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 ۱۱۹-۱۱۱

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 14, Number 1, Pages: 111-119

http://gebsj.ir/

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

10.61882/gebsj.14.1.9

بهینه‌سازی القای ریشه موئین در گیاه دارویی آویشن باغی با استفاده از *Agrobacterium Rhizogenes*

Optimization of Hairy Root Induction in the Medicinal Plant Garden Thyme Using *Agrobacterium Rhizogenes*

مهدی محمودی[۱]، سید احمد سادات نوری[۲*]، زهرا حیدری[۳]

Mahdi Mahmoudi[1], Seyed Ahmad Sadat-Noori*[2], Zahra Heidary[3]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، ۲- استاد، ۳- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد
گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
1- Master's graduate, 2- Professor, 3- Master's graduate
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: ۱۴۰۴/۸/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۱- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۲۷)
Received: 2025/10/26 | Accepted: 2026/01/11 | Published: 2026/01/17

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Mahmoudi M, Sadat Noori A, heidary Z. (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.14.1.9

URL: https://gebsj.ir/article-1-530-en.html

Abstract

The medicinal plant garden thyme (*Thymus vulgaris*) is of great importance due to its valuable secondary metabolites such as thymol. In this study, hairy root induction was performed using two strains of *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, A4) and three types of explants (cotyledon, stem, and leaf). The infected explants were transferred to MS medium containing antibiotics after co-cultivation. The transformation of the produced roots was confirmed using the PCR technique and specific primers for the *rolB* gene. The traits of induction percentage, fresh weight, and dry weight of the hairy roots were evaluated in a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. The PCR results, by amplifying the 780 bp fragment of the *rolB* gene, confirmed the transgenic nature of the induced roots. Data analysis showed that the interaction effect of bacterial strain and explant type was significant on all measured traits. The highest hairy root induction percentage (73%), fresh weight (2.90 g), and dry weight (1.91 g) were obtained in the combined treatment of stem explant and strain ATCC15834. Strain A4 was less efficient compared to strain ATCC15834. In general, this study reports for the first time the successful induction of hairy roots in the medicinal plant garden thyme. The findings indicate that the optimal selection of explant and bacterial strain plays a decisive role in the efficiency of hairy root production. The hairy roots induced in this research can be used as a stable and efficient system for the large-scale production of valuable thyme secondary metabolites under in vitro conditions and at the bioreactor scale.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Garden thyme, Hairy roots, Secondary metabolites.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

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

خلاصه

گیاه دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه باارزشی مانند تیمول از اهمیت بالایی برخوردار است. در این مطالعه، القای ریشه موئین در سه نوع ریزنمونه (کوتیلدون، ساقه و برگ) آویشن باغی با استفاده از دو سویه *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, A4) بهینه‌سازی شد. ریزنمونه‌های تلقیح داده شده با *A. rhizogenes* پس از همکشتی، به محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. تراریختی ریشه‌های تولیدشده با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* تأیید گردید. صفات درصد القا، وزن تر و وزن خشک ریشه‌های موئین در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج PCR با تکثیر قطعه ۷۸۰ جفت بازی ژن *rolB*، ماهیت تراریخت ریشه‌های القاشده را تأیید کرد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. 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. به طور کلی، این مطالعه برای اولین بار القای موفق ریشه موئین در گیاه دارویی آویشن باغی را گزارش می‌کند. یافته‌ها نشان می‌دهد که انتخاب بهینه ریزنمونه و سویه باکتری نقش تعیین‌کننده‌ای در بازده تولید ریشه موئین دارد. ریشه‌های موئین القاشده در این تحقیق می‌توانند به عنوان یک سیستم پایدار و کارآمد برای تولید انبوه متابولیت‌های دارویی باارزش آویشن در شرایط درون‌شیشه‌ای و در مقیاس بیورآکتور مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آویشن باغی، *اگروباکتریوم رایزوژنز*، ریشه موئین، متابولیت ثانویه.

مقدمه Introduction

آویشن باغی با نام علمی (*Thymus vulgaris*) گیاهی چند ساله، علفی پایا و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی از خانواده نعناعیان است (Wirtu *et al*., 2024). حدود ۳۵۰ گونه دارد که در ایران فقط ١٤ گونه آن شناخته شده است. به شرایط گرم و خشک سازگاری دارد و به طور وسیعی در شرایط نیمه خشک هم دیده می‌شود (Hosseinzadeh *et al*., 2015). ترکیبات اصلی و باارزش گیاه آویشن باغی، تیمول و کارواکرول هستند که خواص ضدعفونی‌کنندگی قوی دارند. همچنین فلاونوئیدها، تانن‌ها و اسیدهای فنولی از دیگر ترکیبات موثر آن محسوب می‌شوند (Jilani *et al*., 2025). آویشن باغی به دلیل ترکیبات ضد میکروب و ضد قارچ خود، به طور موثری در درمان عفونت‌های تنفسی و گوارشی استفاده می‌شود. همچنین خاصیت ضد اسپاسم و آنتی‌اکسیدانی قوی دارد (Majedi *et al*., 2024). به دلیل رشد جمعیت، ناپایداری شرایط اقلیمی و کاهش مساحت اکوسیستم‌های طبیعی، لازم است که از رویکردهای مدرن بیوتکنولوژیکی برای به‌دست آوردن متابولیت‌های ثانویه با بهره‌وری بالا استفاده شود(Stepanova *et al*., 2022). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت بافت گیاهی امکان‌پذیر است. به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله کومارین، کشت ریشه موئین یک گزینه مناسب می‌باشد (Kubica *et al*., 2020). ریشه‌های موئین از طریق آلوده کردن سلول‌های گیاهی توسط *A. rhizogenes* (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) تشکیل می‌شوند. این آنکوژن‌ها فرآیندهای سلولی گیاه را مانند تعادل فیتوهورمون‌ها، متابولیسم اکسین و سیتوکینین و سیگنال‌دهی تعدیل می‌کنند. این ریشه‌ها قادراند ترکیباتی که حتی در گیاه وجود ندارند را سنتز کنند (Paolis *et al*., 2019). ریشه‌های موئین 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. این

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

ریشه‌ها برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی ارزشمند می‌باشند و 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).

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته، تاکنون در ایران و جوامع بین‌المللی مطالعات اندکی در زمینه القای ریشه موئین در گیاه دارویی آویشن باغی انجام شده است. لذا هدف از این مطالعه، بررسی القای ریشه موئین در گیاه دارویی آویشن باغی با استفاده از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* جهت استفاده در مطالعات آینده از جمله کاربرد در تولید متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

بذر آویشن باغی از شرکت پوپونیک تهران خریداری شد. به منظور ضدعفونی کردن بذرها از محلول اتانول ٪۷۰ به مدت یک دقیقه و محلول ۱٪۵ هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه همراه با تکان دادن، در زیر هود استریل استفاده شد. پس از ضدعفونی، بذرهای استریل را به منظور تولید گیاهچه‌های سترون جهت تهیه‌ی ریزنمونه، در محیط کشت MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۸ گرم در لیتر آگار، ۵/۸ =pH و بدون هورمون کشت شدند. ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲±۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور LUX ۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از ۷ روز بذرها جوانه زدند و بعد از گذشت یک ماه برای انجام تلقیح از قسمت‌های مختلف گیاهچه‌های سترون (کوتیلدون، ساقه و برگ)، ریز نمونه تهیه شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: در این تحقیق، دو سویه‌ی باکتری *A. rhizogenes* (ATCC-15834 و A4) استفاده شد. کشت باکتری در محیط‌های LB مایع حاوی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین انجام و در دمای ۲۸ درجه داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ در دقیقه قرار گرفتند. OD_{600} محلول باکتری به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری و این پارامتر در ۰/٦ تنظیم و با این محلول ریزنمونه‌ها تلقیح شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون، ساقه و برگ با اندازه تقریبی یک سانتی‌متر پس از زخم سطحی به مدت ۸ 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 منتقل و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ٤۸ ساعت، ریزنمونه‌ها از محیط همکشتی خارج و 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 شد 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 LUX۳۰۰۰ با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

استقرار و نگهداری ریشه‌های موئین درون شیکر انکوباتور: زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود ۵ سانتی متری رسید، در هر تیمار و در هر تکرار، ٤ کلون برتر که رشد بیشتری داشتند، جدا و به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیترمحیط کشت MS/2 مایع منتقل و در تاریکی و 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 (احتمالاً تراریخت) و ریشه‌های غیرموئین (طبیعی) با روش CTAB استخراج شد. 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 –

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

(Cheng *et al*., 2021). پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* استخراج و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به منظور تایید حضور این ژن انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* به صورت زیر بود:

Forward 5-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3
Reverse 5-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3

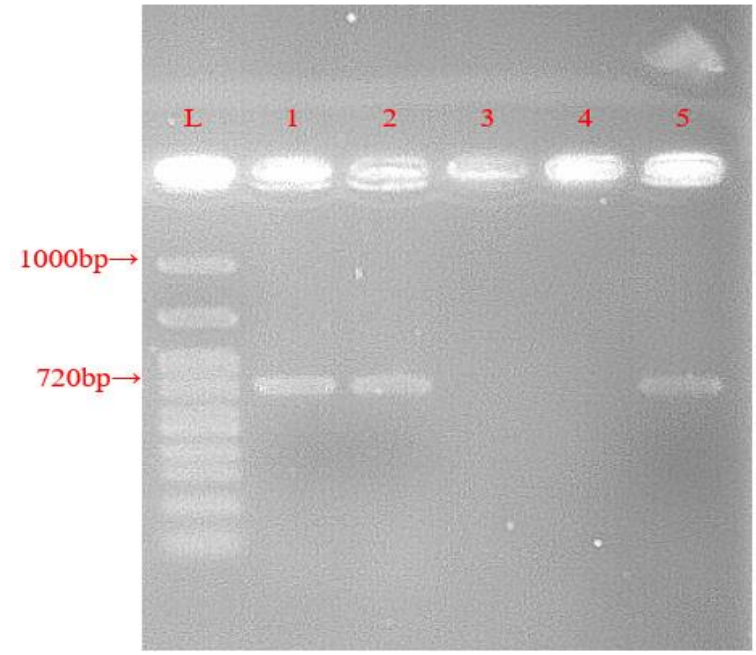
چرخه‌ی PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر شامل واسرشت سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ۵ دقیقه)، واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳۵ چرخه به مدت ۱ دقیقه)، اتصال در ٥٦ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه)، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱ دقیقه) و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۷ دقیقه) بود. جهت الکتروفورز محصولات PCR، ژل آگارز 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.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (۱۰ ریزنمونه در هر تکرار) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه با سه سطح (کوتیلدون، ساقه و برگ) و سویه باکتری با دو سطح(ATCC-15834 و A4) بودند. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار R نسخه‌ی ٤.۲.۱ استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با روش LSD انجام گرفت.

نتایج و بحث
Results and Discussion

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 (شکل ۱). بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین در گیاه دارویی آویشن باغی با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rolB* تایید شد.



شکل ۱- تجزیه و تحلیل PCR قطعه ۷۸۰bp ژن *rolB* . نوارهای ۱ و ۲ مربوط به دو نمونه از ریشه‌های موئین القا شده، نوارهای ٤ و ۵ به ترتیب مربوط به ساقه و ریشه معمولی (کنترل منفی)، نوار ۵ مربوط به پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، نوار L مربوط به لدر ۱۰۰۰bp.

Figure 1. PCR analysis of the *rolB* gene bp780 fragment. Bands 1 and 2 correspond to two samples of induced hairy roots, bands 4 and 5 correspond to normal stem and root (negative control), band 5 corresponds to the bacterial plasmid (positive control), band L corresponds to the 1000 bp lader.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

محققان بر این عقیده‌اند که در میان ژن‌های *rol* موجود در *A. rhizogenes*، *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). با توجه به اینکه در ریشه‌ی طبیعی گیاه آویشن باغی که در محیط گلخانه حاصل شد، باندی از حضور ژن *rolB* در آزمایش PCR تکثیر نشد، در نتیجه *A. rhizogenes* در این گیاه وجود ندارد، یا ژن‌های *rol* که باعث ایجاد ریشه‌های موئین می‌شوند را به ژنوم گیاه منتقل نکرده است.

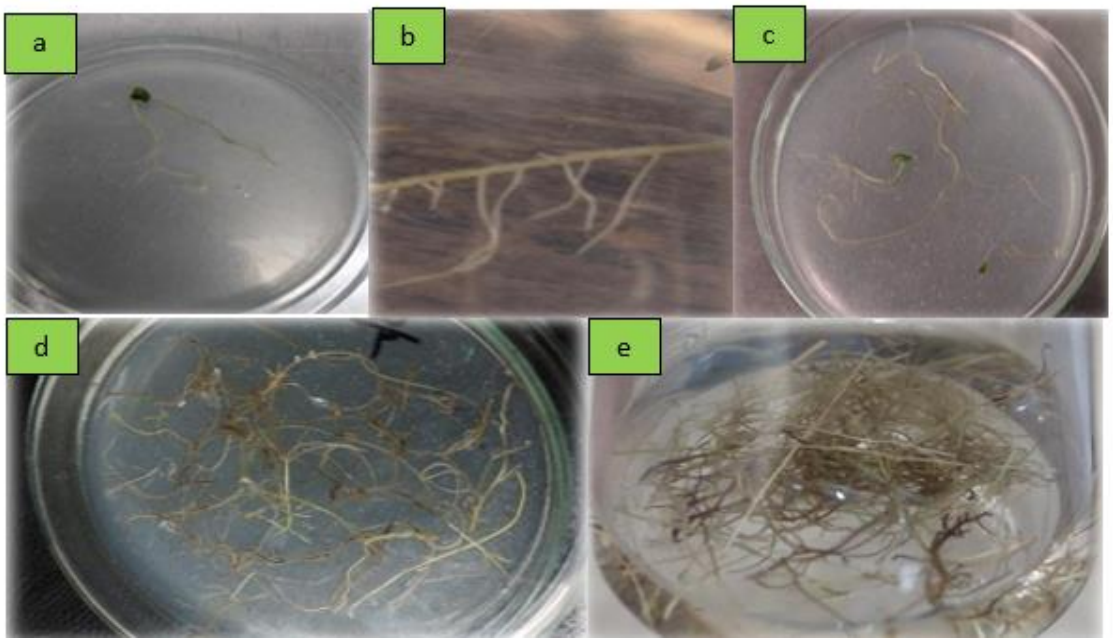
القای ریشه موئین

پژوهشگران بر این باورند که وقتی یک سلول گیاهی زخمی می‌شود، ترکیبات فنلی آن به محیط اطراف منتشر می‌شوند و این ترکیبات توسط *Agrobacterium*دریافت و به سمت محل زخم جذب می‌گردند. همچنین، این ترکیبات می‌توانند بیان ژن‌های بیماریزا را در باکتری‌ها تحریک کنند که این موضوع در فرآیند تراریختی و انتقال ژن به سلول هدف بسیار مؤثر است. البته، پژوهشگران اذعان کردند که این قابلیت در بین ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بوده و پاسخ‌های متفاوتی به زخم نشان می‌دهند (Oksman-Caldentey and Hiltunen, 1996). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه دارویی پریلا (*Perilla ferutescens*) انجام شد نتایج نشان داد که ترکیب تیماری سویه باکتری *A. rhizogenes* – ATCC-15834 و ریزنمونه کوتیلدون بیشترین درصد القا ریشه موئین در ریزنمونه، وزن تر و خشک ریشه‌های موئین حاصل از آن را ایجاد کرد (Mahmoudi *et al*., 2023). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه زنیان *(Trachyspermum)* انجام شد، بهترین سویه‌ها برای القای ریشه موئین به ترتیب سویه‌های ATCC-15834 (۵۰ درصد) و A4 (۱۰ درصد) بودند (Moradi *et al*., 2022). القای ریشه‌های موئین در گیاه دارویی بیلهر(*Dorema aucheri*) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه *Agrobacterium rhizogenes* قرار گرفت، به‌طوری‌که ترکیب سویه ATCC-15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین درصد القا و بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های موئین را نشان داد (Jodaki et al., 2025). در مطالعه‌ای که بر روی جنسینگ هندی (*Withania somnifera*) انجام شد حداکثر زیست توده ریشه‌های موئین توسط سویه A4 مشاهده شد (Soltaninezhad *et al*., 2024). در گزارش ماجامدار و همکاران، مشخص شده است که در گونه *Bacopa monnieri* از خانواده بارهنگیان، ریشه‌های موئین تولید شده به واسطه باکتری *A. 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 (Liu *et al*., 2024).

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]



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

Figure 2- Stages of growth and development of hairy roots in the strain ATCC-15834 medicinal plant garden thyme: Hairy roots on solid MS medium (a, b, c, and d), Growth and development of hairy roots after 2 months of their transfer to Erlenmeyer flasks containing liquid MS/2 medium in an incubator shaker €

درصد القا ریشه موئین

نتایج نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بر روی درصد القای ریشه موئین معنی‌دار بوده است (در سطح ۵ درصد). مقایسه میانگین تیمارها حاکی از آن بود که بیشترین درصد القای ریشه موئین (۷۳ درصد) در تیمار ریز نمونه ساقه و سویه ATCC-15834 باکتری و کمترین درصد (۲۰ درصد) مربوط به تیمار ریز نمونه کوتیلدون و سویه A4 باکتری مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۳).

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

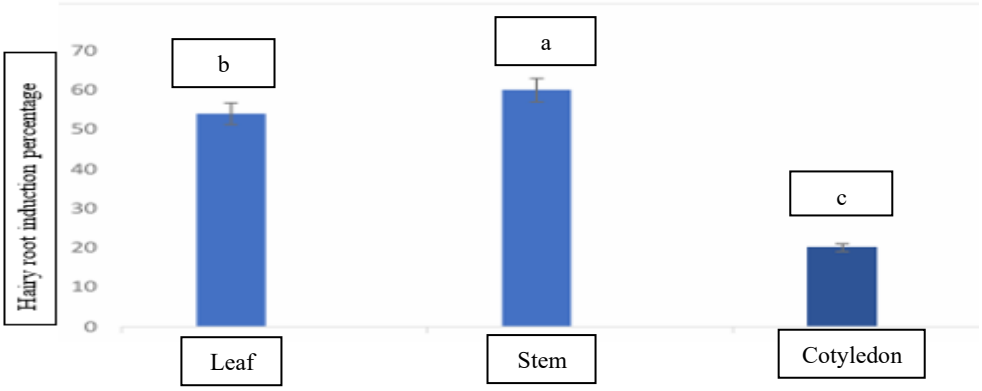
Treatment (Bacteria Strains*Explants)	Percentage of hairy root induction	Fresh weight of hairy roots	Dry weight of hairy roots
ATCC-15834*Stem	0.73 a	2.90 a	1.91 a
ATCC-15834*Leaf	0.53 b	1.37 b	0.82 b
ATCC-15834*Cotyledon	0.26 c	1.02 c	0.53 c
A4*Stem	0.46 a	1.14 a	0.71 a
A4* Leaf	0.33 b	1.06 b	0.63 b
A4* Cotyledon	0.2 b	0.55 b	0.10 b

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]



شکل ۳- اثر نوع ریزنمونه بر روی درصد القای ریشه موئین در آویشن باغی

Chart 3- Effect of explant type on the percentage of hairy root induction in garden thyme

وزن تر و خشک ریشه موئین

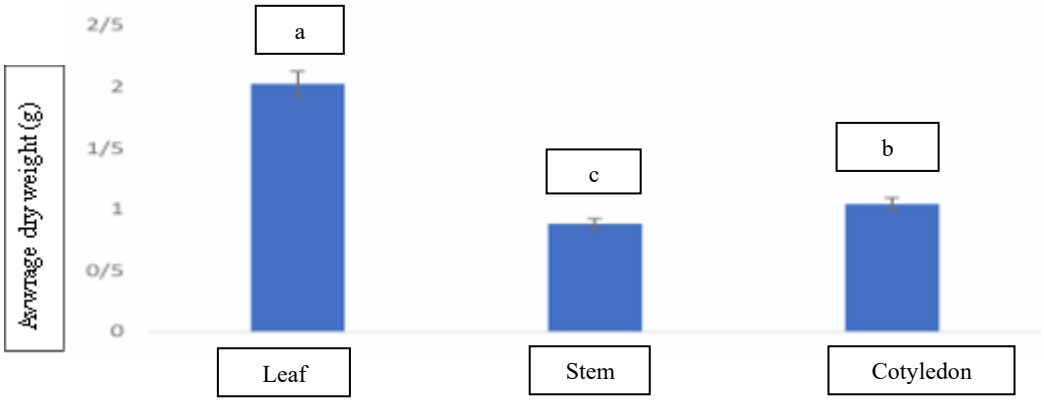
پژوهشگران معتقدند که اختلاف در میزان رشد ریشه‌های موئین و بیوماس آن‌ها مربوط به تنوع پلاسمیدهای وارد شده توسط سویه‌های مختلف باکتری است که به چگونگی تاثیر ژن‌های *rol* مربوط می‌شود. بیان این ژن‌ها سطح هورمون‌های اکسین و سیتوکینین گیاه میزبان و نیز میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطح هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهند (Tiwari *et al*., 2007). در آزمایشی که بر روی گیاه *Justicia gendarussa* انجام شد نتایج نشان داد که ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین را دارد (Wahyuni *et al*., 2015).

در این پژوهش 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 که بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه از نظر وزن تر ریشه موئین تفاوت معنی‌داری وجود داشته به طوری که بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین در ترکیب سویه ATCC-15834 و ریزنمونه ساقه حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول ۱، شکل ٤ و ٥).

در مطالعه‌ای که بر روی گیاه یونجه انجام شد، نتایج نشان داد که وزن خشک ریشه‌های القا شده در ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به سایر ریزنمونه‌های ارزیابی شده بیشتر بود (Mirzaie Delbari *et al*., 2022). بر خلاف ریشه‌های معمولی، ریشه‌های موئین به دلیل فقدان پلاستیدهای مختلف از جمله آمیلوپلاست، پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین‌گرایی) نشان داده و در مقایسه با ریشه‌های معمولی انشعابات بیشتر، رشد سریع‌تر و بیوماس بیشتری داشته و در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توانند کشت شوند (Georgiev *et al*., 2007).

وزن خشک ریشه‌های موئین پس از دو ماه، نیز به طور معنی‌داری متاثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. 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 در ترکیب تیماری سویه ATCC-15834 و ریزنمونه ساقه حاصل شده و به طور معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری بیشتر بوده است (جدول ۱). در این مطالعه، بهترین ریزنمونه و بهترین سویه *A. rhizogenes* برای القای ریشه موئین و در نهایت بایومس تولیدی، سویه ATCC-15834 و ریزنمونه ساقه می‌باشد و لذا پیشنهاد می‌شود برای مطالعات بعدی در ریشه‌های موئین گیاه آویشن باغی، استفاده از این ترکیب تیماری برای رسیدن به حجم بالایی از ریشه موئین به خصوص در بیوراکتور مناسب می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]



شکل ٤- اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر روی درصد وزن تر ریشه موئین در آویشن باغی

Chart 4 - Effect of bacterial strain and explant type on the percentage of fresh weight of hairy roots in garden thyme

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که القای ریشه موئین در *Thymus vulgaris* فرآیندی به‌شدت وابسته به برهم‌کنش سویه *A. rhizogenes* و نوع ریزنمونه است و این برهم‌کنش تعیین‌کننده کارایی انتقال T-DNA، بیان ژن‌های *rol* و در نهایت تولید زیست‌توده ریشه‌ای می‌باشد. برتری معنی‌دار سویه ATCC15834 در ترکیب با ریزنمونه ساقه، که به بیشترین درصد القا و بالاترین وزن تر و خشک منجر شد، احتمالاً بازتاب تفاوت‌های ساختاری و تنظیمی پلاسمید Ri و توان بالاتر این سویه در فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به اکسین از طریق بیان مؤثرتر ژن *rolB* است. پاسخ قوی‌تر ریزنمونه ساقه نسبت به کوتیلدون و برگ را می‌توان به حضور سلول‌های مریستمی فعال‌تر، ظرفیت بالاتر ترشح ترکیبات فنولی القاکننده ژن‌های ویرولانس و آمادگی بیشتر بافت برای تمایز ریشه‌ای نسبت داد. تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌ها از طریق تکثیر قطعه اختصاصی *rolB*، همراه با افزایش چشمگیر بیوماس، نشان می‌دهد که ریشه‌های موئین القاشده از پایداری ژنتیکی و توان متابولیکی بالایی برخوردارند. در مجموع، این مطالعه نه‌تنها نخستین گزارش موفق القای ریشه موئین در آویشن باغی را ارائه می‌دهد، بلکه با معرفی ترکیب بهینه سویه–ریزنمونه، چارچوبی قابل اتکا برای توسعه سامانه‌های پایدار تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، به‌ویژه تیمول، در شرایط درون‌شیشه‌ای و مقیاس بیورآکتور فراهم می‌سازد.

منابع

References

Cheng, Y., Wang, X., Cao, L., Ji, J., Liu, T., & Duan, K. (2021). Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods*, *17*, 1-12. **doi.org/10.1186/s13007-021-00778-7**

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**

Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A. J., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The Application of *Thymus vulgaris* in Traditional and Modern Medicine : A Review. 9(3), 260–266. **doi.org/10.5829/idosi.gjp.2015.9.3.94246**

Jilani, S., Ferjeni, M., Al-Shammery, K., Rashid Mohammed AlTamimi, H., Besbes, M., Ahmed Lotfi, S., ... & Ben Selma, W. (2025). The synergistic effect of Thymus vulgaris essential oil and carvacrol with imipenem against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: in vitro, molecular docking, and molecular dynamics studies. *Frontiers in Pharmacology*, *16*, 1582102. **doi.org/10.3389/fphar.2025.1582102**

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) :180-189.2025. Doi: **10.61882/gebsj.13.2.2 [In Persian]**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

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**

Liu, L., Qu, J., Wang, C., Liu, M., Zhang, C., Zhang, X., ... & Zhang, S. (2024). An efficient genetic transformation system mediated by *Rhizobium rhizogenes* in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion. *Plant Biotechnology Journal*, *22*(8), 2093-2103. **doi.org/10.1111/pbi.14328**

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) **doi: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.4.8. [In Persian]**

Majedi, S., Yassen, A. O., & Issa, S. Y. (2024). Assessing the combination of three plant species: Thyme (*Thymus vulgaris*), Damask Rose (Rosa damascena), and Stachys lavandulifolia vahl, to determine their synergistic effects on antimicrobial properties. *Chemical Review and Letters*, *7*(2), 294-310. **doi.org/10.22034/crl.2024.437005.1286**

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

Moradi, N., Sadat Noori, S. A., Fadavi, A., Mortazavian, S. M. M., & Pakdin Parizi, A. (2021). Analysis efficiency of Iranian Ajowan ecotypes on hairy root production mediated by different *Agrobacterium rhizogenesis* strains. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *10*(1), 117-127. **doi: 10.30479/IJGPB.2022.17488.1325.**

Oksman-Caldentey, K. M., & Hiltunen, R. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field crops research*, *45*(1-3), 57-69. **doi: 10.1016/0378-4290(95)00059-3**

Paolis, A. D., Frugis, G., Giannino, D., Iannelli, M. A., Mele, G., Rugini, E., ... & Caretto, S. (2019). Plant cellular and molecular biotechnology: following Mariotti's steps. *Plants*, 10;*8*(1), 18. **doi: 10.3390/plants8010018**

Soltaninezhad, N., Sadat-Noori, S. A., Izady-Darbandi, A., Amini, F., & Mirjalili, M. H. (2023). Induction and study of hairy root growth pattern in Indian ginseng medicinal plant using *Agrobacterium rhizogenes*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *12*(2), 184-194. **dx.doi.org/10.61186/gebsj.12.2.184 [In Persian]**

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., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G. Q., & Zheng, G. C. (2007). Genetic transformation of Gentiana macrophylla with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, *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**

Wirtu, S. F., Ramaswamy, K., Maitra, R., Chopra, S., Mishra, A. K., & Jule, L. T. (2024). Isolation, characterization and antimicrobial activity study of *Thymus vulgaris*. *Scientific Reports*, *14*(1), 21573. **doi.org/10.1038/s41598-024-71012-2**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.1.9]