است (Archana and Namasivayam, 1999; Mishra et al., 2000; Abou-Douh, 2002; Jayaprakasam, 2003; Atta-Ur-Rahman et al., 1999; Atta-Ur-Rahman et al., 2003; Arora et al., 2004; Owais et al., 2005). ترکیب‌های شیمیایی غالب در این گونه‌ها، لاکتون‌های استروئیدی (ویتانولیدها) می‌باشند. این ترکیب‌ها بطور عمده در برگ‌ها ذخیره شده و غلظت آنها از ۰/۰۰۱ تا ۰/۵ درصد ماده خشک گیاه متغیر است (Kapoor, 2001). سیل کیم و همکاران شش ویتانولید جدید ۷۲-۷۷ را از *W. somnifera* جدا کردند (Kim et al., 2019).

ویتانولیدها به صورت تجاری از طریق استخراج با حلال از ریشه‌ها و برگ‌های گیاه بدست می‌آیند. عملکرد کم از منبع طبیعی، وابسته بودن مقدار استخراج به تغییرات ژنوتیپی و فیتوشیمیایی، ناهماهنگی در محتوا، دورهٔ طولانی انتظار ٤ تا ۵ سال از زمان کاشت تا برداشت، محدودیت‌های عمده در تولید ویتانولید صنعتی می‌باشد (Baldi et al., 2008). به منظور افزایش ویتانولیدها کشت‌های کنترل شده سلولی و ریشه مویین می‌تواند یک انتخاب جایگزین باشد.

ریشه‌های مویین از طریق تراریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط اگروباکتریوم مولد ریشه (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

تشکیل می‌شوند. پایداری ژنتیکی ریشه‌های موین در طول دورهٔ کشت، رشد سریع آنها، زمان دو برابرشدن پایین، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیفی از ترکیبات شیمیایی در ریشه‌های موین از جمله مزایایی است که آنها را به منبعی مهم و دایمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل نموده است. ریشه‌های موین برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفادهٔ دارویی، آرایشی و افزودنی‌غذایی ارزشمند می‌باشند. ریشه‌های موین تراریخته سازوکارهای بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی را تقلید کرده و حتی مقادیر بالاتری از آنها را نشان می‌دهند. بنابراین ابزاری قدرتمند جهت انجام تحقیقات به منظور بالا بردن میزان تولید متابولیت‌های دارویی با ارزش محسوب می‌شوند (Hasanlou, 2008).

در تحقیق حاضر القای ریشه موین در گیاه دارویی جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* با سه سویه باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و الگوی رشد سوبه‌ها در ریشه‌های موین این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر جنسینگ هندی از هند وارد شد. پس از کاشت در گلخانه آموزشی گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران از گیاهان کاشته شده بذر مورد نیاز جمع آوری و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. بذرها ابتدا از میوه خارج و با آب فراوان در آزمایشگاه شسته شدند. برای جوانه زنی به علت کندی جوانه‌زنی بذرها، ابتدا بذرها تحت پیش تیمار با اسید جیبرلیک با غلظت ۰/۲۵ پی پی ام به مدت ۲٤ ساعت در اتاق رشد، با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. برای ضدعفونی، بذرها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ٤۵ ثانیه تیمار و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و سپس با هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۲ دقیقه تیمار و مجدد سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذور استریل شده درون جارهای حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) با مقدار ۰/۸ گرم در لیتر آگار و مقدار 30 گرم در لیتر ساکارز و pH= ۵/۸ کشت داده شدند. جارها در اتاق رشد با شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ٦ روز بذرها سبز شدند و بعد از دو هفته از گیاهچه‌های تولید شده با روش کشت انتهای ساقه‌چه یا Shoot tip culture واکشت انجام شد تا گیاهچه‌هایی با کیفیت جهت تلقیح داشته باشیم. در این روش قسمت انتهای ساقه حاوی یک برگ زیر هود استریل جدا و به جارهای حاوی محیط کشت Ms منتقل شدند. جارها در اتاق رشد با شرایط ذکر شده در بالا قرار داده شدند و بعد از گذشت یک ماه گیاهان برای تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تلقیح از ریز نمونه‌های مختلف (برگ، ساقه، هیپوکوتیل، کوتیلدن) استفاده شد (Mirjalili et al., 2009; Mirzajani et al., 2010).

سویه‌های باکتری و کشت آنها

برای تلقیح ریز نمونه‌های مختلف، از سه سویه مختلف از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به نام های A4 ، Atcc-15834 و R318 استفاده شد. سویه A4 از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی و سویه Atcc-15834 از آزمایشگاه گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و سویه R318 از پژهشکده ملی ژنتیک تهیه شدند. باکتری‌ها روی محیط YEB و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت و تکثیر شدند (Maniatis et al., 1982). بعد از ٤۸ ساعت از زمان کشت، باکتری‌ها برای تلقیح استفاده شدند.

القاء و کشت ریشه های موین

برای تلقیح، از گیاهچه‌های جوان، ریز نمونه‌های مختلف (برگ، ساقه، هیپوکوتیل، کوتیلدن) گرفته شد. با نوک سوزن یا تیغ جراحی استریل آغشته به مقدار ناچیزی از کلونی اگروباکتریوم و به روش زخم زنی (Mirjalili et al., 2009 , Mirzajani et al., 2010) بر سطح زیرین ریز نمونه‌های برگ، روی ریز نمونه‌های ساقه و هیپوکوتیل و سطح زیرین ریز نمونه کوتیلدن تلقیح انجام شد. نمونه‌ها، درون پلیت‌های حاوی محیط کشت ام اس بدون هورمون و بر سطح آن به نحوی قرار داده شدند که سطح آغشته با اگروباکتریوم (سطح زیرین برگها) رو به بالا قرار گیرد (شکل۱). در ادامه و پس از ثبت مشخصات مربوط به نژاد اگروباکتریوم و تاریخ تلقیح، پلیت‌های حاوی نمونه‌های تلقیح شده به مدت ۳ روز درون اتاق رشد و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

این مدت و به منظور حذف آگروباکتریوم، ریزنمونه‌ها به ظروف جدید محیط کشت ام اس بدون هورمون و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم انتقال داده شدند. سازه انتقالی دارای ژن مقاومت به سفوتاکسیم بوده است. با ظهور ریشه‌های مویین بر روی ریزنمونه‌ها و پس از ثبت داده‌های مورد نیاز، هر کدام از آنها به عنوان یک رخداد و به منظور تولید یک کلون، درون پلیت‌های جداگانهٔ حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. به منظور حذف کامل آگروباکتریوم از سطح ریشه‌های مویین و در طول دورهٔ رشد، به تناوب و به فواصل زمانی کوتاه، ریشه‌ها بر روی محیط کشت جدید حاوی آنتی بیوتیک واکشت داده شدند.

برای شناسایی و تشخیص حذف کامل آلودگی اگروباکتریوم از سطح ریشه‌های مویین، از هر کلون سه ریشهٔ مویین و به صورت تصادفی انتخاب و پس از له کردن، بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت YEB قرار داده شدند. این پلیت‌ها به مدت ٤ روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شده و در نهایت عدم رشد اگروباکتریوم، به منزلهٔ حذف آن از کلون‌های ریشه‌های مویین تشخیص داده شد.

رسم منحنی رشد

پس از تولید مقدار کافی از ریشه‌های مویین و به منظور ارزیابی الگوی رشد و تولید آنها، کشت ریشه‌ها درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع ام اس بدون هورمون انجام گرفت. ارلن‌ها درون شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

استخراج DNA و آنالیز PCR

DNA کل از کلون‌های ریشه‌های مویین با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت زیست فناوری کاوش پارسیان و روش مربوط به آن، استخراج و برای آزمایش‌های مولکولی استفاده گردید. واکنش پی سی آر برای شناسایی هر کدام از ژن‌های ترانسفورم شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و مستر میکس فرموله شده انجام گرفت. توالی آغازگرها برای ژن‌های مورد مطالعه به صورت جدول ۱ بود.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق **Table 1.** primers used in this study

gene	Sequence of primers	Size of PCR product (base pair)
rolA	5´ TGGAATTAGCCGGACTAAAC 3´ 3´GCGTACGTTGTAATGTGTTG 5´	600
rolB	AGTTCAAGTCGGCTTTAGGC 3´ 5´ 3´ TCCACGATTTCAACCAGTAG5´	700
rolC	5´ TAACATGGCTGAAGACGACC 3´ 3´AAACTTGCACTCGCCATGCC 5´	534

واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹٤ درجه به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. نوارهای DNA پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک پس از گذشت ٦۰ تا ۹۰ دقیقه قابل مشاهده است. تصویر برداری با دستگاه Cat Infinity انجام شد.

اندازه‌گیری وزن تر: در هر هفته در زمان مقرر وزن تر ریشه‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری وزن خشک: بعد از اندازه‌گیری وزن تر نمونه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در فریزر منفی ۸۰ قرار داده شدند و سپس با فریز درایر خشک شده و وزن خشک آنها با ترازوی دقیق اندازه-گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

نتایج و بحث

القای ریشه مویین:

جنسینگ هندی به علت دارا بودن ماده ضد سرطان ویتانولید از اهمیت دارویی زیادی برخوردار است. به سبب مقدار کم این ماده در ریشه‌های طبیعی این گیاه و لزوم افزایش این ماده مؤثره جهت استفاده در صنایع دارویی، استفاده از کشت ریشه مویین می‌تواند مفید باشد. نتایج این تحقیق نشان داد پس از زخم‌زنی ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۱۵ روز در ریزنمونه برگ ریشه مویین ظاهر شد و در سایر ریزنمونه‌های استفاده شده ریشه مویین مشاهده نشد. موفقیت در تولید ریشه‌های مویین که منجر به تولید درصد بالایی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی شده به وسیله تعداد زیادی از محققین گزارش شده است (tripati et al, 2003). پس از رشد ریشه مویین درصد القای ریشه توسط هر سویه تعیین شد که به ترتیب در سویه A4 (٦٦ درصد)، سویه Atcc-15834 (۷۲ درصد) و در سویه R318 (۸۳ درصد) بود (جدول ۲). مطالعه الگوی رشد سویه‌ها نشان داد که حداکثر زیست توده تولید شده در مدت زمان شش هفته در سویه A4 (٤/۲۹ گرم)، Atcc-15834 (۲/۳۸ گرم) و R318 (۱/۳۵ گرم) به دست آمد (شکل‌های ۲ و ۳). زمان دو برابر شدن برای سویه A4 در روز پنجم، سویه Atcc-15834 در روز نهم و برای سویه R318 در روز بیستم تعیین شد.

در گزارش ماجامدار و همکاران در گونه *Bacopa monnieri* از خانواده بارهنگیان، ریشه‌های مویین تولید شده به واسطه اگروباکتریوم رایزوژنز، پنج برابر مقدار ساپونین بیشتری نسبت به گیاهان غیر تراریخت تولید کردند (Majamdar et al., 2011). تولید ویتانولیدهای آ و دی و ویتافرین آ از کشت ریشهٔ مویین جنسینگ هندی توسط باکتری اگرباکتریوم رایزوژنز گزارش شده است (Rai et al., 1996; Bandyopadhyay et al., 2007; Murthy et al., 2008).

در یک بررسی شاخص رشد ریشه‌های مویین در گیاه جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* در هفته پنجم بعد از کشت دو برابر ریشه‌های نابجا و میزان دو برابر شدن ریشه‌های مویین در روز سی‌ام بود (Yusefian et al., 2018). در گزارش (Sangwan et al., 2007) تولید ۰/۲ درصد ویتانولید آ در کشت درون شیشه شاخساره این گیاه گزارش شده است. در بررسی انجام شده در گیاه کلم بروکلی از دو سویه A4 و Atcc-15834 در القای ریشه مویین روی ریزنمونه‌های مختلف استفاده شد که سرعت القای ریشه مویین در ریزنمونه هیپوکوتیل (با میانگین ۸/٦ روز) سریع‌تر از کوتیلدون (با میانگین ۱۱/۳۳ روز) به دست آمد (Bigdeli and sadat-Noori, 2021). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایش حاضر نشان داد بین تکرارهای مختلف اختلاف بین سویه‌ها در زمان‌های مورد بررسی معنی دار نبود اما در بین خود سویه‌های مورد بررسی، زمان‌های مورد بررسی و اثر متقابل سویه و زمان معنی‌دار بود. این اختلاف نشان دهنده این است که سویه‌های مختلف در تولید وزن زیست توده تازه اختلاف نشان دادند به نحوی که بهترین زیست توده تازه مربوط به سویه A4 و سپس Atcc-15834 به دست آمد که این نتیجه با مسیر بیوسنتزی گیاه نیز سنخیت دارد (جدول ۳).

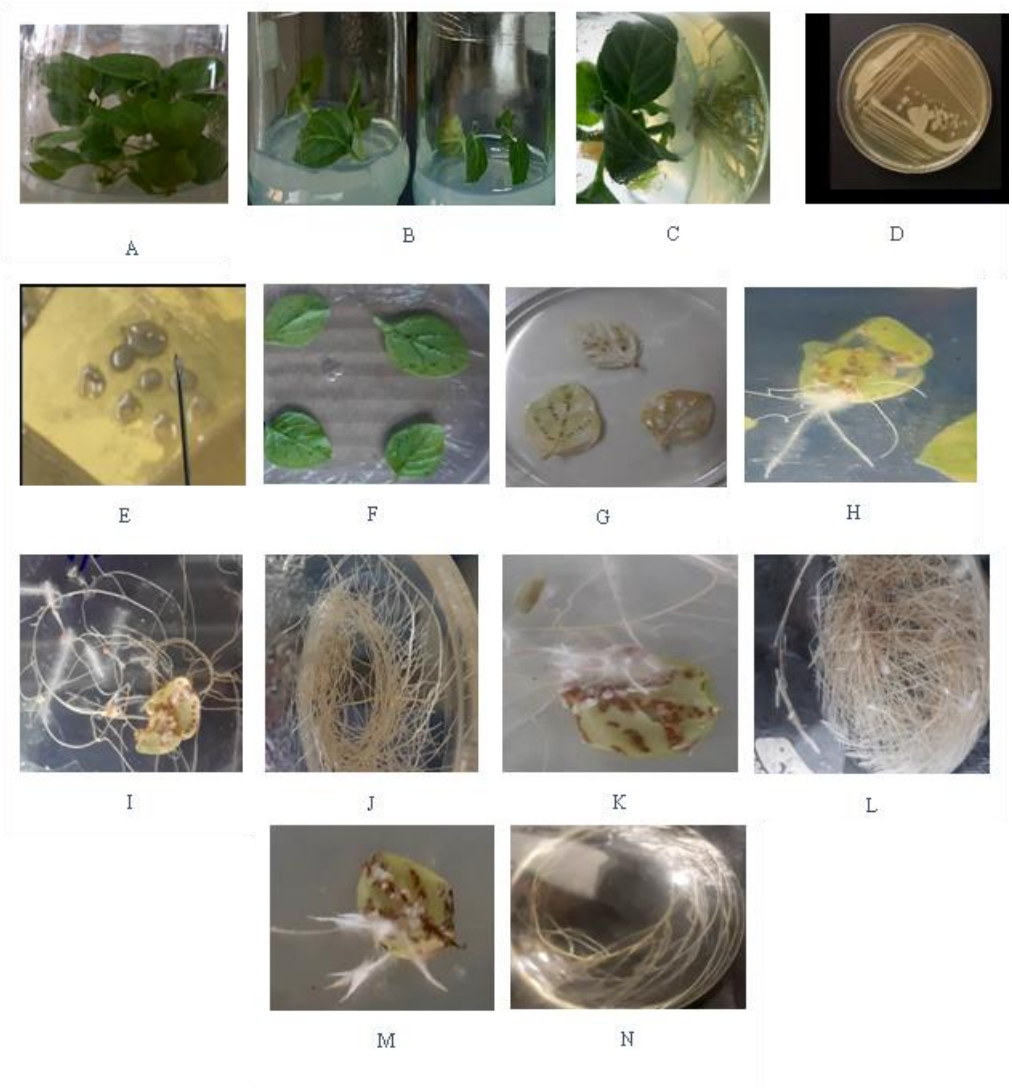
جدول ۲- نتایج القای ریشه مویین در سویه‌های مورد مطالعه در *Withania somnifera*

Table 2. The results of hairy root induction in the studied strains of *Withania somnifera*.

Average number of roots per sample	The percentage of hairy root formation induction	Total number of rooted samples	The total number of inoculated samples	Number of days until root emergence	Bacterial strains
leaf	leaf	leaf	leaf	leaf	
7.1[a]	66[c]	10[a]	15[a]	14-15	A4
4.7[b]	72[b]	8[b]	11[b]	15-16	Atcc-15834
3.7[b]	83[a]	10[a]	12[b]	16-18	R318

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

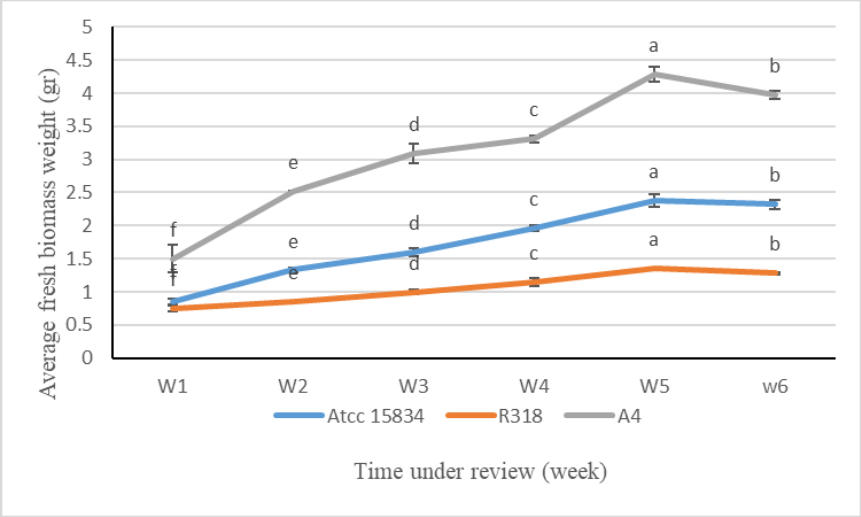


شکل ۱- مراحل مختلف القای ریشه مویین در گیاه دارویی جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* **A**: منبع گیاهی مورد استفاده **B**: Shoot tip culture **C**: منبع ریزنمونه **D**: باکتری کشت داده شده **E**: تک کلونی مورد استفاده برای تلقیح **F**: برگ‌های تلقیح شده با باکتری **G**: نمونه شاهد **H**: ریشه مویین ظاهر شده (سویهA4) **I**: ریشه‌های مویین رشد یافته (سویه A4) **J**: کشت ریشه‌های مویین (سویه A4) **K**: ریشه مویین ظاهر شده (سویهAtcc-15834) **L**: کشت ریشه‌های مویین (سویهAtcc-15834) **M**: ریشه مویین ظاهر شده (سویه R318) **N**: کشت ریشه‌های مویین (سویه R318).

Figure 1. Different stages of hairy root induction in Indian ginseng medicinal plant *(Withania somnifera)* A: Plant source used B: Shoot tip culture C: explant source D: Cultured bacteria E: Single colony used for inoculation F: Leafs Inoculated with bacteria G: Control sample H: Appeared hairy roots (A4 strain) I: Grown hairy roots (A4 strain) J: Cultivation of hairy roots (A4 strain) K: Appeared hairy roots (Atcc-15834 strain) L: cultivation of hairy roots (Atcc- 15834 strain) M: Appeared hairy roots (R318 strain) N: Cultivation of hairy roots (R318 strain).

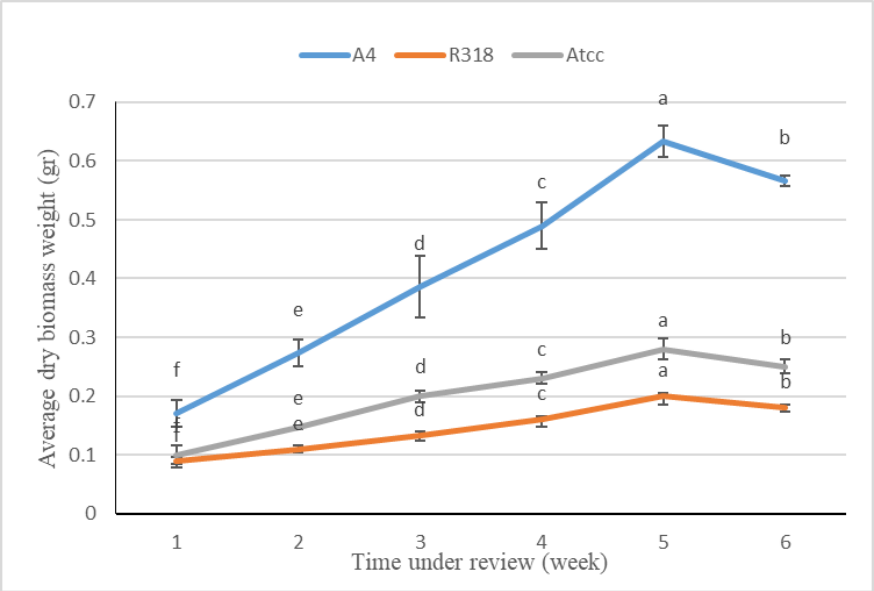
آنالیز نرمال بودن داده‌ها انجام شد و داده‌ها نرمال بودند. نتایج تجزیه واریانس وزن زیست توده خشک نیز نشان داد بین تکرارهای مختلف اختلاف بین سویه‌ها در زمان‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود اما در بین خود سویه‌های مورد بررسی، زمان‌های مورد بررسی و اثر متقابل سویه و زمان معنی‌دار بود. این اختلاف نشان دهنده این است که سویه‌های مختلف در تولید وزن زیست توده خشک اختلاف نشان دادند به نحوی که بهترین زیست توده خشک مربوط به سویه A4 و سپس Atcc-15834 به دست آمد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین بین سویه‌های مختلف در زمان-های مختلف در شکل‌های ٤ و ٥ نشان داده شده است. تأیید مولکولی ریشه‌های مویین در شکل ٦ آورده شده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]



شکل ۲- مقایسه میزان رشد بر اساس تجمع زیست توده تر ریشه‌های موین در سویه‌های (A4, Atcc-15834, R318) در گیاه دارویی *Withania somnifera*. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد با ۳ تکرار نشان داده شده اند.

Figure 2. Comparison of the growth rate based on the biomass accumulation of hairy roots in strains (A4, Atcc-15834, R318) in the medicinal plant *Withania somnifera*. Data are shown as mean ± standard error with 3 replicates.



شکل ۳- مقایسه میزان رشد بر اساس تجمع زیست توده خشک ریشه‌های موین در سویه‌های (A4, Atcc-15834, R318) در گیاه دارویی *Withania somnifera* داده ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد با ۳ تکرار نشان داده شده اند.

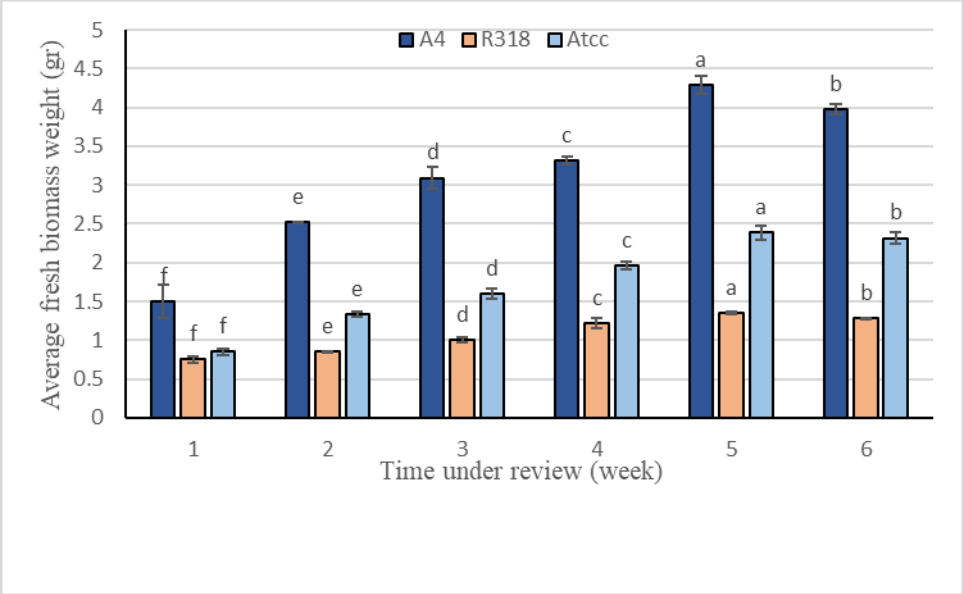
Figure 3. Comparison of growth rate based on dry biomass accumulation of hairy roots in strains (A4, Atcc-15834, R318) in medicinal plant *Withania somnifera*. Data are shown as mean ± standard error with 3 replicates.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس مطالعه الگوی رشد ریشه‌های موین حاصل از القای سویه‌های (A4, Atcc-15834, R318) در گیاه دارویی *Withania somnifera*.

Table 3. The results of the analysis of variance of the study of the growth pattern of hairy roots resulting from the induction of strains (A4, Atcc-15834, R318) in the medicinal plant *Withania somnifera*.

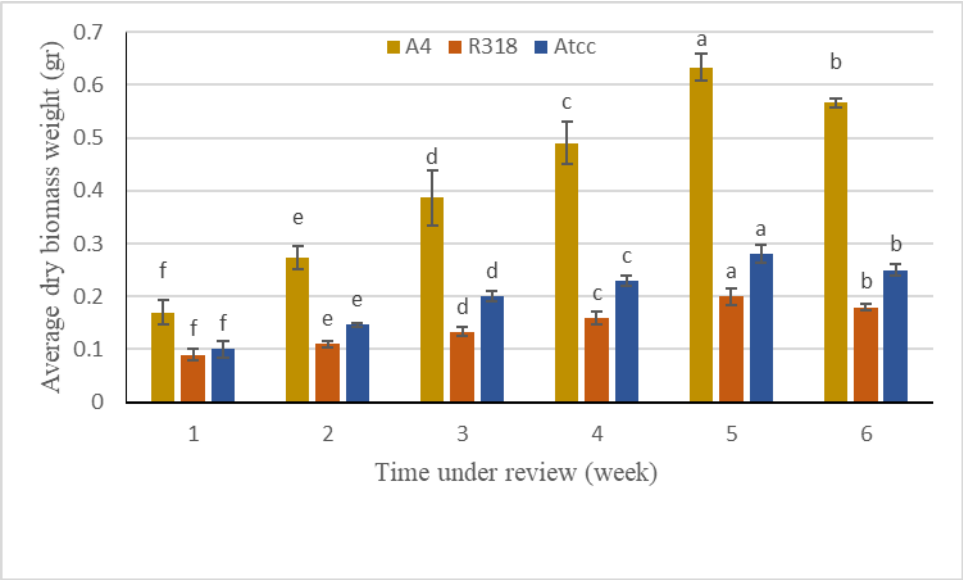
Fresh biomass weight	Dry biomass weight	Degrees of freedom	Source of variation
3.40181**	0.08189**	5	Time
19.49236**	0.3789**	2	Strain
0.46373**	0.01561**	10	Strain×Time
0.64837**	0.04536**	34	Error
6.98	14.29	-	Coefficient of variation

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]



شکل ٤- مقایسه زیست توده تر سویه‌های (A4, Atcc-15834, R318) در گیاه دارویی *Withania somnifera* در زمان‌های مورد بررسی. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد با ۳ تکرار نشان داده شده اند.

Figure 4. Comparison of the biomass of the strains (A4, Atcc-15834, R318) in the medicinal plant *Withania somnifera* in the studied times. Data are shown as mean ± standard error with 3 replicates.

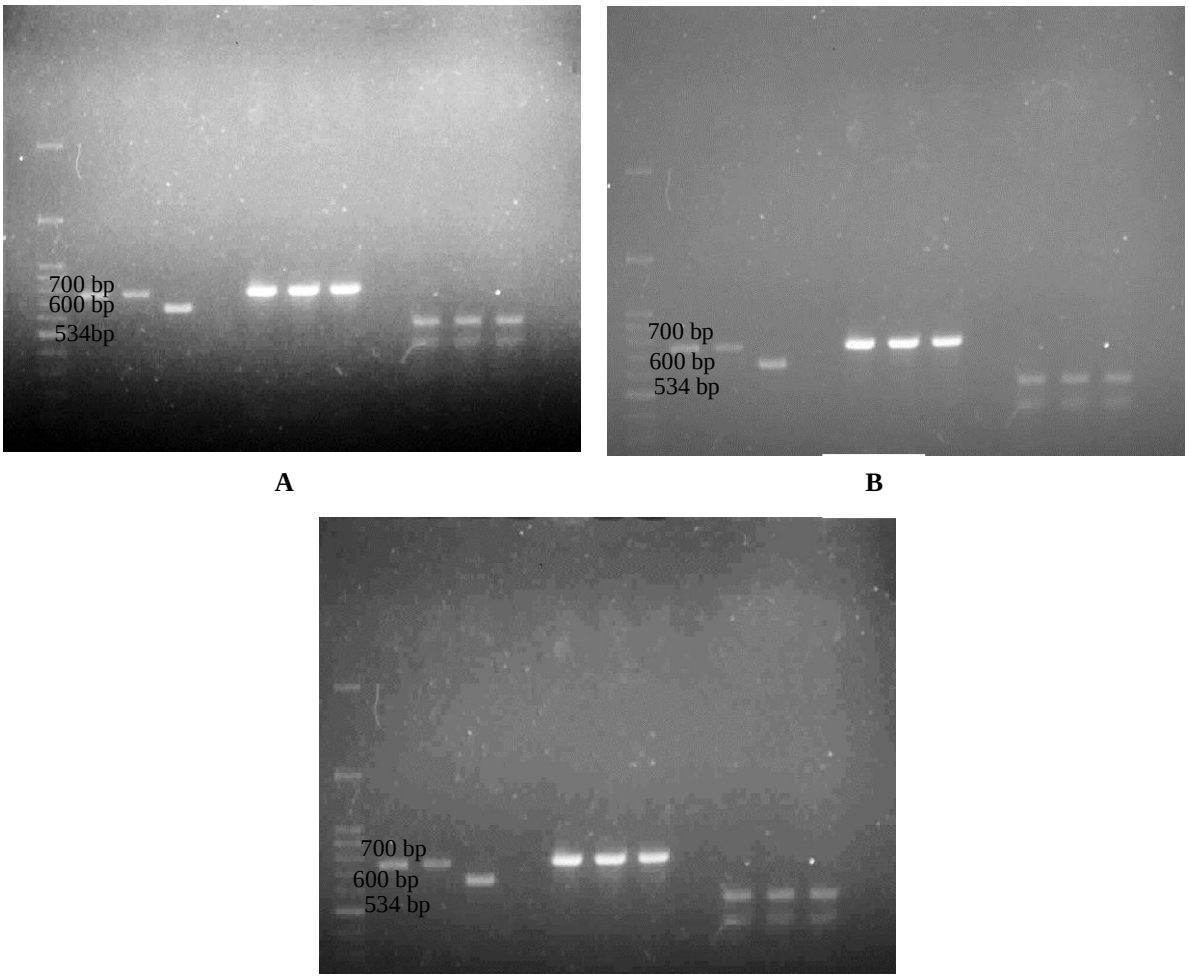


شکل ٥- مقایسه زیست توده خشک سویه‌های (A4, Atcc-15834, R318) در گیاه دارویی *Withania somnifera* در زمان‌های مورد بررسی. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد با ۳ تکرار نشان داده شده اند.

Figure 5. Comparison of the dry biomass of the strains (A4, Atcc-15834, R318) in the medicinal plant *Withania somnifera* in the studied times. Data are shown as mean ± standard error with 3 replicates.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]



شکل ٦- A: تأیید تراریختی سویه باکتری A4 با ژن‌های *rolA, rolB, rolC* B : تأیید تراریختی سویه باکتری R318 با ژن‌های *rolA, rolB, rolC*
C: تأیید تراریختی سویه باکتری Atcc-15834 با ژن‌های *rolA, rolB, rolC* .کنترل منفی گیاه غیر تراریخت در نظر گرفته شده است. (سایز مارکر ۱۰۰-۳۰۰۰ جفت باز)

Figure 6. A: Transgenic confirmation of A4 bacterial strain with *rolA, rolB, rolC* genes B: Transgenic confirmation of R318 bacterial strain with *rolA, rolB, rolC* genes C: Transgenic confirmation of Atcc-15834 bacterial strain with *rolA, rolB, rolC* genes. The negative control is considered to be a non-transplanted plant. (marker size 100-3000 bp).

تولید متابولیت‌های ثانویه به صورت گسترده در ریشه‌های موین مورد بررسی قرار گرفته است. این متابولیت‌ها شامل ترکیباتی مانند آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها (Barba spin et al., 2020)، فلاونوئیدها، جین‌سنوزیدها، فنولیک‌ها، استیلبن‌ها، لیگنان‌ها و ترپنوئیدها هستند (Wawrosch and Zotchev, 2021). بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بهترین زمان القای ریشه موین در روز پانزدهم و با سویه A4 به دست آمد ولی درصد القای ریشه موین در دو سویه R318 و Atcc-15834 بالاتر بود. در یک تحقیق روی گیاه شاه اسپرم *(Tanacetum balcamita)* ریزنمونه-های مختلف عکس‌العمل‌های متفاوتی نسبت به القای ریشه توسط اگروباکتریوم سویه A4 نشان دادند و تولید ریشه‌های القا شده برای هر ریزنمونه به صورت معنی‌داری متفاوت بود (Maroufi and Majdi, 2015). در آزمایشی دیگر اثر متقابل عوامل مورد بررسی بر روی صفات روز تا القای ریشه موین، درصد القای ریشه موین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه، معنی‌دار بوده است. ظهور ریشه‌های موین در ترکیب تیماری ریزنمونه کوتیلدون تلقیح شده با Atcc-15834 سریعتر از سایر ترکیبات تیماری مورد مطالعه بود. بیشترین درصد القا و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

ظهور ریشه موین، وزن تر و خشک آن در ترکیب تیماری سویه Atcc-15834 و ریزنمونه کوتیلدون حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (Mahmoudi et al., 2023). در بررسی انجام شده روی گیاه زنیان بهترین سویه‌ها برای القای ریشه موین در این گیاه سویه-های A4 (۱۰ درصد) و Atcc-15834 (۵۰ درصد) تعیین شدند (Moradi et al., 2022). در یک بررسی برای القای ریشه موین در عروسک پشت پرده اثر پنج سویه *Agrobacterium rhizogenes* شامل GM، C58، A4، MSU و 15834 و ریزنمونه‌های برگ و ساقه مطالعه شد. بیشترین درصد تراریختی مربوط‌به ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه-های A4، MSUو 15834 بود. ریزنمونه‌های برگ با تولید ٦/٥ ریشه موین به ازای هر ریز نمونه نسبت به ریزنمونه‌های ساقه (۹/۲ ریشه موین به‌ازای هر ریز نمونه) عملکرد بهتری داشتند (Aziz-khajeh et al., 2018).بر اساس نتایج این تحقیق رخداد-های ریشه موین به دست آمده از سویه A4 در گیاه جنسینگ هندی هم رشد بهتر و هم خصوصیات موفولوژی بهتری را نشان دادند و در مطالعه الگوی رشد سویه‌ها در زمان‌های مورد بررسی وزن زیست توده تر و خشک بالاتری را هم نشان دادند. با توجه به مسیر بیوسنتزی گیاه این امر نشان دهنده این است که اگروباکتریوم سویه A4 با مسیر بیوسنتزی گیاه بهتر واکنش نشان داده و هم تعداد ریشه موین بالاتری را تولید می‌کند و هم سرعت رشد ریشه‌های موین تولید شده با این سویه نسبت به سویه‌های مورد مطالعه بالاتر است. این نتیجه با نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های حاصل از وزن خشک و تر به دست آمده مطابقت دارد. بنابراین سویه A4 به عنوان بهترین سویه برای تولید ریشه موین در جنسینگ هندی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران و پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی که امکانات لازم برای انجام این پروژه را در اختیار گذاشتند تشکر و قدردانی می-گردد.

منابع

Abou-Douh, A.M. (2002). New withanolides and other constituents from the fruit of *Withania somnifera*, Medicinal Chemistry, 6: 267-276. doi:10.1002/1521-4184(200208)335.

Archana, R., Namasivayam, A. (1999**).** Antistressor effect of *Withania somnifera*. Journal of Ethnopharmacology, 64: 91-93. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00107-X.

Arora, S., Dhillon, S., Rani, G., & Nagpal, A. (2004). The in vitro antibacterial/synergistic activities of *Withania somnifera* extracts. Fitoterapia, 75: 385-388. doi:10.1016/j.fitote.2004.01.002.

Atta-Ur-Rahman, Shabbir.M., Yousaf, M., Qureshi, S., Shahwar, D., Naz, A., & Choudhary, I. (1999). Three withanolides from *Withania coagulans*, Phytochemistry, 52: 1361-1364. doi:10.1016/S0031-9422(99)00416-1.

Atta-Ur-Rahman, Shahwar. D., Naz, A., & Choudhary, I. (2003). Withanolides from *Withania coagulans*, Phytochemistry, 63: 387-390. doi:10.1016/S0031-9422(02)00727-6.

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 (1) :33-40 dor: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.2.1.

Baldi, A., Singh, D., & Dixit, V.K. (2008). Dual elicitation for improved production of withaferin A by cell suspension cultures of *Withania somnifera*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 151: 556-564. doi: 10.1007/s12010-008-8231-2.

Bandyopadhyay, M., Jha, S., & Tepfer, D. (2007). Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. Plant Cell. 599–609. doi: 10.1007/s00299-006-0260-0.

Barba-Espín, G., Chen, S.T., Agnolet, S., Hegelund, J.N., Stanstrup, J., & Christensen, J.H. (2020). Ethephon-induced changes in antioxidants and phenolic compounds in anthocyanin-producing black carrot hairy root cultures. J. Exp. Bot. 7030–7045. doi: 10.1093/jxb/eraa376.

Bigdeli, M., Sadat-Noori, S.A., Izady-Darbandi, A., Lotfi, M., & Bahmankar, M. (2021). Optimizing the induction of hairy roots in the medicinal plant broccoli. The 12th National Conference and the 4th International Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran. (In Persian with English abstract).

Estaki, M., & Davazdah-emami, S. (2012). JinSing, the secret of immortality, health and intelligence. Nosooh. P:224. (In Persian). doi: 615.32384.

Hasanlou, T., Rezazadeh, S.h., & Rahnema, H. (2008). Hairy roots are a source for the production of medicinal compounds. Journal of Medicinal Plants. dor: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.1.2.

Jayaprakasam, B., Zhang, Y., Seeram, N., & Nair, M. (2003). Growth inhibition of tumor cell lines by withanolides from

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]

Withania somnifera leaves. Life Science, 74:125-132. doi: 10.1016/j.lfs.2003.07.007.

Kapoor, L.D. (2001). Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC Press, London, UK, pp. 337-338. doi:10.1201/9780203719473.

Kim, S., Yu, J.S., Lee, J.Y., Choi, S.U., Lee, J., & Kim, K.H. (2019). Cytotoxic withanolides from the roots of Indian Ginseng *(Withania somnifera).* J. Nat. Prod. 82, 765–773. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00665.

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) dor: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8.

Majumdar, S., Garai, S., & Jha, S. (2011). Genetic transformation of Bacopa monnieri by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant Cell Reports 30(5):941-954. doi:10.1007/s00299-011-1035-9.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA. doi: 10.1016/0307-4412(83)90068-7.

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. dor: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.2.2.

Mirjalili, M.H., Fakhr-Tabatabaei, S.M., Alizadeh, H., Ghassempour, A., & Mirzajani, F. (2009). Genetic and withaferin A analysis of Iranian natural populations of *Withania somnifera* and W. coagulans by RAPD and HPTLC. Natural Product communications, 4: 337-346. doi:10.1177/1934578X0900400307.

Mirjalili, M.H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M., & Palazon, J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. Molecules, 14: 2373-2393. doi: 10.3390/molecules14072373.

Mirzajani, F., Ghassempour, A., Jalali-Heravi, M., & Mirjalili, M.H. (2010). Optimisation of a microwave-assisted method for extracting withaferin A from *Withania somnifera* Dunal. using central composite design, Phytochemical Analysis, 21 (6). 544-549. doi:10.1002/pca.1230.

Mishra, L.C., Singh, B.B., Dagenais, S. (2000). Scientific basis for therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. Alternative Medicine Review, 5: 334-346. PMID: 10956379.

Moradi, N., Sadat-Noori, S.A., Fadavi, A., Mortazavian, S.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.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15 (3), 473–497. doi:10.1111/ j.1399 3054.

Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B., Hahn, E.J., & Paek, K.Y. (2008). Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. Journal of Integration and Plant Biology. 975-81. doi:10.1111/j.1744-7909.

Owais, M., Sharad, K.S., Shehbaz, A., & Saleemuddin, M. (2005). Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. Phytomedicine, 12: 229-235. doi: 10.1016/j.phymed.2003.07.012

Rai, M., Jogee, P.S., Agarkar, G., Dos-Santos, C.A. (2016). Anticancer activities of *Withania somnifera*: Current research, formulations, and future perspectives. Pharm. Biol. 54. 189–197. doi: 10.3109/13880209.2015.1027778.

Sangwan, R.S., Chaurasiya, N.D., Lal, P., Misra, L., Uniyal, G.C., Tuli, R., & Sagwan, N.C. (2007). Whitanolide A bioregeneration in in vitro shoot cultures of Ashwagandha *(Withania somnifera* Dunal*)*, a main medicinal plant in Ayurveda. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 55: 1371–1375. doi: 10.1248/cpb.55.1371.

Tripathi, L., Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical J. of Pharmaceutical Res. 2: 243 - 53. doi: 10.4314/tjpr.v2i2.14607.

Wawrosch, C., & Zotchev, S.B. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies-status and outlook. Appl Microbiol Biotechnol. 105(18):6649-6668. doi: 10.1007/s00253-021-11539-w.

Yousefian, Z., Hosseini, B., Rezadoost, H., Palazón, J., & Mirjalili, M.H. (2018). Production of the anticancer compound withaferin a from genetically transformed hairy root cultures of *Withania somnifera*. Natural Product Communications.13(8): 1934578X1801300806. doi:10.1177/1934578X1801300806.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.184]