



بهینه‌سازی القای ریشه موئین در گیاه دارویی بیلهر (*Dorema aucheri*) با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* برای تولید متابولیت‌های ثانویه

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

فاطمه جودکی^۱، سید احمد سادات نوری^{۲*}، سید محمد مهدی مرتضویان^۳، فاطمه امینی^۴، مهدی محمودی^۵

Fatemeh Jodaki¹, Seyed Ahmad Sadat-Noori^{2*}, Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian³, Fatemeh Amini⁴, Mahdi Mahmoudi⁵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، ۲- استادیار، ۳- دانشیار، ۴- استادیار، ۵- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد

گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

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

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: noori@ut.ac.ir

noori@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۵/۱۳)

Received: 2024/11/29 | Accepted: 2025/03/10 | Published: 2025/08/04

Abstract

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

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

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

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

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

خلاصه

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

کلیدواژه ها: *اگروباکتریوم ریزوژنز*، بیلهر، ریشه موئین، متابولیت های ثانویه

مقدمه

Introduction

بیلهر با نام علمی *Dorema aucheri*، یک گیاه دارویی چندساله از خانواده چتریان (*Apiaceae*) است (Yazdi et al., 2015). این گیاه بومی ایران بوده و عمدتاً در خاک های شنی یا در زیستگاه هایی از شیب دار تا مناطق مسطح رشد کرده و در اوایل فصل بهار در مناطق سردسیر کوهستانی استان های اصفهان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد ایران می روید (Ajani & Bockhoff-Claßen, 2021). بیلهر گیاهی دیپلوئید با تعداد کروموزوم $2n=22$ است (Akhavan Roofigar et al., 2023). گیاه بیلهر به نام های کندل کوهی و زو نیز شناخته می شود.

خواص متعدد و زیادی برای این گیاه ذکر شده که از جمله مهم ترین آن ها می توان به خواص آنتی اکسیدانی، ضد سرطان، اثر محافظتی بر روی کبد، خلط آور، ضد اسپاسم (گرفتگی عضلات)، محافظت کننده عصبی، ضد فشارخون، ضد دیابت، کاهش دهنده چربی خون و ضد کلسترول اشاره کرد. همچنین برگ های این گیاه به عنوان یک عامل ضد انگلی برای دستگاه گوارش استفاده می شوند و ریشه ی آن برای درمان سوختگی به کار می رود (Ahangarpour et al., 2014). اجزای فعال عصاره ی گیاه بیلهر شامل اسانس، رزین، کومارین ها، فورانو کومارین ها، انواع ترین ها و فلاونوئیدها است. همچنین مقدار کمی آلکالوئید نیز در این گیاه وجود دارد (Etebari et al., 2016). یکی از اصلی ترین مواد مؤثره این گیاه، ماده ی کومارین است که ترکیبات شیمیایی در کلاس بنزوپیرون از ترکیبات آلی هستند و دارای خواص بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد دیابتی هستند. کومارین به عنوان یک دارو برای درمان لنف ادم (Lymphedema) با پروتئین بالا و بهبود گردش خون ویریدی استفاده می شود و در آزمایشات بالینی به عنوان یک ضد نئوپلاستیک مورد استفاده قرار گرفته است (Zibae et al., 2020).

به دلیل رشد جمعیت، ناپایداری شرایط اقلیمی و کاهش مساحت های اکوسیستم های طبیعی، لازم است که از رویکردهای مدرن بیوتکنولوژیکی برای به دست آوردن متابولیت های ثانویه با بهره روری بالا استفاده شود (Stepanova et al., 2022). امروزه تولید متابولیت های ثانویه در شرایط درون شیشه ای از طریق کشت بافت گیاهی امکان پذیر است. به منظور افزایش متابولیت های ثانویه از جمله کومارین، کشت

ریشه موین یک گزینه مناسب می باشد (Kubica et al., 2020). ریشه های موین از طریق آلوده کردن سلول های گیاهی توسط آگروباکتریوم رایزوژنز (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) تشکیل می شوند. این آنکوژن ها فرآیندهای سلولی گیاه را مانند تعادل فیتوهورمون ها، متابولیسم اکسین و سیتوکینین و سیگنال دهی تعدیل می کنند. این ریشه ها قادراند ترکیباتی که حتی در گیاه وجود ندارند را سنتز کنند (Paolis et al., 2019). ریشه های موین دارای پایداری ژنتیکی بالایی در طول دوره کشت هستند و از طرفی رشد سریع، نگهداری آسان و توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی را دارا می باشند که این ویژگی ها آن ها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت های ثانویه ارزشمند تبدیل کرده است. ریشه های موین برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی ارزشمند می باشند. ریشه های موین سازوکارهای بیوشیمیایی و فعال در ریشه های طبیعی را تقلید کرده و حتی مقادیر بالاتری از آن ها را نشان می دهند. بنابراین، این ریشه ها ابزار قدرتمندی برای انجام تحقیقات به منظور افزایش میزان تولید متابولیت های دارویی با ارزش محسوب می شوند (Stepanova et al., 2022). با توجه به بررسی های صورت گرفته، تاکنون در ایران و جوامع بین المللی مطالعاتی درباره القای ریشه موین در گیاه دارویی بیلهر گزارش نشده است. در این تحقیق، القای ریشه موین در گیاه دارویی بیلهر (*Dorema aucheri*)، با دو سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز انجام شد که در آن صفت های درصد القا، وزن تر و وزن خشک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

Materials and Methods

بذر بیلهر از شرکت پوپونیک تهران خریداری شد. به منظور ضدعفونی کردن بذرها از محلول اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و محلول ۱/۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن، در زیر هود استریل استفاده شد. پس از ضدعفونی، بذرها استریل را به منظور تولید گیاهچه های سترون جهت تهیه ریزنمونه، در محیط کشت MS از عناصر میکرو و ماکرو به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۸ گرم در لیتر آگار، pH= ۵.۸ و بدون هورمون کشت شدند. ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای 24 ± 2 درجه سانتی گراد و شدت نور ۳۰۰۰ LUX با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از ۴۰ روز بذرها جوانه زدند و بعد از گذشت یک ماه برای انجام تلقیح از قسمت های مختلف گیاهچه های سترون (هیپوکوتیل، ساقه و برگ)، ریز نمونه تهیه شد.

آماده سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه ها

در این تحقیق، دو سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC-15834 و A4) مورد مطالعه قرار گرفت. کشت باکتری در محیط های LB مایع حاوی ۷۵ میلی گرم بر لیتر ریفامپسین انجام و در دمای ۲۸ درجه و دور ۱۸۰ در دقیقه داخل شیکر انکوباتور قرار گرفتند. OD₆₀₀ محلول باکتری به وسیله دستگاه اسپکتوفوتومتری اندازه گیری و این پارامتر بین ۰/۶ تا ۰/۸ تنظیم و با این محلول ریزنمونه ها تلقیح شدند. ریزنمونه های کوتیلدون، ساقه و برگ با اندازه تقریبی یک سانتی متر پس از زخم سطحی به مدت ۸ دقیقه داخل سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. ریزنمونه های تلقیح شده به منظور دفع رطوبت اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شده و سپس به محیط همکشتی منتقل و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، ریزنمونه ها از محیط همکشتی خارج و به محیط های MS دارای آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر انتقال داده شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه ها صورت گرفت. برای تهیه نمونه های شاهد، تعدادی ریزنمونه به مدت زمان مشابه در آب مقطر استریل قرار گرفته و سپس در شرایط کاملاً مشابه کشت و نگهداری شدند. در هر پلیت، ۱۰ ریزنمونه کشت شد و سه تکرار (پلیت) برای هر ترکیب تیماری در نظر گرفته شد. ظروف کشت در اتاق رشد با دمای 24 ± 2 درجه سانتی گراد و شدت نور ۳۰۰۰ LUX با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

استقرار و نگهداری ریشه‌های موین درون شیکر انکوباتور

زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود ۴-۳ سانتی متری رسید، در هر ترکیب تیماری و در هر تکرار، ۵ کلون برتر که رشد بیشتری داشتند، جدا و به درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت MS/2 مایع منتقل و در تاریکی و دمای 24 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با دور ۹۰rpm قرار گرفته و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از گذشت حدود دو ماه، وزن‌تر و خشک ریشه‌ها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. بازدهی تولید ریشه به صورت میزان تولید ماده خشک بر حسب گرم در هر تیمار محاسبه شد.

استخراج DNA و آنالیز PCR

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

Reverse TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC و Forward ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA

چرخه‌ی PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ۵ دقیقه)، واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۵ چرخه به مدت ۱ دقیقه)، اتصال در ۵۶ 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 الکتروفورز محصولات PCR، ژل آگارز ۰/۹ درصد با استفاده از بافر TAE تهیه شد. دستگاه الکتروفورز مدل RAD-BIO با ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت ۱/۵ ساعت استفاده شد. جهت مشاهده باندها از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد استفاده و برای ثبت نتایج توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

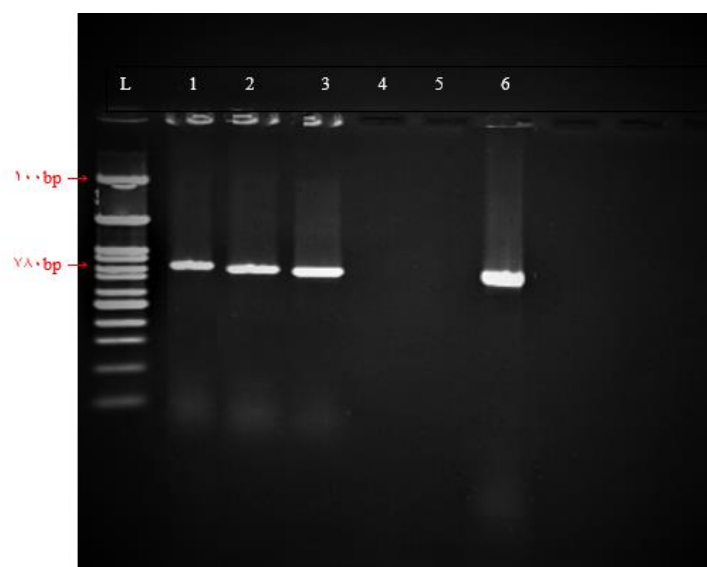
این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار (۱۰ ریزنمونه در هر تکرار) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با سه سطح (هیپوکوتیل، ساقه و برگ) و سویه باکتری با دو سطح (ATCC-15834 و A4) بودند. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار R نسخه‌ی ۴.۲.۱ استفاده شد و گروه‌بندی میانگین‌ها با روش LSD انجام گرفت.

Results and Discussion

نتایج و بحث

تایید تراریختی ریشه‌های موین

در این مطالعه، نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز منجر به تکثیر قطعاتی با طول حدود ۷۸۰bp شده بود که تقریباً با باند کنترل مثبت (باکتری) هم اندازه بود، اما برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته نواری تکثیر نشد (شکل ۱). بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های موین در گیاه دارویی بیلهر با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* تایید شد.



شکل ۱- تجزیه و تحلیل PCR قطعه ۷۸۰bp ژن *rolB* تهیه شده از شرکت سیناژن کرج. نوارهای ۱، ۲ و ۳ مربوط به سه نمونه از ریشه‌های موئین القا شده، نوارهای ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به آب و ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ۶ مربوط به پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، نوار L مربوط به لدر ۱۰۰bp.

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

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

القای ریشه موئین

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

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

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

درصد القای ریشه موین

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

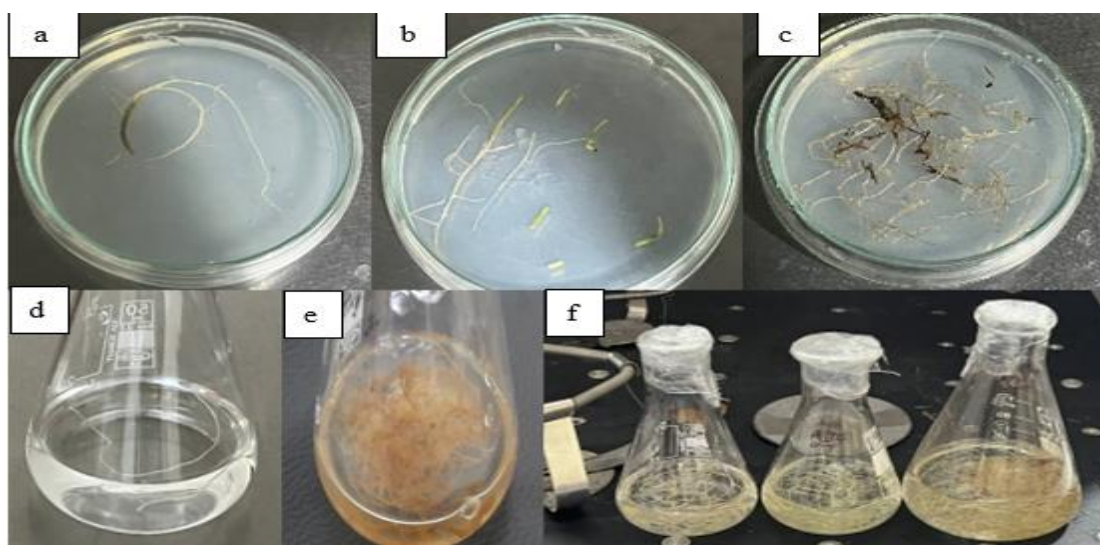
جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر متقابل سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی صفات اندازه‌گیری شده

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

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

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



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

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

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

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

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

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

وزن تر و خشک ریشه موئین

نتایج نشان داد که وزن تر ریشه‌های موئین پس از دو ماه، به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. مقایسات میانگین حاکی از آن بود که بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه از نظر وزن تر ریشه موئین تفاوت معنی‌داری وجود داشته به طوری که بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین در ترکیب سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول ۱). بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن تر ریشه موئین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در حالی که در برش‌دهی اثر متقابل که بین سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از سویه باکتری است، نتایج حاکی بر آن بود که بین سویه باکتری A4 و ریزنمونه‌های ساقه و برگ از نظر وزن تر ریشه موئین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). پژوهشگران معتقدند که اختلاف در میزان رشد ریشه‌های موئین و بیوماس آن‌ها مربوط به تنوع پلاسمیدهای وارد شده توسط سویه‌های مختلف باکتری است که به چگونگی تاثیر ژن‌های rol مربوط می‌شود. بیان این ژن‌ها سطح هورمون‌های اکسین و سیتوکینین گیاه میزبان و نیز میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطح هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهند (Tiwari et al., 2007). در آزمایشی که بر روی گیاه *Justicia*

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

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

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

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

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

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

جدول ۴- مقایسه میانگین حاصل از برش دهی اثر ریزنمونه در سطوح مختلف سویه باکتری بر روی صفات اندازه گیری شده

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

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

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

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

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

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

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

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

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

References

منابع

- Ajani, Y., & Claßen-Bockhoff, R. (2021). The unique inflorescence structure of *Dorema aucheri* (Apiaceae): an adaptation to the arid environment. *Journal of Arid Environments*, 184, 104-194. doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104194
- Ahangarpour, A., Zamaneh, H. T., Jabari, A., Nia, H. M., & Heidari, H. (2014). Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Dorema aucheri* hydroalcoholic leave extract in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes in male rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(10), 808.14 doi.org/10.22038/ijbms.2014.1428 [In Persian]
- Akhavan Roofigar, A., Khazaei, Z., Asadi-Corom, F., & Jalili, A. (2023). Chromosome numbers and karyotype features of eight species of Apiaceae in Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 29(1), 73-77. doi.org/10.22092/ijb.2023.362115.1408 [In Persian]
- Dorani, E., & Aharizad, S. (2018). Effects of Agrobacterium rhizogenes strains and explants on induction of hair root in *Physalis alkekengi*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 7(1), 33-40. doi.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.1.2.1 [In Persian]
- Cheng, Y., Wang, X., Cao, L., Ji, J., Liu, T., & Duan, K. (2021). Highly efficient Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods*, 17, 1-12. doi.org/10.1186/s13007-021-00778-7
- Etebari, M., Sajjadi, S. E., Jafarian-Dehkordi, A., & Nazmakanipour, S. (2016). Genotoxicity evaluation of hydroalcoholic and aqueous extracts of *Dorema aucheri* by the comet assay. *Advanced biomedical research*, 27(5), 199. PMID: 28217637. doi.org/10.4103/2277-9175.194830

- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 1175-1185. doi:10.1007/s00253-007-0856-5
- Kubica, P., Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Miceli, N., Taviano, M. F., Maugeri, A., ... & Ekiert, H. (2020). Production of verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids in callus, suspension, and bioreactor cultures of *Verbena officinalis* and biological properties of biomass extracts. *Molecules*, 25(23), 5609. doi:10.3390/molecules25235609
- Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of biotechnology*, 128(3), 681-692. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.008
- Soltaninezhad, N., Sadat-Noori, S. A., Izady-Darbandi, A., Amini, F., & Mirjalili, M. H. (2023). Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using *Agrobacterium rhizogenes*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 12(2), 184-194. doi:20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8 [In Persian]
- Mahmoudi, M., Sadat-Noori, S.A., Ebrahimi, M., & Bahmankar, M. (2023). Optimization of induction of hairy roots in *Perilla*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*; 12 (1): 17-27. doi:20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8
- Majumdar, S., Garai, S., & Jha, S. (2011). RETRACTED ARTICLE: Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Reports*, 30(5), 941-954. doi:10.1007/s00299-011-1035-9
- Mirzaie Delbari, E., Vatandoost, J., Jami Moeini, M., & Kohan-Baghkheirati, E. (2022). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction in Different Explants of Alfalfa. *Applied Biology*, 35(3), 127-142. Doi: 10.22051/JAB.2021.34309.1398
- Moradi, N., Sadat Noori, S. A., Fadavi, A., Mortazavian, S. M. M., & Pakdin Parizi, A. (2021). Analysis efficiency of Iranian Ajowan ecotypes on hairy root production mediated by different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 10(1), 117-127. doi:10.30479/IJGPB.2022.17488.1325.
- Oksman-Caldentey, K. M., & Hiltunen, R. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field crops research*, 45(1-3), 57-69. doi:10.1016/0378-4290(95)00059-3
- Paolis, A. D., Frugis, G., Giannino, D., Iannelli, M. A., Mele, G., Rugini, E., ... & Caretto, S. (2019). Plant cellular and molecular biotechnology: following Mariotti's steps. *Plants*, 8(1), 18. doi:10.3390/plants8010018
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 125-134. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb.04573.x
- Stepanova, A. Y., Malunova, M. V., Gladkov, E. A., Evsyukov, S. V., Tereshonok, D. V., & Solov'eva, A. I. (2022). Collection of hairy roots as a basis for fundamental and applied research. *Molecules*, 27(22), 8040. doi.org/10.3390/molecules27228040
- Soltaninezhad, N., Sadat-Noori, S. A., Izady-Darbandi, A., Amini, F., & Mirjalili, M. H. (2023). Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using *Agrobacterium rhizogenes*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 12(2), 184-194. dx.doi.org/10.61186/gebsj.12.2.184 [In Persian]
- Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, 44, 643-652. doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.007
- Tiwari, R. K., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G. Q., & Zheng, G. C. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicoside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 26(2), 199-210. doi:10.1007/s00299-006-0236-0
- Wahyuni, D. K., Vidiandi, F., Purnobasuki, H., Ermayanti, T. M., Prajoga, B., & Utami, E. S. W. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in *Justicia gendarussa* Burm. f. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 5(4), 87-93. doi:10.1186/s13007-021-00778-7
- Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of *Dorema aucheri* (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, 6(1), 58-64. doi:10.22037/jps-v6i1.37295 [In Persian]
- Zibace, E., Amiri, M. S., Boghrati, Z., Farhadi, F., Ramezani, M., Emami, S. A., & Sahebkar, A. (2020). Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Dorema* species (Apiaceae): A review. *Journal of Pharmacopuncture*, 23(3), 91-123. doi:10.3831/KPI.2020.23.3.91