نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۰۵-۳۹۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 393-405
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین و تولید زیست‌توده در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

رقیه فتحی[۱]- مهدی محب الدینی[۲*]- اسماعیل چمنی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷

چکیده

ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح گیاهان با سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* به عنوان ابزار کشت بافتی برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد زیرا ریشه‌های مویین از ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی برخوردارند همچنین قادرند متابولیت‌های گیاهی را در زمان کوتاهی تولید کنند. کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاه دارویی متعلق به تیره‌ی Asteraceae می‌باشد و حاوی ترکیبات دارویی بسیار مهمی از جمله شیکوریک اسید، اینولین، اسکولین، کومارین و فلاونوئیدها می‌باشد. در این تحقیق، القای ریشه‌های مویین توسط *A. rhizogenes* سویه‌ی ۱۱۳۲۵ انجام شد. تأثیر سه مدت هم‌کشتی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر کارایی القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ۲۰ روزه و ۲۸ روزه بررسی شد. بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۵۳/۳۳ درصد) و تعداد ریشه (۸/۵ ریشه در هر ریزنمونه) و بیشترین طول ریشه (۹/۱۶ سانتی‌متر) در ریزنمونه‌ی برگ ۲۰ روزه و ۷۲ ساعت هم کشتی حاصل شد. تائید مولکولی ریشه‌های مویین به وسیله‌ی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B انجام شد. در ادامه، تأثیر سه نوع محیط کشت مختلف (MS جامد، MS مایع و MS ۱/۲مایع) بر میزان تولید زیست‌توده در پر رشدترین لاین ریشه‌های مویین بررسی شد. نتایج نشان داد محیط کشت MS ۱/۲ مایع، بهترین محیط کشت برای تولید بیشترن وزن تر (۲/۰۱ گرم) و خشک (۰/۱۶ گرم) می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *اگروباکتریوم رایزوژنز*، ریشه‌های مویین، ژن *rol*، متابولیت‌های ثانویه، هم‌کشتی

مقدمه

از دیرباز تاکنون، گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع، هم به لحاظ درمان و هم پیش گیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. در واقع این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر داشته و یکی از مهمترین منابع دارویی بشر درطول نسل‌ها بوده‌اند. روش‌های سنتی کشت گیاهان دارویی اغلب نیاز به ماه‌ها و حتی سال‌ها زمان جهت تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. به علاوه مقدار متابولیت تولید شده بسیار اندک می‌باشد (۲۷) همچنین تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله عوامل بیماری‌زا یا تغییرات آب و هوایی می‌باشد. کشت بافت گیاهان دارویی به عنوان یک راه حل جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش معرفی شده است (۱۰). یکی از روش‌هایی که امروزه برای افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است استفاده از کشت بافت ریشه‌های مویین می‌باشد (۸ و ۳۴) تشکیل ریشه‌های مویین در گیاهان، با استفاده از *A. rhizogenes* انجام می‌گیرد. ریشه های مویین، با داشتن سرعت رشدی بسیار زیاد، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش، در زمان کم با بازده فراوان و بدون نیاز به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، راهکاری سودمند برای تولید ترکیبات دارویی می‌باشد به طور مثال در کشت ریشه‌های مویین گیاه بذرالبنج مقدار ماده‌ی اسکوپولامین (Scopolamine) به میزان ۴/۱٪ وزن خشک ریشه گزارش شده است (۲۶ و ۳۰).

گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) بسته به مناطق مختلف، به صورت یکساله، دوساله و چندساله رشد می‌کند. تقریباً تمام قسمت‌های گیاه کاسنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله ترکیبات برگ کاسنی شیکوریک اسید، سولفات و فسفات‌های سدیم، منیزیم، پتاسیم و نیترات پتاسیم است. ریشه دارای ۱۵-۱۱درصد اینولین، قند های مختلف از قبیل گلوکز، فروکتوز و ساکارز، شیکوریک اسید، پکتین، سسکویی‌ترپن‌لاکتون، اسید تارتاریک می‌باشد.گل‌های کاسنی حاوی ماده‌ی شیکوریک اسید می‌باشد. از ریشه‌ی این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی و التیام زخم، همچنین به عنوان اشتهاآور، محرک صفرا و کمک‌کننده به عمل هضم غذا، مدر و تب‌بر استفاده می‌شود (۱۲). با توجه به اهمیت کبد در تصفیه‌ی بدن از

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: (Email:mohebodini@uma.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i3.63287

سموم و کمبود داروهای کبدی در کشور، اهمیت ریشه‌ی کاسنی در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی بیش از پیش مورد توجه است. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی القا و کشت ریشه‌ی مویین حاصل از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه کاسنی با استفاده از *A. rhizogenes* سویه‌ی ۱۱۳۲۵ در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

تولید ریشه‌های مویین تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار دارد. بسته به گونه‌های گیاهی مختلف، نوع ریزنمونه‌ی مناسب برای القای ریشه‌های مویین ممکن است متفاوت باشد. انواع قسمت‌های مختلف گیاه از جمله کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ، دمبرگ، گره ساقه، ساقه و گیاهچه‌ی کامل را می‌توان به عنوان ریزنمونه‌ی گیاهی استفاده کرد تا بهترین ریزنمونه را گزینش کرد (۹ و ۳۲). بهینه‌سازی مدت تماس بافت گیاهی با باکتری در طی تلقیح و هم‌کشتی نیز از عوامل تأثیرگذار در القاء و رشد ریشه‌های مویین می‌باشد (۳۷). در این تحقیق از بین سه مدت هم‌کشتی مختلف، بیشترین درصد القای ریشه های مویین در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی حاصل شد همانطور که پژوهش‌های دیگری نیز گزارش کردند که مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی بیشترین تأثیر را در القای ریشه‌های مویین نسبت به۱ تا ۶ روز هم کشتی بود (۱۸) همچنین در گیاه *Berberis aristata* DC. نیز ۴۸ ساعت هم‌کشتی کارایی بهتری نسبت به ۲۴ ساعت هم‌کشتی داشته است (۵). همچنین در گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) بهترین مدت زمان تلقیح، پنج دقیقه و ۴۸ ساعت مدت هم‌کشتی گزارش شده است (۱۵). اتصال ناحیه‌ی T-DNA به داخل ژنوم گیاهی بصورت تصادفی اتفاق می‌افتد به همین دلیل ریشه‌های تولید شده معمولاً الگوهای مختلف تجمع متابولیت ثانویه را نشان می‌دهند. در پژوهشی ۴۵ لاین ریشه‌های مویین از گیاه *Daboisia leichhardtii* F. آنالیز شد و دریافتند که تغییرات قابل توجهی در سرعت رشد، محتوای آلکالوئید در بین لاین‌های مختلف وجود دارد. بسته به جایگاه ورود T-DNA در ژنوم گیاه، توان ریشه‌های مویین در تولید متابولیت ثانویه متفاوت می‌باشد. مشخص شده که ریشه‌های مویین از نظر ژنتیکی پایدار بوده و زیرکشت آن‌ها آسان می‌باشد. اما لاین‌های مختلف آن دارای ناهمگنی می‌باشد و برای دستیابی به لاین‌های برتر که دارای قدرت رشد و تولید متابولیت ثانویه‌ی بیشتری می‌باشند لازم است عمل گزینش بین لاین‌ها انجام شود (۹).

تحقیقات نشان داده است در بیشتر گونه‌های گیاهی، بافت‌های جوان‌تر کارآیی بیشتری در تولید ریشه‌های مویین دارند. در واقع سن ریزنمونه بر خصوصیات فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها تأثیر گذاشته و توانایی سلول‌های گیاهی بر تراریخت شدن و بیان شدن ژن‌های منتقل شده از اگروباکتریوم رایزوژنز را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی و کشت بذر

جهت ضدعفونی بذور، ابتدا بذور به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بنومیل ۲ درصد نگهداری شدند. سپس زیر هود لامینار در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند و پس از چند بار آبکشی، در الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه غوطه‌ور شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور ضدعفونی شده در محیط کشت MS (۲۳) کشت گردیدند. داخل هر شیشه ۲۰ عدد بذر قرار گرفت و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری

یک کلونی از باکتری *A. rhizogenes* در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB (۴) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، کشت گردید. کشت باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و با چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. میزان OD_{600} سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB ، ۰/۶ در نظر گرفته شد.

تلقیح و هم‌کشتی ریزنمونه با باکتری

از گیاهچه‌های ۲۰ و ۲۸ روزه ریز نمونه‌ی برگ و دمبرگ تهیه شد. ریز نمونه‌ها به طول ۱ سانتی‌متر برش داده شدند و در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۵/۵ گرم در لیتر آگار کشت و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به عنوان شاهد در شرایطی مشابه با تیمار کشت گردیدند. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از سپری شدن مدت هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها در آب مقطر استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی استریل، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال داده شد. هر آزمایش با سه تکرار انجام شد و در هر تکرار پنج ریز نمونه کشت گردید. بعد از استقرار ریز نمونه‌ها در محیط کشت، اطراف پتری دیش‌ها با سلفون بسته شد و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از گذشت چهار هفته از ظهور ریشه‌ها، درصد القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد و طول ریشه‌ها محاسبه گردید.

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

جهت تأیید مولکولی ریشه‌های مویین، استخراج DNA به روش CTAB (۱۷) از ریشه‌های مویین و همچنین ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نیافته به عنوان شاهد انجام شد. پلاسمید *A. rhizogenes* سویه‌ی ۱۱۳۲۵ نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برنامه‌ی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* B بر روی DNA استخراج شده انجام شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). برنامه‌ی RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک، مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند.

کشت ریشه‌ها در محیط کشت‌های مختلف

ابتدا برای انتخاب بهترین لاین ریشه‌های مویین، چهار لاین مختلف حاصل از یک ریزنمونه، در ظروف جداگانه در محیط کشت MS مایع حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، در ظروف شیشه مربا کشت شدند سپس در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند پس از سه هفته، لاینی از ریشه‌ی مویین که بیشترین رشد (افزایش وزن) را داشت با استفاده از توزین ریشه‌ها انتخاب شد (داده‌ها آورده نشده است). در مرحله‌ی بعد به منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت در رشد ریشه‌ها، ۱۰۰ میلی‌گرم از نوک ریشه‌های لاین برتر، جدا و به ظروف شیشه مربای حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS جامد، MS مایع و ۱/۲MS مایع در سه تکرار کشت گردید. لازم به ذکر است که از سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در تمام محیط کشت‌ها استفاده شد. ریشه‌های کشت شده در محیط مایع بر روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند و ریشه‌های کشت شده در محیط کشت جامد در بصورت ثابت و دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. هر دو هفته یکبار واکشت ریشه‌ها انجام گردید. بعد از پنج هفته، ریشه‌ها از شیشه مربایی بیرون آورده شد و وزن تر آن‌ها با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. پس از خشک کردن ریشه‌ها در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت وزن خشک آن یادداشت‌برداری شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش مربوط به بررسی تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی (برای برگ و دمبرگ به طور جداگانه) بر میزان القای ریشه‌های مویین بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. همچنین آزمایش مربوط به تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر میزان وزن تر و خشک لاین انتخاب شده از ریشه‌های مویین به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام گردید. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

القای ریشه‌های مویین در ریز نمونه‌های برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها معنی‌دار نبوده اما اثر اصلی سن ریزنمونه بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد همچنین اثر اصلی مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و بر میانگین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگ ۲۰ روزه در القای ریشه‌ی، با ۵۳/۳۳ درصد تراریختی و میانگین ۸/۵ عدد ریشه و طول ۹/۱۶ سانتی‌متر در هر ریزنمونه بیشترین تأثیر را در القای ریشه‌های مویین داشته است. در ریزنمونه‌های غیرتراریخت، بیشترین القای ریشه های نابجا در برگ‌های ۲۰ روزه (۱۳/۳۳ درصد) مشاهده شد (جدول ۱ و ۲ و شکل ۱).

در تحقیق حاضر القای ریشه‌های مویین گیاه کاسنی با استفاده از سویه‌ی ۱۱۳۲۵ *A. rhizogenes* انجام شد و تلقیح ریزنمونه‌ها از طریق شناورسازی در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. روش و مدت زمان تلقیح از عوامل مؤثر بر القای ریشه‌های مویین می‌باشد. در بسیاری از تحقیقات از روش شناورسازی برای تلقیح استفاده شده است (۲۲، ۳۵ و ۳۶) همچنین تأثیر *A. rhizogenes* بر القای ریشه‌های مویین به عوامل مختلفی از جمله سویه‌ی باکتری، نوع گیاه، سن ریزنمونه، نوع ریزنمونه، مدت هم‌کشتی، نوع محیط کشت بستگی دارد (۲۸).

برخی گونه‌های گیاهی مستعد القای ریشه‌های مویین هستند و برخی دیگر از گونه‌ها به سختی می‌توانند ریشه‌های مویین تولید کنند مثلاً گونه‌های چوبی از جمله گیاه جینکو (*Biloba ginkgo*) که فنل زیادی تولید می‌کند، القای ریشه‌های مویین به سختی در آنها اتفاق می‌افتد (۱ و ۱۹). زمان ظهور ریشه‌ها نیز بسته به نوع و سن ریزنمونه متفاوت می‌باشد به‌طوری که در ریزنمونه‌های برگ در مدت ۱۲-۹ روز پس از تلقیح، اما در ریزنمونه‌های دمبرگ ۱۵ روز پس از تلقیح ظاهر شد. همچنان که در ریزنمونه‌های برگی گیاه *Zanthoxylum zanthoxyloides* ۱۱ روز (۱۸)، در گیاه *Scrophularia buergeriana* miquel ۱۵ روز پس از تلقیح، ریشه‌های مویین ظاهر شدند (۲۹) همچنین درصد القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های با سن پایین‌تر بیشتر بود به طوری که در برگ‌های ۲۰ روزه ۵۳/۳۳ درصد اما در برگ‌های ۲۸ روزه ۴۶/۶۶ درصد بود. همچنین نتایج پژوهشی نشان داد سویه‌ی A13 و محیط کشت MS بیشترین کارایی را در القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی هشت روزه داشته اند (۱۴).

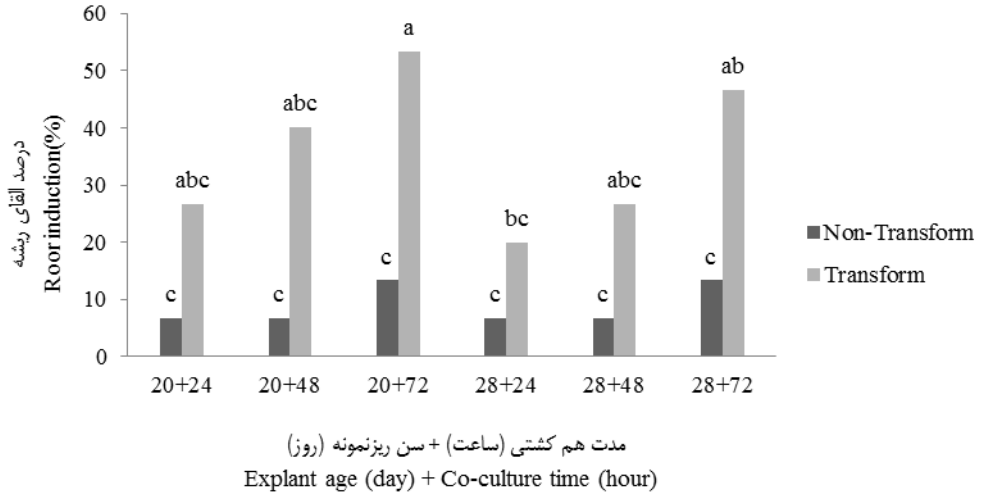
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی مختلف بر برخی صفات ریشه‌های نابجا و مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 1- Analysis of variance for the effect of different explant age and co-culture time on some characteristics of *Cichorium intybus* L. hairy roots

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		درصد القای ریشه Root induction (%)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (cm)
سن ریزنمونه Explant age	3	2058.58**	79.88**	102.58 **
مدت هم کشتی Co-culture time	2	1077.77*	33.04*	45.28**
مدت همکشتی× سن ریزنمونه Explant age × Co-culture time	6	85.18 ns	1.96 ns	6.56 ns
اشتباه آزمایشی Error	24	300	5.38	5.57

ns، *، **: به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

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



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Figure 1- Mean comparisons of the effects of explant age and co-culture time on hairy root induction of *Cichorium intybus* L. (DMRT, $p<0.05$)

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر روی صفات ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 2- Mean comparisons of the effects of explant age and co-culture time on hairy root characteristics of *Cichorium intybus* L.

	مدت هم‌کشتی (ساعت) + سن ریزنمونه (روز) Explant age (day) + Co-culture time (hours)	تعداد ریشه Root nunber	طول ریشه Root length (cm)
غیر تراریخت Non-Transform	20+24	0.33 c	0.83 d
	20+48	0.33 c	1 d
	20+72	1 c	3.66 bcd
	28+24	0.33 c	1 d
	28+48	0.33 c	1.33 d
	28+72	0.66 c	2.83 cd
تراریخت Transform	20+24	3.23 bc	6.16 abc
	20+48	7 ab	7.86 ab
	20+72	8.5 a	9.16 a
	28+24	1.66 c	3.5 cd
	28+48	2.83 bc	5.03 abcd
	28+72	8.33 a	8.73 a

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns based on Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

القای ریشه‌های مویین در ریز نمونه‌های دمبرگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی‌ها بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها معنی‌دار نبوده اما اثر اصلی سن ریزنمونه بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد همچنین اثر اصلی مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و بر میانگین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های دمبرگ ۲۰ روزه، باعث بیشترین میزان تراریختی (۳۳/۳۳ درصد) شد همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه (۳/۶۶) و طول ریشه (۱۱/۴۶ سانتی‌متر) در ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های دمبرگ ۲۸ روزه حاصل شد (جدول ۳ و ۴ و شکل ۳). در ریزنمونه‌های دمبرگ غیرتراریخت، القای ریشه‌های نابجا صورت نگرفت (شکل ۲).

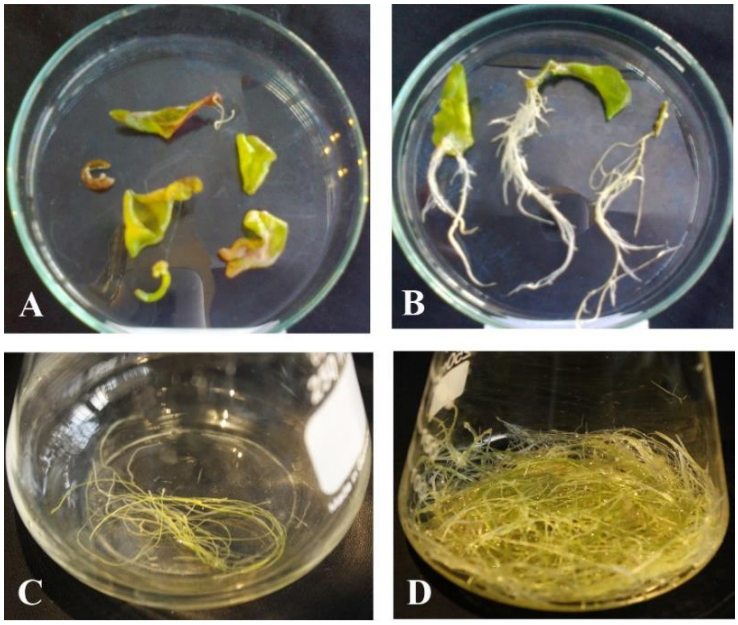
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی مختلف بر برخی صفات ریشه‌های نابجا مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 3- Analysis of variance of different explant age and co-culture time on some characteristics of *Cichorium intybus* L. hairy roots

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square		
		درصد القای ریشه Root induction (%)	تعداد ریشه Root nunber	طول ریشه Root length (cm)
سن ریزنمونه Explant age	3	977.77**	14.54**	173.30**
مدت هم کشتی Co-culture time	2	411.11*	5.33*	22.98**
مدت همکشتی× سن ریزنمونه Explant age × Co-culture time	6	144.44ns	1.85ns	10.16**
اشتباه آزمایشی Error	24	88.88	1.47	2.57

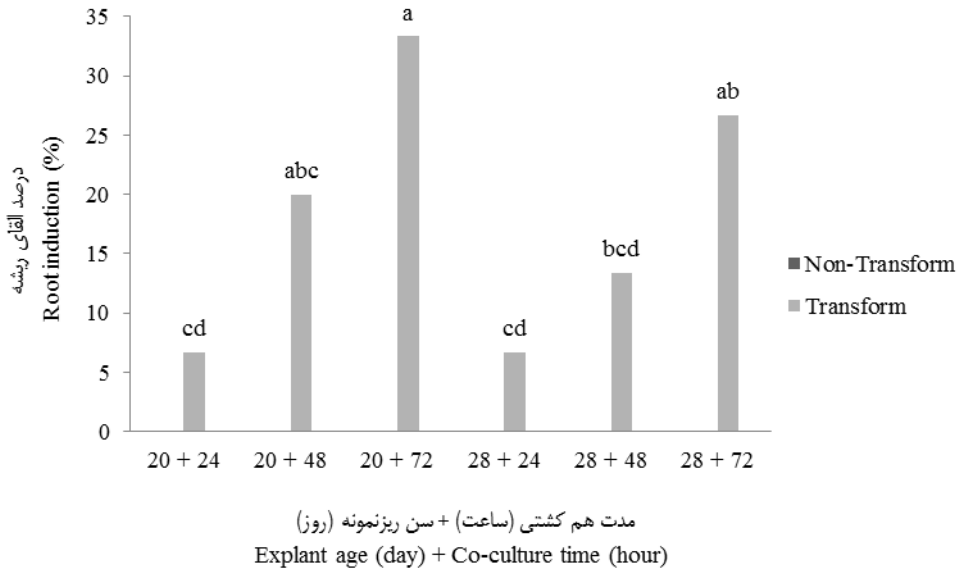
ns، *، **: به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

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



شکل ۲- مقایسه‌ی رشد ریشه‌های مویین و ریشه‌های نابجا در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) A: القای ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ غیر تراریخت، B: القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ تراریخت ، C: رشد ریشه‌های نابجا در محیط‌کشت MS مایع. D: رشد ریشه‌های مویین در محیط‌کشت MS مایع

Figure 2- Comparatives of hairy roots and adventitious root growth of *Cichorium intybus* L., A: Adventitious root induction on non-transformed leaf and petiol explants, B: Hairy root induction on transformed leaf and petiol explants, c: Adventitious root growth on liquid MS medium, D: Hairy roots growth on liquid MS medium.



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Figure 3- Mean comparisons of the effects of explant age and co-culture time on hairy root induction of *Cichorium intybus* L. (DMRT, $p<0.05$)

جدول ٤- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر روی صفات ریشه‌های نابجا و مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 4- Mean comparisons of the effects of explant age and co-culture time on hairy root characteristics of *Cichorium intybus* L.

	سن ریزنمونه (روز) + مدت هم‌کشتی (ساعت) Explant age (day) + Co-culture time (hours)	تعداد ریشه Root nunber	طول ریشه Root length (cm)
غیر تراریخت Non-Transform	24+20	0 d	0 d
	48+20	0 c	0 d
	72+20	0 c	0 cde
	24+28	0 c	0 de
	48+28	0 c	0 de
	72+28	0 c	0 de
تراریخت Transform	24+20	0.66 bc	5.83 cd
	48+20	1.66 abc	8 bc
	72+20	3.33 a	9.16 ab
	24+28	1 bc	3.73 d
	48+28	2.66 ab	7.4 bc
	72+28	3.66 a	11.46 a

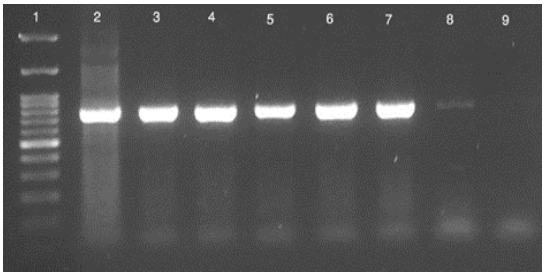
اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns based on Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

تراریخت‌سازی توسط *A. rhizogenes* از طریق انتقال و درج ناحیه‌ی T- DNA پلاسمید باکتری در داخل گیاه میزبان می‌باشد بنابراین مدت هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، از عوامل مهم در تعیین درصد تراریختی می‌باشد. در این تحقیق بیشترین درصد تراریختی و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی حاصل شد همانطور که در گیاه *Berberis aristata* DC. نیز ۴۸ ساعت هم کشتی کارایی بهتری نسبت به ۲۴ ساعت هم‌کشتی داشته است (۵) همچنین در گیاه *Chonemorpha fragrans* ۷ روز هم‌کشتی کارایی بهتری نسبت به ۸ –۱ روز هم‌کشتی نشان داده است (۱۶)

تائید مولکولی ریشه‌های مویین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار bp ۷۶۰ مربوط به تکثیر ژن B*rol* را نشان داد که با نوار شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود اما برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نشده نواری تکثیر نشد (شکل ۴).



شکل ٤- تکثیر قطعه DNA به اندازه‌ی bp ۷٦۰ در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن B *rol* بر روی DNA ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.): ۱: نشانگر اندازه‌ی DNA یک کیلوبازی، ۲: *A. rhizogenes* سویه‌ی ۱۱۳۲۵ به عنوان کنترل مثبت، ۳–۸: ریشه‌های مویین، ۹: ریشه نابجای حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی

Figure 4- PCR amplified DNA fragments in size (760 bp) using specific primers for *rol*B gene of *A. rhizogenes* on *Cichorium intybus* L.hairy root DNA. 1: 1 Kb DNA Ladder, 2: *A. rhizogenes* strain 11325 as positive control, 3-8: hairy roots, 9: Adventitious root raised form non-transformed explant as negative control

در پژوهشی که بر روی القای ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی انجام شد انتقال و بیان ژن گزارشگر GUS از باکتری سویه A13 تراریخته به ریشه‌های مویین بررسی شد و نتایج تکثیر ژن با PCR و آزمون فیتوشیمیایی ریشه‌های مویین، انتقال یافتن و بیان این ژن در ریشه‌های مویین کاسنی را تائید کرد (۱۳).

انتقال و درج ناحیه‌ی T-DNA در سلول‌های گیاه میزبان به صورت تصادفی اتفاق می‌افتد لذا تنوع رشدی و مورفولوژی زیادی بین هر لاین ریشه‌های مویین که هر کدام از یک سلول تراریخت

حاصل شده‌اند مشاهده می‌شوند. در واقع تنوع در تعداد نسخه‌های درج شده از T-DNA و میزان بیان ژن‌های موجود در آن از جمله ژن *rol* نقش بسزایی در تنوع رشدی لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین دارد (۶). در این پژوهش، فنوتیپ رشدی لاین‌های تراریخت که به طور جداگانه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی mg/l ۲۵۰ سفوتاکسیم کشت شده بودند تنوع مشهودی را در میزان رشد نشان دادند. برخی از لاین‌ها رشد طولی زیادی از خود نشان دادند اما برخی دیگر از لاین‌ها رشد طولی کمتر اما انشعاب‌دهی زیادی داشتند برخی دیگر نیز رشد کمتر داشته و پوشش کالوسی پیدا کردند. در پژوهشی آذرمهر و همکاران (۲) میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در دودمان‌های مختلف ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح برگ های چهار هفته‌ای کاسنی با سویه‌ی A4، بررسی کردند و نتایج بدست آمده نشان داد که دودمان‌های مختلف ریشه‌های مویین که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده است تفاوت معنی‌داری از لحاظ توانایی رشد و تولید متابولیت ثانویه نسبت به یکدیگر دارند. پژوهش‌های دیگر نیز از جمله کشت ۴۵ لاین مختلف ریشه‌های مویین گیاه *Duboisia leichhardtii* در محیط کشت MS تفاوت معنی‌داری را در توان رشدی و تولید متابولیت‌های ثانویه در لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین نشان داد (۲۱) همچنین در تحقیقی برای بررسی توان رشدی لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین حاصل از گیاه *Gentiana scabra*، ۲۴ لاین مختلف در محیط کشت WPM کشت شده بود و پس از ۸ هفته میزان وزن خشک لاین‌های مختلف تفاوت چشمگیری با یکدیگر داشتند به طوری که وزن خشک لاین پنج به میزان ۴۴ برابر افزایش یافت در حالی که لاین ۱۸ فقط به میزان تقریباً دو برابر افزایش نشان داده بود (۱۱).

مقایسه‌ی تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ی برگ

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان دادکه اثر متقابل سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. جدول مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر (۲/۰۱ گرم) و خشک (۰/۱۶ گرم) در ریشه‌های مویین حاصل از برگ‌های ۲۰ روزه که در محیط کشت MS ۱/۲ کشت شده بود حاصل شد و کمترین وزن تر (۰/۱۱ گرم) و خشک (۰/۰۱ گرم) مربوط به ریشه‌های نابجای حاصل از برگ‌های ۲۸ روزه‌ی غیرتراریخت که در محیط کشت MS جامد کشت شده بود مشاهده شد (جدول ۵ و ۶). به نظر می‌رسد نوع و غلظت محیط کشت، تأثیر بسزایی بر رشد ریشه‌های مویین دارد به همین دلیل بهینه‌سازی محیط کشت به منظور رشد مطلوب و تولید متابولیت‌های ثانویه حائز اهمیت است (۳۱).

مقایسه‌ی تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های دمبرگ

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر ریشه‌های مویین در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. جدول مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر (۱/۵۴ گرم) و وزن خشک (۰/۱۳ گرم) در ریشه‌های حاصل از دمبرگ‌های ۲۰ روزه و کشت ریشه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ حاصل شد (جدول ۷ و ۸)

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر برخی صفات ریشه‌های نابجا و مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 5- Analysis of variance of explant age and type of medium on some characteristics of adventitious and hairy roots of *Cichorium intybus* L.

منابع تغییرات Soursec of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares	
		وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
سن ریزنمونه Axplant age	3	3.19**	0.023**
نوع محیط کشت Medium type	2	0.92**	0.007**
نوع محیط کشت× سن ریزنمونه Explant age × Medium type	6	0.33**	0.003**
اشتباه آزمایشی Error	24	0.056	0.0004

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at 1% probability levels

جدول ٦- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر روی صفات ریشه‌های نابجا و مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 6- Mean comparisons of the effects of explant age and medium type on adventitious and hairy root characteristics of *Cichorium intybus* L.

	نوع محیط کشت + سن ریزنمونه (روز) Explant age (day) + Medium type	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)
غیر تراریخت Non-Transform	20+ Solid MS	0.14 d	0.017 c
	20+ Liquid MS	0.16 d	0.014 c
	20+ Liquid 1/2MS	0.19 cd	0.017 c
	28+ Solid MS	0.11 d	0.016 c
	28+ Liquid MS	0.16 d	0.016 c
	28+ Liquid 1/2MS	0.19 cd	0.021 c
تراریخت Transform	20+ Solid MS	0.56 cd	0.044 c
	20+ Liquid MS	1.44 d	0.13 b
	20+ Liquid 1/2MS	2.01 a	0.16 a
	28+ Solid MS	0.62 c	0.053 c
	28+ Liquid MS	1.17 b	0.101 b
	28+ Liquid 1/2MS	1.20 b	0.109 b

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns based on Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

جدول ۷- تجزیه واریانس تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر برخی صفات ریشه‌های نابجا و مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 7- Analysis of variance of explant age and type of medium on some characteristics of adventitious and hairy roots of *Cichorium intybus* L.

منابع تغییرات Souere of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares	
		وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
سن ریزنمونه Explant age	3	6.38**	0.016**
نوع محیط کشت Medium type	2	2.22**	0.006**
نوع محیط کشت× سن ریزنمونه Explant age × Medium type	6	0.79**	0.002**
اشتباه آزمایشی Error	24	0.26	0.0002

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at 1% probability levels

جدول ۸- مقایسه‌ی میانگین تأثیر سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر روی صفات ریشه‌های مویین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Table 8- Mean comparisons of the effects of explant age and medium type on adventitious and hairy root characteristics of *Cichorium intybus* L.

	نوع محیط کشت + سن ریزنمونه Explant age (day) + Medium type	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)
تراریخت Transform	20+ Solid MS	0.47 c	0.038
	20+ Liquid MS	0.89 b	0.076
	20+ Liquid 1/2MS	1.54 a	0.130 a
	28+ Solid MS	0.27 cd	0.024 cd
	28+ Liquid MS	0.61 bc	0.051 bc
	28+ Liquid 1/2MS	1.24 a	0.106 a

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns based on Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

استفاده از محیط کشت مناسب، از عوامل تأثیرگذار در استقرار و رشد ریشه‌های مویین می‌باشد (۲۰ و ۳۳) لذا بهینه‌سازی محیط کشت به منظور رشد مطلوب و تولید متابولیت‌های ثانویه حائز اهمیت است (۳۱). این تحقیق نشان داد که محیط کشت ۱/۲MS مناسب‌ترین

محیط کشت برای رشد ریشه‌های مویین می‌باشد. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در آزمایشی طی مقایسه‌ی اثر نوع محیط کشت ۱/۲MS، MS و (Gamborg) B5 بر رشد ریشه‌های مویین در گیاه *Scrophularia buergeriana*، محیط کشت ۱/۲ MS مناسب‌ترین محیط کشت معرفی شد (۲۵). در تعدادی از گیاهان دیگر نیز، محیط کشت ۱/۲MS بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های مویین گزارش شده است (۳۵) اما پاک دین پاریزی و همکاران (۲۴) رشد ریشه‌های مویین حاصل از گیاه *Valeriana officinalis* L. را در محیط کشت‌های MS، ۱/۲MS، B_5، ۱/۲B5 و N6 مورد مطالعه قرار دادند که بعد از سه هفته بیشترین تجمع زیست‌توده در ریشه‌های مویین کشت شده درمحیط کشت B_5 و بعد از آن به ترتیب در ۱/۲B_5، ۱/۲MS و MS مشاهده شد و محیط کشت N6 کمترین تأثیر را نشان داد (۷). در پژوهشی آذرمهر و همکاران (۳) تأثیر فلز روی در غلظت‌های مختلف بر روی میزان رشد ریشه‌های مویین، تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد و نتایج بدست آمده نشان داد فلز روی باعث کاهش وزن ریشه‌های مویین شده، اما اثرات مثبتی بر افزایش متابولیت ثانویه‌ی موجود در ریشه‌های مویین از جمله فنل، فلاونوئید و شیکوریک اسید، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در ریشه‌های مویین داشته است. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و بررسی منابع انجام شده، این بررسی اولین گزارش القا ریشه مویین در گیاه کاسنی با استفاده از سویه ۱۱۳۲۵ با استفاده از تیمارهای انجام شده می‌باشد که بیشترین میزان تراریخته سازی با استفاده از تیمارهای مختلف بدست آمد.

منابع

1- Ayadi R., and Tremouillaux-Guiller J. 2003. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*. Tree Physiology, 23: 713–718.

2- Azarmehr B., Karimi F., Taghizade M., and Mousavi Gargari S.L. 2012. Comparative study of growth and secondary metabolite production ability in transformed hairy roots from *Cichorium intybus* L. Journal of Plant Research, 26: 476-485. (In Persian with English abstract)

3- Azarmehr B., Karimi F., taghizadeh M., and Mousavi Gargari S.L. 2013. Secondary metabolite contents and antioxidant enzyme activities of *Cichorium intybus* hairy roots in response to z inc. Journal of Medicinal Plants and By-Products, 2: 131-138.

4- Bertani G. 1952. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62: 293-300.

5- Brijwal A., and Tamta S. 2015. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC, SpringerPlus, 4: 443-453.

6- Cho H.J., Widholm J.M., Tanaka N., Nakanishi Y., and Murooka Y. 1998. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus Sinicus* (Chinese milk). Plant Science, 138: 53-65.

7- Chu C.C., Wang C.S., Sun C.C., Hsu C., Yin K.C., and Chu C.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica, 18: 659-668.

8- Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., and Xu J. 2012. Genetically transformedroots: from plant disease to biotechnological resource. Journal of Trends in Biotechnology, 30: 528–537.

9- Grzegorczyk-Karolak I., Kuzma L., Skała E., and Kiss A. 2018. Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. Industrial Crops and Products, 117: 235-242.

10- Hasanlu T., Rezazadeh S., and Rahnama H. 2008. Hairy roots sources for the production of valuable pharmaceutical compounds. Journal of Medicinal Plants, 29: 1-17.

11- Huang S.H., Vishwakarma R.K., Lee T.T., Chan H.S., and Tsay H.S. 2014. Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. Botanical Studies, 55: 1- 17.

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

13- Kabirnataj S., Nematzadeh G., Zolala J., and Talebi A. 2016. High-efficient transgenic hairy roots induction in chicory: redawn of a traditional herb. Acta Agriculturae Slovenica, 107(2): 321-334

14- Kabirnetaj S., Zolala J., Nematzadeh G.A., and Shokri, E. 2012. Optimization of hairy root cultue establishment in chicory plants (*Cichorium intybus* L.) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology, 4: 61–75. (In Persian with English abstract)

15- Karthikeyan A., Palanivel S., Parvathy S., and Bhakya R.R. 2007. Hairy root induction from hypocotyl segment of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). African Journal Biotechnology, 15: 1817-1820.

16- Kedari P., and Malpatak N. 2014. Hairy root culture of *Chonemorpha fragrans* (moon) Alston plant for compothecin production. Indian Journal of Biotechnology, 13: 231-235.

17- Khan S., Irfan Q. M., Kamaluddin A., and Abdin 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.
18- Kodjo D., Atsou V.A., Melin C., Bland N., Oudin A., Courdavault V., Creche J., and Lanoue A. 2013. Optimized genetic transformation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of chelerythrine and skimmiamine in hairy root cultures. Engineering in Life Sciences, 14: 95–99.
19- Lanoue A., Shakourzadeh K., Marison I., and Laberche J. C. 2004. Occurrence of circadian rhythms in hairy root cultures grown under controlled conditions. Journal of Biotechnology and Bioengineering, 88: 722–729.
20- Lourenco P.M.L., Castro S.D., Martins T.M., and Domingos A.C. 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. Enzyme and Microbial Technology, 31: 242–249.
21- Mano Y., Ohkawa H., and Yamada Y. 1989. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Science, 59: 191-201.
22- Manuhara Y. S., Kristanti A.N., Utami E.S., and Yachya A. 2015. Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. Hairy root in balloon-type bubble bioreactor. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(12): 1027-1032.
23- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum, 15: 473-476.
24- Pakdin Parizi A., Farsi M., Nematzadeh G.A., and Mirshamsi A. 2014. Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L.. Acta Agriculturae Slovenica, 103: 299-305
25- Park S.U., Li X., Eom S.H., Lee C.Y., and Lee S.Y. 2010. E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophulari buergeriana* miquel. Archives of Biological Sciences Belgrade, 62(3): 649-652.
26- Rischer H., Hakkinen S.T., Ritala A., Seppanen-Laakso T., Miralpeix B., Capell T., Christou P., and Oksman-Caldentey K.M. 2013. Plant cells as pharmaceutical factories. Current Pharmaceutical Design, 19: 5640–5660.
27- Ritala A., Dong L., Imseng N., Seppänen-Laakso T., Vasilev N., and Krol S. 2014. Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committedstep in terpenoid indole alkaloid pathway. Journal of Biotechnology, 176: 20-28.
28- Samadi A., Carapetian J., Heidary R., Jafari M., and Hssanzadeh A. 2012. Hairy root induction in *Linum mucronatum* sp. an anti-tumor lignans production plant. Nothlae Botanicae Hortiagrobatanici Cluj- Napaca, 40(1): 125-131.
29- Sang U., Xiaohua L., Seok H., Chung Y., and Sook Y. 2010. E-P-Methoxycinamic acid production in hairy root culture of *Scrophularia buergeriana* miquel. Archives of Biological Sciences, 62(3): 649-652.
30- Sevonand N., and Oksman-Caldentey K.M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as source of alkaloids. Planta Medica, 68: 859–868.
31- Shinde A., Malpathak N., and Fulzele D. 2010. Impact of nutrient components onproduction of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. Journal of Natural Medicines, 64: 346-353.
32- Singh R., Kamal S., Rani D., Mukhopadhyay K., and Banerjee M. 2014. Development of hairy root culture system of *Phlogacanthus thyrsiflorus* Nees. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 1(3): 107-112.
33- Sivakumar G., Yu K.W., and Paek K.Y. 2005. Production of biomass and ginsenoides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. Engineering in Life Sciences, 5: 333-342.
34- Srivastava V., Kaur R., Chattopadhyay S.K., and Banerjee S. 2013. Production of industrially important cosmaceutical and pharmaceutical derivatives of betuligenolby *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. Industrial Crops and Products, 44: 171–175.
35- Sujatha G., Zdravkovic-Korac S., Calic D., Flamini G., and Ranjitha Kumari B.D. 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.
36- Thiruvengadam M., Rekha K., and Chung I. 2016. Induction of hairy roots by Agrobacterium rhizogenes-mediatedtransformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) forthe assessment of phenolic compounds and biological activities. Scientia Horticulturae, 198: 132-141.
37- Young-Am C., Yu H.S., Song J.S., Chun H.K., and Park S.U. 2000. Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctoium* Lour. Biotechnology Letters, 22: 1527-1530.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 393-405
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۰۵-۳۹۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Optimization of Hairy Root Induction and Biomass Production of Chicory (*Cichorium intybus* L.)

R. Fathi[1]- M. Mohebodini[2*]- E. Chamani[3]

Received: 22-05-2017
Accepted: 29-09-2018

Introduction: Transformed hairy roots obtained by infection of plants with *Agrobacterium rhizogenes* strains are used as a tissue culture tool for secondary metabolite production since hairy roots are genetically and biologically stable and they are able to produce metabolite within a short time. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a medicinal plant from *Asteraceae*. This plant contains many important metabolites include chicoric asid, inulin, scoline, coumarin and flavonoids.

Materials and Methods: The seeds were surface-sterilized by rinsing with 2% benomil for 30 min and later sterilized with 5% sodium hypochlorite for 20 min and subsequently with 70% ethanol for 90 s. the wounded leaf of 20 and 28-day-old seedlings inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* 11325. Bacterial colonies were cultured on liquid LB medium for 1 day. The explants were submerged in the solution for 15 min and were shaken gently. After that, the explants were drained on sterile filter paper and then transferred to MS solid medium. The explants were incubated at (25 ± 2) ˚C under dark condition for three different co-cultivation period (24, 48 and 72 hours). In the next step, the explants were transferred to MS solid medium supplemented with 500 mg/L cefotaxime. The explants were incubated at (25 ± 2) ˚C under a 16-h photoperiod condition for four weeks. At the end of incubation time, the percentage of hairy root induction, root number and root length were investigated. Genomic DNA of *Cichorium intybus* L. hairy root was extracted following the method of CTAB and subjected to PCR analysis. Non-transformed root DNA was used as a negative control and pRi11325 plasmid DNA was used as positive control. The pair of primers specific to the *rol*B fragment sequences was: 5-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA -3 and 5-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3. The amplification protocol for the *rol*B was a 5 min melting at 94 ◦C followed by 35 cycles of a 5 min melting at 94 ◦C, a 45 s annealing at 55 ◦C and a 1 min elongation at 72 ◦C, and final elongation at 72 ◦C for 7 min. PCR products were electrophoretically separated on 0.8 % agarose gels (w/v) and stained with gel red. To determine the best media composition for growth of hairy roots, approximately 100 mg FW roots were cultured in basal liquid MS, solid MS and liquid 1/2MS medium supplemented with 500 mg/L cefotaxime on a rotary shaker (90 rpm) at 25 ◦C in dark for 5 weeks, and increase in fresh weight and dry weight was recorded at 5 week later. Three replicates were made for each experimental set. Non-transformed roots were cultured on same mediums.

Results and Discussion: Each of the two different explants – leaf and petiole showed different levels of hairy root induction in different co-culture time. Hairy root induction was observed 7 days after co-cultivation. There were low adventitious roots formed from control explants. 72 hours co-cultivation period was found to be more efficient in inducing hairy root phenotype in both explant types. The infection of explants by *A. rhizogenes* is a process that implies a succession of events, including the transfer and integration of T-DNA, into the host plant genome. Therefore, the time of contact between *A. rhizogenes* and the explants determines the transformation efficiency. A maximum of transformation frequency (53.33%) was observed in leaf explants in 72 hours co-cultivation followed by 33.33% in petiole explants in 72 hours co-cultivation. In leaf explants maximum root number (8.5 roots per explant) and maximum length of root (9.16 cm) induced from 20-day-old seedling in 72 hours co-culture. In petiole explants maximum root number (3.66 roots per explant) and maximum root length (11.46 cm) induced from 28-day-old seedling in 72 hours co-culture. The "hairy root" phenotype characterized by high branching and fast growth was previously reported in "reactive species" like *Datura innoxia* but not for "difficult species". The high phenolic content of woody plant species could be responsible for the reduced hairy root phenotype as reported for gingko or pine. Three different culture media (solid MS, liquid MS and 1/2 MS media) were tested to determine the best suitable media for the maximum Biomass of hairy roots line.

1, 2 and 3- Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Horticutural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: mohebodini@uma.ac.ir)

Conclusions: Genetically transformed hairy roots obtained by infection of plants with *Agrobacterium rhizogenes* are suitable source for production of bioactive molecules due to their genetic stability and generally show fast growth in culture media free of growth hormones. This study describes the protocol for hairy root induction which could further be useful for the production of secondary metabolites and biomass.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Co- culture, Hairy roots, *Rol* gene, Secondary metabolites