مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱٤، شماره ۱، بهار و تابستان ۱٤۰٤
صفحه ۵۹-٤۸

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 14, Number 1, Pages: 48-59

http://gebsj.ir/

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

10.61882/gebsj.14.1.4

بهینه‌سازی القای ریشه‌های موئین در گیاه دارویی بروکلی

The Optimization of Hairy Root Induction in Broccoli Plant

مریم بیگدلی[۱]، سید احمد سادات نوری*[۲]، علی ایزدی دربندی[۳]، محمود لطفی[٤]، مسلم بهمن‌کار[۵]

Maryam Bigdeli[1], Seyed Ahmad Sadat Noori*[2], Ali Izadi darbandi[3], Mahmood Lotfi[4], Moslem Bahmankar[5]

۱- دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- استاد، ۳- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

٤-دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، ایران

۵-استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، درفول، ایران

1. Student of Agricultural Biotechnology, 2. Professor, 3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Aburihan Faculty of Agricultural technology, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
4. Professor, Department of Horticulture, Agriculture Faculty, University of Tehran, Paradis of Aburihan, Iran.
5. Assistant Professor of Seed and Plant Improvement Research Department, Safiabad Agricultural Research and Education and Natural Resources Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Dezful, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۱- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۸/۶)
Received: 2025/06/06 | Accepted: 2025/10/23 | Published: 2025/10/28

چکیده

بروکلی (*Brassica oleracea* var. *Italica*) گیاهی شناخته شده، مناسب برای آب و هوای سرد و خنک، متعلق به خانواده براسیکاسه است. این گیاه منبع خوبی از مواد مغذی است. کشت بروکلی شامل بسیاری از متابولیت‌های ثانویه حیاتی، به‌ویژه آن‌هایی که حاوی گلوکوزینولات‌ها و محصولات تجزیه آن‌ها هستند. مهم‌ترین متابولیت دارویی در بروکلی گلوکوزینولات است که مسئول بوی تند و خواص ضد سرطانی آن است. در گیاه، گلوکوزینولات-گلوکورافانین به سولفورافان و ۱-بوتن، ۴-ایزوتیوسیانات تبدیل می‌شود. با توجه به اهمیت و کاربرد متابولیت‌های ثانویه، کشت ریشه‌های موئین راهبرد مناسبی برای افزایش تولید این ترکیبات است. برای بهینه‌سازی القای ریشه‌های موئین، از روش کشت بافت استفاده شد. این پروژه به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار (در شرایط کشت پتری دیش) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل دو سویه باکتریایی (ATCC-15834، A4)، چهار ژنوتیپ گیاهی (هراکلیون، کستل دوم، ساکورا و سنتورا) و دو نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و کوتیledون) بود. بهترین تیمار برای القای ریشه‌های موئین در بروکلی ترکیب ژنوتیپ SENT، سویه A4 و ریزنمونه کوتیledون بود که ۱۰۰ درصد القا و بیشترین تعداد ریشه را ایجاد کرد. برای تولید بیشترین زیست‌توده (وزن تر و خشک)، ترکیب ژنوتیپ HER، سویه A4 و ریزنمونه کوتیledون بهترین نتیجه را نشان داد. تراریخت بودن ریشه‌های موئین با ردیابی بخشی از ژن *rolB* با استفاده از PCR تأیید شد، در حالی که محصول مربوطه برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخت تکثیر نشد. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که القای ریشه‌های تراریخت در بروکلی تحت تأثیر ریزنمونه و سویه باکتریایی است و این یافته‌ها به‌عنوان پیش‌نیاز کلیدی برای آزمایش‌های مرتبط با کشت ریشه‌های موئین به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کند.

کلمات کلیدی: بروکلی، ریشه‌های موئین، متابولیت‌های ثانویه، *rolB*

Abstract

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) is a well-known plant, suitable for cold and cool climates, belonging to the Brassicaceae family. This plant is a good source of nutrition. Broccoli cultivation involves many vital secondary metabolites, particularly those containing glucosinolates and their breakdown products. The most important medicinal metabolite in broccoli is glucosinolate, which is responsible for its pungent odor and anti-cancer properties. Within the plant, glucosinolate-glucoraphanin is converted into sulforaphane and 1-butene, 4-isothiocyanate. Given the importance and application of secondary metabolites, the cultivation of hairy roots is a suitable strategy for enhanced production of these compounds. To optimize hairy root induction, the tissue culture method was employed. This project was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized block design with three replicates (under Petri dish culture conditions). The studied factors included two bacterial strains (ATCC-15834, A4), four plant genotypes (Heraklion, Castle Dome, Sakura, and Sentora), and two types of explants (Hypocotyl and Cotyledon). The best treatment for hairy root induction in broccoli was the combination of genotype SENT, strain A4, and cotyledon explant, which achieved 100% induction and the highest number of roots. For producing the highest biomass (fresh and dry weight), the combination of genotype HER, strain A4, and cotyledon explant showed the best result. The transgenic nature of the hairy roots was confirmed by tracking a part of the *rolB* gene using PCR, while the corresponding product was not amplified for natural and non-transgenic roots. In general, the results of this study indicated that the induction of transgenic roots in broccoli is influenced by the explant and bacterial strain, and these findings serve as a key prerequisite for experiments related to hairy root culture aimed at producing secondary metabolites.

Keywords: Broccoli, Hairy roots, Secondary metabolites, *rolB*

رفرانس دهی این مقاله Citation

Bigdeli M, Sadat Noori A, Izadi Darbandi A, Lotfi M, Bahmankar M. (2025). The optimization of hairy root induction in broccoli plant. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (1): 48-59. Doi: 10.61882/gebsj.14.1.4
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

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

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 1, 2025

خلاصه

کلم بروکلی (*Brassica oleracea* var. *Italica*) یک گیاه شناخته شده و مناسب برای آب و هوای سرد و خنک از خانواده Brassicaceae است. این گیاه منبع خوبی برای تغذیه بوده و مهمترین متابولیتهای ثانویه آن گلوکوزینولات‌ها بوده که دلیل بوی تند و خواص ضد سرطانی آن نیز می‌باشد. در داخل این گیاه، گلوکوزینولات-گلوکورافانین به سولفورافان و ۱-بوتن، ٤-ایزوتیوسیانات تبدیل می‌شود. با توجه به اهمیت و کاربرد متابولیت‌های ثانویه، کشت ریشه‌های موئین راهکار مناسبی برای تولید بیشتر این مواد است. به منظور بهینه سازی القای ریشه های مویین از روش کشت بافت استفاده شد. این پروژه به صورت آزمایش فاکتوریل بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار (در شرایط کشت پتری دیش) انجام شد. عوامل مورد مطالعه شامل دو سویه باکتریایی (ATCC-15834, A4) چهار ژنوتیپ گیاهی (هراکلیون، کسل دام، ساکورا و سنتورا) و دو نوع ریزنمونه Hypocotyl و Cotyledon بودند. بهترین تیمار القای ریشه‌های موئین در کلم بروکلی، ترکیب ژنوتیپ SENT، سویه A4 و ریزنمونه کوتیلدون بود که به ۱۰۰٪ القا و بیشترین تعداد ریشه دست یافت. برای تولید بیشترین زیست‌توده (وزن تر و خشک)، ترکیب ژنوتیپ HER، سویه A4 و ریزنمونه کوتیلدون بهترین نتیجه را نشان داد. ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* بوسیله PCR تایید شد در حالی که برای ریشه‌های طبیعی و غیرتراریخته محصول مربوطه تکثیر نشد. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که القای ریشه‌های تراریخته در بروکلی تحت تاثیر ریزنمونه و سویه باکتری بوده و این نتایج یک پیش نیاز کلیدی برای آزمایشات مربوط به کشت ریشه مویین با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: ریشه‌های موئین، کلم بروکلی، متابولیت‌های ثانویه، *rolB*

مقدمه Introduction

کلم بروکلی (*Brassicacea oleraceae* var.*italica*) گیاهی دارویی و خوراکی از خانواده Brassicaceae بوده که دارای 2n=18 کروموزوم می‌باشد. این گیاه احتمالاً در زمان رومیان باستان از فرم‌های وحشی یا فرم‌های اولیه کشت شده گیاه *Brassicaceae oleraceae* در نواحی مدیترانه‌ی شرقی تکامل یافته و تنوع قابل توجهی از آن در ایتالیا توسعه یافته است (Lim 2014). از عوامل کشت و زراعت کلم بروکلی می‌توان به گل‌آذین بزرگ با قابلیت خوراکی آن اشاره نمود که هر ۱۰۰ گرم از بخش خوراکی آن حاوی ۲/۸۸ گرم آب، ۱۳۸ کیلوژول انرژی، ٤/٤ گرم پروتئین، ۹/۰ گرم چربی می‌باشد (Nath *et al*. 2015).

مهم‌ترین ترکیب در بروکلی گلوکوزینولات است که دلیل بوی تند آن بوده و همچنین خاصیت ضد سرطانی دارد. عمده‌ترین گلوکوزینولات در بروکلی گلوکورافانین بوده و سولفورافان از تجزیه‌ی گلوکورافانین توسط آنزیم میروزیناز ایجاد می‌شود (Kim *et al.* 2013). سولفورافان، یک ایزوتیوسیانات است که در بدن انسان تحریک کننده تولید آنزیم‌های مهمی بوده که رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند. از آنجایی که التهاب و رادیکال‌های آزاد سبب بروز انواع سرطان‌ها می‌شوند. به نظر می‌رسد سولفورافان می‌تواند با مسدود کردن آنزیم‌های فعال کننده‌ی سرطان در بدن، یک نقش حفاظتی دوگانه داشته باشد (Santín-Márquez *et al*. 2019). این ماده در کاهش بیماری‌های نورودژنراتیو، بیماری‌های چشمی، مشکلات تنفسی، بیماری‌های قلبی و دیگر عوارضی که به خاطر وجود رادیکال‌های آزاد در بدن بروز پیدا می‌کنند، نقش داشته باشد. گیاهان دارویی از دیرباز به منظور درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Niazian *et al*. 2019).

در سال‌های اخیر با توجه به توصیه سازمان بهداشت جهانی براستفاده از داروهایی با منشأ گیاهی با توجه به ایجاد عوارض جانبی داروهای با منشاء شیمیایی باعث شده است تا در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تقاضای روزافزونی برای داروهای گیاهی بوجود آید، اما

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

متابولیت‌های ثانویه‌ای که در گیاهان داروئی ساخته می‌شوند غالباً محدود می‌باشند (Verpoorte *et al*. 2002). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه درون شیشه از طریق کشت بافت گیاهی امکان پذیر بوده و این روش‌ها مستلزم دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان دارویی با استفاده از *آگروباکتریوم رایزوژنز* (*Agrobacterium rhizogenes*) می‌باشد. ورود بخش T-DNA پلاسمیدهای R_i (القای ریشه) باکتری به ژنوم گیاهی باعث ایجاد تظاهر مورفولوژیک بافت ریشه‌های تراریخت شده که ریشه‌های موئین نامیده می‌شوند، ریشه‌های موئین دارای رشد بسیار سریع‌تر بوده و توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارنداز ویژگی‌های دیگر ریشه‌های موئین می‌توان به ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی، نگهداری آسان و قابلیت رشد در محیط کشت بدون هورمون اشاره کرد (Lee *et al*. 2013).

در مطالعه‌ای که بر روی گیاه دارویی آویشن باغی انجام شد، بیشترین درصد القای ریشه موئین (۷۳٪)، وزن تر (۲/۹۰ گرم) و وزن خشک (۱/۹۱ گرم) در تیمار ترکیبی ریزنمونه ساقه و سویه ATCC15834 به دست آمد. سویه A4 در مقایسه با سویه ATCC15834 کارایی کمتری داشت (Mahmoudi *et al*. 2025). در مطالعه‌ای که بر روی القا ریشه‌های موئین در نهال‌های چند ساله سرخدار (*Taxus baccata*) انجام شد، نتایج نشان داد که 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 بوده است (Mahmoudi *et al*. 2024). در پژوهش دیگری که بر روی القا ریشه‌های موئین در گیاه دارویی بیلهر صورت پذیرفت، فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با سه سطح (هیپوکوتیل، ساقه و برگ) و سویه باکتری با دو سطح ATCC15834 و A4 بود. نتایج نشان داد که اثر متقابل عوامل مورد بررسی بر روی صفت‌های درصد القای ریشه موئین، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه به طور معنی‌داری 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 معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (Jodaki *et al*. 2024). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه دارویی پریلا انجام شد نتایج نشان داد که ترکیب تیماری سویه باکتری *اگروباکتریوم رایزوژنز* ATCC-15834 و ریزنمونه کوتیلدون بیشترین درصد القا، وزن تر و وزن خشک را ریشه‌های موئین ایجاد کرد (Mahmoudi *et al*. 2023).

نظر به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر القای ریشه موئین در گیاه دارویی و خوراکی کلم بروکلی ارائه نشده است و یکی از تکنیک‌های افزایش تولید متابولیت‌های دارویی استفاده از ریشه‌های موئین است، لذا هدف اصلی از تحقیق حاضر بهینه‌سازی القای ریشه موئین در این گیاه به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه بود.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

تهیه ریزنمونه‌های گیاهی: بذرهای ٤ ژنوتیپ مختلف کلم بروکلی(Sent-Sac-Her- Cast) که از شرکت پوپونیک تهران خریداری شد، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. بذرها به منظور استریلیزاسیون سطحی، زیر آب جاری شسته شدند. سپس زیر هود لامینار بذرهای شسته شده به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (NaClO) قرار گرفته و در نهایت سه بار با آب دوبار اتوکلاو شده استریل شستشو داده شدند. برای تولید گیاهچه‌های سترون، بذرهای استریل شده در محیط کشت MS/2 به همراه ۳ درصد آگارز و ۰/۷ درصد آگار (pH=5.8) و عاری از هورمون کشت داده شدند. گیاهچه‌های کشت شده تحت شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی با شدت LUX ۳۰۰۰ در دمای ۲ ± ٢٤ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از دستیابی به گیاهچه‌های قوی، کوتیلدون و هیپوکوتیل گیاهچه‌های ۸ روزه جدا شده و به عنوان ریزنمونه برای القای ریشه‌های موئین استفاده شدند.

آماده‌سازی محلول باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: در این مطالعه از دو سویه باکتری *Agrobacteriom rhizogenez* به نام A4 و ATCC-15834 به منظور القای ریشه‌های موئین استفاده گردید. سلول‌های سویه‌های مختلف باکتری در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

محیط کشت مایع LB (Luria-Bertani) به همراه ۷۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت داده شده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. OD_{600} محلول باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شده و این پارامتر بین ۰/٦ تا ۰/۸ تنظیم و ریزنمونه‌ها با آن تلقیح شدند. پس از طی این مرحله، ریز نمونه‌های (کوتیلدون و هیپوکوتیل) جدا شده از گیاهچه‌های استریل به اندازه تقریبی ۱ سانتی‌متر با استفاده از یک تیغه اسکالپل استریل به صورت سطحی زخمی شده و به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند. برخی از ریزنمونه‌ها به عنوان شاهد (تحت شرایط یکسان) با آب مقطر استریل تلقیح شدند. پس از طی این مرحله به منظور رفع رطوبت اضافی، ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفته و به محیط هم کشتی MS جامد بدون هورمون در تاریکی با دمای ٢٤ ± ۲ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ٤٨ ساعت، ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط کشت MS جامد بدون هورمون حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای محدود کردن رشد آگروباکتریوم منتقل شدند. شش ریزنمونه از هر ترکیب تیماری (Her.Cast.Sac.Sent × Hypocotyl.Cotyledon × ATCC-15834.A4) به طور جداگانه در هر پتری دیش با سه تکرار قرار داده شدند. همه پتری‌دیش‌ها در یک اتاق رشد تحت دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی با شدت LUX ۳۰۰۰ در دمای ٢٤ ± ۲ درجه سانتیگراد برای القای ریشه‌های موئین نگهداری شدند. تمامی ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار در محیط‌های کشت یکسان کشت مجدد داده شدند. سرعت ظهور ریشه‌های موئین از هر ترکیب تیماری، پس از مشاهده ریشه‌های موئین تراریخته اولیه در محل‌های زخم ثبت شد. درصد القای ریشه موئین نیز به صورت تعداد ریزنمونه‌های مولد ریشه موئین نسبت به تعداد کل ریزنمونه کشت شده در هر پتری محاسبه گردید.

استقرار و نگهداری ریشه‌های موئین درون شیکر انکورباتور: زمانیکه طول ریشه‌های موئین تولید شده به اندازه ۲-۳ سانتی‌متر رسیدند، از ریزنمونه‌های برتر جدا شده و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS ½ بدون هورمون و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت داده شدند و سپس در تاریکی با دمای ٢٤ ± ۲ درجه سانتیگراد روی شیکر انکوباتور با سرعت ۹۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. ریشه‌های موئین نیز به صورت دوره‌ای در فواصل دو هفته‌ای در همان محیط‌ها کشت مجدد داده شدند. پس از حدود ۲ ماه انکوباسیون روی شیکر، ریشه‌های موئین گسترش یافته برای تجزیه و تحلیل زیست توده تازه و خشک با استفاده از یک ترازوی تحلیلی (RADWAG, AS 220.R1) برداشت شدند.

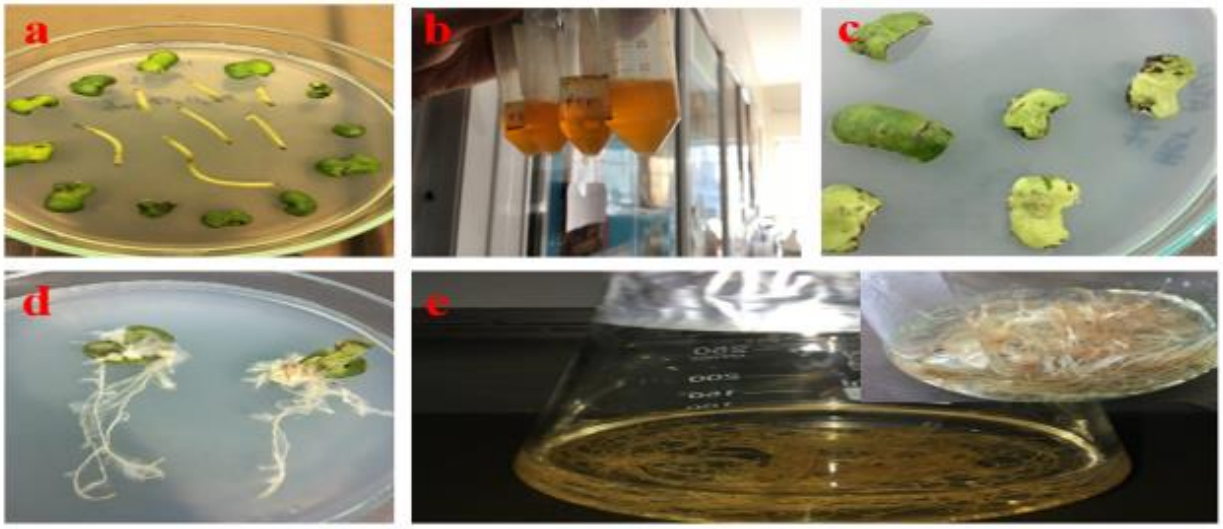
تجزیه و تحلیل داده‌ها: این مطالعه به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ فاکتور و ۳ تکرار (به عنوان پتری دیش حاوی ٦ ریزنمونه) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل چهار ژنوتیپ مختلف بروکلی (هراکلیون، کسل دام، ساکورا و سنتورا)، دو ریزنمونه (هیپوکوتیل و کوتیلدون) و دو سویه *آگروباکتریوم رایزوژنز* (ATCC-15834, A4) بودند. داده‌های مربوط به آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.4 و Excel تجزیه و تحلیل گردید و گروه‌بندی میانگین‌ها با روش LSD صورت پذیرفت.

تایید تراریختی با استفاده از PCR: ریشه‌های فرضی موئین و ریشه‌های غیر موئین کلم بروکلی، به کمک ازت مایع پودر شدند و با استفاده از روش CTAB، DNAهای نمونه‌ها استخراج شدند. پلاسمید باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* به عنوان کنترل مثبت و DNAهای ریشه‌های معمولی گیاه (غیرترانسفورم) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. DNA استخراج شده به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعین وجود ژن *rolB* مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر ژن *rolB* با آغازگرهای اختصاصی با توالی به شرح زیر بود: آغازگر رفت: 5′TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC آغازگر برگشت: 5′ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA

چرخه‌ی PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر شامل واسرشت سازی اولیه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ۵ دقیقه)، واسرشت سازی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد (۳۵ چرخه به مدت ۱ دقیقه)، اتصال در ٥٦ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه)، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه) و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۷ دقیقه) بود. جهت الکتروفورز محصولات PCR، ژل آگارز

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

۰/۹درصد 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.



شکل ۱- ایجاد و گسترش کشت ریشه‌های موئین: (a) ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون کلم بروکلی، (b) محلول باکتری‌ها، (c) عدم تشکیل ریشه های مویی در نمونه شاهد، (d) ریشه‌های موئین اولیه، (e) توسعه ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع MS

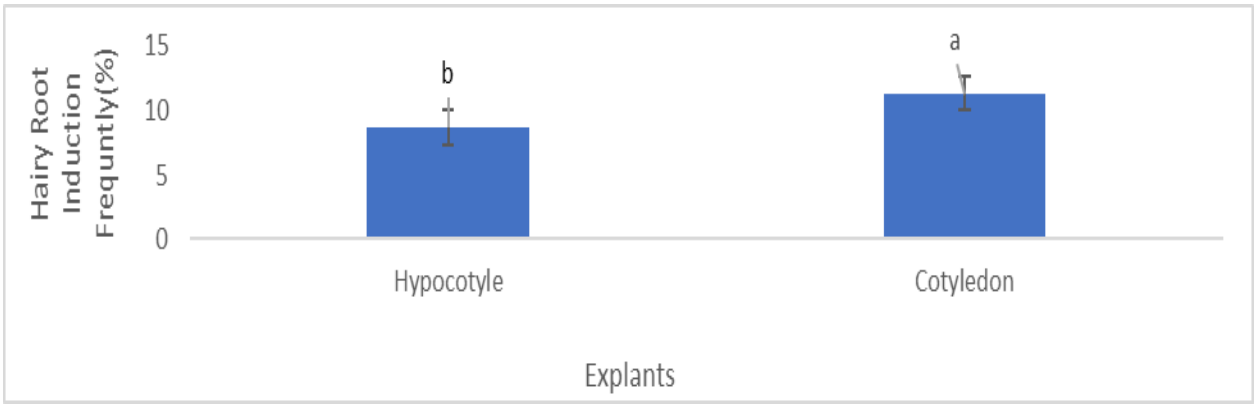
Fig 1. Establishment and expansion of hairy root cultures: (a) Hypocotyls and cotyledon explants of Broccoli, (b) The solution of bacteria, (c) Absence of hair root formation in the control, (d) Primary hair roots, (e) Development of hairy roots in the MS liquid mediu

نتایج و بحث
Results and Discussion

درصد و سرعت القای ریشه‌های موئین

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در برخی از نمونه‌های شاهد در محل زخم و نزدیک به آن کالوس تولید شد و هیچگونه ریشه‌ای ظاهر نگردید. برخی از نمونه‌های شاهد نیز پس از قرارگیری در داخل محیط MS، پس از مدتی نکروزه شده و از بین رفتند (شکل 1 قسمت C). در مطالعه حاضر بدون استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی، ریزنمونه‌های هیپوکویتل و کوتیلدون کلم بروکلی شادابی خود و در نتیجه توانایی تکثیر سلول‌ها را حفظ نمودند، این ویژگی لازمه کشت در شرایط درون شیشه‌ای چه به منظور ریزازدیادی و تکثیر گیاه و چه با سایر اهداف از جمله تراریختی گیاه است. این در حالی است که در برخی گیاهان دارویی قهوه‌ای شدن و سوختگی ریزنمونه‌ها از موانع اصلی ترانسفورم کردن بافت‌های گیاه و القای ریشه موئین در آنها به شمار می‌رود (Acid 2013). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه و سویه بر روی سرعت القای ریشه موئین و درصد القای ریشه موئین معنی‌دار نبوده است. نتایج حاکی از آن بود که ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون مورد مطالعه از نظر سرعت القای ریشه موئین با همدیگر تفاوت معنی‌دار داشته به طوری که سرعت القای ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل (با میانگین ۸/٦٦ روز) سریعتر از کوتیلدون (با میانگین(۱۱/۳۳) بوده است (نمودار ۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

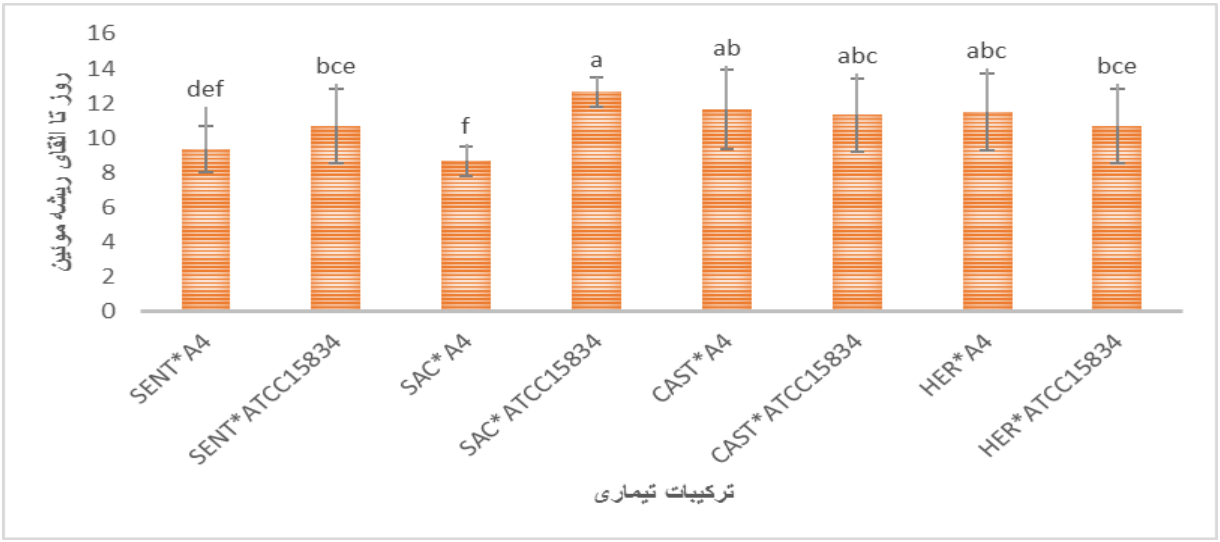


نمودار ۱- مقایسه میانگین ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل از نظر سرعت القای ریشه موئین (تعداد روز تا القای ریشه موئین) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد. در هر ستون وجود حروف غیر مشترک، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است.

Chart 1. Mean comparison of hairy root induction frequency (%) in different explants of Broccoli using two different strains of A. rhizogenes for hairy root induction based on the LSD test. Values in each column followed by the same letters are not significantly different at the 5% level.

تعداد روز تا القای ریشه های موئین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل سه گانه عوامل مورد بررسی (رقم*ریزنمونه*سویه باکتری) بر روی صفت تعداد روز تا القای ریشه موئین معنی‌دار نشده بود. همچنین نتایج نشان داد که از بین اثرات دوگانه عوامل مورد بررسی، اثر دوگانه (رقم گیاه * سویه باکتری) و (رقم گیاه * نوع ریزنمونه) بر روی صفت تعداد روز تا القای ریشه موئین معنی‌دار شده و سایر اثرات دوگانه معنی‌دار نشده بود. نتایج مقایسه میانگین اثر دوگانه رقم گیاه و سویه باکتری نشان داد که القای ریشه موئین در ترکیبات تیماری SAC*A4 و SENT*A4 سریع‌تر از سایر ترکیبات تیماری به وقوع پیوسته است (نمودار۲).



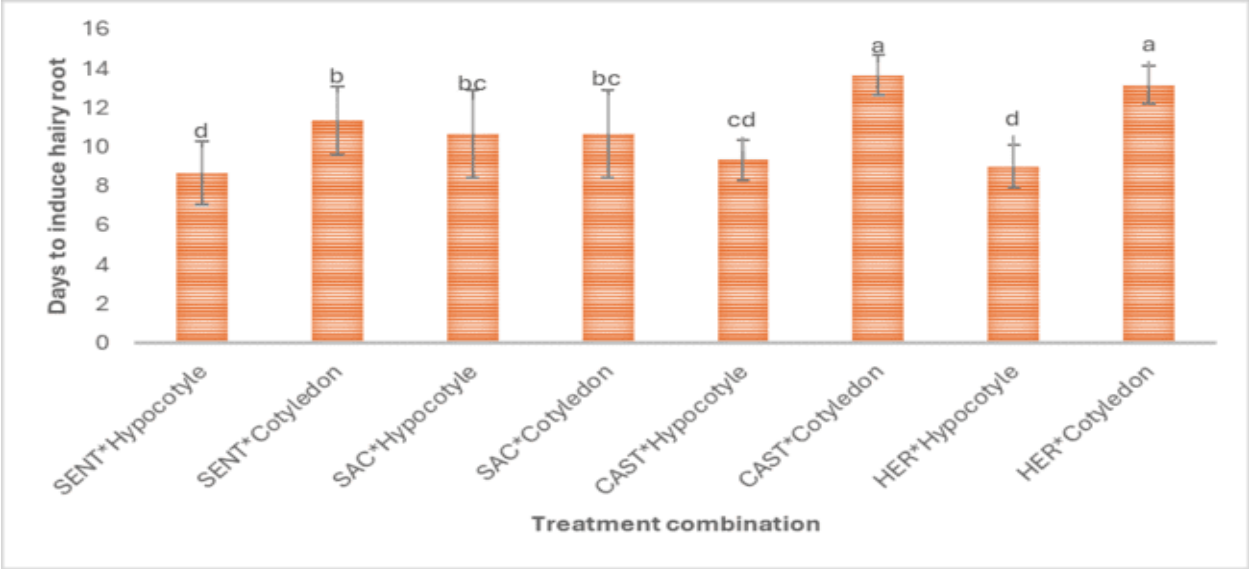
نمودار ۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر دوگانه بر تعداد روز تا القای ریشه موئین: چپ- رقم × سویه باکتری، راست- رقم × ریزنمونه گیاه. حروف مشترک در ستون‌ها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (آزمون دانکن، ٪۵) است.

Chart 2. Comparison of mean hairy root formation on days to root induction: Left – genotype × bacterial strain, Right –genotype × plant explant. Shared letters in columns indicate no significant difference (Duncan's test, 5%).

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

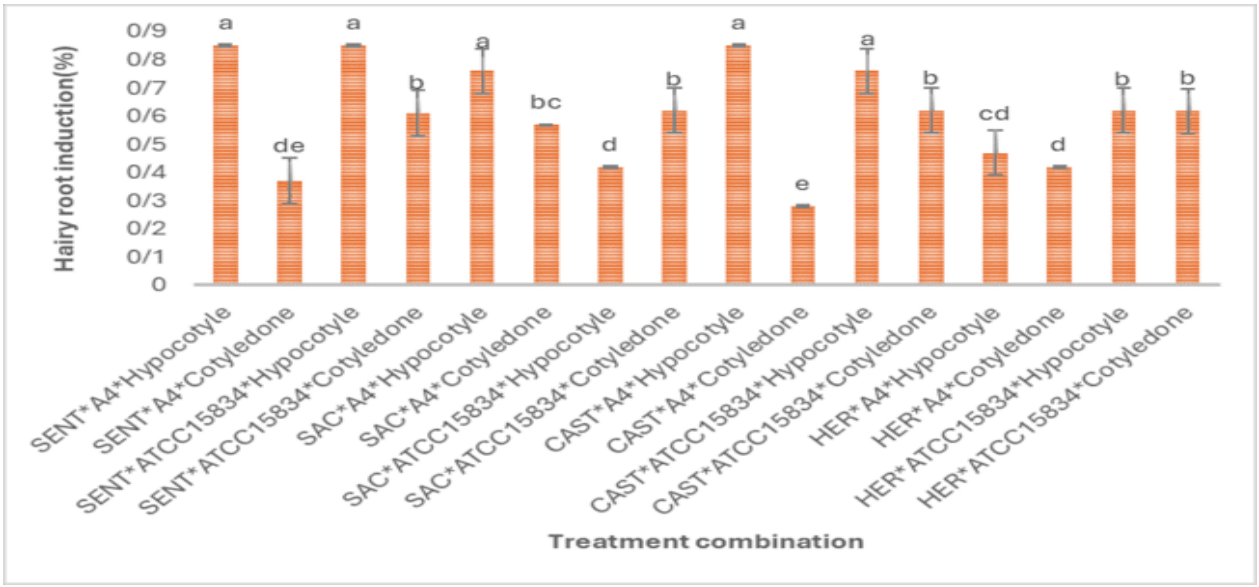
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

نتایج مقایسه میانگین اثر دوگانه رقم گیاه و نوع ریزنمونه نشان داد که القای ریشه موئین درترکیبات تیماری SENT*Hypocotyl، HER*Hypocotyl و CAST*Hypocotyl سریع‌تر از سایر ترکیبات تیماری به وقوع پیوسته است (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر دوگانه رقم* ریزنمونه گیاه بر روی تعداد روز تا القای ریشه موئین. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشد

Chart 3. Comparison of the average combination of treatments obtained from the effect of the double number* of the plant based on the number of days to induce hairy root. The presence of at least one common letter in each column indicates that there is no significant difference with Duncan's test at the 5 percent level.



نمودار ٤- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر دوگانه رقم* سویه باکتری بر روی درصد القای ریشه موئین. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشد.

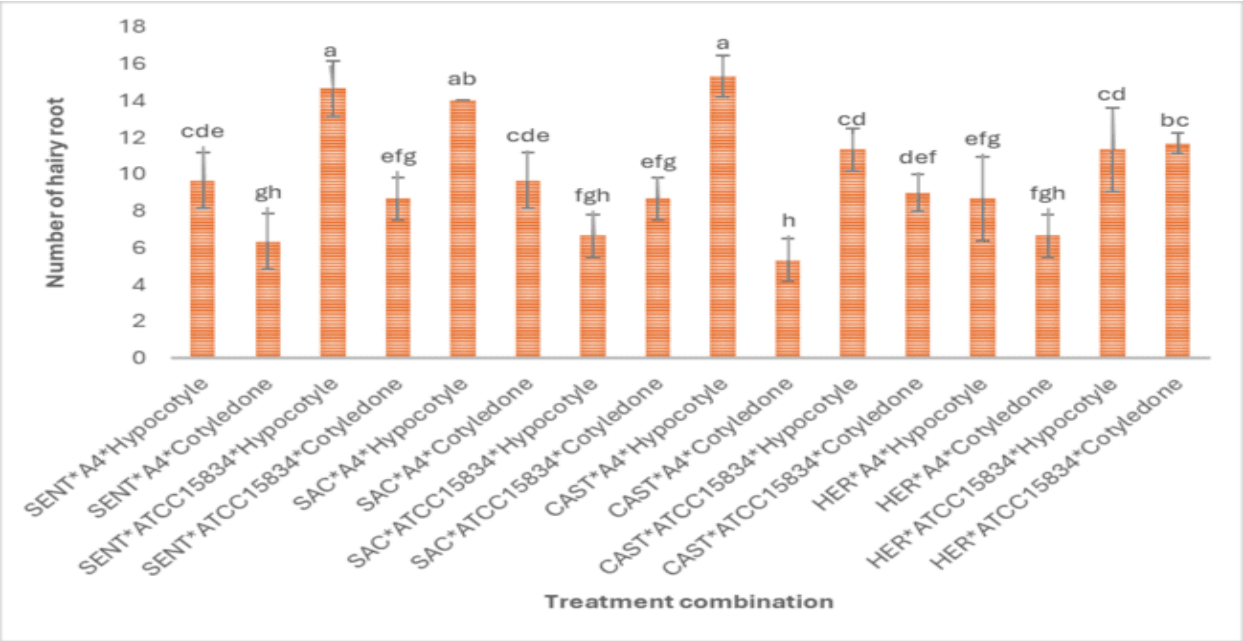
Chart 4. Comparison of the average combination of treatments obtained from the effect of double number* soy bacteria on the percentage of the hairy root. The presence of at least one common letter in each column indicates that there is no significant difference with Duncan's test at the 5 percent level.

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

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

تعداد ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل سه‌گانه عوامل مورد بررسی (رقم × ریزمونه × سویه باکتری) بر صفت «تعداد ریشه موئین» معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که بیشترین تعداد ریشه موئین مربوط به تیمارهای SENT×A4×Cotyledon، SAC×A4×Hypocotyl، SENT×ATCC15834×Hypocotyl و CAST×A4×Hypocotyl می‌باشد (نمودار ۵).



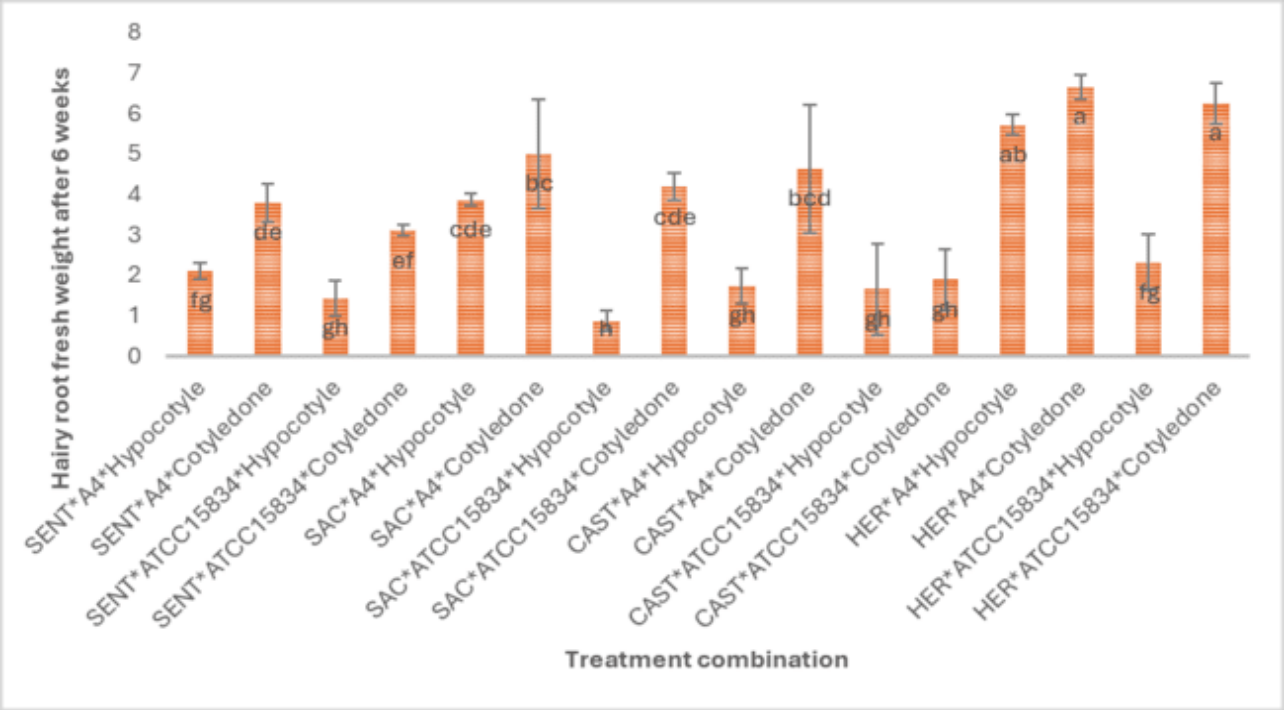
نمودار ۵- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر دوگانه رقم* سویه باکتری بر روی تعداد ریشه موئین. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشد.

Chart 5. Comparison of the average combination of treatment results obtained from the effect of the double number* of bacteria on the number of hairy root. The presence of at least one common letter in each column indicates that there is no significant difference with Duncan's test at the 5 percent level.

وزن تر ریشه‌های موئین پس از شش هفته

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل سه گانه عوامل مورد بررسی (رقم*ریزنمونه*سویه باکتری) بر روی صفت وزن تر ریشه‌های موئین پس از شش هفته، معنی‌دار شده است. مقایسات میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه عوامل مورد بررسی نشان داد که بیشترین وزن تر ریشه موئین مربوط به ترکیبات تیماری Her*A4*Cotyledon و Her* ATCC15834*Cotyledon بود (نمودار٦).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]



نمودار ٦- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه رقم*سویه باکتری*ریزنمونه گیاه بر روی وزن تر ریشه موئین پس از شش هفته. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشد.

Chart 6. Comparison of the average treatment combinations resulting from the triple effect of cultivar*bacterial strain*plant explant on hairy root fresh weight after six weeks. The presence of at least one common letter in each column indicates the absence of significant difference with Duncan's test at the 5% level.

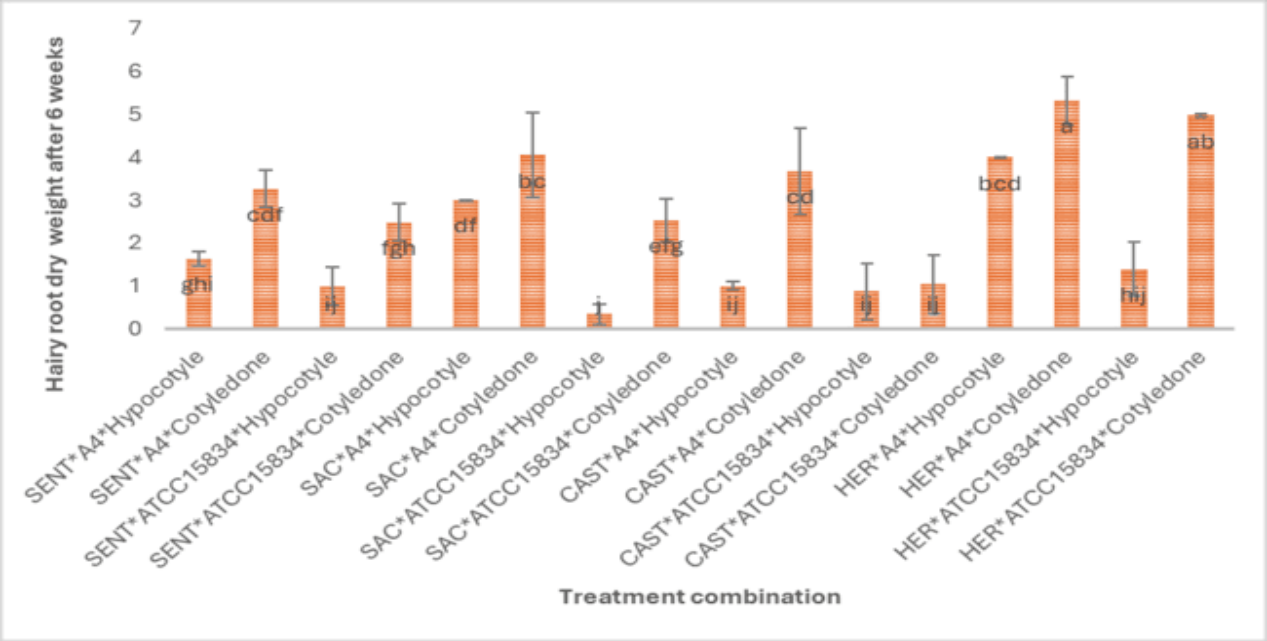
وزن خشک ریشه‌های موئین پس از شش هفته

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل سه گانه عوامل مورد بررسی (رقم*ریزنمونه*سویه باکتری) بر روی صفت وزن خشک ریشه‌های موئین پس از شش هفته، معنی‌دار شده است. مقایسات میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه عوامل مورد بررسی نشان داد که بیشترین وزن خشک ریشه موئین مربوط به ترکیبات تیماری Her*A4*Cotyledon و Her*ATCC15834*Cotyledon بود (نمودار 7).

تایید آنالیز PCR برای ریشه‌های موئین

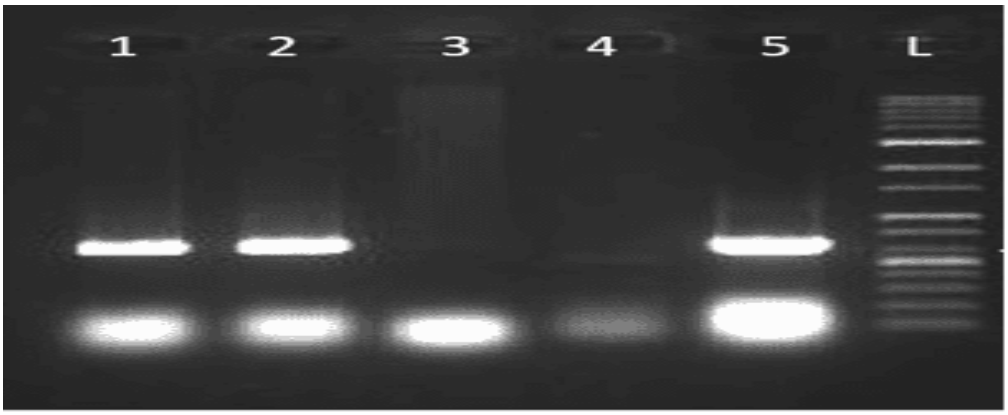
ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین تولیدی با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* با به کارگیری واکنش PCR تایید شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با DNA استخراج شده از ریشه های موئین تراریخت شده منجر به تکثیر قطعاتی با طول حدود (bp۳۰۰) شده بود. ولی این ژن در DNA به دست آمده از ریشه طبیعی و غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد (شکل5). همچنین محصولات PCR حاوی پلاسمید باکتری نوار یکسانی را دقیقاً در همان محل و اندازه ایجاد کردند که حضور T-DNA پلاسمیدهای باکتریایی را در ژنوم ریشه‌های موئین گیاه کلم بروکلی تایید می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که تراریختی و القای ریشه موئین در ریزنمونه‌های مختلف بروکلی توسط سویه‌های مختلف آگروباکتریوم امکانپذیر بوده و می‌تواند در مطالعات انتقال ژن و کشت ریشه‌های موئین به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مورد استفاده قرار گیرد (شکل 2).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]



نمودار ۷- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه رقم*سویه باکتری*ریزنمونه گیاه بر روی وزن خشک ریشه موئین پس از شش هفته. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح 5 درصد می‌باشد.

Chart 7. Comparison of the mean of treatment combinations resulting from the triple effect of cultivar*bacterial strain*plant microsample on hairy root dry weight after six weeks. The presence of at least one common letter in each column indicates the absence of significant difference with Duncan's test at the 5% level.



شکل ۲- آنالیز PCR قطعه ۶۸۰ bp ژن *rolB* ریشه‌های موئین کلم بروکلی . نوارهای (۱ و ۲) به ترتیب مربوط به دو نمونه از ریشه‌های موئین، نوار ۳ مربوط به ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ٤ مربوط به آب، ، نوار 5 مربوط به پلاسمید(کنترل مثبت)، نوار L مربوط به لدر.

Figure 2. PCR analysis of 680 bp fragment of *rolB* gene of hairy roots of broccoli. Bands (1 and 2) correspond to two samples of hairy roots, band 3 to normal root (negative control), band 4 to water, band 5 to plasmid (positive control), and band L to ladder

نتیجه‌گیری کلی: نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر دوگانه رقم گیاه و سویه باکتری نشان داد که سرعت القای ریشه های موئین در ترکیبات تیماری SAC*A4 و SENT*A4 از سایر ترکیبات تیماری بیشتر می باشد. هم‌چنین مقایسات میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه عوامل مورد بررسی نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه موئین مربوط به ترکیبات تیماری SENT*A4*Cotyledon، CAST*A4*Hypocotyl، SAC*A4*Hypocotyl، SENT*ATCC15834*Hypocotyl و CAST*ATCC15834*Hypocotyl بود. هم‌چنین

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

بررسی‌ها نشان داد که بیشترین تعداد ریشه موئین مربوط به ترکیبات تیماری SENT*A4*Cotyledon، SENT*ATCC15834*Hypocotyl، SAC*A4*Hypocotyl، CAST*A4*Hypocotyl می‌باشد. بیشترین وزن تر ریشه موئین با مقایسه‌ی میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه عوامل مورد بررسی مربوط به ترکیبات تیماری Her*A4*Cotyledon و Her*ATCC15834*Cotyledon بود. همچنین بیشترین وزن خشک ریشه موئین بر اساس مقایسات میانگین ترکیبات تیماری حاصل از اثر سه گانه عوامل مورد بررسی، مربوط به ترکیبات تیماری Her*A4*Cotyledon و Her*ATCC15834*Cotyledon می‌باشد. این پژوهش نشان داد که القای ریشه‌های موئین در کلم بروکلی با استفاده از *آگروباکتریوم رایزوژنز* امکان‌پذیر است و عوامل مختلفی چون ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه و سویه باکتری بر موفقیت فرآیند تأثیرگذارند. با بهینه‌سازی این عوامل، می‌توان به سیستم پایدار و پربازدهی برای تولید متابولیت‌های دارویی با ارزش دست یافت. این روش می‌تواند به عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیک امیدوارکننده در افزایش تولید ترکیبات دارویی گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

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

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

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

Jodaki, F., Sadat Noori, S. A., Mortazavian, S. M. M., & Mahmoudi, M. (2024). 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

Kim, S. J. et al. (2013). Glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (Brassica oleracea var. italica). Natural Product Communications, 8(2), 217–220.

Lee, Y., Kim, H. J., Park, C. K., Kim, Y. G., Lee, H. J., Kim, J. Y., & Kim, H. H. (2013). MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. Bone, 56(2), 383–389. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.07.007

Lim, T. K. (2014). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 7, flowers. Springer. Doi: 9789400773950

Mahmoudi, M., & Sadat Noori, S. A. (2024). 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

Mahmoudi, M., & Sadat Noori, A. (2025). Optimization of Hairy Root Induction in the Medicinal Plant garden Thyme (Thymus vulgaris) Using Agrobacterium Rhizogenes. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14(1), 111-119. Doi: 10.61882/gebsj.13.2.2

Mahmoudi, M., Sadat Noori, S. A., Ebrahimi, M., & Bahmankar, M. (2023). Optimization of induction of hairy roots in Perilla (Perilla frutescens (L.) Britton). Genetic Engineering and Biosafety Journal, 12(1), 17-27. Doi: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8

Nath, A., Mandal, S., Singh, R. K., Deka, B. C. & Ngachan, S. V. (2015). Ascorbic Acid, β-Carotene and Antioxidant Activity of Broccoli During Short-Term Refrigerated Storage. In Processing and Impact on Active Components in Food (pp. 27-34). Elsevier Inc. doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00004-4

Niazian, M., Sadat-Noori, S. A., Tohidfar, M., Galuszka, P. & Mortazavian, S. M. M. (2019). Agrobacterium-mediated genetic transformation of ajowan (Trachyspermum ammi (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. Industrial Crops and Products, 132, 29–40. DOI:10.1016/J.INDCROP.2019.02.005

Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. & Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of Artemisia annua L. Biotechnology Letters, 29, 1143–1146. DOI: 10.1007/s10529-007-9368-8

Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., & Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. Journal of Agricultural Research, 41(7), 507-540. https://handle.nal.usda.gov/10113/IND43967883

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]

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

Santín-Márquez, R., Alarcón-Aguilar, A., López-Diazguerrero, N. E., Chondrogianni, N. & Königsberg, M. (2019). Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. GeroScience, 41, 655–670. DOI: 10.1007/s11357-019-00061-7

Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K. H., & Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (Arctium lappa L.). Journal of Medicinal Plants, 11(44), 41-49. dorl.net/dor/20.1001.1.2717204.2012.11.44.17.9

Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1, 13–25. doi:10.1023/A:1015871916833

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

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.4]