مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
صفحه ۲۶۴-۲۵۶

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 13, Number 2, Pages: 256-264

http://gebsj.ir/

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

10.61882/gebsj.13.2.9

القای ریشه موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار با استفاده از *اگروباکتریوم رایزوژنز* به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه

Induction of Hairy Roots in Multi-Year-Old Yew (*Taxus baccata*) Seedlings Using *Agrobacterium rhizogenes* for the Production of Secondary Metabolites

مهدی محمودی[۱]، سید احمد سادات نوری[۲*]
Mahdi Mahmoudi[1], Seyed Ahmad Sadat-Noori*[2]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، ۲- استاد گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
1- Master's graduate, 2- Professor, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۱۲- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۶/۲۳)
Received: 2025/02/27 | Accepted: 2025/08/03 | Published: 2025/09/14

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Mahmoudi M, Sadat Noori S A. (2025). Induction of hairy roots in multi-year-old yew (*Taxus baccata*) seedlings using Agrobacterium rhizogenes for the production of taxol. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (2): 256-264. Doi: 10.61882/gebsj.13.2.9
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

Abstract

Yew (*Taxus baccata*) is a diploid plant with a chromosome number of 2n=2x=24, belonging to the order Taxales and the family Taxaceae. Among its most important secondary metabolites is taxol, a well-known anticancer drug. The aim of this study was to investigate the induction of hairy roots in perennial yew seedlings using *Agrobacterium rhizogenes* to optimize the production of secondary metabolites under *in vitro* conditions. The experiment was conducted as a factorial design in a completely randomized format with three replications. The factors examined included explant type at two levels (root and leaf) and bacterial strain at three levels (ATCC-15834, TR107, MAFE01724). The results demonstrated that the interaction of the examined factors significantly influenced the traits of hairy root induction percentage, fresh weight, and dry weight of hairy roots after two months. The highest percentage of hairy root induction, as well as fresh and dry weights, were achieved with the combination of the MAFE01724 strain and leaf explants, which were significantly higher compared to other treatment combinations. The transgenic nature of the hairy roots was confirmed by tracing a segment of the *rolB* gene using PCR amplification, while no corresponding band was amplified for non-transgenic (wild-type) roots. Overall, the results of this study indicate that the induction of hairy roots in perennial yew (*Taxus baccata*) seedlings is influenced by the explant type and bacterial strain. These findings provide an essential prerequisite for further experiments on hairy root cultures aimed at the production of pharmaceutical metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, Taxol, Yew

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

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

خلاصه

سرخدار با نام علمی *Taxus Baccata*، گیاهی دیپلوئید با تعداد کروموزوم 2n=2x=24 متعلق به رده Taxales و از خانواده Taxaceae می‌باشد. از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه سرخدار، تاکسول می‌باشد که به عنوان یک داروی ضد سرطان مهم شناخته می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی القای ریشه موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار با استفاده از *اگروباکتریوم ریزوژنز* به منظور بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای است. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با دو سطح (ریشه و برگ) و سویه باکتری با سه سطح (ATCC-15834, TR107, MAFE01724) بود. نتایج نشان داد که عوامل مورد بررسی بر روی صفت‌های درصد القای ریشه موئین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه، اثر معنی‌داری داشت. بیشترین درصد القای ریشه موئین، وزن تر و خشک آن در ترکیب تیماری سویه MAFE01724 و ریزنمونه برگ حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بود. 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 (غیرتراریخته) نوار مربوطه تکثیر نشد. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که ریز نمونه و سویه‌ی باکتری در القای ریشه‌های موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار (*Taxus Baccata*) نقش دارند و نتایج این مطالعه یک پیش نیاز مهم برای آزمایشات مربوط به کشت ریشه موئین با هدف تولید متابولیت‌های دارویی است.

کلمات کلیدی: *اگروباکتریوم رایزوژنز*، تاکسول، ریشه موئین، سرخدار

مقدمه Introduction

سرخدار با نام علمی *Taxus Baccata*، گیاهی دیپلوئید با تعداد کروموزوم 2n=2x=24 متعلق به رده Taxales و از خانواده Taxaceae می‌باشد (Xue et al. 2020). سرخدار بومی جنگل‌های هیرکانی است و از آستارا تا جنگل‌های علی‌آباد در کوهستان البرز شمالی با ارتفاعی بین ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ متر می‌روید. زیستگاه اصلی این درخت در استان‌های مازندران و گلستان است (Chang et al., 2001).

یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه‌ی سرخدار، تاکسول می‌باشد که با نام Paclitaxel نیز شناخته می‌شود و به عنوان موثرترین داروی ضد سرطان قرن بیستم شناخته شد. در سال ۱۹۹۲ جهت درمان سرطان تخمدان و در سال ۱۹۹٤ برای درمان سرطان سینه از سوی FDA (سازمان غذا و دارو آمریکا) مورد تایید قرار گرفت که برای درمان انواع سرطان‌ها از جمله سینه، تخمدان، ریه، مری، مجاری ادراری و پوست مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jennewein et al., 2001).

تاکسول اولین دارو هدف‌گیری میکروتوبول بود که در مقالات و منابع متعددی توصیف شد. مکانیسم اصلی عمل آن شامل توقف پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون توبولین است که در نتیجه‌ی آن، چرخه تقسیم میتوزی سلول متوقف می‌شود و با تشکیل دوک تقسیم غیرطبیعی، موجب توقف رونویسی DNA در مرحله G2/M تقسیم میتوز می‌شود. بدین ترتیب تاکسول موجب مرگ سلول‌های سرطانی در حال تکثیر می‌شود (Gallego et al., 2020).

میزان تاکسول در انواع گونه‌های سرخداریان بسیار ناچیز (۰/۰۱ تا ۰/۰۳ میلی گرم در یک گرم وزن پودر خشک) است. از این رو، تأمین نیاز یک دوره درمانی یک بیمار مبتلا به سرطان (حدود دو گرم پاکلی‌تاکسل) از پوست ۳ تا ۱۰ درخت صدساله استخراج می‌شود که علاوه بر افزایش خطر انقراض گونه‌های سرخداریان، تخریب زیست‌بوم جانداران را به همراه دارد (Fu et al., 2024).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان دارویی، غالباً حاوی مقدار محدودی می‌باشند، لذا به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله تاکسول، کشت ریشه موئین یک گزینه مناسب می‌باشد (Kubica et al., 2020). ریشه‌های موئین از طریق آلوده کردن سلول‌های گیاهی توسط *اگروباکتریوم رایزوژنز* (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) ایجاد می‌شوند. یافته‌ها نشان می‌دهد که چهار مورد از ۱۸ ORF موجود در T-DNA باکتری *Agrobacterium rhizogenes* برای تشکیل ریشه‌های موئین ضروری هستند و به عنوان ژن‌های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* نامگذاری شده‌اند. این آنکوژن‌ها فرآیندهای سلولی گیاه را مانند تعادل فیتوهورمون‌ها، متابولیسم اکسین و سیتوکینین و سیگنال‌دهی تعدیل می‌کنند (Paolis et al., 2019; Gutierrez-Valdes et al., 2020). این ریشه‌ها 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 می‌باشند که این ویژگی‌ها آن‌ها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل کرده است.

ریشه‌های موئین برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی ارزشمند می‌باشند. ریشه‌های موئین سازوکارهای بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی را تقلید کرده و حتی مقادیر بالاتری از آن‌ها را نشان می‌دهند. بنابراین، این ریشه‌ها ابزار قدرتمندی برای انجام تحقیقات به منظور افزایش میزان تولید متابولیت‌های دارویی با ارزش محسوب می‌شوند (Stepanova et al., 2022). در این تحقیق، القای ریشه موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار (*Taxus Baccata*)، با سه سویه باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* انجام شد که در آن صفت‌های درصد القا، وزن تر و وزن خشک مورد برسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

نهال‌های چند ساله سرخدار از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران خریداری شدند. برای ضدغفونی کردن، ریزنمونه‌های ریشه و برگ به مدت ۵ دقیقه با مایع ظرفشویی شستشو داده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه با آب اتوکلاو شده آبشویی شدند. در مرحله‌ی بعد، به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه با محلول هیپوکلرید سدیم ۵ درصد شناور شدند و در نهایت سه بار با آب اتوکلاو شده شستشو شدند.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: در این تحقیق، سه سویه‌ی باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* (ATCC-15834, TR107, MAFE01724) مورد مطالعه قرار گرفت. کشت باکتری در محیط‌های LB مایع حاوی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین انجام و در دمای ۲۸ درجه و دور ۱۸۰ در دقیقه داخل شیکر انکوباتور قرار گرفتند. OD_{600} محلول باکتری به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. این پارامتر بین ۰/٦ تا ۰/۸ تنظیم و ریزنمونه‌ها با این محلول تلقیح شدند. ریزنمونه‌های ریشه و برگ با اندازه تقریبی یک سانتی‌متر پس از زخم سطحی به مدت ۲۵ دقیقه داخل سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به منظور دفع رطوبت اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شده و سپس به محیط همکشتی MS منتقل و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ٤٨ ساعت، ریزنمونه‌ها از محیط همکشتی خارج و پس از شستشو به محیط‌های MS دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با میزان ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انتقال داده شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه‌ها صورت گرفت. برای تهیه نمونه‌های 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 و سه تکرار (پلیت) برای هر ترکیب تیماری در نظر گرفته شد. ظروف کشت در اتاق رشد با دمای ۲±۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰LUX با دوره‌ی نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

استقرار و نگهداری ریشه‌های موئین درون شیکر انکوباتور: زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود ٤-۳ سانتی‌متری رسید، در هر ترکیب تیماری و در هر تکرار، ۳ کلون برتر که رشد بیشتری داشتند، جدا و به درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیترمحیط کشت MS/2 مایع

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

منتقل و در تاریکی با دمای ۲±۲٤ 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 موئین (تراریخت) و ریشه‌های غیرموئین (طبیعی) با روش CTAB استخراج شد (Cheng et al., 2021). به منظور تایید تراریختی ریشه‌های موئین 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 موئین نقش دارند (Bose et al., 2022). پلاسمید باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* 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. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به صورت زیر بود (Mahmoudi et al., 2023) : Forward-5′ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3′

Reverse-5′TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3′

یک چرخه واسرشت سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ٥٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه) و در نهایت یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۷ دقیقه) بود. جهت الکتروفورز محصولات PCR، ژل آگارز ۰/۹درصد با استفاده از بافر TAE تهیه شد. از دستگاه الکتروفورز مدل RAD-BIO، با ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت ۹۰ دقیقه استفاده شد. جهت مشاهده باندها از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد استفاده شد. برای ثبت نتایج و مشاهده‌ی باندها، عکس برداری توسط دستگاه ژل داک انجام شد.

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 دو سطح (ریشه و برگ) و سویه باکتری با سه سطح , TR107 ,(ATCC-15834 MAFE01724) بودند. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار R نسخه‌ی ٤.۲.۱ استفاده شد و مقایسه میانگین با روش LSD انجام گرفت.

نتایج و بحث Results and Discussion

القای ریشه موئین: در مطالعه حاضر، سه سویه *اگروباکتریوم رایزوژنز* (ATCC15834, TR107, MAFE01724) برای القای ریشه‌های موئین در نهال‌های چندساله سرخدار مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که در محل زخم و نزدیکی آن، ریشه‌های موئین ظاهر شدند (شکل ۱). 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، پژوهش‌ها نشان داده‌اند 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).

نتایج مطالعه‌ای بر روی گیاه دارویی پریلا (*Perilla ferutescens*) نشان داد ترکیب تیماری سویه ATCC-15834 *اگروباکتریوم رایزوژنز* و ریزنمونه کوتیلدون بیشترین درصد القا، وزن تر و وزن خشک را ریشه‌های موئین ایجاد کرد (Mahmoudi et al., 2023). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه زنیان انجام شد، بهترین سویه‌ها برای القای ریشه موئین به ترتیب سویه‌های ATCC-15834 (۵۰ درصد) و A4 (۱۰ درصد) بودند (Moradi et al., 2022). در گزارش ماجامدار و همکاران، مشخص شده است که در گونه *Bacopa monnieri* از خانواده بارهنگیان، ریشه‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

موئین 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 موئین تأکید کرده‌اند. این عوامل به طور قابل توجهی بر روی فرآیند القای ریشه موئین تأثیر می‌گذارند و درک بهتر این برهمکنش‌ها می‌تواند به بهینه‌سازی روش‌های تولید ریشه‌های موئین کمک کند (Aziz Khajeh et al., 2018). در این مطالعه، ریشه‌های موئین القا شده توسط سویه باکتری MAFE01724 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.

درصد القا ریشه موئین: نتایج نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بر روی درصد القای ریشه موئین معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاکی از آن بود که بیشترین درصد القای ریشه موئین در ترکیب تیماری ریز نمونه برگ و سویه MAFE01724 و کمترین درصد مربوط به ترکیب تیماری ریز نمونه ریشه و سویه ATCC15834 مشاهده شد. (جدول ۱).

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

Table1- 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
ATCC15834*Root	0.07 c	0.41 c	0.17 c
ATCC15834*Leaf	0.16 c	0.60 c	0.23 c
TR107*Root	0.18 c	0.65 c	0.26 c
TR107*Leaf	0.37 b	1.01 b	0.49 b
MAFE01724*Root	0.28 b	0.81 b	0.31 b
MAFE01724*Leaf	0.57 a	1.79 a	0.61 a

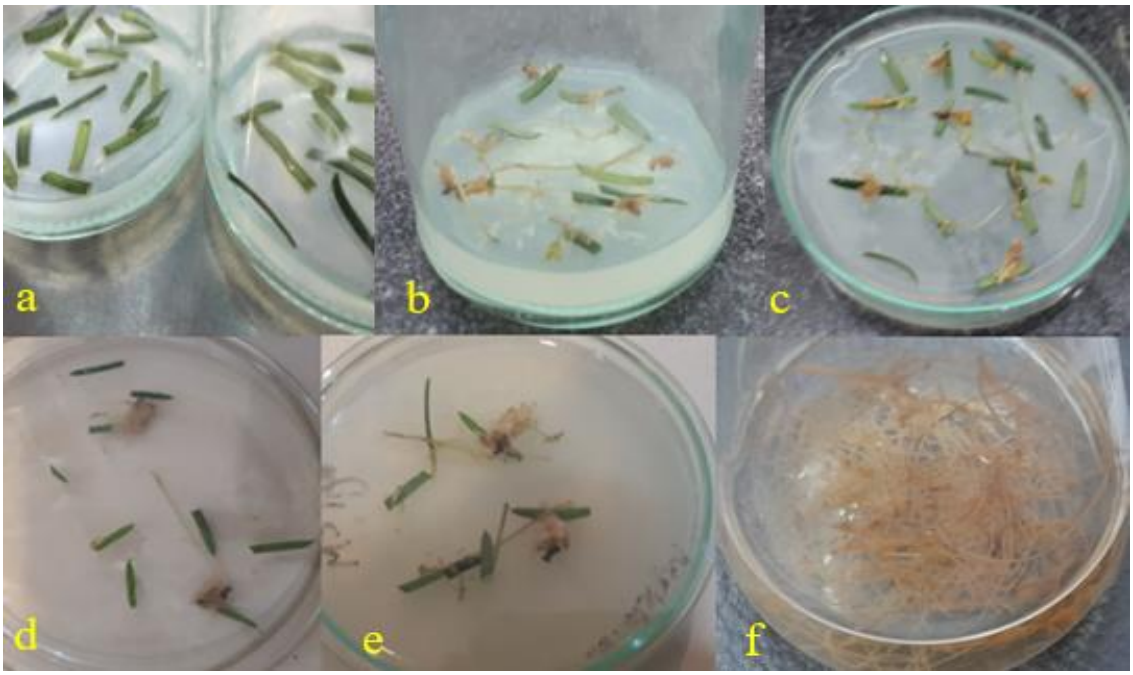
حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

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

وزن تر 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 تفاوت معنی‌داری از نظر وزن‌تر ریشه موئین وجود داشت. به‌طوری که بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین با اختلاف معنی‌داری از سایر ترکیبات تیماری در ترکیب سویه MAFE01724 و ریزنمونه برگ حاصل شد (جدول ۱). 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). نتایج آزمایش مشابهی بر روی گیاه *Justicia gendarussa* نشان داد که ریزنمونه برگ نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین را دارد (Wahyuni et al., 2015).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]



شکل ۱- مراحل رشد و توسعه ریشه‌های موئین در ترکیب تیماری MAFE01724*Leaf در نهال‌های چند ساله سرخدار(*Taxus baccata*): ریزنمونه‌های برگ تلقیح یافته (a)، ریشه‌های موئین در محیط MS جامد (d,c,b)، رشد و توسعه ریشه‌های موئین پس از گذشت ۲ ماه از انتقال آن‌ها به ارلن حاوی محیط MS/2 مایع درون شیکر انکوباتور(f).

Figure 1- Stages of growth and development of hairy roots in the MAFE01724*Leaf combination in the multi-year-old yew (*Taxus baccata*): 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	2	0.231	0.004131**
Explant	1	0.113	0.0008179**
Bacterial strain* explant	2	0.104	0.013419*
Test error	12	0.095	-

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

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

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

Sources of change	Degree of freedom	Variance	F
Bacterial strain	2	1.954	7.27e-03 **
Explant	1	2.656	1.01e-08 **
Bacterial strain* explant	2	1.003	0.000281 **
Test error	12	0.038	-

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

وزن خشک ریشه موئین: وزن خشک ریشه‌های موئین، نیز به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بود. مشابه وزن تر ریشه موئین، از نظر وزن خشک نیز تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه مشاهده شد، به طوری که بیشترین میزان آن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

در ترکیب تیماری سویهMAFE01724 و ریزنمونه برگ حاصل شد که اختلاف معنی‌داری بیشتر از سایر ترکیبات تیماری بود (جدول ۱). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه یونجه انجام شد، نتایج نشان داد که وزن خشک ریشه‌های القا شده در ریزنمونه برگ نسبت به سایر ریزنمونه‌های ارزیابی شده بیشتر بود (Mirzaie Delbari et al., 2022).

جدول ٤- جدول تجزیه واریانس اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی وزن خشک ریشه موئین

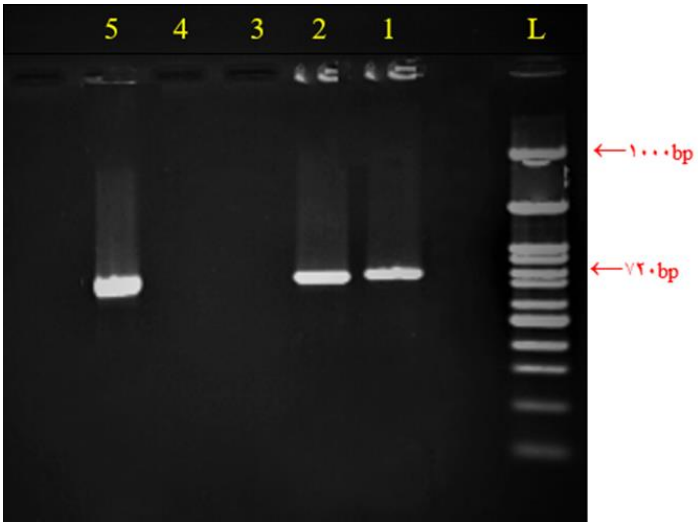
Table 4- Analysis of variance table for the effect of bacterial strain and type of explant on the dry weight of hairy roots

Sources of change	Degree of freedom	Variance	F
Bacterial strain	2	1.2472	0.000427 **
Explant	1	1.1593	0.000351 **
Bacterial strain* explant	2	0.4927	0.004462 **
Test error	12	0.0569	-

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

تایید تراریختی ریشه‌های موئین: در این مطالعه، نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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. بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار (*Taxus Baccata*) با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* تایید شد.



شکل ۲- تجزیه و تحلیل PCR قطعه ۷۸۰bp ژن *rolB* . نوارهای ۱، ۲ مربوط به دو نمونه از ریشه‌های موئین القا شده، نوارهای ۳ و ٤ به ترتیب مربوط به آب و ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ۵ 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 and 2 correspond to three samples from induced root hairs, bands 3 and 4 correspond to water and normal root (negative control), band 5 corresponds to the bacterial plasmid (positive control), and band L corresponds to the 100 bp ladder.

محققان بر این عقیده‌اند که در میان ژن‌های *rol* موجود در *اگروباکتریوم ریزوژنز*، *rolB* نقش ضروری در القای ریشه موئین دارد در حالی که ژن‌های *rolC*، *rolA* 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 بیوسنتز متابولیت‌های دارویی در ریشه‌های موئین با فراوانی نسخه‌های mRNA از *rolB* همبستگی دارد (Kiselev et al., 2007).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

نتیجه‌گیری کلی: در این مطالعه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در نهال‌های چندساله سرخدار 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 معنی‌داری متاثر از اثر متقابل عوامل مورد بررسی بوده است. القا ریشه‌های موئین در ترکیب تیماری ریزنمونه برگ تلقیح شده با MAFE01724، سریع‌تر از سایر ترکیبات تیماری مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه موئین در ترکیب تیماری سویه MAFE01724 و ریزنمونه برگ حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بود. ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از ردیابی تکثیر 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 از نهال‌های چند ساله سرخدار، می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تولید سریع متابولیت‌های دارویی از جمله تاکسول شود.

منابع

References

Aziz Khajeh, A., Dorani, E., & Aharizad S. (2018). Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains and explants on induction of hair root in Physalis alkekengi. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 7: 33-40. **dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.1.2.1 [In Persian]**

Chang, S. H., Ho, C. K., Chen, Z. Z., & Tsay, J. Y. (2001). Micropropagation of *Taxus* mairei from mature trees**.** *Plant Cell Reports*, *20*, 496-502. **doi.org/10.1007/s002990100362**

Fu, Y., Li, X., Yuan, X., Zhang, Z., Wei, W., Xu, C., ... & Gu, C. (2024). *Alternaria alternata* F3, a novel taxol-producing endophytic fungus isolated from the fruits of *Taxus* cuspidata: isolation, characterization, taxol yield improvement, and antitumor activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *196*(4), 2246-2269. **doi.org/10.1007/s002990100362**

Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2020). A compressive review about Taxol®: History and future challenges. *Molecules*, *25*(24), 5986. **doi.org/10.3390/molecules25245986**

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.org/10.1007/s00253-007-0856-5**

Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., OksmanCaldentey, K. M., Ritala, A., et al. (2020). Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. Front. Plant Sci. 11, 1–11. **doi: 10.3389/fpls.2020.00033**

Jennewein, S., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. B. (2001). Taxol biosynthesis: taxane 13α-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(24), 13595-13600. **doi.org/10.1073/pnas.25153939**

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**

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.org/10.3390/molecules25235609**

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. **dor: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8 [In Persian]**

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**

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**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]

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.**

Oksman-Caldentey, K.M., and R. Hiltunen. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. F. Crop. Res. 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., et al. (2019). Plant cellular and molecular biotechnology: following Mariotti's steps. Plants 8, 1–27. **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**

Tiwari, R.K., M. Trivedi, Z.C. Guang, G.Q. Guo, and G.C. Zheng. 2007. Genetic transformation of Gentiana macrophylla with *Agrobacterium rhizogenes*: Growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Rep*. **26(2): 199–210. doi: 10.1007/s00299-006-0236-0**

Wahyuni, D. K., Vidianti, 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**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.9]