

بهینه‌سازی القاء، شرایط کشت و آنالیز فیتوشیمیایی ریشه‌های موین در گیاه دارویی استبرق (*Calotropis procera*)

اسماعیل داردان و مراد جعفری*

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

چکیده

استبرق (*Calotropis procera*) از تیره خرزهره، یک گیاه صنعتی و دارویی مهم است. این گیاه منبعی از متابولیت‌های ثانویه متعدد با خواص دارویی مختلف از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی و ضدسرطانی می‌باشد. ریشه‌های موین القاشده توسط *Agrobacterium rhizogenes* پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای تولید متابولیت‌های دارویی مهم فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر، اثرات سویه‌های *A. rhizogenes* (A4، A7، A13، K599، ATCC 11325، ATCC 15834)، مدت زمان تلقیح (۱۵ و ۳۰ دقیقه)، نوع ریزنمونه (لپه، محور زیرلپه، نوساقه، برگ) و سن ریزنمونه (۱۴، ۱۸، ۲۴، ۳۲ و ۴۲ روز) بر تولید ریشه موین در استبرق مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر محیط‌های مختلف کشت (MS، B5، SH و WPM) بر میزان تجمع زیست‌توده در بهترین لاین‌های ریشه موین مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، القاء ریشه‌ی موین فقط در سویه‌های ATCC 15834 و K599 و ریزنمونه‌های برگ و نوساقه موفقیت‌آمیز بود. حداکثر میزان القاء ریشه‌های موین (۵۰٪) در ریزنمونه‌های برگی با سن ۱۸ روز در مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه‌ای با سویه K599 حاصل شد. بین لاین‌های ریشه موین از نظر رشد و تولید زیست‌توده تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیشترین میزان تولید زیست‌توده تر (تقریباً ۱۳ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) در لاین‌های ریشه موین کشت شده در محیط کشت MS بدست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل کل و فلاونوئید کل در لاین‌های ریشه موین منتخب با تولید زیست‌توده بالا (K5L4 و A15L7) در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته بیشتر بود. آنالیز GC-MS نشان داد محتوای فیتوشیمیایی ریشه‌های موین استبرق تقریباً ۲ الی ۹ برابر بیشتر از ریشه‌های طبیعی بود.

واژه‌های کلیدی: استبرق، *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه‌های موین، متابولیت‌های ثانویه، آنالیز GC-MS

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: m.jafari@urmia.ac.ir

مقدمه

چگالی کم، برای ساخت کامپوزیت‌های سبک وزن استفاده می‌شود (۲۸).

قسمت‌های مختلف استبرق به عنوان دارو به طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی مانند صرع، زردی، سرماخوردگی و سرفه، اسهال، درمان زخم و عفونت‌های پوستی و قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶۷ و ۴۵). مطالعات فارماکولوژی نشان داد استبرق دارای فعالیت ضد درد (۱۵)، ضد تشنج (۴۷)، ضد التهاب (۸)، ضد قارچ

استبرق با نام علمی *Calotropis procera* (Aiton) *Apocynaceae* درختچه‌ای دائمی و چندساله از خانواده است (شکل ۱) که در نواحی گرم بیابانی جنوب غربی آسیا و ناحیه مدیترانه تا سواحل آفریقا انتشار دارد (۷ و ۴۵). استبرق از گونه‌های گیاهی ارزشمند در عرصه طبیعی، صنعتی و دارویی می‌باشد. این گیاه به شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، شوری و گرما مقاوم است و در احیای زمین‌های مناطق خشک و بیابانی نقش مهمی دارد (۶۷). از الیاف ساقه استبرق، با توجه به توخالی بودن و

Sun و همکاران (۵۸) در ریشه‌های مویین این گیاه تولید ترکیبات کاردنولیدی تحت تاثیر محرک‌های کیتوسان، متیل‌جاسمونات و عصاره مخمر را مطالعه کردند. با توجه به اهمیت دارویی استبرق، استفاده از روش‌های زیست‌فناورانه برای تولید متابولیت‌های دارویی آن ضروری به نظر می‌رسد. بر اساس منابع علمی قابل دسترس، تاکنون مطالعات زیست‌فناورانه‌ای در زمینه تراریخت‌سازی ژنتیکی و القا و تولید ریشه مویین با در نظر گرفتن فاکتورهای موثر در گونه *C. procera* گزارش نشده است. لذا در این تحقیق برای اولین بار بهینه‌سازی القاء ریشه مویین در گیاه استبرق و مقایسه محتوای ترکیبات اسانس لاین‌های گزینش شده ریشه مویین در مقایسه با ریشه طبیعی (ریشه غیرتراریخته) مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- درختچه استبرق (الف)، گل‌ها (ب)، کپسول‌های بذر (پ) و بذرها با تارهای ابریشمی (ت). خط مقیاس (الف): ۵۰ میلی‌متر، خط مقیاس (ب و پ): ۱۰ میلی‌متر، خط مقیاس (ت): ۵ میلی‌متر. محل عکس‌برداری: استان هرمزگان، شهرستان پارسیان.

مواد و روشها

مواد گیاهی و کشت گیاه: بذرهای استبرق از مراتع طبیعی شهرستان پارسیان، استان هرمزگان با مختصات جغرافیایی بین $22^{\circ} 53'$ طول شرقی و $7^{\circ} 27'$ عرض شمالی و ارتفاع ۵۴ متری از سطح دریا جمع‌آوری گردید.

(۲۷)، ضد باکتری (۳۴) و فعالیت حشره‌کشی (۷) قابل توجهی است. اخیراً، گزارش شده است ترکیبات فعال استبرق اثرات سمیت سلولی بالایی نسبت به سلول‌های سرطانی دارد (۱۲، ۲۳ و ۵۳). طیف وسیعی از ترکیبات زیستی از جمله فنل، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی، آلکالوئیدها، رزین‌ها، آنتوسیانین و ترکیبات استرولی در این گیاه شناسایی شده است (۲۷ و ۶۷).

تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های رایج از قبیل جمع‌آوری از طبیعت و کشت در زمین‌های زراعی به دلایل متعددی شامل سرعت و مقدار بسیار پایین تولید، تاثیرپذیری تولید از شرایط نامساعد محیطی، آلودگی‌های عوامل بیماریزا و عدم صرفه اقتصادی مناسب نمی‌باشد. از طرفی گیاهان دارویی زیستگاه طبیعی محدودی داشته و جمع‌آوری گیاهان دارویی از طبیعت، آنها را در معرض خطر انقراض قرار داده است (۲۳). از طرف دیگر، متابولیت‌های ثانویه‌ای که در گیاهان ساخته می‌شوند، ممکن است محدود به جنس یا گونه خاصی باشند و یا اغلب در مرحله رشدی خاصی تولید گردند (۶۵). لذا برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه، استفاده از روش‌های زیست‌فناورانه ضروری به نظر می‌رسد. کشت ریشه‌های مویین در دو دهه اخیر مسیر جدیدی برای تولید بهبود یافته متابولیت‌های ثانویه فراهم کرده است (۱۶ و ۳۶). ریشه‌های مویین در شرایط کشت بدون تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی، پایدار بوده و تولید بالایی دارد. رشد سریع، کمتر بودن مدت زمان دو برابر شدن تولید زیست توده، نداشتن زمین‌گرایی، سهولت نگهداری و توانایی سنتز ترکیبات شیمیایی گوناگون از جمله مزایایی ریشه‌های مویین بوده که آنها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل نموده است (۲۱، ۳۶، ۴۰ و ۵۶).

تولید ریشه‌های مویین در جنس *Calotropis* برای اولین بار در گونه *C. gigantea* مطالعه و گزارش شده است.

در محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت و در اتاقک رشد در شرایط تاریکی قرار گرفتند. واکنش ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام و در هر واکنش غلظت سفوتاکسیم به میزان نصف کاهش یافت تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید. ریشه‌های القاشده از ریزنمونه‌ها جدا و برای رشد بیشتر در محیط کشت MS جامد کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند.

تایید مولکولی ریشه‌های موین: استخراج DNA ژنومی از ریشه‌ها به روش CTAB (۲۹) انجام شد. جهت تأیید ماهیت تراریختگی ریشه‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر همزمان بخش‌هایی از ژن‌های *rolA* و *rolB* (به صورت Duplex PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

Forward: 5' -
CAGTTTCGCATCTTGACAG-3'/Reverse: 5' -
GTTCTCGCGAGAAGTGCA-3' استفاده شد. بمنظور اطمینان از عدم آلودگی میان بافتی با باکتری تلقیح‌شده، تکثیر ژن *virD2* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

Forward: 5' -
CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA -
(3'/Reverse: 5' -ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3'

انجام گردید. واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، چرخه بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در انتها تکمیل چرخه بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۷ دقیقه انجام شد.

بررسی میزان رشد لاین‌های ریشه موین: جهت مشخص نمودن لاین‌های پررشد، قطعاتی حاوی مریستم رأسی ریشه از لاین‌های مختلف ریشه موین PCR⁺ در محیط کشت MS مایع کشت و بر روی شیکر انکوباتور (شرکت نور

بمنظور تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، بذرها با اتانول ۷۰٪ و محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪، به ترتیب به مدت ۳ و ۱۰ دقیقه ضد عفونی و پس از چند بار شستشو با آب مقطر استریل، در محیط کشت MS (۳۸) کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲۴ °C و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری و تلقیح: جهت القاء ریشه موین از شش سویه باکتری *A. rhizogenes* شامل A4، A7، A13، ATCC 11325، ATCC 15834 و K599 استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، ابتدا یک تک کلنی از باکتری‌های مذکور در محیط کشت LB مایع، حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتور (شرکت نور صنعت آزما فردوس، ایران) با تکانش ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفت. سپس، سوسپانسیون با سرعت ۳۶۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله سانتریفوژ، رسوب و در ۱۰ mL محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد و به مدت ۴ ساعت روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ rpm در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جهت تلقیح ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، ساقه و برگ، گیاهچه‌های با سنین ۱۴، ۱۸، ۲۴، ۳۲ و ۴۲ روز، توسط سوزن آغشته به باکتری زخمی شدند و سپس در سوسپانسیون باکتری در دو مدت زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا باکتری‌های اضافی حذف و برای عمل هم‌کشتی روی محیط کشت MS جامد کشت و در محلی تاریک به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS 1/2 مایع حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور با تکانش ۸۰ rpm و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شدند. پس از شستشو، ریزنمونه‌ها

متانولی، تنها از متانول خالص استفاده گردید. میزان جذب نوری مخلوط ۳۰ دقیقه بعد از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/Vis 2100 (شرکت Unico، آمریکا) خوانده شد و میزان فلاونوئید کل برحسب هم‌ارز کوئرستین (میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) انجام شد (۱۲). به این منظور، ۴ میلی‌لیتر از استوک DPPH (۰/۰۰۴) گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی ریشه اضافه و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین شد. جهت تهیه شاهد (بلانک) آنتی‌اکسیدان به جای عصاره ریشه، متانول ۸۰٪ اضافه شد.

$$100 \times [(Ab - As) / Ab] = (\%) \text{ فعالیت رادیکال‌های آزاد}$$

Ab: جذب بلانک

As: جذب نمونه

آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): جهت تولید اسانس، ۲۵ گرم پودر خشک شده ریشه‌های مویین و همچنین ریشه طبیعی به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر (شرکت کیمیا طب گستر، ایران) طبق روش فارماکوپه بریتانیا (۱۰) به شکل جداگانه استفاده شد. تفکیک ترکیبات اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies) Agilent 7890A، (آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی Agilent 5975C بر روی یک ستون مویرگی HP-5MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ستون در دمای ابتدایی ۸۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان توقف ۳ دقیقه شروع و با

صنعت آزما، ایران) با دور rpm ۱۰۰ با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی قرار گرفتند و در نهایت میزان تجمع زیست‌توده تر ریشه‌ها در طی دوره رشد ۳۵ روزه اندازه‌گیری شد.

مقایسه میزان رشد لاین‌های ریشه مویین انتخابی در محیط کشت‌های مختلف: بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میزان رشد لاین‌ها در محیط کشت MS، دو لاین A15L7 و K5L4 که از نظر میزان رشد در بین لاین‌های حاصل از تلقیح سویه K599 و ATCC 155834 متمایز بودند، انتخاب و میزان رشد آنها در محیط کشت‌های ۱/۲ MS، MS، B5 (۲۰)، SH (۴۸) و WPM (۳۱) مورد بررسی قرار گرفت. وزن تر ریشه‌ها هر پنج روز یک بار و طی پنج هفته متوالی اندازه‌گیری و منحنی رشد ریشه‌ها رسم گردید.

اندازه‌گیری فنول کل: محتوای فنل کل با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu اندازه‌گیری شد (۵۴). به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۷۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰٪ افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، ۷۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰٪ اضافه گردید و پس از ۲ ساعت میزان جذب نوری نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و در نهایت محتوای فنل کل برحسب هم‌ارز گالیک اسید (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) گزارش شد.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئید کل ریشه‌های مویین بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (۱۴). به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی، به ترتیب ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵٪، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪، ۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه شاهد به جای عصاره

بین این سویه‌ها از نظر میزان القاء ریشه تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/01$) وجود داشت. بین زمان‌های تلقیح نیز از نظر القاء ریشه موین اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0/01$) مشاهده شد. در ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه ATCC 15834 در مدت زمان تلقیح ۱۵ دقیقه‌ای ریشه موین القاء نشد، در حالیکه با استفاده از سویه K599 در هر دو زمان تلقیح (۱۵ و ۳۰ دقیقه) ریشه‌های موین القا شدند، با این‌حال بیشترین میزان القاء ریشه در مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه‌ای حاصل شد (شکل ۲-الف). نوع ریزنمونه نیز در القاء ریشه موین استبرق موثر بود و بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر میزان القاء ریشه موین اختلاف آماری معنی‌دار ($P \leq 0/01$) وجود داشت. در ریزنمونه‌های لپه و محور زیرلپه هیچ ریشه‌ای القاء نشد ولی در ریزنمونه‌های برگ و نوسافه ریشه‌های متعددی القا شدند (شکل‌های ۲-ب و ۳-ب، پ)، که بیشترین تعداد ریشه القا شده در برگ مشاهده شد. تولید ریشه موین در استبرق به سن ریزنمونه‌ها نیز وابسته بود، که بیشترین درصد القاء ریشه موین در ریزنمونه‌های با سن گیاهی ۱۴ تا ۱۸ روز ظاهر شد. با افزایش سن ریزنمونه‌ها به ۲۴ روز درصد القاء ریشه موین کاسته شد و در ریزنمونه‌های با سن ۴۲ روز القاء ریشه موین مشاهده نگردید (شکل ۲-پ). شکل ۳ فرآینده کلی تولید ریشه موین توسط *A. rhizogenes* در گیاه استبرق و استقرار آنها در محیط کشت مایع را نشان می‌دهد.

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موین: جهت تعیین وضعیت تراریختی ریشه‌های موین تولید شده از آنالیز Duplex PCR برای تکثیر همزمان بخشی از ژن‌های *rolA* و *rolB* (در ناحیه T-DNA) استفاده شد و نوار مورد انتظار (bp ~1200) در ریشه‌های موین تکثیر گردید که نشان دهنده تلفیق این ژن‌ها در ژنوم گیاه است (شکل ۴-الف). همچنین عدم تکثیر ژن *virD2* که در خارج از T-DNA قرار دارد و در فرآیند ترانسفورماسیون توسط باکتری به سلول‌های گیاهی انتقال نمی‌یابد، دلیلی بر عدم

سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد رسید. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. دمای دریچه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و در مد split با نسبت ۵۰:۱ و محدوده جرمی ۴۰ تا ۵۰۰ m/z استفاده شد. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص‌های بازداری و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه‌های دستگاه (NIST08) انجام شد.

تجزیه آماری: آزمایش تأثیر سویه‌های باکتری، مدت زمان تلقیح، سن و نوع ریزنمونه‌ی گیاهی بر میزان القاء ریشه موین به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تأثیر نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های موین و آزمایش‌های مربوط به میزان ترکیبات فنل و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید و همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

تأثیر عوامل مختلف بر میزان القاء ریشه موین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد بین عوامل مختلف یعنی سویه باکتری *A. rhizogenes*، ریزنمونه، سن ریزنمونه و مدت زمان تلقیح و همچنین اثرات متقابل بین آنها از نظر اثر بر القاء و تولید ریشه موین در گیاه استبرق اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه با استفاده از سویه‌های A4، A7، A13 و ATCC 11325 در هیچ یک از ریزنمونه‌ها با وجود گذشت دو ماه ریشه موین القاء نشد، این سویه‌ها از آنالیزهای آماری حذف شدند. ولی سویه‌های K599 و ATCC 15834 قادر به القاء ریشه موین بودند (شکل ۲-الف) و

هر گونه آلودگی باکتریایی در فضاها بین سلولی و اطمینان از تراریخته بودن ریشه‌های مویین بود (شکل ۴-ب). به این ترتیب ماهیت تراریختگی ریشه‌های مویین تولید شده تایید شد.

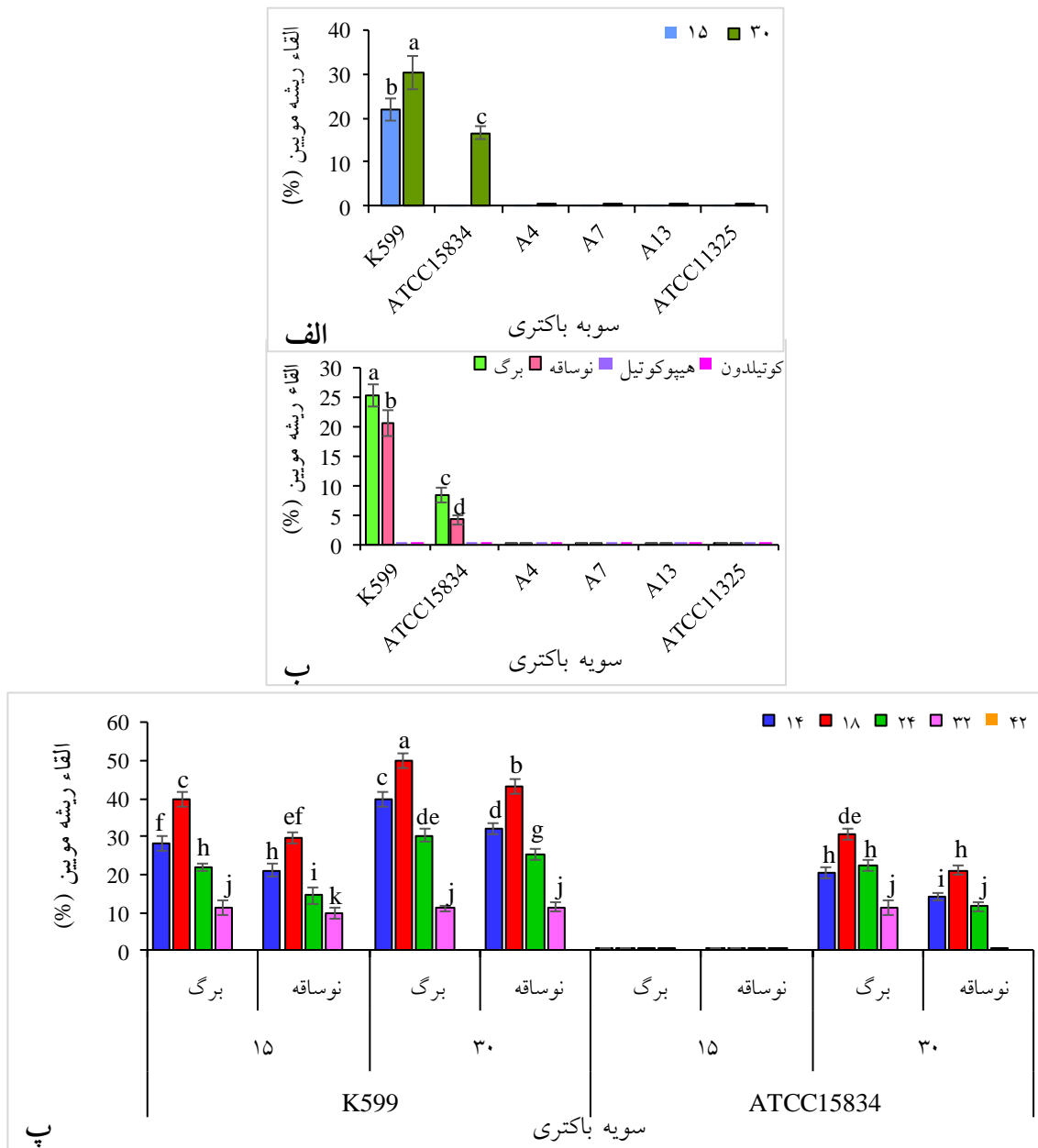
تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد لاین‌های ریشه مویین: برای تعیین اثر محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین، آنها در محیط‌های مختلف مایع (MS، ½ MS، B5، SH، WPM) کشت شد و سیستمیک رشد ریشه‌ها (شکل ۵-الف) در یک دوره ۴۰ روزه پیگیری شد. پس از فاز تأخیری (lag phase) ۵ روز، ریشه‌ها شروع به رشد نمایی کرده و فاز نمایی (exp. phase) تقریباً تا روز ۳۰ام ادامه داشت و وزن تر به طور نمایی و در نهایت به صورت خطی افزایش نشان داد. بعد از روز ۳۵ام میزان رشد ریشه‌ها کم شد تا اینکه وارد فاز سکون (stationary

phase) گردید (شکل ۵-ب). نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد بین محیط‌های کشت از نظر تأثیر بر میزان رشد ریشه‌های مویین استبرق اختلاف آماری معنی‌دار ($P \leq 0/01$) وجود دارد و نوع محیط کشت بر میزان تجمع وزن تر ریشه‌های مویین استبرق تأثیر معنی‌داری دارد. محیط کشت MS در مقایسه با سایر محیط‌های کشت تأثیر قابل توجهی بر رشد ریشه‌های مویین داشت (شکل ۵-ب). بیشترین وزن تر (۱۷/۱۷ گرم) در محیط کشت MS و کمترین وزن تر (۵ گرم) در محیط کشت WPM بدست آمد. به این ترتیب اثر محیط‌های کشت بر میزان رشد و تولید زیست‌توده ریشه‌های مویین استبرق به صورت $WPM < B5 \leq 1/2 MS < SH < MS$ رتبه‌بندی شدند.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر سویه باکتری، ریزنمونه، سن ریزنمونه و مدت زمان تلقیح بر القاء ریشه مویین در گیاه استبرق.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه باکتری	۱	۵۸۷۲/۰۴**
ریزنمونه	۱	۲۰۹/۰۱**
سن ریزنمونه	۳	۹۵۵/۶۹**
مدت زمان تلقیح	۱	۴۱۹۰/۰۸**
سویه باکتری × ریزنمونه	۱	۲۲۳/۷۸**
سویه باکتری × سن ریزنمونه	۳	۹۳۹/۸۴**
سویه باکتری × مدت زمان تلقیح	۱	۶۶۹/۱۳**
ریزنمونه × سن ریزنمونه	۳	۲۴۷/۵۳**
ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۱	۴۰/۷۵**
سن ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۳	۱۸۰/۱۸**
سویه باکتری × ریزنمونه × سن ریزنمونه	۳	۵۰/۴۹**
سویه باکتری × ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۱	۱۳۶/۶۴**
سویه باکتری × سن ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۳	۱۹/۸۹**
ریزنمونه × سن ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۳	۸/۳۷*
سویه باکتری × ریزنمونه × سن ریزنمونه × مدت زمان تلقیح	۳	۷/۰۲*
خطا	۶۴	۲/۳۹
ضریب تغییرات (%)	-	۸/۱۶

*, ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار.



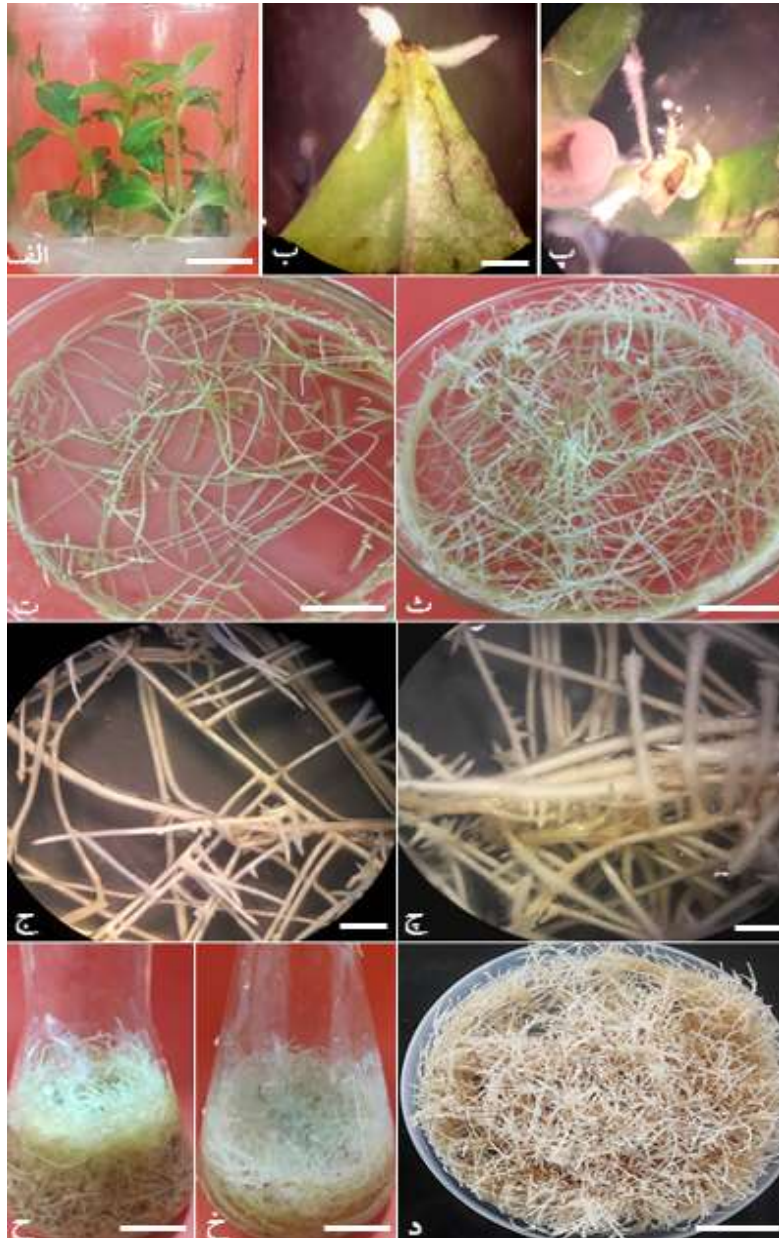
شکل ۲- تاثیر عوامل مختلف بر القاء ریشه موئین در گیاه استبرق. الف) تاثیر سویه باکتری و مدت زمان تلقیح، ب) تاثیر ریزنمونه، پ) تاثیر سویه باکتری، مدت زمان تلقیح (دقیقه)، نوع و سن ریزنمونه (روز). داده‌ها بیانگر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل سه تکراری است. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

سویه K599 از رشد خوبی برخوردار بودند و وزن تر بیشتری نسبت به لاین‌های حاصل از ترانسفورم با سویه ATCC 15834 داشتند (شکل ۳-ح، خ و د و شکل ۶). بیشترین میزان وزن تر ریشه موئین، تقریباً ۱۳ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مربوط به لاین‌های K5L6، K5L4

مقایسه لاین‌های ریشه موئین از نظر تولید زیست‌توده: نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد بین لاین‌های ریشه موئین استبرق از نظر تاثیر میزان رشد و تولید زیست توده اختلاف آماری معنی‌دار ($P \leq 0.01$) وجود دارد. به شکل کلی، لاین‌های حاصل از ترانسفورم با

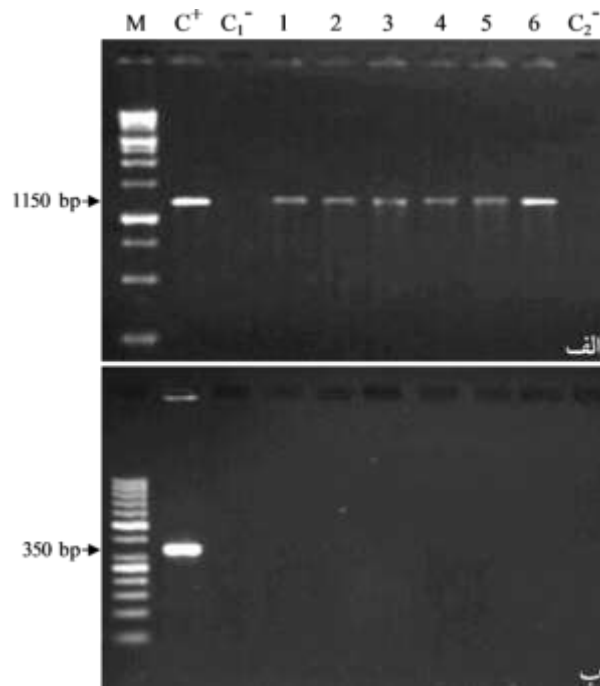
میلی‌لیتر محیط کشت برآورد شد که مربوط به لاین‌های A15L1، A15L3، A15L7 و A15L9 بود (شکل ۶).

و K5L7 بود که از ترانسفورم با سویه K599 حاصل شدند، در حالیکه بیشترین میزان وزن تر در ریشه‌های مویین حاصل از ترانسفورم با سویه ATCC 15834، ۶ گرم در ۵۰



شکل ۳- فرآیند تولید ریشه مویین تراریخته توسط *A. rhizogenes* در گیاه استبرق. الف) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به عنوان منبع ریزنمونه، ب) ریشه‌های مویین القا شده از ریزنمونه برگ، پ) ریشه‌های مویین القا شده از ریزنمونه نوساقه، ت) لاین ریشه مویین A15L7 حاصل از ترانسفورم با بکتری سویه ATCC 15834 با انشعابات فرعی کم، ث) لاین ریشه مویین K5L4 حاصل از ترانسفورم با بکتری سویه K599، حاوی انشعابات فراوان و رشد سریع، ج) نمای نزدیک از مورفولوژی لاین ریشه مویین A15L7 در محیط کشت جامد MS حاوی انشعابات فرعی کم، چ) نمای نزدیک از مورفولوژی لاین ریشه مویین K5L4 در محیط کشت جامد MS ½ حاوی انشعابات فراوان، ح) لاین ریشه مویین K599 با رشدی عالی و تولید زیست‌توده قابل توجه در محیط کشت مایع MS در طول ۳۵ روز، خ) لاین ریشه مویین A15L7 با رشدی خوب و تولید زیست‌توده مناسب در

محیط کشت مایع MS در طول ۳۵ روز، د) تولید میزان قابل توجهی زیست‌توده خشک از لاین ریشه موین پر رشد K5L4 حاصل ترانسفر و ماسیون با باکتری سویه K599. خط مقیاس (الف، ح و خ): ۱۲ میلی‌متر، خط مقیاس (ب، پ، ج و ج): ۵ میلی‌متر، خط مقیاس (ت، ث و د): ۲۰ میلی‌متر.



شکل ۴- آنالیز Duplex PCR برای ژن‌های *rolA* و *rolB* (الف) و آنالیز PCR برای ژن *virD2* (ب) در لاین‌های ریشه موین تراریخته استبرق. (M) نشانگرهای 1 Kb DNA ladder (الف) و 50 bp DNA ladder (ب)، C⁺: پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* به عنوان کنترل مثبت، C₁⁻: ریشه طبیعی به عنوان کنترل منفی اول، 1-6: ریشه‌های موین تراریخته، C₂⁻ واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی دوم.

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت بر رشد ریشه‌های موین گیاه استبرق.

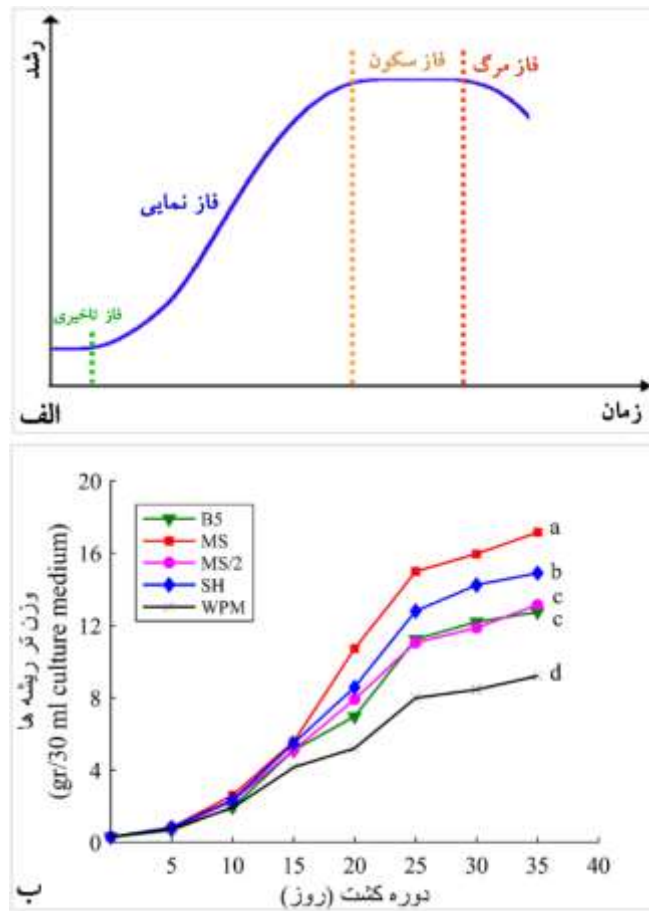
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۴	۲۳/۸۲**
خطا	۱۰	۰/۱۷
ضریب تغییرات (%)	-	۳/۰۴

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

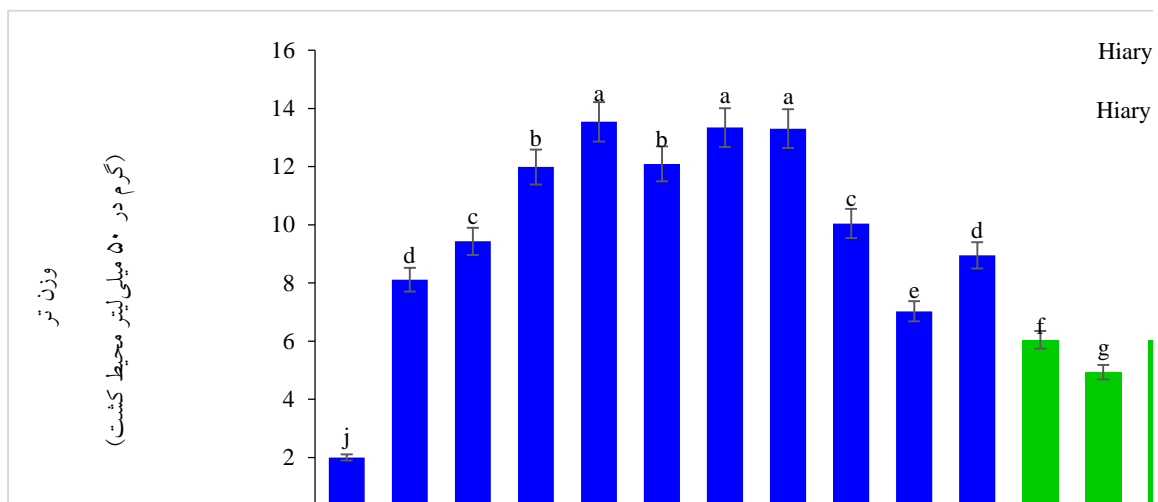
جدول ۳- تجزیه واریانس مقایسه رشد لاین‌های ریشه موین گیاه استبرق.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
لاین ریشه موین	۲۰	۳۶/۹۴**
خطا	۴۲	۰/۲۳
ضریب تغییرات (%)	-	۶/۱۲

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۵- اثر محیط‌های کشت مختلف بر رشد و تولید زیست‌توده در لاین‌های ریشه مویین استبرق. الف) سینتیک رشد، ب) اثر محیط کشت بر رشد و تولید زیست‌توده در ریشه‌های مویین. داده‌ها بیانگر میانگین سه آزمایش مستقل سه تکراری است. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۶- مقایسه رشد لاین‌های ریشه مویین تراریخته بر اساس تولید زیست‌توده تر در یک دوره رشد ۳۵ روز در محیط کشت MS K5L1-K5L10. لاین‌های حاصل از ترانسفورم با باکتری *A. rhizogenes* سویه K599، A15L1-A15L10: لاین‌های حاصل از ترانسفورم با باکتری سویه ATCC 15834، control: ریشه غیرتراریخته. داده‌ها بیانگر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل سه تکراری است. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

آمده است. نتایج آنالیز GC-MS نشان داد که ریشه‌های مویین استبرق قادر به تولید ترکیبات مختلفی بودند که بعضی از این ترکیبات در ریشه غیرتراریخته وجود نداشت. از مجموع ۷۲ ترکیب شناسایی شده، ۴۹ و ۴۸ ترکیب، به ترتیب، در اسانس لاین‌های ریشه مویین K5L4 و A15L7 شناخته شد (جدول ۵ خلاصه‌ای از مهمترین آنها را نشان می‌دهد). آلکان‌ها با ۱۹/۹۷٪ و ۱۷/۶۲٪ بیشترین گروه ترکیبات اسانس A5L4 و A1L8 بودند. اسیدهای کربوکسیلیک دومین قسمت اصلی اسانس A5L4 و A15L7، به ترتیب، با مقادیر ۱۵/۵۸٪ و ۱۶/۵٪ بود. از ترکیبات مهمی که در ریشه‌های مویین در مقایسه با ریشه طبیعی به مقدار زیاد تولید شده‌اند، می‌توان به 2-pentylfuran (۶ الی ۹ برابر)، 4'-hydroxyacetophenone (۲ الی ۶ برابر)، methyl salicylate (۲ الی ۳ برابر)، tetradecanal (۱/۲ الی ۵ برابر)، Linalool (~ ۲ برابر) و caryophyllene oxide (۱/۵ الی ۶/۵ برابر) اشاره نمود که کاربردهای متنوع مهمی از جمله کاربردهای دارویی و صنعتی دارند. بین دو لاین ریشه مویین تفاوت‌های کمی در محتوای ترکیبات شیمیایی وجود داشت (جدول ۵). ترکیباتی مانند 2, 6-nonenal، cis-1-ethyl-2- و 3-methyldecane، dimethyldecalin و methylcyclopentane در ریشه‌های مویین وجود داشت، ولی در ریشه‌های طبیعی شناسایی نشد. همچنین، ترکیب 2-ethyl-1-hexanol تنها ماده‌ای بود که فقط در لاین ریشه مویین A15L7 شناسایی شد اما در لاین K5L4 و همچنین ریشه طبیعی وجود نداشت.

ارزیابی محتوای فنل و فلاونوئید کل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد بین لاین‌های ریشه مویین تولید شده و ریشه طبیعی استبرق (شاهد) از نظر محتوای فنلی و فلاونوئیدی تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/01$) وجود دارد. محتوای فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین A15L7 و K5L4 به ترتیب ۱/۸۵ و ۲/۰۸ برابر بیشتر از ریشه‌های طبیعی بود (شکل ۷-الف). از نظر محتوای فنل کل نیز ریشه‌های مویین برتر بودند، به طوری که میزان فنل کل لاین‌های A15L7 و K5L4 تقریباً ۱/۷۳ و ۲/۱۷ برابر ریشه طبیعی بود (شکل ۷-ب).

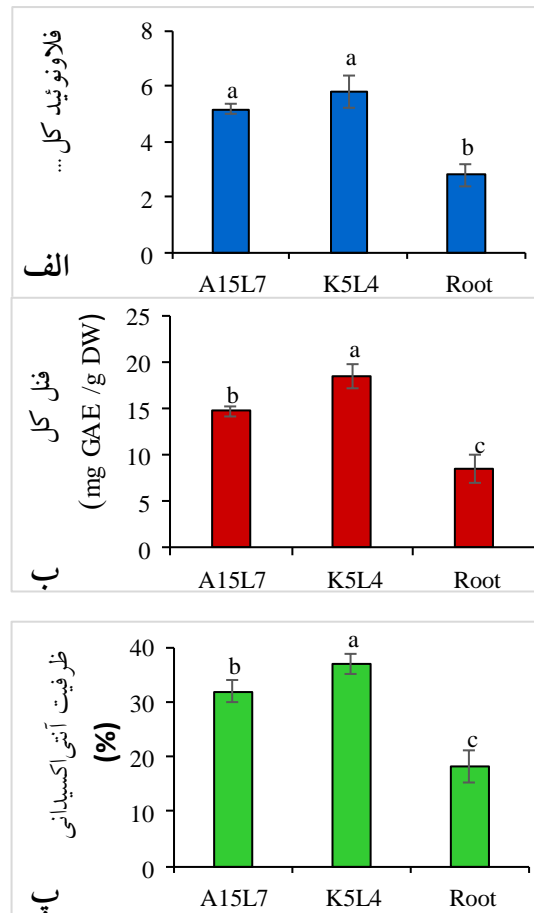
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد مبتنی بر اهدای اتم هیدروژن بر میزان بی‌رنگ کردن محلول DPPH، اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/01$) بین ریشه‌های مویین و ریشه طبیعی از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بود. لاین‌های ریشه مویین K5L4 و A15L7 به ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۳۷٪ و ۳۲/۹۶٪ نشان دادند که تقریباً دو برابر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های طبیعی (۱۸/۲۳٪) بود (شکل ۷-پ).

تجزیه و تحلیل ترکیبات اسانس: آنالیز GC-MS برای اسانس دو لاین ریشه مویین گزینش شده حاصل از دو نوع سویه باکتری در مقایسه با ریشه طبیعی گیاه انجام گرفت که کروماتوگرام آنالیز در شکل ۸ نشان داده شده است و ترکیبات مهم قابل شناسایی به صورت خلاصه در جدول ۵

جدول ۴- تجزیه واریانس مقایسه لاین‌های ریشه مویین با ریشه طبیعی گیاه استبرق از نظر محتوای فلاونوئید کل، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی.

میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	فلاونوئید کل	فنل کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
نمونه ریشه	۲	۷/۸۳**	۷۶/۰۵**	۲۸۱/۹۹**
خطا	۶	۰/۰۵۳	۰/۱۵	۰/۲۷
ضریب تغییرات (%)	-	۵/۰۴	۲/۷۳	۱/۷۸

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۷- محتوای فلاونوئید کل (الف)، فنل کل (ب) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (پ) در لاین‌های ریشه موئین در مقایسه با ریشه طبیعی استبرق. داده‌ها بیانگر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل سه تکراری است. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

استبرق متفاوت است، به طوری که از بین سویه‌های استفاده شده، تنها سویه‌های K599 و ATCC 15834 قادر به القاء ریشه موئین بودند (شکل ۲-الف). این تفاوت به قدرت و شدت قابلیت بیماری‌زایی سویه بستگی دارد که این خصوصیت توسط ژنوم و نوع پلاسمیدهای Ri موجود در سویه‌های باکتری *A. rhizogenes* تعیین می‌شود (۴۱ و ۵۹). بر اساس نتایج حاصل قابلیت ترانسفورم سویه K599 بالاتر از سویه ATCC 15834 بود (شکل ۲-الف و ب). سویه K599 یکی از سویه‌های با قابلیت بیماری‌زایی بالا در بین سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* می‌باشد (۶۴). توالی‌هایی به نام توالی‌های محرک انتقال DNA (DNA

بحث و نتیجه‌گیری

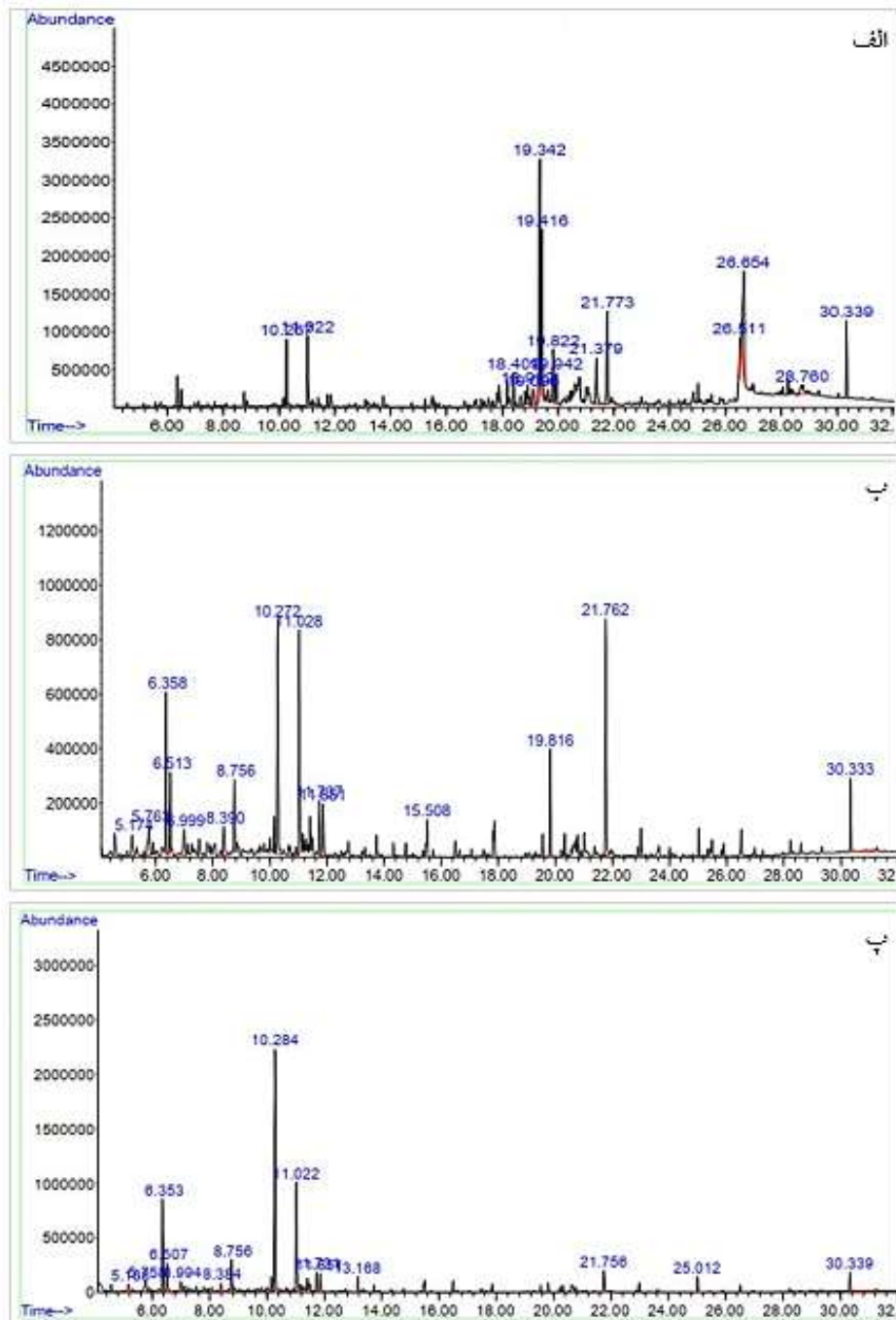
القاء ریشه‌ی موئین بر پایه آلوده‌سازی گیاه با باکتری *A. rhizogenes* می‌باشد که در طول مراحل آلوده‌سازی بخشی از DNA پلاسمید Ri، تحت عنوان T-DNA به سلول‌های گیاهی منتقل می‌شود و در نتیجه بیان ژن‌های این بخش در سلول گیاه باعث القاء ریشه‌های موئین می‌شود (۲۱ و ۳۶). عوامل مختلفی در افزایش القاء ریشه‌ی موئین موثر هستند که یکی از مهم‌ترین آنها نوع سویه باکتری است (۱، ۲، ۶ و ۵۹). نتایج این مطالعه نشان داد توانایی سویه‌های مختلف در ترانسفورماسیون سلول گیاه

(۴۹). از دلایل دیگر تفاوت در پتانسیل القاء ریشه مویین، تعداد رونوشت T-DNA وارد شده (۱۷ و ۲۵) و محل تلفیق آن در ژنوم گیاهی است که میزان القاء ریشه مویین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۹ و ۶۲).

(simulator sequences)، که در بین سویه‌های مختلف با تکرارهای متعددی روی پلاسمید Ri حضور دارند، کارایی ترانسفورماسیون توسط سویه باکتری را تقویت می‌کنند (۳۷). وجود تفاوت در القاء ریشه مویین در سویه‌های مختلف در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است (۵) و

جدول ۵- ترکیبات فرار تولید شده در لاین‌های ریشه مویین K5L4 و A15L7 در مقایسه با ریشه طبیعی استبرق.

ردیف	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیب	Peak Area (%)		ریشه طبیعی
			K5L4	A15L7	
۱	۵/۱۷۰	cis -1-ethyl-2-methylcyclopentane	۱/۵۷	۱/۳۴	-
۲	۵/۳۲۸	3-ethyl-2-methylheptane	۰/۸۸	۰/۵۵	۰/۸۸
۳	۵/۷۶۸	benzaldehyde	۲/۲۲	۱/۹۸	۲/۰۵
۴	۶/۲۲۸	cis-1,4-dimethylcyclohexane	۰/۷۶	۰/۷۰	۰/۵۵
۵	۶/۳۵۵	2-pentylfuran	۶/۴۰	۹/۱۶	۱/۰۳
۶	۶/۹۹۶	4-methyldecane	۱/۴۸	۱/۷۵	۰/۸۲
۷	۷/۱۲۵	2-ethyl-1-hexanol	-	۰/۷۶	-
۸	۷/۵۳۱	benzeneacetaldehyde	۰/۷۸	۰/۷۴	۱/۱۲
۹	۷/۸۱۵	trans 2-dodecenal	۱/۰۰	۰/۹۱	۰/۸۷
۱۰	۸/۰۷۲	3-methyldecane	۰/۹۷	۰/۹۴	-
۱۱	۸/۳۹۰	4-methylbenzaldehyde	۱/۶۲	۱/۳۴	۰/۷۷
۱۲	۸/۷۵۸	linalool	۳/۵۶	۳/۷۶	۱/۹۹
۱۳	۸/۸۶۰	nonanal	۰/۹۰	۰/۸۶	۳/۰۳
۱۴	۹/۳۳۴	1-ethyl-2-propylcyclohexane	۱/۶۲	۰/۵۷	-
۱۵	۹/۶۴۰	cis-di-tert-butylethylene	۰/۶۷	۰/۶۹	۰/۶۰
۱۶	۹/۸۰۹	cyclohexanecarboxylic acid	۰/۸۹	۰/۹۰	۰/۵۶
۱۷	۱۰/۰۰۹	3,4-hexadien-1-ol	۱/۰۸	۰/۹۰	-
۱۸	۱۰/۱۴۸	nonenal	۱/۵۲	۱/۳۴	-
۱۹	۱۰/۲۷۲	4'-hydroxyacetophenone	۹/۳۵	۲۳/۷۳	۳/۹۵
۲۰	۱۰/۵۸۸	ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	۰/۷۲	۰/۷۸	۰/۸۷
۲۱	۱۱/۰۲۲	methyl salicylate	۱۰/۳۶	۱۱/۵۰	۳/۹۹
۲۲	۱۱/۱۳۸	dodecane	۱/۴۸	۰/۹۲	۰/۵۵
۲۳	۱۱/۲۵۶	2,6-dimethyldecalin	۱/۵۳	۱/۰۴	-
۲۴	۱۱/۴۰۵	2,3-dimethyldecahydronaphthalene	۱/۵۵	۱/۴۹	۱/۴۳
۲۵	۱۱/۵۵۵	β -cyclocitral	۰/۸۷	۱/۰۹	۰/۵۴
۲۶	۷۵۰۱۲	cinnamaldehyde	۱/۰۱	۲/۳۵	۱/۹۹
۲۷	۱۳/۱۷۱	thymol	۱/۴۶	۱/۵۲	۱/۳۲
۲۸	۱۹/۸۲۰	caryophyllene oxide	۳/۵۹	۰/۸۴	۰/۵۴
۲۹	۲۰/۷۰۵	α -eudesmol	۱/۵۱	۱/۹۶	۰/۵۵
۳۰	۲۰/۷۸۰	2-isopropylphenol	۱/۱۵	۰/۶۱	-
۳۱	۲۱/۷۶۸	tetradecanal	۱۰/۰۹	۲/۲۹	۱/۹۱
۳۲	۲۲/۹۹۰	benzylbenzoate	۱/۳۶	۱/۰۹	۰/۷۶
۳۳	۲۶/۵۰۸	dibutyl phthalate	۱/۱۶	۰/۵۹	/۳۱
۳۴	۳۰/۳۳۵	tricosane	۲/۲۶	۱/۴۵	۰/۴۷



شکل ۸- کروماتوگرام آنالیز GC-MS اسانس لاین‌های ریشه موین استبرق. الف) لاین A5L4، ب) لاین A15L7، پ) ریشه طبیعی.

نوع گیاه و بافت گیاهی فراوانی ترانسفورماسیون متفاوت است. به عنوان مثال، پتانسیل بالای القاء ریشه‌موین در ریزنمونه‌های محور زیرپه در *Psoralea corylifolia* (۵)، برگ در *Artemisia vulgaris* (۵۷) و نوساقه در *Ficus carica* (۶) گزارش شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ریزنمونه‌های برگ و نوساقه برای القاء ریشه موین در

نوع و سن ریزنمونه گیاهی نیز بر میزان القاء ریشه موین تاثیر دارد، که این حساسیت می‌تواند به علت وضعیت فیزیولوژیکی بافت‌ها باشد (۳۵). تفاوت در تقسیم سلولی و سنتز DNA، ساختار دیواره سلولی و وضعیت فیزیولوژیکی بافت‌های گیاهی ممکن است علت تفاوت توانایی القاء ریشه موین باشد (۳۹ و ۴۴). بنابراین بسته به

کشت مورد بررسی، MS مناسب‌ترین محیط برای رشد و تولید زیست‌توده بیشتر در کشت ریشه‌های موئین استبرق تعیین شد.

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها از جمله متابولیت‌های مهم گیاهی هستند که با بسیاری از فعالیت‌ها زیستی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارند (۴۳). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین نسبت به ریشه طبیعی بالاتر بود. این افزایش ممکن است در ارتباط با مسیر علامت‌رسانی H_2O_2 باشد که منجر به تحریک برخی از ژن‌های مرتبط با مکانسیم دفاع در برابر عوامل خارجی، از جمله انتقال T-DNA در گیاه مورد ترانسفورم، می‌شود که نتیجه با بیوستنر برخی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی همراه می‌باشد (۵). مشابه با نتایج این مطالعه، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین *Genista tinctoria* (۳۳) و *Momordica charantia* (۶۰) نسبت به ریشه طبیعی بالاتر بودند.

نتایج آنالیز GC-MS ترکیبات اسانس نشان داد بین اسانس ریشه‌های موئین با ریشه طبیعی تفاوت‌های قابل توجهی وجود دارد و ریشه‌های موئین استبرق پتانسیل خوبی برای تولید و مطالعه متابولیت‌های ثانویه دارد. مشابه با مطالعه حاضر، Abdelkader و Lockwood (۳) تفاوت در محتوای شیمیایی اسانس ریشه‌های طبیعی و ریشه‌های موئین گیاه *Anethum graveolens* را گزارش کردند. خصوصیات ژنتیکی، سیستم رشدی ریشه‌های موئین و شرایط کنترل شده کشت درون شیشه‌ای باعث می‌شود ریشه‌های موئین پتانسیل بالایی در میزان و نوع تولید متابولیت‌های ثانویه تولیدی در مقایسه با گیاه کامل نشان دهند. گیاهانی که توان بالای تولید ترکیبات دی‌ترپنی (فیتول) را در قلمرو گیاهی داشته باشند، معمولاً کم هستند (۵۴). در تحقیق حاضر بررسی ترکیبات اسانس ریشه‌های موئین استبرق نشان داد میزان تولید فیتول در هر دو لاین K5L4 و

گیاه استبرق بسیار مستعد هستند. همچنین نتایج نشان داد القاء ریشه موئین با افزایش سن ریزنمونه، کاهش می‌یابد. ویژگی‌های فیزیولوژیکی سلول‌ها در سنین مختلف تغییر می‌یابد، که تأثیر قابل توجهی در پاسخ به میزان آلودگی باکتریایی دارد (۱۸). ثابت شده است که ریزنمونه‌های جوان‌تر معمولاً توان تکثیر بالاتری داشته، از این رو دارای شرایط مناسب‌تر جهت تراریختگی می‌باشند (۵۰). ارتباط درجات مختلف القاء ریشه موئین با سن ریزنمونه‌ها طی مطالعات قبلی گزارش شده است (۴۱، ۵۹ و ۶۱). به عنوان مثال، در مطالعه Pirian و همکاران (۴۴) بالاترین میزان القاء ریشه موئین در گیاه *Portulaca oleracea* در ریزنمونه‌های برگی با سن ۱۴ روز بدست آمد. بنابراین با توجه به اثرات متقابل گیاه-پاتوژن، بدهی است که نه تمامی سویه‌های آگروباکتریوم قابلیت بیماری‌زایی داشته و نه هر نوع ریزنمونه‌ای قابلیت القاء ریشه موئین را دارد.

بین لاین‌های ریشه موئین استبرق از نظر میزان رشد و مورفولوژی تنوع مشاهده گردید که متأثر از نوع سویه باکتری مورد استفاده در ترانسفورم بود. ریشه‌های موئین حاصل از ترانسفورم با سویه K599 مورفولوژی بسیار پرانشعاب و رشد سریع‌تری داشتند. خصوصیات فنوتیپ رشدی مختلف لاین‌های ریشه‌های موئین ناشی از تفاوت در تعداد رونوشت و محل تلفیق ژن‌های *rol* در درون ژنوم گیاهی است (۱۶ و ۱۷). مطابق با نتایج تحقیق حاضر، Amani و همکاران (۶) نیز تنوع رشدی متفاوتی بین لاین‌های مختلف ریشه موئین *F. carica* مشاهده کردند و بر مبنای سرعت رشد و میزان تولید زیست‌توده، لاین‌های (های) برتر را انتخاب کردند. رشد ریشه‌های موئین همچنین وابسته به غلظت و برهم‌کنش مواد غذایی موجود در محیط کشت می‌باشد و تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت می‌تواند نرخ رشد ریشه‌های موئین را تغییر دهد (۲، ۳۵ و ۵۶). بنابراین تعیین محیط کشت مناسب نیز یکی از اهداف مهم جهت بهینه‌سازی رشد و تولید زیست‌توده مناسب می‌باشد. در مطالعه حاضر از بین پنج نوع محیط

و سن (برگ با سن ۱۸ روز)، افزایش چند برابری میزان متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های طبیعی استبرق را اثبات نمود. همچنین در این تحقیق محیط کشت مناسب (MS) جهت حداکثر رشد ریشه‌های مویین و تولید بالای زیست‌توده معرفی شد که برای بهینه‌سازی‌های بعدی جهت بهبود میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در استبرق می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. آنالیز ترکیب شیمیایی ریشه‌های مویین نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ریشه‌ها برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در گیاه استبرق می‌باشد. لذا در مطالعات بعدی می‌توان با استفاده از روش‌های زیست‌فناورانه مانند مهندسی متابولیت، مسیرهای بیوسنتز و تیمار با عوامل محرک مختلف برای تولید بهبودیافته متابولیت‌های مهم دارویی و صنعتی این گیاه در ریشه مویین را مورد بررسی قرار داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مالی و از گروه پژوهشی شیمی تجزیه جهاد دانشگاهی واحد استان آذربایجانغربی به خاطر همکاری در آنالیزهای فیتوشیمی اعلام می‌دارند.

A15L7 بالا بوده و جز ترکیبات اصلی ریشه‌های مویین می‌باشد. اثرات ضد میکروبی فیتول در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (۲۴). از دیگر ترکیبات قابل توجه در ریشه‌های مویین، tetradecanal است که میزان آن در لاین ریشه مویین K5L4 تا ۵ برابر ریشه غیرتاریخته بود. این متابولیت از ترکیبات اصلی آروماتیک در گونه‌های *Calotropis* است که داری خواص ضد میکروبی می‌باشد (۵۲ و ۶۶). ترکیب tetradecanal در صنایع آرایشی در ساخت کلد کرم‌ها (۲۲) و همچنین به عنوان سوبسترای طبیعی در واکنش نورتابی باکتریایی مانند باکتری *Vibrio fischeri* نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد که از نظر زیست‌فناوری در ساخت بیوسنسورهای میکروبی ارزش ویژه‌ای دارد (۳۰). معمولا محتوای ترکیبات شیمیایی ریشه‌های مویین بیشتر و متنوع‌تر از سایر بخش‌های گیاه در حالت طبیعی گزارش شده است (۳۷، ۴۱، ۵۷ و ۶۵). در تحقیق حاضر نیز مقدار اکثر متابولیت‌های ثانویه ریشه‌های مویین استبرق بیشتر و مقدار بعضی از ترکیبات خیلی بالاتر (۲ الی ۹ برابر) از ریشه طبیعی برآورد شد.

نخستین گام در کشت ریشه‌های مویین یافتن مناسب‌ترین سویه باکتری و بهترین ریزنمونه گیاهی جهت القاء ریشه‌ی مویین است. نتایج مطالعه حاضر علاوه بر تعیین بهترین سویه باکتری (K599) و مناسب‌ترین ریزنمونه از نظر نوع

منابع

- ۱- زارع، ن.، مدنی، و.، جمالی گله‌شیران، ا. و اصغری زکریا ر. (۱۴۰۱). عوامل مؤثر بر کارایی آگروباکتریوم رایزوزنز در القای ریشه‌های مویین تراریخت و ارزیابی تولید والرینیک اسید در ریشه‌مویین گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۳۵ (۱): ۶۹-۸۳.
- ۲- سهرابی‌نژاد، ز.، مرعشی، ح.، و مشتاقی، ن. (۱۳۹۷). بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) به منظور تولید ترکیب دارویی اولتانولیک اسید. مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۳۱ (۳): ۶۵۴-۶۴۰.
- ۳- Abdelkader, M.S.A., and Lockwood, G.B. (2016). Essential oils from the plant, hairy root cultures and shoot cultures of *Egyptian Anethum graveolens* (dill). *Journal of Essential Oil Research* 28(2): 104-112.
- ۴- Abhyankar, G., Reddy, V.D., Giri, C.C., Rao, K.V., Lakshmi, V.V. S., Prabhakar, S., and Bhattacharya, P.S. (2005). Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. *Phytochemistry* 66(20): 2441-2457.
- ۵- Alderete, L.G., Ibáñez, S.G., Agostini, E., and Medina, M.I. (2012). Phytoremediation of phenol at pilot scale by *tobacco* hairy roots. *International Journal of Environmental Sciences* 3(1): 398-407.
- ۶- Amani, S., Mohebodini, M., Khademvatan, S., and Jafari, M. (2020). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Ficus carica* L. for the efficient production of secondary metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (5): 2185-2197.

- 7- Anjum, S.I., Hussain, S., Attaullah, M., Ullah Khan, H., Khattak, B., and Fouad, H. (2016). Evaluation of the larvicidal potential of *Calotropis procera* plant extract against *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research* 3(6): 1-5.
- 8- Arya, S., and Kumar, V.L. (2005). Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators of Inflammation* 31 (4): 228-232.
- 9- Batello, C., Marzot, M., Touré, A.H., and Kenmore, P.E. (2004). The future is an ancient lake: traditional knowledge, biodiversity and genetic resources for food and agriculture in Lake Chad Basin ecosystems. *Rom. Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- 10- British Pharmacopoeia. (1988). Published on the recommendation of the Medicine Commission. Volume 2, London: Her Majesty's Stationery Office; p. A138.
- 11- Chandrawat, P., and R.A. Sharma. (2015). An overview on giant milkweed (*Calotropis procera* (Aiton)). *Journal of Plant Sciences* 3(1): 19-24.
- 12- Burits, M., and Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14: 323-328.
- 13- Cerella, C., Muller F., Gaigneaux, A., Radogna, F., Viry, E., Chateauvieux, S., M. Dicato, and Diederich, M. (2015). Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450. *Cell Death and Disease* 6: 1782-1795.
- 14- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- 15- Dewan, S., Sangraula, H., and Kumar, V.L. (2000). Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 307-311.
- 16- Dhakulkar, S., Bhargava, S., Ganapathi, T.R., and Bapat, V.A. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Founder's Day Special Issue* 261: 100-106.
- 17- Doran, P.M. (2002). Properties and applications of hairy root cultures. *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (Eds. K. M. okasman-caldenty and W. H. Barz). *Mercel Dekker Inc., New York, USA*, 4: 143-162.
- 18- Dupré, P., Lacoux, J., Neutelings, G., Mattar-Laurain, D., Fliniaux, M.A., David, A., and Jacquin-Dubreuil, A. (2000). Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiologia Plantarum* 108(4): 413-419.
- 19- Furze, J.M., Hamill, J.D., Parr, A.J., Robins, R.J., and Rhodes, M.J.C. (1987). Variations in morphology and nicotine alkaloid accumulation in protoplast-derived hairy root cultures of *Nicotiana rustica*. *Journal of Plant Physiology* 131(3-4): 237-246.
- 20- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1): 151-158.
- 21- Gantait, S., and Mukherjee, E. (2021). Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105: 35-53.
- 22- Hsieh, S.C., Wang, J.H., Lai, Y.C., Su, C.Y., and Lee, K.T. (2018). Production of 1-Dodecanol, 1-Tetradecanol, and 1,12-Dodecanediol through whole-cell biotransformation in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology* 84(4): e01806-17.
- 23- Ibrahim, S.R., Mohamed, G.A., Shaala, L.A., Moreno, L., Banuls, Y., Kiss, R., and Youssef, D.T.A. (2014). Proceraside A, a new cardiac glycoside from the root barks of *Calotropis procera* with in vitro anticancer effects. *Natural Product Research* 28(17): 1322-1327.
- 24- Islam, M.T., Ali, E.S., Uddin, S.J., Shaw, S., Islam, M.A., Ahmed, M.I., et al. (2018). *Phytol: A review of biomedical activities*. *Food and Chemical Toxicology* 121:82-94.
- 25- Jafari, M., Norouzi, P., Malboobi, M.A., Ghareyazie, B., Valizadeh, M., Mohammadi, S.A., and Mousavi, M. (2009). Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cryIAb* gene. *Euphytica* 165(2): 333-344.
- 26- Jha, S., Badypadhyay, M., Chaudhuri, K.N., Ghosh, S., and Ghosh, B. (2005). Biotechnological approaches for the production of forskolin, withanolides, colchicine and tylophorine. *Plant Genetic Resources* 3(2): 15-101.
- 27- Kareem, S.O., Akpan, I., and Ojo, O.P. (2008). Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. *African Journal of Biomedical Research* 11: 105-110.
- 28- Khairnar, A.K., Bhamare, S.R. and Bhamare, H.P. (2012). *Calotropis procera*: An ethnopharmacological update. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals* 2(2):142-56.
- 29- Khan, S., Irfan, Q., Kamaluddin, A., and Abidin, M. (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.
- 30- Lee, J., Müller, F., Visser, A.J.W.G. (2019). The Sensitized bioluminescence mechanism of bacterial luciferase. *Photochemistry and Photobiology* 95(3): 679-704.
- 31- Lloyd, G.B., and McCown, B.H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 30: 421-427.

- 32- Lourenco, P.M.L., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Oliveira, M.M., Deans, S.G., and Scheffer, J.J.C. (1999). Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. *Phytochemistry* 51(5): 637-642.
- 33- Luczkiewicz, M., and Kokotkiewicz, A. (2005). *Genista tinctoria* hairy root cultures for selective production of isoliquiritigenin. *Zeitschrift für Naturforschung C* 60(11-12): 867-875.
- 34- Mainasara, M.M., Aliero, B.L., Aliero, A.A., and Dahiru, S.S. (2011). Phytochemical and antibacterial properties of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Sodom Apple) fruit and bark extracts. *International Journal of Modern Botany* 1(1): 8-11.
- 35- Mehrotra, S., Kumar Kukreja, A., Singh Khanuja, S.P., and Nath Mishra, B. (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(2): 69-75.
- 36- Melina, A., Laura, T.A., Oller, W., Paola, S.G., and Agostin, E. (2012). Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Patents on Biotechnology* 6: 115-133.
- 37- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *Journal of Molecular Biology* 307:771-784.
- 38- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- 39- Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B., and Paek, K.Y. (2008). Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(8): 975-981.
- 40- Ono, N.N. and Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Science* 180(3): 439-446.
- 41- Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J., and Maziah, M. (2013). Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(3): 421-430.
- 42- Pawar, P.K., and Maheshwari, V.L. (2003) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 414-417.
- 43- Pilaisangsuree, V., Somboon, T., Tonglairoum, P., Keawracha, P., Wongsu, T., Kongbangkerd, A., and Limmongkon, A. (2018). Enhancement of stilbene compounds and anti-inflammatory activity of methyl jasmonate and cyclodextrin elicited peanut hairy root culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1): 165-179.
- 44- Pirian, K., Piri, K. and Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3: 642-649.
- 45- Rahimi, M. (2015). Pharmacognostical aspects and pharmacological activities of *Calotropis procera*. *Bulletin of Environment., Pharmacology and Life Sciences* 4(2): 156-162.
- 46- Ranjan, N., Kumar, S., Singh S.K. and Kumari, C. (2017). Biological morphology and ethano pharmacological importance of *Calotropis* Species- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 6(4): 1640-1648.
- 47- Saleh, I., Abd-ElGawad, A., El Gendy, A.E.N., Abd El Aty, A., Mohamed, T., Kassem, H., and Hegazy, M.E.F. (2020). Phytotoxic and antimicrobial activities of *Teucrium polium* and *Thymus decussatus* essential oils extracted using hydrodistillation and microwave-assisted techniques. *Plants* 9(6): 716-728.
- 48- Schenk, R.U., and Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50(1): 199-204.
- 49- Shahnawaz, M. (Ed.). (2021). *Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites: Recent Trends and Future Prospects* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003034957>
- 50- Shilpha, J., Jayashre, M., Iargia, M.J.V. and Ramesh, M. (2016). Direct shoot organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Solanum trilobatum* L. *Turkish Journal of Biology* 40(4): 866-877.
- 51- Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Fedoreyev, S.A. and Zhuravlev, Y.N. (2008). Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering* 100(1): 118-125.
- 52- Singh, M., and Javed, K. (2013). Chemical characterization and antimicrobial activity of *Calotropis gigantea* Linn. flower essential oil collected from northern plain of India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 4: 533-541.
- 53- Slingerland, M., Cerella, C., Guchelaar H.J., Diederich, M., and Gelderblom, H. (2013). Cardiac glycosides in cancer therapy from preclinical investigations towards clinical trials. *Investigational New Drugs* 31: 1087-1094.
- 54- Slinkard, K., and Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28(1): 49-55.
- 55- Soares, P.M., Lima, S.R., Matos, S.G., Andrade, M.M. and Vasconcelos, S.M. (2005). Antinociceptive

- activity of *Calotropis procera* latex in mice. Journal of Ethnopharmacology 99(1):125-9.
- 56- Srivastava, S. and Srivastava, A.K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology 27(1): 29-43.
- 57- Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., and Kumari, B.R. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential oil analysis. Industrial Crops and Products 44: 643-652.
- 58- Sun, J., Xiao, J., Wang, X., Yuan, X. and Zhao, B. (2012). Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. Biotechnology Letters 34(3): 563-569.
- 59- Tao, J., and Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. South African Journal of Botany 72(2): 211-216.
- 60- Thiruvengadam, M., Praveen, N., John, K.M., Yang, Y.S., Kim, S.H., and Chung, I.M. (2014). Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118(3): 545-557.
- 61- Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C.H., Kim, S.J., Al-Dhabi, N.A., and Park, S.U. (2016). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Frontiers in Microbiology 7: 318.
- 62- Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang, Z.C., Guo, G.Q., and Zheng, G.C. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicoside in transformed hairy root cultures. Plant Cell Reports 26(2): 199-210.
- 63- Torkamani, M.R.D., Abbaspour, N., Jafari, M., and Samadi, A. (2014). Elicitation of valerenic acid in the hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L (*Valerianaceae*). Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13(6): 943-949.
- 64- Veena, V. and Taylor, C.G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 43, 383-403.
- 65- Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1(1): 13-25.
- 66- Wahba, H.E., and Khalid, K.A. (2018). Comparative study on essential oil composition in various organs of Sodom apple (*Calotropis procera*) grown wild in Egypt. Asian Journal of Plant Sciences 17(2): 85-90.
- 67- Yogi, B., Sujeet Kumar, G., and Ashutosh, M. (2016). *Calotropis procera* (Madar): A medicinal plant of various therapeutic uses-A Review. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 5(7): 81-74.

Optimization of induction, culture conditions, and phytochemical analysis of hairy roots in the medicinal plant giant milkweed (*Calotropis procera*)

Dardan E. and Jafari M.

Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

Abstract

Calotropis procera (Aiton), belonging to the family Asclepiadaceae, is an important industrial and medicinal plant. It is a source of numerous secondary metabolites with pharmacological properties such as anticancer and antimicrobial activities. Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* offer tremendous potential for the production of pharmaceutically important metabolites. In this study, the effects of *A. rhizogenes* strains (A4, A7, A13, ATCC 15834, ATCC 11325, K599), infection time (15 and 30 min), explant type (cotyledon, hypocotyl, shoot, leaf) and explant age (14, 18, 24, 32, 42 old days) on hairy root production in *C. procera* were investigated. The effect of different culture media (WPM, SH, B5, MS) on biomass accumulation of the best-grown hairy root lines was also evaluated. Based on the results, hairy root induction was successful only in ATCC 15834 and K599 strains and leaf and shoot explants. Maximum hairy root induction (50%) was obtained using the K599 strain in an infection time of 30 min in 18-day-old leaf explants. There was a significant difference between the hairy root lines in terms of growth and biomass production. The highest amount of fresh root biomass (about 13 g/50 ml culture medium) was obtained in the hairy root lines cultured on MS medium. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid contents were higher in selected high-biomass-producing hairy root lines (A15L7 and K5L4) compared to non-transformed roots. The GC-MS analysis showed that the phytochemical content of *C. procera* hairy roots was about 2 to 9-fold higher than in wild-type roots.

Keywords: *Calotropis procera*, *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy roots, Secondary metabolites, GC-MS analysis