مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۷۶-۶۳

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

تولید ریشه‌های مویین در کاسنی با هدف افزایش متابولیت‌های ثانویه

Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production

رقیه فتحی، مهدی محب‌الدینی* و اسماعیل چمنی

Roghayeh Fathi, Mehdi Mohebodini*, Esmaeil Chamani

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران
Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.

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

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

چکیده

کشت ریشه‌های مویین روش موثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی می‌باشد زیرا ریشه‌های مویین از پایداری ژنتیکی و بیولوژیکی برخوردارند و قادر به تولید متابولیت‌ها در زمان کوتاه و بدون نیاز به هورمون می‌باشند. کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. از جمله گیاهان دارویی ارزشمند بوده و شامل ترکیبات دارویی مهمی می‌باشد. در این تحقیق، القای ریشه‌های مویین توسط *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌ی ATCC11325 انجام شد. در آزمایش اول تاثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر کارایی القای ریشه‌های مویین بررسی شد. در آزمایش دوم تاثیرلاین‌های مختلف ریشه‌های مویین بر میزان رشد ریشه‌ها بررسی شد. در آزمایش سوم تاثیر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (۱/۵ و ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز (٦ و ٥، ٤، ٣ درصد) بر میزان تجمع زیست‌توده بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۷۵/۵۵ درصد) و تعداد ریشه (۷/۲٦ ریشه در هر ریزنمونه) مربوط به ریزنمونه‌های کوتیلدون ٥ روزه است. همچنین معلوم شد که ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۳ و ٤ درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش وزن تر، خشک و شاخص رشد داشت. بیشترین محتوای فنول کل و همچنین فلاونوئید در طول موج ۲۷۰ نانومتر، در ریشه‌های مویین رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ٤ درصد ساکارز مشاهده شد در حالی که بیشترین میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر، در ریشه‌های مویین رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ٥ درصد ساکارز به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی

ژن *rol*B،
سن ریزنمونه،
متابولیت ثانویه،
نفتالین استیک اسید،
ریشه‌های مویین

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

مقدمه

کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. و از تیره‌ی *Asteraceae* می‌باشد که بسته به مناطق مختلف، به‌صورت یکساله، دوساله و چندساله رشد می‌کند. تقریباً تمام قسمت‌های این گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Vahabinia *et al*., 2019). برگ کاسنی شامل ترکیب‌های شیکورین، سولفات و فسفات‌های سدیم، منیزیم، پتاسیم و نیترات پتاسیم است. بعلاوه ریشه کاسنی دارای ۱۵-۱۱درصد اینولین، قندهای مختلف از قبیل گلوکز، فروکتوز و ساکارز، شیکورین، پکتین، لوولین، سسکویی‌ترپن‌لاکتون (Cova *et al*., 2019)، اسید تارتاریک، ویتامین و ترکیبات فنولی می‌باشد (Jayswal *et al*. 2011). گل‌های کاسنی حاوی ماده شیکورین می‌باشد (Velayutam *et al*. 2006). از ریشه این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی استفاده می‌شود (Yang, 2009). شیکوریک اسید به دلیل توانایی در مهار آنزیم HIV integrase فعالیت ضدویروس HIV دارد (Peng *et al*., 2019). ترکیب برگ و ریشه برای تقویت بنیه و تصفیه خون به‌ویژه در بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود (Velayutam *et al*. 2006). ترکیبات فنولی موجود در کاسنی از جمله هیدروکسی سینامیک اسید، شیکوریک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کافتاریک اسید، آپیژنین، کوئرستین، بنزوییک اسید، فلاونول، آنتوسیانین و گالیک اسید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی عمل می‌کنند (Carazzone *et al*., 2009; Heimler *et al*., 2013).

یکی از روش‌های مؤثر برای افزایش تولید متابولیت ثانویه در سیستم کشت بافت و تراریخته نمودن گونه‌های گیاهی، استفاده از سیستم ناقل اگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد (Nigutova *et al*., 2019). این باکتری جزو باکتری‌های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه‌ای و گاهی گیاهان تک‌لپه‌ای را آلوده می‌کند (Zafar *et al*., 2019) و منجر به تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود. سلول‌های ریشه‌های مویین حامل قطعه‌ی T-DNA پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته‌ای خود می‌باشند (Hakkinen and Oksman-Caldentey, 2018). عوامل متعددی در فرآیند تراریخت کردن گیاهان با اگروباکتریوم رایزوژنز مؤثر است. این عوامل شامل ژنوتیپ گیاه، شرایط تلقیح، نوع و سن ریزنمونه‌ی گیاهی، نوع و ترکیبات محیط کشت می‌باشند (Gelvin, 2000). ریشه‌های مویین توانایی بی‌نظیری در رشد در شرایط درون‌شیشه‌ای در غیاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را دارند (Ramachandra & Ravishancar, 2007). از این ویژگی‌های رشدی می‌توان برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی و بررسی نقش ژن‌ها استفاده کرد (Parr, 2016). در تحقیقی میزان رشد و تولید متابولیت ثانویه در ریشه‌های مویین حاصل از سویه LMG 150 اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه کاسنی بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که این تیمار باعث افزایش ۱/۵۷ برابری رشد ریشه تراریخت نسبت به ریشه غیرتراریخت می‌شود. همچنین تولید متابولیت ثانویه ٤/٠٦ برابر ریشه غیرتراریخت گزارش شد (Bais *et al*., 2000). همچنین در مطالعه دیگری تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر روی رشد و تولید متابولیت ثانویه ریشه‌های مویین کاسنی بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که جیبرلین در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تنظیم‌کننده برای افزایش رشد ریشه‌ها و متابولیت ثانویه است (Bais *et al*., 2001). برای تعیین بهترین سویه‌ی اگروباکتریوم رایزوژنز به‌منظور ایجاد ریشه مویین در گیاه کاسنی و بهینه‌سازی محیط کشت، ریزنمونه‌ی کوتیلدونی با سویه‌های A4، A13 و ATCC15834 اگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح شد. همچنین از سه نوع محیط کشت مختلف MS، LS و B5 به‌عنوان محیط هم‌کشتی استفاده کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که اگروباکتریوم قادر به القای ریشه مویین بوده و در بین محیط‌های کشت مختلف، MS بالاترین کارآیی را در رشد ریشه‌ها نشان داد. همچنین میزان ترکیبات فنولی در کلون‌های القاء شده توسط سویه‌های A_4 و A13 افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته‌اند. اما در ریشه‌های القاء شده توسط سویه ATCC15834 کاهش ترکیبات فنولی مشاهده شد (Kabirnotaj *et al*., 2012). نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده‌است که استفاده از الیسیتورها می‌تواند نقش موثری در افزایش رشد ریشه‌های مویین و تولید متبولیت‌های ثانویه داشته‌باشد (Park *et al*., 2017). الیسیتورهای هورمونی از جمله NAA و متیل‌جاسمونات در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

محیط کشت مایع باعث افزایش تولید زیست‌توده و ترکیبات دارویی ریشه‌های مویین شده‌اند (Linh *et al.*, 2019). در پژوهشی تاثیر اکسین‌ها به‌عنوان محرک رشد ریشه‌های مویین گیاه کاسنی، مثبت و موثر ارزیابی شده و توانایی جذب هورمون توسط ریشه‌های مویین تراریخت بیشتر از ریشه‌های غیر تراریخت گزارش شد (Fathi *et al.*, 2018). در آزمایشی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد را بر روی رشد ریشه‌های مویین بررسی کرده و گزارش کردند که نفتالین استیک اسید (NAA) بیشترین تاثیر را در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین گیاه *Plumbago indica* نسبت به جیبرلیک اسید (GA_3)، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) داشته است (Gangopadhyay *et al.*, 2011). به‌منظور تولید بیشینه ماده‌ی جنتیوپیکروساید (gentiopicroside) در ریشه‌های مویین گیاه *Gentiana scabra* از انواع اکسین‌ها استفاده شد و نتایج پژوهش نشان داد بیشترین میزان این متابولیت در اثر افزودن یک میلی‌گرم در لیتر NAA به محیط‌کشت مایع حاصل شد (Huang *et al.*, 2014). تاثیر غلظت ساکارز در بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین نیز توسط برخی پژوهشگران به اثبات رسیده است از جمله تولید زیست‌توده و تولید ساپونین در ریشه‌های مویین گیاه *Talinum paniculatum* Gaertn در اثر استفاده از محیط کشت حاوی ۵ درصد ساکارز تایید شد (Manuhara *et al.*, 2015). اما تابه‌حال پژوهشی با هدف بررسی تاثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی در القای ریشه‌های مویین توسط سویه ATCC11325 اگروباکتریوم رایزوژنز و بررسی تاثیر الیسیتور هورمونی و غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه انجام نشده است، به همین خاطر هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین با استفاده از سویه‌ی ATCC11325 اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه کاسنی، انتخاب لاین برتر ریشه‌های مویین براساس میزان رشد ریشه‌ها و سپس بررسی تاثیر هورمون NAA و غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان تولید زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

القای ریشه‌های مویین: به‌منظور القای ریشه‌های مویین، از اگروباکتریوم رایزوژنز سویه‌ی ATCC11325 و ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل در دو سن ۵ و ۱۲ روزه استفاده شد. تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری به شرح زیر انجام شد. یک کلونی از باکتری در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، کشت گردید. کشت باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و با چرخش ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و سپس از سوسپانسیون حاصل به‌طور مستقیم برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد . میزان OD_{600} سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB ، ۰/۶ در نظر گرفته شد. ریزنمونه‌ها پس از ایجاد زخم سطحی توسط اسکالپل، در شرایط استریل در محیط کشت LB حاوی سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شده و تکان‌داده‌شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS جامد، کشت و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به‌عنوان شاهد در شرایطی مشابه با تیمارها کشت گردیدند. پس از سپری شدن مدت هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها در آب استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک شدن نسبی در روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انتقال داده شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر هفته انجام

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

شد و هر بار غلظت سفوتاکسیم به‌نصف کاهش داده‌شد و در نهایت از محیط‌کشت حذف شد. پس از گذشت چهار هفته از ظهور ریشه‌ها، درصد القای ریشه مویین، میانگین تعداد و طول ریشه‌ها و تعداد انشعابات ریشه اصلی محاسبه گردید.

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین: در تشخیص ریشه‌های مویین از ریشه‌های نابجا علاوه بر استفاده از صفات مورفولوژیکی ریشه‌ها (ازجمله زمان القاء، محل خروج ریشه، تعداد ریشه و میزان رشد ریشه‌ها)، از طریق تأیید مولکولی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B انجام شد. استخراج DNA به روش CTAB (Khan *et al.*, 2007) از ریشه‌های مویین و ریشه‌های نابجای حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) انجام شد. پلاسمید اگروباکتریوم رایزوژنز سویه‌ی ATCC11325 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر، با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B بر روی DNA استخراج شده انجام شد. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCTTCTGGTTTACTGCAGCA-3' (آغازگر معکوس). برنامه‌ی RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

انتخاب لاین برتر ریشه‌های مویین: برای انتخاب بهترین لاین ریشه‌های مویین، لاین‌های مختلف حاصل از ریزنمونه‌ها، در ظروف جداگانه در محیط کشت MS مایع حاوی ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، در ظروف شیشه مربا کشت شدند سپس در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ rpm و دمای ۲٦ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند پس از سه هفته، لاینی از ریشه مویین که بیشترین رشد (افزایش وزن تر) را داشت با استفاده از توزین ریشه‌ها انتخاب شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن بر روی رشد ریشه‌های مویین و متابولیت‌های ثانویه: در این آزمایش ریشه‌های لاین C به‌دست آمده از کوتیلدون‌های ۵ روزه به دلیل اینکه بیشترین میزان رشد را داشتند، ۷ هفته پس از تلقیح، به‌عنوان ماده آزمایشی استفاده شدند. نوک ریشه‌ها به قطعاتی به طول دو سانتی‌متر برش داده شدند زیرا قطعات کوچک‌تر ریشه، هوادهی بهتری در شیکر داشته و رشد بیشتری خواهند داشت. در هر تکرار ۵۰ میلی‌گرم ریشه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ظروف شیشه مربا کشت شد. هورمون NAA در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز به‌عنوان منبع کربن برای رشد ریشه‌های مویین در چهار غلظت (۳، ٤، ۵ و ٦ درصد) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت، شیشه‌ها در شیکر با دور ۱۰۰ rpm نگهداری شدند. بعد از چهار هفته، وزن تر و خشک ریشه‌ها اندازه‌گیری شد و شاخص رشد محاسبه گردید همچنین میزان فنول کل و فلاونوئید موجود در ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

محتوای ترکیبات فنولی کل ریشه‌های مویین و ریشه‌های غیرتراریخت با استفاده از روش فولین- سیوکالتیو (Sonald & Laima, 2001) اندازه‌گیری شد. ۰/۰۱ گرم از بافت‌های خشک شده‌ی ریشه‌ها را که پودر شده، با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد سپس به مدت ۲٤ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با ٦۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل اضافه شده و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد سپس شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد .غلظت فنول کل، با استفاده از منحنی استاندارد گالیک‌اسید محاسبه گردید (شکل ۳-۱). اندازه‌گیری میزان فنول کل با سه تکرار انجام شد. میزان فلاونوئید ریشه‌های مویین با استفاده از روش Krizek *et al.* (1998) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۲ گرم بافت ریشه خشک شده، در هاون به همراه ۳

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

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

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

نتایج و بحث

تأثیر نوع ریزنمونه و مدت زمان هم‌کشتی بر القای ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه و مدت زمان هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های مویین و میانگین تعداد، طول و انشعاب ریشه معنی‌دار نبوده اما اثرات اصلی نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های مویین در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که در بین ریزنمونه‌های مختلف، ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه با ۷۵/۵۵ درصد القای ریشه‌های مویین پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی، بیشترین توانایی را در تولید ریشه‌های مویین داشته‌اند و کمترین درصد القای ریشه‌های مویین (۱۳/۳۳ درصد) در هیپوکوتیل ۱۲ روزه پس از ۲٤ ساعت هم‌کشتی بدست آمد (شکل ۱). از بین مدت زمان‌های هم‌کشتی، ۷۲ ساعت هم‌کشتی بیشترین (٤۸/۳۳ درصد)، و ۲٤ ساعت هم‌کشتی کمترین تأثیر (۲۱/٦٦) را در افزایش درصد القای ریشه‌های مویین را داشته‌اند (شکل ۲). از لحاظ تعداد ریشه‌های مویین، ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه با میانگین ۷/۲٦ عدد ریشه (جدول ۲) و ۷۲ ساعت هم‌کشتی با میانگین ۵/۹۵ عدد ریشه در هر ریزنمونه بیشترین تأثیر را در افزایش تعداد ریشه داشتند (جدول ۳). نتایج نشان داد که در بین ریزنمونه‌های مختلف، بیشترین میانگین طول (۷/٦٦ سانتی‌متر) و انشعاب ریشه (۱۰/٤۱) در ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه و در بین مدت زمان‌های هم‌کشتی مختلف، بیشترین میانگین طول (۷/۹٦ سانتی‌متر) و انشعاب ریشه (۸/۷٦) در تیمار ۷۲ ساعت هم‌کشتی مشاهده شد.

تأثیر اگروباکتریوم رایزوژنز بر القای ریشه‌های مویین علاوه بر سویه‌ی باکتری، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه، به نوع گیاه و مدت زمان هم‌کشتی گیاه با اگروباکتریوم نیز بستگی دارد (Samadi *et al.* 2012). درصد القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های با سن پایین‌تر بیشتر بود به‌طوری‌که در کوتیلدون‌های ۵ روزه ۷۵/۵۵ درصد اما در کوتیلدون‌های ۱۲ روزه ۳۵/٥٤ درصد مشاهده شد. مطابق با این نتایج، در گیاه *Gmelina arborea* Roxb. نیز درصد القای ریشه‌های مویین در کوتیلدون ۵ روزه تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از کوتیلدون ۲۵ روزه گزارش شده است (Dhakulkar *et al.* 2005). از نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که ریزنمونه‌ی کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیل از توان تولید ریشه‌های مویین بیشتری برخوردار است. لذا می‌توان گفت بسته به گونه‌ی گیاهی، نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های مویین تأثیرگذار است. سن ریزنمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه مویین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین کننده‌ی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است (Kabirnotaj *et al.* 2012). در تحقیق حاضر زمان القای ریشه‌های مویین بسته به سن ریزنمونه‌ها متفاوت بود، در ریزنمونه‌های با سن ۵ روزه در کوتاه‌ترین زمان (پس از ۷ روز) ریشه‌ها در هر دو نوع ریزنمونه ظاهر شدند ولی در ریزنمونه‌های با سنین بالاتر ریشه‌های مویین دیرتر (۱۵-۱۰ روز بعد از تلقیح) القاء شدند. هرچه تعداد روزهای لازم جهت ظهور ریشه‌های مویین کمتر باشد از نظر صرفه‌جویی در وقت بسیار مطلوب می‌باشد (Weber *et al*, 2011). تاثیر نوع ریزنمونه در زمان القای ریشه مویین در گیاهان دارویی دیگر نیز گزارش شده است، به‌عنوان مثال در ریزنمونه‌های برگی خرفه (Pirian and Piri, 2012) و گیاه کولئوس (*Coleus*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

forskohlii Briq) بهتر از سایر ریزنمونه‌ها القای ریشه‌های مویین اتفاق افتاد (Reddy *et al.* 2012). شی و کنتزیوس (2003) تأثیر معنی‌دار نوع ریزنمونه‌های مختلف را در القای ریشه‌های مویین در گیاه *Pueraria phaseoloides* گزارش کرده و ریزنمونه‌ی کوتیلدون را بهترین نوع ریزنمونه برای تولید ریشه مویین دانستند. تراریخت‌سازی توسط اگروباکتریوم رایزوژنز از طریق انتقال و درج ناحیه‌ی T- DNA پلاسمید باکتری در داخل گیاه میزبان می‌باشد بنابراین مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، از عوامل مهم در تعیین درصد تراریختی می‌باشد. در این تحقیق از بین سه مدت زمان هم‌کشتی مختلف، بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین در ۷۲ ساعت هم‌کشتی حاصل شد که مطابق با کار پژوهشگران قبلی بود (Kodjo *et al.* 2013). Moradi *et al.* (2019) نیز از بین سه زمان هم‌کشتی (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت)، بیشترین میزان تراریختی را در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی مشاهده کردند. آن‌ها همچنین تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری (۰/٦، ۰/۹، ۱/۲ و ۱/۵) و غلظت‌های مختلف ساکارز (۰، ۳ و ٦ درصد) را در بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین در سیر (*Allium sativum*) بررسی کرده و بیشترین تاثیر را متعلق به غلظت ۰/٦ و ۰/۹ باکتری و ٦ درصد ساکارز دانستند. نتایج پژوهش Faizal (2019) and Sari نشان‌دادند که از بین مدت‌های مختلفی (۵، ۱۰ و ۲۰ روز) که ریشه‌ها در معرض هورمون‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید قرار گرفتند، متیل جاسمونات و ۱۵ روز در معرض‌گذاری باعث افزایش ۱/۵ برابری ساپونین‌ها در ریشه‌های مویین گیاه *Talinum paniculatum* Gaertn شدند.

جدول۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه و مدت زمان‌های هم‌کشتی مختلف بر القای ریشه‌های مویین

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

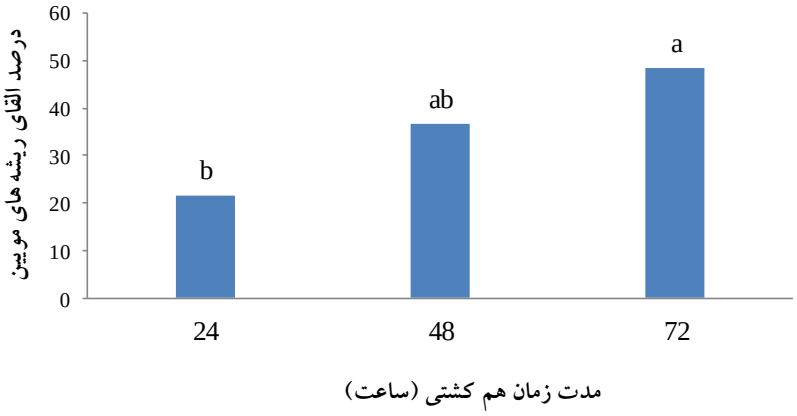
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد القای ریشه	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه (سانتی‌متر)	انشعابات ریشه اصلی
نوع ریزنمونه	۳	۷۲۲۹/٦۳**	٦۹/۰۲**	۳۳/۷۱**	۱۰۹/٤۲**
مدت هم‌کشتی	۲	۲۱٤٤/٤٤**	٥٦/۳۷**	۷۳/٦۱**	٦٥/٥٦**
مدت هم‌کشتی×نوع ریزنمونه	٦	۱۲۹/٦۳ns	۲/٥۰ns	۱/٤۹ ns	۰/۹۸ ns
اشتباه آزمایشی	۲٤	۱٥٥/٥٥	۱/٥۱	۳/۹٥	٦/۹٦
ضریب تغییرات		۸/٦۳	۱۳/۲۸	۲۲/۸٦	۱٦/۳٦

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

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین
Figure 2- Mean comparisons of the effects of co-culture time on hairy root induction

جدول۲- مقایسه میانگین تأثیر ریزنمونه بر روی صفات ریشه‌های مویین
Table 2- Mean comparisons of the effects of explant on hairy root characteristics

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

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند
.Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

جدول۳- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان هم‌کشتی بر روی صفات ریشه‌های مویین
Table 3- Mean comparisons of the effects of co-culture time on hairy root characteristics

مدت زمان هم‌کشتی (ساعت)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	انشعاب ریشه
۲۴	۳/۲۶[b]	۳/۰۲[c]	۴/۳۷[b]
۴۸	۳/۷۵[ab]	۵/۰۹[b]	۷/۹۴[a]
۷۲	۵/۹۵[a]	۷/۹۶[a]	۸/۷۶[a]

اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند
Numbers that have at least one common letter are not significantly different from each other

انتخاب لاین برتر ریشه‌های مویین حاصل از انواع ریزنمونه

انتخاب بهترین لاین‌های ریشه‌های مویین با استفاده از توزین ریشه‌ها انتخاب شد. نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه‌ی تولید کننده‌ی ریشه و انوع لاین بر وزن تر ریشه‌های مویین در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ٤). مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر (۰/٤۲ گرم در فلاسک) در ریشه‌های حاصل از کوتیلدون ۵ روزه و لاین C بوده و کمترین وزن تر (۰/۰۵ گرم در فلاسک) در ریشه‌های حاصل از کوتیلدون و لاین B بدست آمد (شکل ۳). انتقال و درج ناحیه‌ی T-DNA در سلول‌های گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

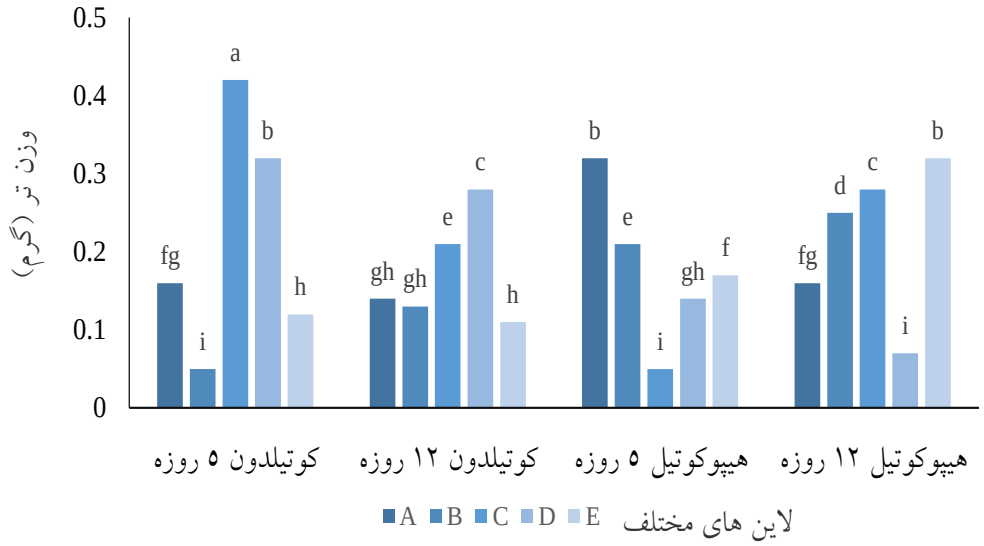
میزبان به‌صورت تصادفی اتفاق می‌افتد لذا تنوع رشدی و مورفولوژی زیادی بین هر لاین ریشه‌های مویین که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده‌اند مشاهده می‌شود. درواقع تنوع در تعداد نسخه‌های درج شده از T-DNA و میزان بیان ژن‌های موجود در آن ازجمله ژن *rolB* نقش بسزایی در تنوع رشدی لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین دارد (Fang *et al.*, 2016). در این پژوهش، فنوتیپ رشدی لاین‌های تراریخت که به‌طور جداگانه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۲۵۰ mg/l سفوتاکسیم کشت شده بودند تنوع مشهودی را در میزان رشد نشان دادند. برخی از لاین‌ها رشد طولی زیادی از خود نشان دادند اما برخی دیگر از لاین‌ها رشد طولی کمتر اما انشعاب‌دهی زیادی داشتند برخی دیگر نیز رشد کمتر داشته و پوشش کالوسی پیدا کردند. همچنین در تحقیقی برای بررسی توان رشدی لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین حاصل از گیاه *Gentiana scabra*، ۲٤ لاین مختلف در محیط کشت مایع کشت شده بود و پس از ۸ هفته میزان وزن خشک لاین‌های مختلف تفاوت چشم‌گیری با یکدیگر داشتند به‌طوری‌که وزن خشک لاین پنج به میزان ٤٤ برابر افزایش یافت درحالی‌که لاین ۱۸ فقط به میزان تقریباً دو برابر افزایش نشان داده بود (Huang *et al.* 2014).

جدول٤- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه و لاین‌های ریشه‌های مویین بر وزن تر ریشه‌ها

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات میانگین وزن تر
نوع ریزنمونه	۳	۰/۰۰٤**
لاین‌های مختلف	٤	۰/۰۰۸**
نوع ریزنمونه × لاین‌های مختلف	۱۲	۰/۰٤۸ **
اشتباه آزمایشی	٤۰	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات		۷/۰۷

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



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه بر روی وزن تر لاین‌های ریشه‌های مویین

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن بر رشد و مقدار متابولیت‌های ثانویه‌ی ریشه‌های مویین

برطبق نتایج به‌دست آمده، اثر متقابل NAA و غلظت‌های مختلف ساکارز بر وزن تر و خشک، شاخص رشدی، فنول کل و فلاونوئید ریشه‌های مویین معنی‌دار شد (جدول ٥). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ١/٤ و ٠/١٠٧ گرم در فلاسک) و بیشترین شاخص رشد (٢١/٤٢) در محیط کشت MS حاوی ١/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA و ٣ درصد ساکارز به‌دست آمد (جدول ٦، شکل ٤). نتایج نشان داد که ١/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ٤ درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش محتوای فنول کل (٦/٧٦ میلی‌گرم برگرم وزن خشک ریشه) و فلاونوئید (٧٥/٠٨ مایکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در طول موج ٢٧٠ نانومتر داشت. همچنین تیمار ١/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ٥ درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش فلاونوئید (به‌ترتیب ٩٧/٩٢ و ١١١/٦٢ مایکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در طول موج ٣٠٠ و ٣٣٠ نانومتر نشان داد (جدول ٧).

مطابق با نتایج حاصل، غلظت ٠/٥ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین تأثیر را در تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت ثانویه را در گیاه *Plumbago indica* نسبت به اکسین‌های دیگر داشته است (Gangopadhyay *et al*., 2010). همچنین در پژوهشی، انواعی از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی از جمله اکسین، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات، نیترات نقره و عصاره‌ی مخمر در میزان رشد ریشه‌های مویین گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) بررسی شده و بیشترین تاثیر را در تیمار عصاره‌ی مخمر و اکسین مشاهده شد (Siahmansour *et al*., 2018). استفاده از منبع کربن مناسب در رشد و تولید متابولیت ثانویه در گیاه حائز اهمیت است. ساکارز به عنوان منبع کربن نقش بسزایی در رشد و افزایش انشعابات ریشه و تولید متابولیت ثانویه دارد (Malamy & Ryan, 2001). در سال‌های اخیر کشت ریشه‌های مویین به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش در تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی در مقیاس تجاری صورت گرفته است (Srivastava & Srivastava, 2007). میزان تولید ترکیبات ثانویه در ریشه‌های مویین بالاتر از ریشه های طبیعی یا سایر بافت‌ها می باشد بنابراین ریشه های مویین یک ابزار قدرتمند جهت انجام تحقیقات به منظور بالا بردن میزان تولید متابولیت‌های ثانویه و حتی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی محسوب می شوند (Bulgakov *et al.* 2012).

جدول٥- تجزیه واریانس تأثیرNAA و ساکارز بر روی صفات ریشه‌های مویین

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		میانگین وزن تر	میانگین وزن خشک	شاخص رشدی	فنول	فلاونوئید ٢٧٠ نانومتر	فلاونوئید ٣٠٠ نانومتر	فلاونوئید ٣٣٠ نانومتر
NAA	٣	٠/٢٥٦**	٠/٠٠١**	٤٥/٥١**	١٤/٦٣**	٧٢٠/٦٧**	١٨٩٠/٥٨**	١٨٨٩/٥٦**
ساکارز	٣	٠/٣٢٢**	٠/٠٠٢**	٨٣/٩٢**	٣/٥١**	١١١٥/٢٦*	١٩٨٢/٠٤**	١٨٦١/٠١*
NAA × ساکارز	٩	٠/٦٩٩**	٠/٠٠٦**	٢٤١/٨١**	٠/٨١**	٣٢٢/١٦*	٤٠٥/٧٦*	٥١٩/٨٥*
اشتباه آزمایشی	٣٢	٠/٠١١	٠/٠٠٠١	٥/٨٨	٠/٢٥	١١٠/٠٧	٢١٦/٦٦	٣٧٦/٢٦

*، **: معنی‌داری در سطح احتمال ٥ و ١٪

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

جدول٦- مقایسه میانگین تأثیر NAA و ساکارز بر روی رشد ریشه‌های مویین

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

هورمون(mgl^{-1}) + ساکارز (درصد)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	شاخص رشد
٣ +٠ NAA	٠/١ hi	٠/٠٠٨ fg	٠/٧٤ fg
٤ + ٠ NAA	٠/٥٨ ef	٠/٠٤٩ bc	٩/٢٧ bc
٥ + ٠ NAA	٠/٢٥ gh	٠/٠٢٣ efg	٣/١٦ efg
٦ + ٠ NAA	١ cd	٠/٠٩٩ a	١٩/٦٩ a
٣ + ٠/٥ NAA	٠/٩٣ d	٠/٠٩١ a	١٧/٩٥ a
٤ + ٠/٥ NAA	٠/٧ e	٠/٠٦٣ b	١٢/٢٦ b
٥ + ٠/٥ NAA	٠/٤٣ fg	٠/٠٤٠ cde	٧/٤٠ cde
٦ + ٠/٥ NAA	٠/٥٥ ef	٠/٠٥٤ bc	١٠/٣٨ bc
٣ + ١ NAA	٠/٠٦٧ i	٠/٠٠٥٧ g	٠/١٩ g
٤ + ١ NAA	١/٠٤ cd	٠/٠٩٠ a	١٧/٨١ a
٥ + ١ NAA	١/١٤ bc	٠/١٠٤ a	٢٠/٦٦ a
٦ + ١ NAA	٠/٥٥ ef	٠/٠٤٧ bcd	٨/٧٩ bcd
٣ + ١/٥ NAA	١/٤ a	٠/١٠٧ a	٢١/٤٢ a
٤ + ١/٥ NAA	١/٣ ab	٠/١٠٠ a	١٩/٩٦ a
٥ + ١/٥ NAA	٠/٣ g	٠/٠٢١ efg	٣/٣٧ efg
٦ + ١/٥ NAA	٠/٣٥ g	٠/٠٢٨ def	٤/٨٣ def

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

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

جدول٧- مقایسه میانگین تأثیر NAA و ساکارز بر روی متابولیت ثانویه‌ی ریشه‌های مویین

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

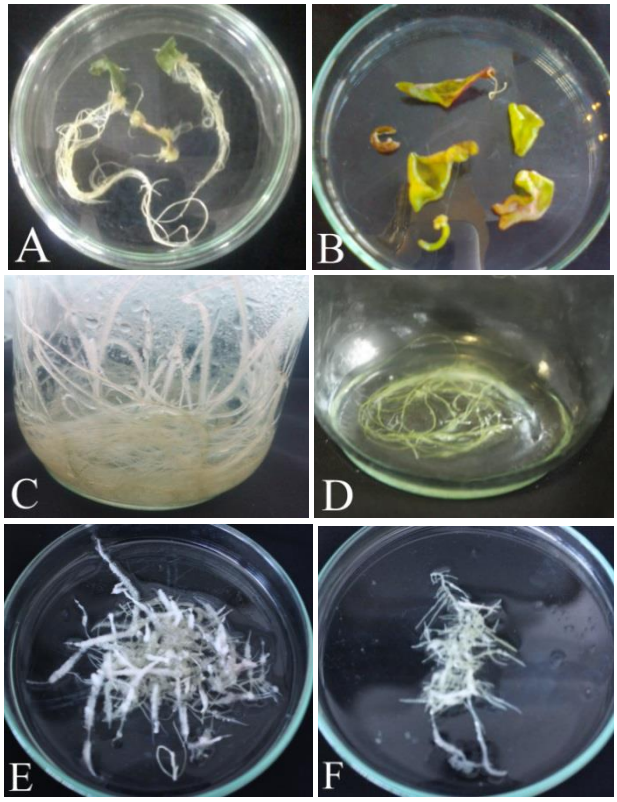
هورمون(mgl^{-1}) + ساکارز (درصد)	فنول	فلاونوئید ٢٧٠ نانومتر	فلاونوئید ٣٠٠ نانومتر	فلاونوئید ٣٣٠ نانومتر
٣ +٠ NAA	٢/١٨ g	٢٨/٩٠ cde	٣٧/٤٨ d	٤٥/١٧ cd
٤ + ٠ NAA	٣/٢٤ def	٣٢/٠٦ b-e	٥٤/٨٤ bcd	٥٧/٧٦ cd
٥ + ٠ NAA	٢/٦١ fg	٢٥/٨٩ e	٣٦/٠٣ d	٤٤/٤٣ d
٦ + ٠ NAA	٢/٥٤ fg	٢٣/٩٤ e	٣٢/٦١ d	٤٣/٩٦ d
٣ + ٠/٥ NAA	٣/٣٦ def	٣٦/٥٢ b-e	٥٥/٨٨ bcd	٧٠/٧٥ bc
٤ + ٠/٥ NAA	٣/٦١ cde	٤٧/٧٩ bc	٦٩/٩١ bc	٧٧/٤٤ bc
٥ + ٠/٥ NAA	٣/٤٥ def	٣٥/٧٦ b-e	٥٦/٣٥ bcd	٦٣/٤٠ cd
٦ + ٠/٥ NAA	٣/١٦ def	٣٢/١٣ b-e	٤٧/٦٤ cd	٤٩/٦٢ cd
٣ + ١ NAA	٣/٧٩ cde	٢٤/٥١ e	٣٩/٣٢ d	٤٦/٤٣ cd
٤ + ١ NAA	٤/٠٢ cd	٤٧/٢٢ bcd	٧١/٥٢ bc	١٧/٨١ a
٥ + ١ NAA	٢/٩٦ efg	٥١/١٦ b	٥٩/٤٦ bcd	٧٦/٩٤ bc
٦ + ١ NAA	٢/٨٩ efg	٢٧/٤٤ de	٤٣/٢١ bc	٥٢/٧٩ cd
٣ + ١/٥ NAA	٥/٥٨ b	٤٩/٥٧ b	٦٨/٦ bc	٧٠/٦٩ bc
٤ + ١/٥ NAA	٦/٧٦ a	٧٥/٠٨ a	٧٩/٦٢ ab	٧٥/٠١ bc
٥ + ١/٥ NAA	٤/٥١ c	٣٥/٨٢ b-e	٩٧/٩٢ a	١١١/٦٢ a
٦ + ١/٥ NAA	٤/١٠ c	٢٦/١٤ e	٣٦/٧٢ d	٤٨/٢٧ cd

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

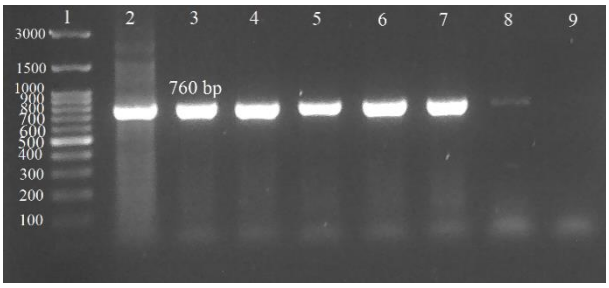
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]



شکل ٤- القای ریشه‌های مویین توسط سویه *A. rhizogenes* ATCC11325 در گیاه کاسنی. A: ظهور ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل، طی یک تا دو هفته پس از تلقیح، B: القای کم ریشه‌های غیر تراریخت در ریزنمونه‌های تلقیح نشده، C: افزایش رشد ریشه های مویین در محیط کشت مایع، D: رشد کم ریشه‌های غیرتراریخت در محیط کشت مایع، E: کشت ریشه‌های مویین در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز، F: کشت ریشه‌های مویین در محیط کشت حاوی صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز

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

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین: ژن‌های *rol*B نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های مویین دارد و درصورت غیر فعال شدن آن، ریشه مویین تولید نخواهد شد (El-Esawi *et al*., 2017). در این تحقیق بررسی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده از ردیابی ژن *rol*B انجام شد. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار ۷٦۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rol*B را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود اما برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نشده نواری تکثیر نشد (شکل ۵).



شکل ۵- تکثیر قطعه‌ی DNA به اندازه‌ی ۷٦۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B بر روی DNA ریشه‌های مویین.: 1: نشانگر اندازه‌ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، 2: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* سویه‌ی ATCC11325 به عنوان کنترل مثبت، 3-8: ریشه‌های مویین، 9: ریشه‌های نابجای حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

منابع

Bais HP, Sudha G, Ravishankar, GA. 2000. Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 6: 648-653.

Bais HP, Sudha G, George J, Ravishankar GA. 2001. Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root culture in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. In Vitro Cellular and Developmental Biology Journal 37: 293-299.

Bulgakov V, Gorpenchenko T, Veremeichik G, Shkryl Y, Tchernoded G, Bulgakov D. 2012. The *rol*B gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. Plant Physiology 158(3): 1371-1381.

Carazzone C, Mascherpa D, Gazzani G, Papetti A. 2013. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (Cichorium intybus) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Food Chemistry 138(2-3): 1062-1071.

Cova CM, Boffa L, Pistocchi M, Giorgini S, Luque R, Cravotto G. 2019. Technology and Process Design for Phenols Recovery from Industrial Chicory (*Chicorium intybus*) Leftovers. Molecules 24(15): 2681.

Dhakulkar S, Ganapathi T, Bhargava A, Bapat T. 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169: 812–818.

El-Esawi MA, Elkelish A, Elansary HO, Ali HM, Elshikh M, Witczak J, Ahmad M. 2017. Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. Oxidative medicine and cellular longevity 2: 10-17.

Faizal A, Sari AV. 2019. Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. African Journal of Biotechnology 18(6):130-135.

Fang R, Wu F, Zou A, Zhu Y, Zhao H, Zhao H, Wang X. 2016. Transgenic analysis reveals LeACS-1 as a positive regulator of ethylene-induced shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots. Plant molecular biology 90(4-5): 345-358.

Fathi R, Mohebodini M, Chamani E. 2018. Optimization of hairy roots induction in chicory (*Cichorium intybus* L.) and effects of auxin and carbon source on their growth. Iranian Journal of Horticultural Science 49(3): 657-667. (In Farsi with English abstract).

Gangopadhyay M, Chakraborty D, Bhattacharyya S, Bhattacharya S. 2010. Regeneration of transformed plants from hairy roots of Plumbago indica. Plant Cell Tissue and Organ Culture 102: 109-114.

Gangopadhyaya M, Dewanjeeb S, Chakrabortyc D, Bhattacharya S. 2011. Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. Industrial Crops and Products 33: 445-450.

Gelvin SB. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and interaction. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 223-256.

Hakkinen ST, Oksman-Caldentey KM. 2018. Progress and Prospects of Hairy Root Research. Hairy Roots 3-19.

Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A. 2009. Polyphenol content and antiradical activity of Cichorium intybus L. from biodynamic and conventional farming. Food Chemistry 114: 765–770.

Henzelyova J, CellArovA E. 2018. Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived *Hypericum tomentosum* regenerants. Acta physiologiae plantarum 40(5): 82-90.

Huang SH, Vishwakarma RK, Lee TT, Chan HS, Tsay HS. 2014. Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. Botanical Studies 55: 1- 17.

Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. 2011. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. Phytochemistry 72: 781‑790.

Kabirnetaj S, Zolala J, Nematzadeh GA, Shokri E. 2012. Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus* L.) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian journal of agricultural biotechnology 4: 61–75. (In Farsi with English abstract).

Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology 6: 175-178.

Kodjo D, Atsou VA, Melin C, Band N, Oudin A, Courdavault V. 2013. Optimized genetic transformation of Zanthoxylum zanthoxyloides by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of chelerythrine and skimmiamine in hairy root cultures. Engineering in Life Sciences 14: 95-99.

Krizek DT, Mirecki RM, Britz SJ. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Journal of Plant Physiology 103: 1-7.

Linh NTN, Tam HT, Tung HT, Luan V Q, Hien VT, Loc NH, Nhut DT. 2019. Improvement of bioactive saponin accumulation in adventitious root cultures of Panax vietnamensis via culture periods and elicitation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 137(1): 101-113.

Malamy JE, Ryan KS. 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. Plant Physiology 127: 899-909.

Manuhara YSW, Kristanti AN, Utami SW, Yachya A. 2015. Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 5(12): 1027-1032.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

Moradi F, Mehrjerdi MZ, Vahdati K, Hasanloo T. 2019. Effect of different factors on induction of hairy roots in Iranian garlic. Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture) 41(4): 43-50.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum 15: 473-476.

Nigutova K, Kusari S, Sezgin S, Petijova L, Henzelyova J, Balintova M, Cellarova E. 2019. Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured Hypericum species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. Journal of Pharmacy and Pharmacology 71(1): 46-57.

Park IS, Kim HJ, Jeong YS, Kim WK, Kim JS. 2017. Differential abilities of Korean soybean varieties to biosynthesize glyceollins by biotic and abiotic elicitors. Food science and biotechnology 26(1): 255-261.

Parr AJ. 2016. Secondary products from plant cell cultures–early experiences with Agrobacterium rhizogenes-transformed hairy roots. Transgenesis and Secondary Metabolism 1-13.

Peng Y, Sun Q, Park Y. 2019. Chicoric acid promotes glucose uptake and Akt phosphorylation via AMP-activated protein kinase α-dependent pathway. Journal of Functional Foods 59: 8-15.

Pirian K, Piri K. 2012. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3: 213–218.

Ramachandra RS, Ravishancar GA. 2002. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

Reddy CS, Praveena CH, Veeresham C. 2012. Strategies to improve the production of Forskolin from hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq. Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology 5: 1720-1726.

Samadi A, Carapetian J, Heidary R, Jafari M, Hssanzadeh A. 2012. Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. an anti-tumor lignans production plant. Nothlae Botanicae Hortiagrobatanici Cluj- Napaca 40(1): 125-131.

Siahmansour Sh, Ismaili A, NazarianFirouzabadi F. 2018. Effect of Different Elicitor Treatments on Hairy Root of Medicinal Plant Poppies (Papaver somniferum L.). Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture) 41(1): 29-42.

Shi HP, Kintzios S. 2003. Genetic transformation of pueraria phaseoloides with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. Plant Cell Reports, 21: 1103-1107.

Srivastava S, Srivastava AK. 2007. Hairy root cultures for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology 27: 29-43.

Sonald SF, Laima SK. 2001. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agric*ulture 1: 1-5.

Vahabinia F, Pirdashti H, Bakhshandeh E. 2019. Environmental factors' effect on seed germination and seedling growth of chicory (*Cichorium intybus* L.) as an important medicinal plant. Acta physiologiae plantarum, 41(2): 27.

Velayutham P, Ranjithakumari BD, Baskaran P. 2006. An efficient in vitro plant regeneration system for Cichorium intybus L. an important medicinal plant. Journal Agricultural Technology 2(2): 287-298.

Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH. 2011. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 46: 1070-1075.

Yang, Y. (2009). Process Optimization of Extracting Phenols from *Cichorium intybus* cv. Puna with Response Surface Methodology. Journal of Northwest Forestry University 24: 118-120.

Zafar S, Dilshad E, Ismail H, Rizvi CB, Mirza B. 2019. Rol genes enhance content of artemisinin and other secondary metabolites in Shennong hybrid of Artemisia annua. *Chinese Herbal Medicines* 11(2): 209-215.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production

Roghayeh Fathi, Mehdi Mohebodini*, Esmaeil Chamani

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

Abstract

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.8.4]