

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی القا ریشه‌های موین و ارزیابی تولید ترکیبات فنولی در گیاه شلغم (*Brassica rapa ssp. rapa*)

فریده بابالو^۱، رشید جامعی^۱ و مراد جعفری^{۲*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶)

چکیده

سیستم کشت ریشه موین به عنوان یک رویکرد عالی برای تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های گیاهی مهم مورد تأیید قرار گرفته است. این مطالعه در آزمایشگاه کشت سلول و بافت گیاهی دانشگاه ارومیه به منظور بهینه‌سازی کشت ریشه‌های موین شلغم و بررسی محتوی ترکیبات فنلی آن انجام شد. جهت القا ریشه موین، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ برگرفته از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای شلغم توسط سه سویه از آگروباکتریوم رایزوژنز شامل A7، A13 و ATCC 15834 تلقیح شدند. تأیید مولکولی ریشه‌های موین از طریق آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rolA-B* انجام گرفت و در نهایت میزان تولید ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی در کشت ریشه‌های موین بررسی و با ریشه‌ی طبیعی مقایسه گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، درصد القا ریشه موین به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه قرار گرفت. حداکثر میزان القا ریشه موین (۳۷٪) در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه A13 آگروباکتریوم رایزوژنز بدست آمد. از نظر رشد و میزان تولید زیست‌توده، تفاوت معنی‌داری بین لاین‌های ریشه موین مشاهده شد. در لاین‌های ریشه موین میزان بیوستز شش نوع اسید فنولیک (رزمارینیک اسید، کلروژنیک اسید، سینامیک اسید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کافیک اسید) و سه نوع فلاونوئید (کوئرستین، اپیزین و روتین) مورد مطالعه بر اساس آنالیز HPLC و بطور کلی محتوای فنول، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بطور معنی‌داری در مقایسه با ریشه نرمال بالاتر بود. نظر به نتایج بدست آمده کشت ریشه موین شلغم می‌تواند به عنوان یک سیستم کارآمد جهت بیوستز متابولیت‌های ثانوی در این گیاه در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، تولید متابولیت ثانویه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدها، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

(Abdel-Razzak, 2021; Zhang et al., 2014). این گیاه به دلیل ریشه‌ها و برگ‌های لذیذش با ارزش غذایی بالا و محتوای کم‌کالری در زمره سبزیجات پرمصرف است و با توجه به اینکه به عنوان علوفه دام نیز کاربرد دارد، نقش حیاتی در اقتصاد کشاورزی و سلامت انسان ایفا می‌کند (Abdel-

شلغم (*Brassica rapa* var. *rapa* L.) یک مورفوتیپ مهم در گونه *B. rapa* متعلق به خانواده Brassicaceae، گیاهی یک‌ساله یا دوساله است که در حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد در اروپا کشت شد و سپس به سایر نقاط جهان گسترش یافت

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

عنوان عامل القاکننده سندرم ریشه موپین در گیاهان شناخته شد (Gutierrez-Valdes et al., 2020; Stepanova et al., 2022). ریشه‌های موپین از محل زخم‌های آلوده به اگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه منشأ می‌گیرند (Gutierrez-Valdes et al., 2020). در طی مکانیسم عفونت و تراریختی، قطعات خاصی از DNA باکتری (T-DNA) از پلاسמיד مولد ریشه آن (پلاسמיד Ri) به ژنوم گیاه منتقل و به طور تصادفی در آن ادغام می‌شود و پس از بیان، تمایز ریشه‌های موپین را در گیاه القا می‌کند (Boccia et al., 2022; Gutierrez-Valdes et al., 2020). سویه‌های اگروباکتریوم بر اساس نوع اپین که سنتز می‌کنند به چهار نوع اگروپین، مانوپین، کوکوموپین و میکیموپین تقسیم می‌شوند (Veena and Taylor, 2007). در سویه‌های اگروپینی اگروباکتریوم رایزوزنز، ناحیه T-DNA متشکل از دو توالی مستقل شامل TL (پایانه چپ) و TR (پایانه راست) است که معمولاً به طور مستقل از هم منتقل و در ژنوم گیاه ادغام می‌شوند؛ با این حال، تنها TL-DNA به دلیل داشتن ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* برای القا ریشه موپین ضروری است (Gutierrez-Valdes et al., 2020). از آنجایی که غیرفعال شدن ژن *rolB* باعث ایجاد اختلال در فرایند القا ریشه موپین در گیاه میزبان می‌شود، به نظر می‌رسد که مرتبط‌ترین ژن *rol* برای القا ریشه موپین، *rolB* باشد (Gutierrez-Valdes et al., 2020; Mirmazloum et al., 2024). کشت‌های ریشه موپین به دلیل پایداری ژنوتیپی و بیوسنتزی، هزینه کم و عدم نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد، قابل مهندسی بودن و توانایی رشد در بیوراکتورها، و از همه مهم‌تر ظرفیت بیوسنتزی مشابه یا بالاتر آن‌ها برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با گیاهان مادری، به عنوان "کارخانه‌های سلولی سبز" از اهمیت تجاری برخوردار هستند (Chung et al., 2016; Mirmazloum et al., 2024).

تاریختی و القا ریشه موپین در بسیاری از گونه‌های جنس *Brassica* گزارش شده است، با این حال، اطلاعات محدودی در مورد القا ریشه موپین در گونه شلغم در دسترس است. برای اولین بار القای ریشه موپین در شلغم و تربچه توسط Tanaka

Razzak, 2021; Chung et al., 2016; Dejanovic et al., 2021). شلغم دارای اندام ذخیره‌ای ریشه در اندازه‌ها و اشکال مختلف از کروی تا مثلی، در رنگ‌های متنوع سفید تا ارغوانی، و برگ‌هایی سبز با طعم تند، تلخ و رایحه گوگردی است (Hirai and Matsumoto, 2007; Serrano et al., 2024). خواص بیولوژیکی و درمانی مختلفی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضدسرطانی، تنظیم آنزیم و کنترل آپوپتوز و چرخه سلولی برای شلغم گزارش شده است که به وجود ترکیبات گوگردی (ایزوتیوسیانات‌ها و گلوکوزینولات‌ها)، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدهای آن نسبت داده شده است (Dejanovic et al., 2021; Padilla et al., 2007; Serrano et al., 2024). میزان ترکیبات مؤثره شلغم در اندام‌های هوایی بیشتر از قسمت‌های ریشه است و این مقدار بسته به عوامل ژنتیکی، محیطی و نحوه مصرف متفاوت است (Dejanovic et al., 2021; Fernandes et al., 2007). تولید ترکیبات مؤثره از طریق کشت سستی گیاهان در مزارع و باغات معایب مختلفی از جمله عملکرد کم، چرخه رشد کند و نوسانات کمی و کیفی ناشی از شرایط نامساعد محیطی، آلودگی و بیماری را به همراه خواهد داشت (Chung et al., 2016).

با درک ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی گونه‌های *Brassica*، استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی می‌تواند در غلبه بر محدودیت‌های کشت سستی و دستیابی به محصولاتی با محتوای بیوشیمیایی غنی‌تر بسیار مؤثر باشد. یکی از این تکنیک‌ها، فناوری کشت درون شیشه‌ای (*In vitro*) ریشه موپین است که می‌تواند تأمین‌کننده ترکیبات ارزشمند گیاهی برای مصارف دارویی، تغذیه‌ای و صنعتی در مقیاس وسیع و به دور از هر گونه محدودیت جغرافیایی، اقلیمی و محیطی باشد (Chandra and Chandra, 2011; Georgiev et al., 2007). در ابتدا ظهور ریشه‌های موپین به عنوان علائم ناشی از تهاجم پاتوزن در گیاهان تلقی می‌شد (Gutierrez-Valdes et al., 2020). در دهه ۱۹۷۰ الی ۱۹۸۰، *Agrobacterium rhizogenes*، یک باکتری همزیست گرم منفی، که اخیراً از نظر طبقه‌بندی به *Rhizobium rhizogenes* تغییر نام داده است، به

برگ، هیپوکوتیل و گیاهچه بذری بدون ریشه (ریشه برش یافته) جهت القا ریشه موین تهیه گردید.

سویه باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها برای القا ریشه موین:

برای القای ریشه موین در شلغم به روش Amani و همکاران (۲۰۲۱) عمل شد. به منظور آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی جهت تلقیح، یک تک کلونی از کشت جامد (محیط کشت LB محتوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین) هر یک از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزورنز (A13، ATCC 15834 و A7) انتخاب و به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع محتوی ریفامپسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردید. کشت‌ها تا زمان رسیدن به غلظت بهینه ($OD_{600} = 0.5-0.8$) بر روی شیکر انکوباتور (۲۰۰ rpm) با دمای $28^{\circ}C$ نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب باکتری حاصل، پس از دور ریختن مایع رویی در ۳۰ الی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS $1/2$ به عنوان محیط القا، مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمد و جهت تلقیح ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تلقیح، ریزنمونه‌ها پس از ایجاد چندین زخم سوزنی با استفاده از اسکالپل برای تسهیل نفوذ باکتری، به مدت زمان ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری مربوطه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده پس از قرار گرفتن بر روی کاغذ صافی سترون جهت حذف باکتری‌های اضافی، به محیط هم‌کشتی (MS $1/2$ بدون تنظیم‌کننده رشدی) منتقل شده و به مدت چهار روز در اتاقک رشد با شرایط تاریکی و دمای $24^{\circ}C$ نگهداری شدند. پس از اتمام دوره هم‌کشتی، جهت نمایان شدن ریشه‌های موین، ریزنمونه‌ها پس از شستشو با استفاده از محلول حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، بر روی محیط کشت جامد MS $1/2$ حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت شدند. لازم به ذکر است که در کشت‌های شاهد تمام مراحل فوق به طور کاملاً مشابه انجام شد، تنها با این تفاوت که ریزنمونه‌ها بعد از ایجاد زخم به جای سوسپانسیون باکتری در محیط کشت MS $1/2$ فاقد باکتری غوطه‌ور شدند. به منظور ثبت دقیق مشاهدات القا ریشه

و همکاران (۱۹۸۵) با استفاده از یک سویه آگروباکتریوم رایزورنز (A4) در ریزنمونه دیسک ریشه غده‌ای گزارش شد. در مطالعات دیگر القای ریشه‌های موین با استفاده از سویه KCTC 2703 آگروباکتری و ریزنمونه برگ در شلغم (Chung et al., 2016) و کلم چینی (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) گزارش شده است. همچنین ریشه‌های موین حاصل از شلغم به عنوان یک سامانه جدید برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی در مقایسه با ریشه موین توتون معرفی شده است (Hute et al., 2014; Ele Ekouna et al., 2017). با این حال اطلاعات کمتری در مورد بهینه‌سازی القا و تولید ریشه موین با نظر درگرفتن فاکتورهای مؤثر مانند نوع ریزنمونه و سویه آگروباکتری و همچنین گزینش لاین‌های برتر ریشه موین از نظر خصوصیات رشدی و محتوی متابولیت ثانویه در شلغم در دسترس است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی امکان القا ریشه موین در ریزنمونه‌های مختلف برگرفته از شلغم (برگ، ساقه، هیپوکوتیل، گیاهچه بذری بدون ریشه) توسط سه سویه مختلف آگروباکتریوم رایزورنز شامل A13، ATCC 15834 و A7 و مقایسه پروفایل ترکیبات فتولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موین در مقایسه با ریشه طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور مورد نیاز گیاه شلغم از شرکت پاکان بذور اصفهان خریداری شد. بذرها پس از انتقال به زیر هود لامینار جهت تولید گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای، بدین صورت مورد ضدعفونی قرار گرفتند: غوطه‌وری در اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه، شستشو با آب مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه، غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه، در نهایت شستشو و آبکشی با آب مقطر سترون به مدت ۱۵ دقیقه. بذرهای سترون شده در شیشه‌های کشت محتوی محیط آب-آگار (۸ گرم در لیتر) کشت شدند و در اتاق رشد با شرایط دمایی $24 \pm 2^{\circ}C$ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای، سه نوع ریزنمونه مختلف شامل

(پس از آبیگری روی کاغذ صافی با ترازوی حساس و تحت شرایط سترون زیر هود لامینار) و خشک (DW) (پس از ۴۸ ساعت خشک شدن در آون با دمای °C ۶۰) لاین‌ها به مدت هر هفته یکبار، اندازه گرفته شد. زمان دو برابر شدن (Doubling time; T_d) و شاخص رشد (Growth index; GI) با فرمول‌های زیر محاسبه شد (Nopo-Olazabal *et al.*, 2014):

$$\mu = \frac{\ln \frac{DW_i}{DW_0}}{Dt}$$

μ = نرخ رشد ویژه، t = زمان (i = بین صفر تا ۴۹ روز = ۷ هفته)

$$T_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad GI = \frac{(DW_i - DW_0)}{DW_0}$$

که در آن DW_i میانگین وزن خشک در پایان ۴۹ روز، و DW_0 میانگین وزن خشک در زمان شروع رشد نمای (روز صفر) است.

تهیه عصاره متانولی جهت ارزیابی‌های بیوشیمیایی و

فیتوشیمیایی ریشه‌های موین: تهیه عصاره متانولی بر اساس روش Amani و همکاران (۲۰۲۱) با اندکی تغییر انجام گرفت. در ابتدا ۵/۰ گرم از بافت خشک ریشه موین پودر شده با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همونایز گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای °C ۳۰ قرار گرفت تا بافت ریشه موین به طور کامل متلاشی گردد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای °C ۴ سانتریفیوژ و از کاغذ صافی عبور داده شدند. در نهایت عصاره صاف‌شده جهت اندازه‌گیری فنول، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فنول کل: جهت سنجش میزان فنول کل ریشه‌های

موین، ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی ریشه‌های موین را با ۱۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ درصد داخل لوله‌های شیشه‌ای تمیز ریخته و به آن ۹۶۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد و در آخر ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس لوله‌های شیشه‌ای به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Dynamica (HALODB-20 خوانده

موین، بررسی کشت‌ها به صورت روزانه انجام گرفت. هر تک ریشه موین القایی، پس از نام‌گذاری به عنوان یک لاین، جهت رشد بیشتر به محیط‌کشت جامد تازه MS ۱/۲ حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز اما با غلظت سفوتاکسیم کمتر منتقل شد. در نهایت لاین‌های ریشه موین در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS ۱/۲ مایع اما با غلظت سفوتاکسیم کمتر منتقل شدند. واکشت لاین‌ها هر دو هفته یکبار در محیطی مشابه اما با غلظت سفوتاکسیم کمتر تا زمان حذف کامل سفوتاکسیم ادامه یافت. کشت‌های مایع در تمام طول دوره آزمایشات در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۲۰ و تاریکی نگهداری شدند.

تأیید تراریختی ریشه‌های موین: DNA ژنومی ریشه‌های

موین القاشده و ریشه‌های نرمال (ریشه‌های طبیعی جداشده از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به عنوان کنترل منفی) به روش CTAB استخراج شد (Khan *et al.*, 2007). DNA استخراجی از پلاسمید اگروباکتریوم رایزوپنز هم به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. تأیید تراریختی ریشه‌های موین از طریق انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rolA-B* جهت تکثیر همزمان ژن‌های *rolA* و *rolB* و آغازگرهای *virD2* جهت اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی ریشه‌های موین انجام شد. آنالیز PCR نمونه‌های DNA با استفاده از آغازگرهای مربوطه مطابق جدول ۱ انجام گرفت. اندازه محصولات PCR بدست‌آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

نرخ رشد ریشه‌های موین: پس از استقرار و تأیید

مولکولی ریشه‌های موین، حدود نه لاین برتر بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و رشدی انتخاب شدند و سپس ۱۰۰ میلی‌گرم از آن‌ها به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS ۱/۲ (۳۰ گرم در لیتر ساکارز) منتقل شدند. کشت‌ها به مدت هفت هفته بر روی شیکر انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای °C ۲۵ ± ۲ قرار گرفتند. جهت مقایسه لاین‌ها و انتخاب بهترین لاین ریشه موین، وزن تر (FW)

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های *rolA-B* و *virD2* مورد استفاده در تحقیق

منبع	توالی	آغازگر	ژن
(Kiyokawa et al., 1992)	5'-CTGTACCTCTACGTCGACT-3'	F	<i>rolA-B</i>
	5'-TCAGTCGAGTGGGCTCCTTG-3'	R	
(Tan et al., 2003)	5'-ATGCCCCGATCGAGCTCAAGT-3'	F	<i>virD2</i>
	5'- CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA-3'	R	

شد. مقدار جذب بدست آمده (Y) در معادله حاصل از کالیبراسیون ($Y=0.0144X+0.2303$) جایگذاری، و مقدار فنول کل (X) بر حسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گزارش شد (Chung et al., 2016).

سنجش فلاونوئید کل: برای سنجش میزان فلاونوئید کل، ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی ریشه‌های موین، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد اضافه و به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی قرار داده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۱۰۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار اضافه نموده و جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از توسط کوئرتستین و با استفاده از معادله حاصل از کالیبراسیون ($Y=0.0094X+0.8712$) میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی گرم کوئرتستین بر گرم وزن خشک گزارش گردید (Chang et al., 2023).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش جاروب‌سازی رادیکال آزاد DPPH (Diphenyl-1-2,2-picrylhydrazyl): برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، به ۵ میکرولیتر عصاره متانولی ریشه‌های موین، ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۰/۰۰۴) گرم پودر DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) اضافه و میزان جذب پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شده و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید (Chiou et al., 2007).

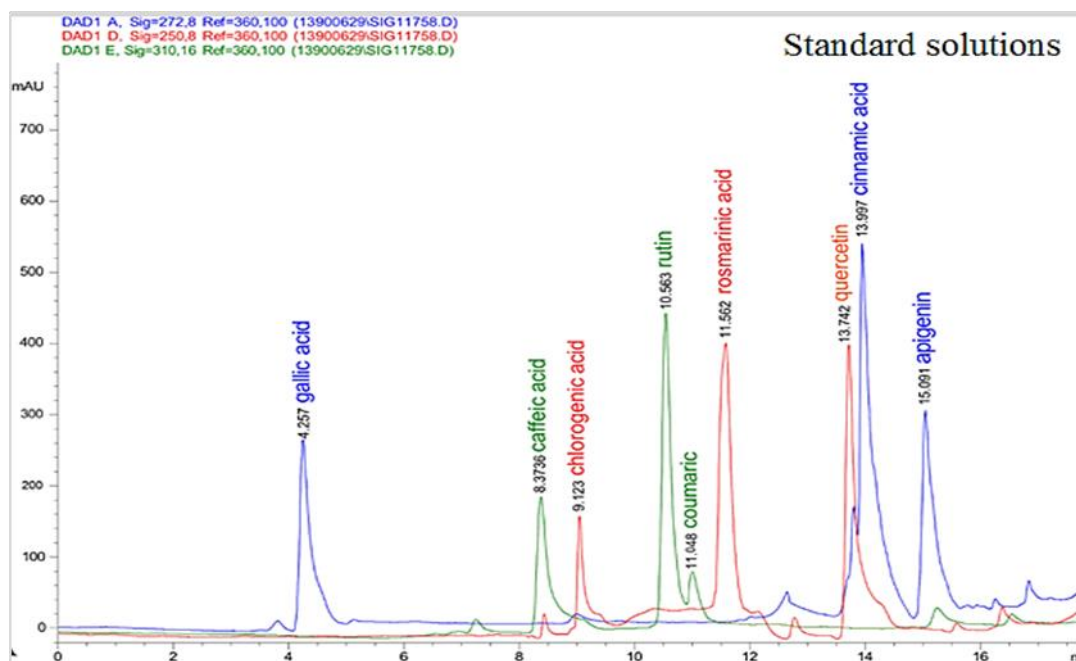
$$DPPH (\%) = [(AC-AS)/AC] \times 100$$

AC: میزان جذب بلانک، AS: میزان جذب نمونه

استخراج ترکیبات پلی‌فنلی و آنالیز به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): ۱۰۰ گرم از

ریشه‌های موین پودر شده و ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد گرید HPLC به آن اضافه شد. عصاره به مدت ۳ تا ۵ ساعت هم زده شد، سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۰ °C تحت حمام اولتراسونیک قرار گرفت و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مواد رویی (به عنوان عصاره متانولی) از طریق فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر و تحت آنالیز HPLC ترکیبات فنلی قرار گرفتند. محلول‌های خالص اسید گالیک، اسید سینامیک، اسید کلروژنیک، اسید رزمارینیک، اسید کافئیک، اسید کوماریک، کورسیتین، آپژنین و روتین (Merck، آلمان) به عنوان استاندارد استفاده شدند. ترکیبات فنلی با دستگاه HPLC مدل G1315B سری ۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۵ میکرولیتر، پمپ گرادیانی چهار حاله و آشکارساز آرایه دیودی صورت گرفت. جداسازی بر روی ستون اکتا دیسیل سیلان (به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر (Shimadzu Kyoto, Japan) انجام شد. فازهای متحرک یک درصد اسید استیک در آب مقطر (حلال A) و یک دهم درصد اسید استیک در استونیتریل (حلال B) بودند. سرعت جریان حلال ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر بود. ترکیبات فنلی عصاره ریشه‌های موین بر اساس زمان ماند و طیف UV استانداردهای معتبر در سه طول موج ۲۵۰، ۲۷۲ و ۳۱۰ نانومتر شناسایی و بر اساس منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد محاسبه شد (شکل ۱). تجزیه و تحلیل در سه تکرار انجام و مقدار ترکیبات شناسایی شده به صورت mg/g وزن خشک (DW) محاسبه و یادداشت شد.

آزمایش تحت تأثیر نوع سویه و نوع ریزنمونه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱



شکل ۱- منحنی‌های کالیراسیون محلول‌های استاندارد ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

واکنش متفاوتی بسته به برهمکنش خاص میزبان-پاتوژن نشان می‌دهند (Zhu et al., 2024). القا موفقیت‌آمیز ریشه موئین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوترنز در بسیاری از گونه‌های گیاهی جنس براسیکا از جمله *Brassica juncea* در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های هیپوکوتیل یا اپیکوتیل با سویه 9402 (Singh et al., 2006)، *B. oleracea* L. var. *italica* در نتیجه تلقیح ریزنمونه برگ با سویه A4 (Amer et al., 2024) و *B. rapa* L. ssp. *Pekinensis* با استفاده از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون با سویه R1000 (Lee et al., 2023) گزارش شده است.

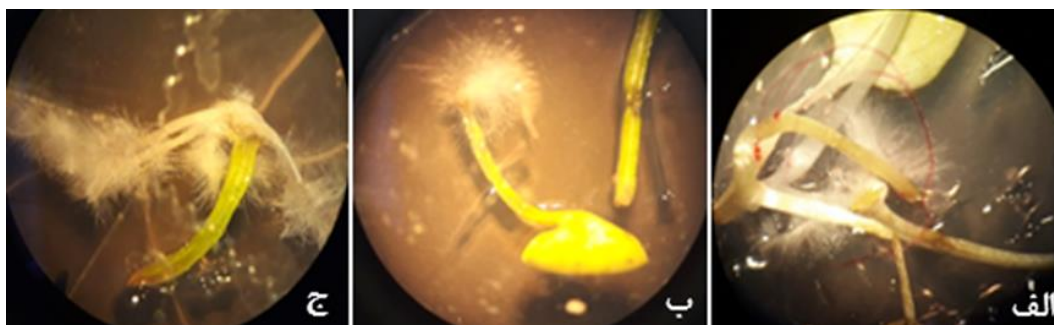
همسو با پژوهش حاضر، Chung و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کرده‌اند که در پی تلقیح ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و قطعات ریشه بدست‌آمده از دانه‌های درون‌شیشه‌ای شلغم با سویه KTCC 2703 آگروباکتریوم رایزوترنز، ریزنمونه برگ با درصد القا ریشه موئین ۸۹٪ در مقایسه با ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۱۱٪) و ریشه (۰٪) مناسب‌ترین ریزنمونه بود.

تأیید مولکولی ریشه‌های موئین: در تحقیق حاضر تراریختی با استفاده از دو سویه آگروپین A7 و ATCC 15834 و یک سویه میکموپین A13 آگروباکتریوم رایزوترنز انجام شد.

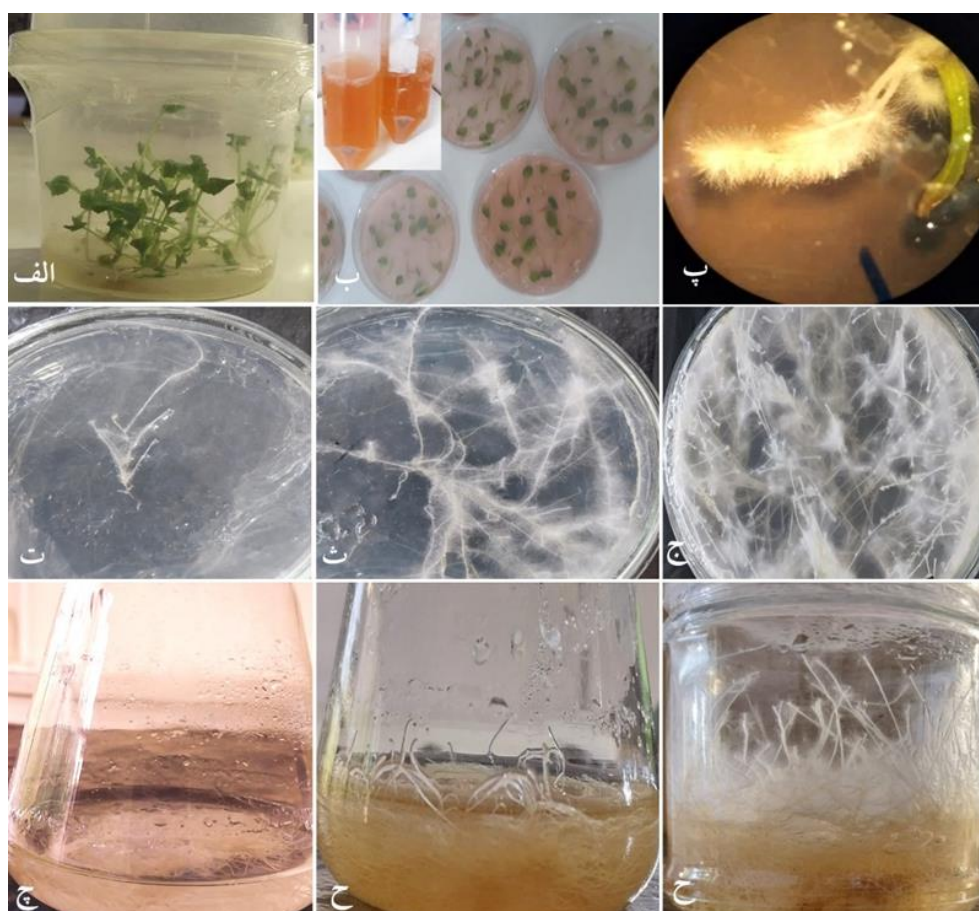
جهت آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (سطح احتمال ۱ و ۵ درصد) استفاده و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

تأثیر نوع سویه و ریزنمونه بر القا ریشه موئین: در نتیجه هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و گیاهچه بذری بدون ریشه با سویه‌های آگروباکتریوم رایزوترنز (A13، ATCC 15834 و A7)، بافت ریشه‌های موئین به صورت مستقیم (بدون تشکیل کالوس) در محل‌های زخم (شکل ۲)، در طی هفته دوم بعد از تلقیح شروع به القا نمود و تا حدود هفته چهارم ادامه یافت. ترتیب مراحل القا و استقرار ریشه موئین در شلغم در شکل ۳ نشان داده شده است. اگرچه القا ریشه موئین در هر سه نوع ریزنمونه نمایان بود اما با این حال صفت درصد القا ریشه موئین به طور معنی‌داری بسته به نوع ریزنمونه و نوع سویه باکتری متغیر بود. حداکثر درصد القا ریشه موئین (۳۷ درصد) در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه A13 آگروباکتریوم رایزوترنز بدست آمد (شکل ۴). گیاهان مختلف نسبت به گونه‌های آگروباکتریوم رایزوترنز



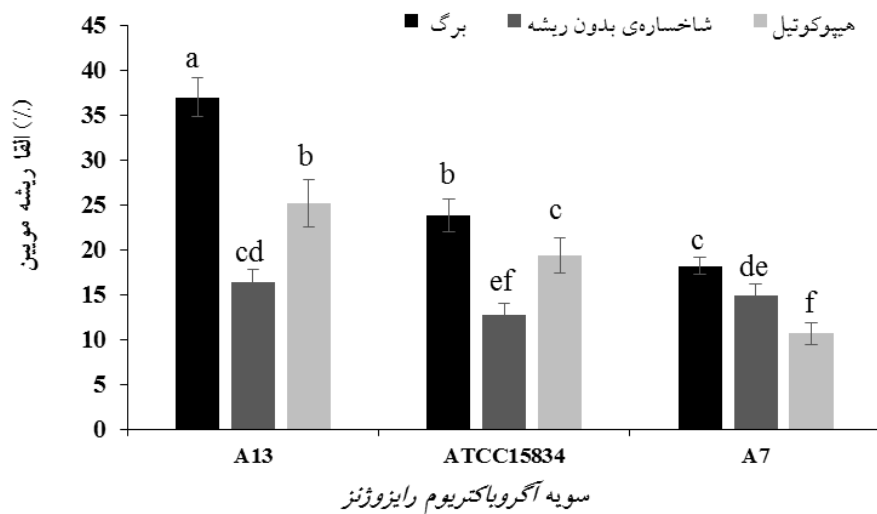
شکل ۲- القا ریشه موین در گیاه شلغم در ریز نمونه‌های به ترتیب الف- گیاهچه بذری بدون ریشه، ب- برگ و ج- هیپوکوتیل.



شکل ۳- مراحل تولید ریشه موین در شلغم. الف- تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به عنوان منبع تهیه ریزنمونه، ب- تهیه سوسپانسیون آگروباکتریوم رایزونوزنز، تلقیح و هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، پ- القا و ظهور ریشه‌های موین از محل آلودگی با باکتری، ت- لاین ریشه موین تراریخته مستقل انتقال یافته به محیط‌کشت جامد MS ½ و شروع به رشد پس از یک هفته، ث و ج- رشد پلاژیوتروپیک و تولید فراوان انشعابات جانبی ریشه‌های موین در محیط‌کشت جامد MS ½، به ترتیب پس از چهار و شش هفته، چ- استقرار لاین ریشه موین در محیط‌کشت مایع MS ½ و رشد سریع پس از یک هفته، ح و خ - رشد نمایی ریشه‌های موین در محیط‌کشت مایع MS ½ و تولید زیست‌توده فراوان به ترتیب پس از چهار و پنج هفته.

T-DNA پیوسته هستند (Veena and Taylor, 2007). اگرچه سازوکار مولکولی القا ریشه موین به درستی مشخص نشده

بر خلاف سویه‌های آگروپین که دارای دو بخش TL-DNA و TR-DNA مستقل هستند، سویه‌های میکروپین دارای

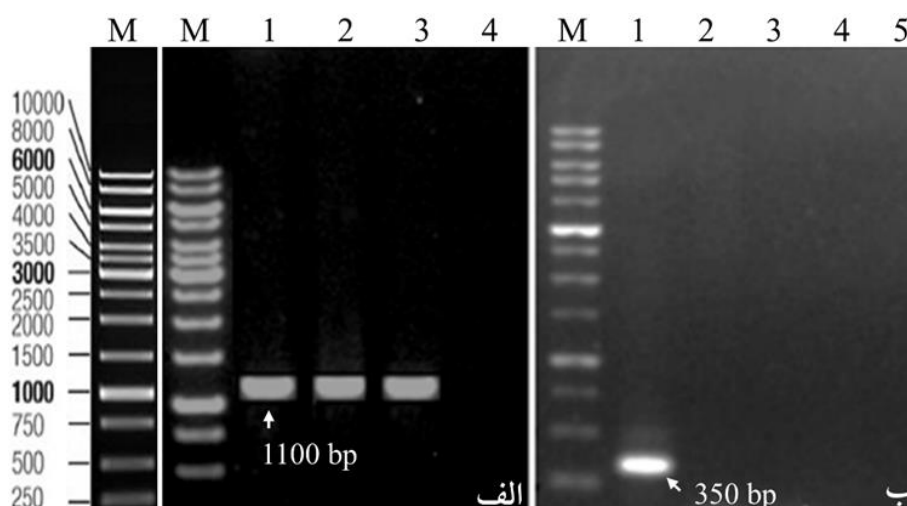


شکل ۴- تأثیر ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم رایزوزنز بر میزان القا ریشه در شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0.05$).

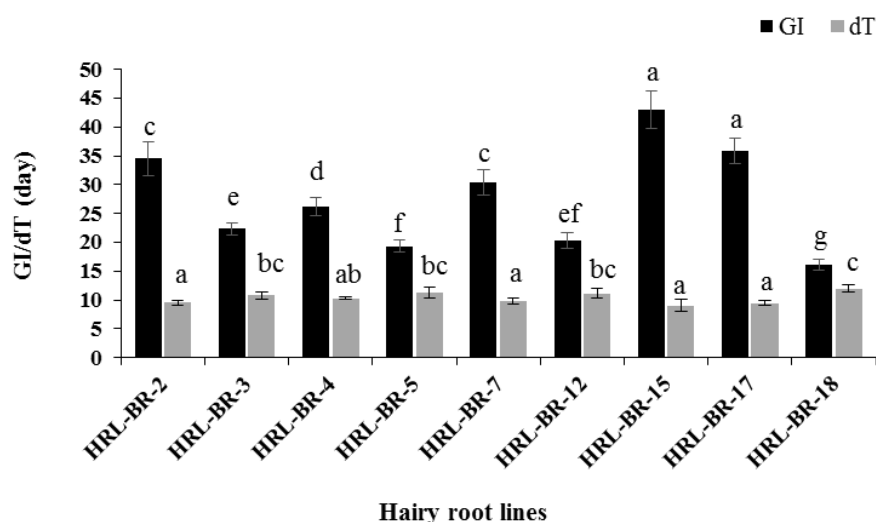
می‌توانند متابولیت‌های ثانویه را تولید و افزایش دهند (Zhong et al., 2024).

نرخ رشد در لاین‌های مختلف ریشه موئین: لاین‌های ریشه موئین القا شده در شلغم دارای رشد سریع با انشعابات بسیار بودند. بین لاین‌های به دست آمده از نظر میزان تولید زیست‌توده تر تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود داشت. بطور کلی لاین‌های حاصل از ترانسفورم با سویه A13 از رشد و نمو خوبی برخوردار بودند و زیست‌توده بالایی نسبت به لاین‌های حاصل از ترانسفورم با سویه‌های دیگر داشتند. با توجه به اینکه حداکثر نرخ رشد متعلق به لاین HRL-BR-15 حاصل تلقیح ریزنمونه برگ با سویه A13 بود (شکل ۶)؛ این لاین به عنوان لاین برتر ریشه موئین انتخاب شد. لاین‌های ریشه موئین القایی در یک گیاه ممکن است علی‌رغم داشتن خصوصیات مورفولوژیکی مشابه، قدرت رشد و پتانسیل بیوسنتزی متفاوتی داشته باشند که می‌تواند به تفاوت در نوع و سطح بیان ژن‌های *rol* مربوط باشد (Gai et al., 2015). پروتئین‌های حاصل از بیان ژن‌های *rol* در تشدید حساسیت سلول‌ها به اکسین و سیتوکینین و در نتیجه تقویت رشد و افزایش زیست‌توده ریشه موئین نقش اساسی دارند (Zheleznichenko et al., 2023).

است، اما آنچه ثابت شده این است که انتقال ژن‌های *rolA* و *rolB* و *rolC* که کلیدی‌ترین آنها ژن *rolB* است، نقش اساسی در القا سندروم ریشه موئین دارد (Georgiev et al., 2012). بنابراین یکی از مراحل ضروری در فرآیند القا ریشه موئین، اطمینان از حضور ژن‌های *rol* به ویژه *rolB* در لاین‌های احتمالی ریشه موئین تراریخته است. آنالیز PCR حاضر با استفاده از آغازگرهای *rolA-B* در ریشه‌های موئین احتمالی نشان از وجود باند تکثیری ۱۱۰۰ bp (مربوط به ژن‌های *rolA* و *rolB*) و کاملاً هم اندازه با قطعه تکثیری در نمونه کنترل مثبت (DNA پلاسمیدی آگروباکتریوم رایزوزنز) داشت در حالی‌که در نمونه کنترل منفی هیچ باند تکثیری مذکور مشاهده نگردید (شکل ۵). همچنین عدم وجود باند تکثیری مربوط به *virD2* (۳۵۰ bp) در ریشه‌های موئین حاکی از عاری بودن ریشه‌های موئین از هر گونه آلودگی باکتریایی، در نتیجه ادغام موفقیت‌آمیز T-DNA در ژنوم لاین‌های ریشه موئین و تأیید وضعیت تراریختی آنها بود (شکل ۵). ناحیه T-DNA در سویه‌های وحشی حاوی ژن‌هایی است که مسئول سنتز اکسین و سیتوکینین در ریشه‌ها و همچنین دارای ژن‌های رمزکننده تولید اوپاین‌ها (اسیدهای آمینه غیرمعمول) هستند. در نتیجه در مقایسه با گیاهان والد خود، ریشه موئین اغلب بهتر



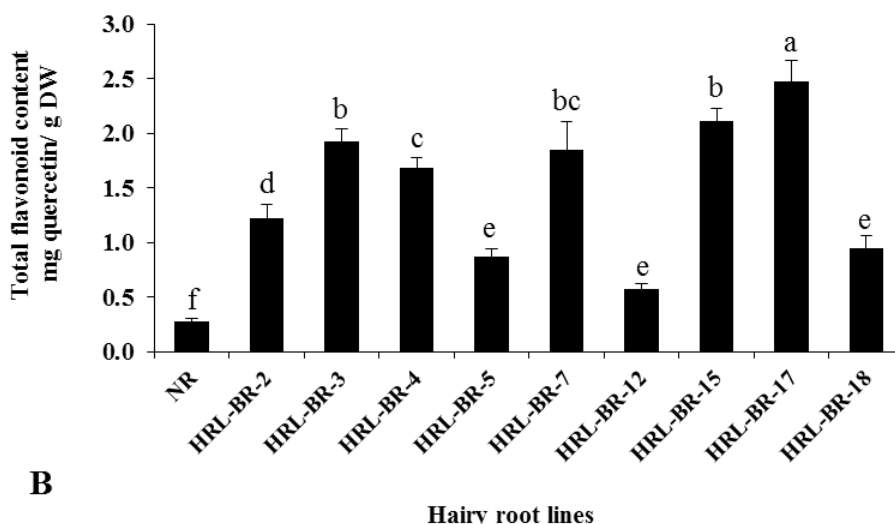
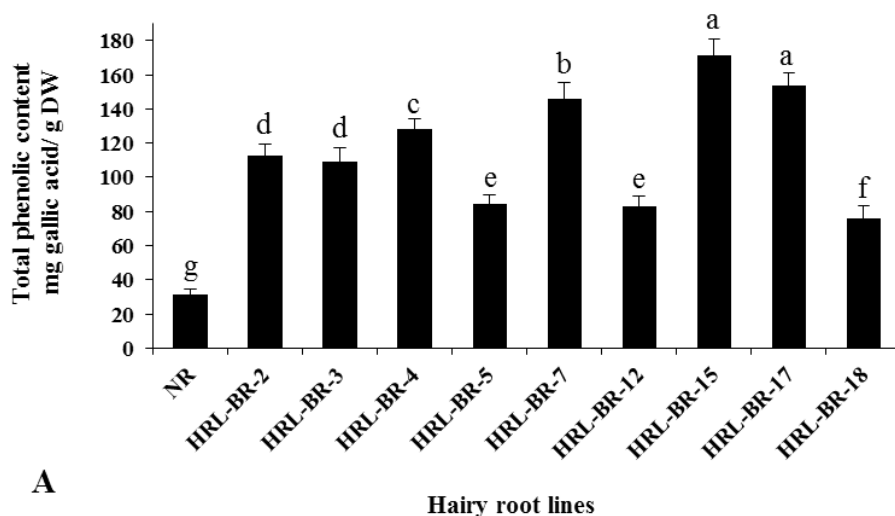
شکل ۵- الف) آنالیز PCR برای تکثیر همزمان ژن‌های *rolA* و *rolB* و ب) آنالیز PCR برای ژن *virD2* در لاین‌های ریشه موین تراریخته شلغم. M: مارکرهای 1 Kb DNA ladder، 1: پلاسمید Ri باکتری به عنوان کنترل مثبت، 2-3: ریشه‌های موین تراریخته، 4: ریشه طبیعی به عنوان کنترل منفی اول در (الف) و واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی دوم در (ب).



شکل ۶- شاخص رشد و زمان دو برابر شدن لاین‌های مختلف ریشه موین شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0.05$).

کشت‌های ریشه موین شلغم در مطالعه Chung و همکاران (۲۰۱۶) نیز سنتز مقادیر بالاتری از فنول و فلاونوئید کل را در مقایسه با ریشه نرمال از خود نشان داد. در سایر گونه‌های گیاهی نیز از جمله *Dracocephalum moldavica* و *Momordica charantia*، افزایش محتوای فنول و فلاونوئید کل در کشت‌های ریشه موین در مقایسه با ریشه نرمال گزارش شده است (Thiruvengadam et al., 2016;).

میزان فنول و فلاونوئید کل در لاین‌های مختلف ریشه موین: بر اساس نتایج بدست‌آمده میزان فنول و فلاونوئید کل در لاین‌های مختلف ریشه موین با یکدیگر متفاوت، اما بطور کلی بیشتر از ریشه‌های نرمال بود. حداکثر میزان فنول کل (۵/۵ برابر بیشتر از ریشه نرمال) در لاین HRL-BR-15 مشاهده شد. حداکثر میزان فلاونوئید کل مربوط به لاین HRL-BR-17 به میزان حدود ۹/۱ برابر بیشتر از ریشه نرمال بود (شکل ۷).

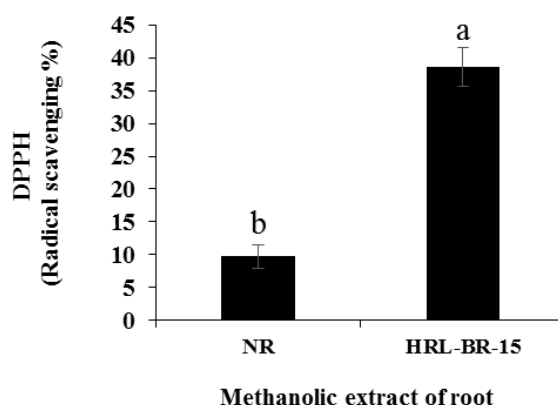


شکل ۷- میزان فنول کل (A) و فلاونوئید کل (B) در لاین‌های مختلف ریشه موئین شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0.05$).

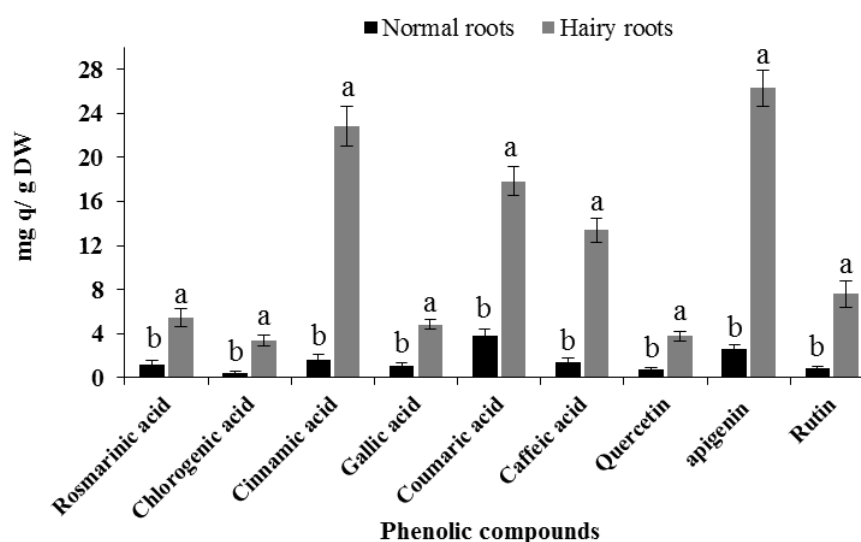
نتایج بدست آمده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس DPPH در لاین برتر ریشه موئین حدود چهار برابر بیشتر از ریشه نرمال بود. مبرهن است این افزایش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دلیل سنتز بالاتر ترکیبات مؤثره دارای خواص آنتی‌اکسیدانی در لاین برتر ریشه موئین در مقایسه با ریشه نرمال است (شکل ۸). از آنجایی که بسیاری از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند؛ افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در لاین برتر ریشه موئین می‌تواند با محتوای فنول و فلاونوئید کل، همبستگی داشته باشد (Paradiso et al., 2024). نتایج

(Weremczuk-Jezyna et al., 2013). با توجه به نتایج این تحقیق و با تکیه بر مطالعات پیشین می‌توان اظهار نمود، نرخ رشد بالا توأم با توان بالای بیوسنتز ترکیبات مؤثره مشابه و در بعضی موارد متفاوت از گیاه مادری (Zhou et al., 2011)، بزرگترین برتری کشت‌های ریشه موئین نسبت به سایر سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای به شمار می‌رود که محبوبیت و استفاده گسترده آن را افزایش داده است (Srivastava and Srivastava, 2007).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی لاین برتر ریشه موئین: با توجه به



شکل ۸- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در لاین برتر ریشه موین و ریشه نرمال. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0.05$).



شکل ۹- محتوای کمی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت‌های ریشه موین و ریشه نرمال شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($P \leq 0.05$).

باعث افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانی DPPH به میزان ۳۱٫۶-۵۰ درصد نسبت به ریشه‌های طبیعی شد (El-Esawi et al., 2017).

آنالیز HPLC ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: شناسایی و سنجش کمی شش اسید فنولی شامل اسید رزمارینیک، اسید کلروژنیک، اسید سینامیک، اسید گالیک، اسید کوماریک و اسید کافئیک و سه ترکیب فلاونوئیدی شامل کوئرستین، آپیزین و روتین در لاین برتر ریشه موین و ریشه نرمال از طریق آنالیز HPLC انجام گرفت (شکل ۹). بنا بر نتایج بدست آمده میزان

حاضر با مطالعات پیشین ریشه موین در سایر گونه‌های گیاهی *Dracocephalum moldavica* (Weremczuk-Jezyna et al., 2013)، *Momordica dioica* (Thiruvengadam et al., 2016)، *Solanum trilobatum* (Shilpha et al., 2015) و *anguria* (Yoon et al., 2015) همراه با افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز در مقایسه با ریشه‌های طبیعی به طور قابل توجهی افزایش یافت. در کشت ریشه موین *Lactuca serriola* افزایش سطح فنول‌ها و فلاونوئیدها،

از آگروباکتریوم رایزوزنز در شلغم، سنتز بالاتر ترکیبات مؤثره و در نتیجه افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی را سبب خواهد شد.

نتیجه‌گیری

نتایج کلی پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از سویه A13 آگروباکتریوم رایزوزنز و ریزنمونه برگ جهت القا و تولید ریشه موئین در شلغم کارایی مناسبی را به همراه خواهد داشت. لاین‌های ریشه موئین شلغم صرف نظر از نوع سویه و ریزنمونه کاربردی، از قدرت رشد و ظرفیت بیوسنتزی ثانویه بالاتری در مقایسه با ریشه‌های نرمال برخوردار بودند. از این رو با انتخاب لاین برتر ریشه موئین، می‌توان بازده سنتز متابولیت‌های ثانویه تا حد امکان تقویت نمود و با انجام مطالعات بیشتر امکان استفاده در سطح تجاری را نیز مقدور نمود.

هر نه ترکیب مورد بررسی در لاین برتر ریشه موئین در مقایسه با ریشه نرمال به طور معنی‌داری بالاتر بود و این نتایج دور از انتظار نبود (شکل ۹). در طی فرآیند تراریختی ریشه موئین، تحریک و افزایش در سطح بیان ژن‌های بیوسنتزی فنول-فلاونوئید، افزایش سنتز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را به همراه خواهد داشت (Chung et al., 2016). مشابه با نتایج حاضر، در کشت‌های ریشه موئین *Fagopyrum tataricum* سنتز مقادیر بالاتری از کاتشین، روتین، کوئرستین، و اسیدهای فنولی کافئیک، کلروژنیک، فرولیک و گالیک در مقایسه با ریشه‌های طبیعی مشاهده شد (Kim et al., 2009). مقادیر بالای سنتز ترکیبات روتین، کوئرستین، کامفرول، اسید گالیک، اسید پروتوکاتچوئیک، اسید فرولیک، اسید رنگوژنیک و اسید کافئیک در کشت ریشه موئین گوجه‌فرنگی نیز گزارش شده است (Singh et al., 2014). با توجه به نتایج اخیر با اطمینان می‌توان چنین نتیجه گرفت که تراریختی ریشه موئین با استفاده

منابع

- Abdel-Razzak, H. S. (2021). Turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.) breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops: Volume 8: Bulbs, Roots and Tubers*, 345-405. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-66965-2_9
- Amani, S., Mohebodini, M., Khademvatan, S., Jafari, M., & Kumar, V. (2021). *Piriformospora indica* based elicitation for overproduction of phenolic compounds by hairy root cultures of *Ficus carica*. *Journal of Biotechnology*, 327, 43-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.015
- Amer, M. A., Mohamed, T. R., Rahman, R. A. A., Shalaby, M. A., & Badr, A. (2024). Improvement of sulforaphane production in hairy root cultures of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by eliciting Myrosinase gene expression and its effect on breast cancer cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 158(1), 12. doi:https://doi.org/10.1007/s11240-024-02802-9
- Boccia, E., Alfieri, M., Belvedere, R., Santoro, V., Colella, M., Del Gaudio, P., & Leone, A. (2022). Plant hairy roots for the production of extracellular vesicles with antitumor bioactivity. *Communications Biology*, 5(1), 848. doi:https://doi.org/10.1038/s42003-022-03781-3
- Chandra, S., & Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, 10, 371-395. doi:https://doi.org/10.1007/s11101-011-9210-8
- Chang, C. C., Yang, H. M., & Wen, J. C. (2023). Chern, estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748
- Chung, I. M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2016). Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *3 Biotech*, 6, 1-16. doi:https://doi.org/10.1007/s13205-016-0492-9
- Chiou, A., Karathanos, V. T., Mylona, A., Salta, F. N., Preventi, F., Andrikopoulos, N., & K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 102, 516-522. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.009
- Dejanovic, G. M., Asllanaj, E., Gamba, M., Raguindin, P. F., Itodo, O. A., Minder, B., & Glisic, M. (2021). Phytochemical characterization of turnip greens (*Brassica rapa* ssp. *rapa*): A systematic review. *PLoS ONE*, 16(2), e0247032. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247032
- Ekouna, J. P. E., Boitel-Conti, M., Lerouge, P., Bardor, M., & Guerineau, F. (2017). Enhanced production of recombinant human gastric lipase in turnip hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131, 601-610. https://doi.org/10.1007/s11240-017-1309-1

- El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), 5604746. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/5604746>
- Fernandes, F., Valentao, P., Sousa, C., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2007). Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). *Food Chemistry*, 105(3), 1003-1010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.063>
- Gai, Q. Y., Jiao, J., Luo, M., Wang, W., Ma, W., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2015). Establishment of high-productive *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures: A promising approach for efficient production of bioactive alkaloids. *Biochemical Engineering Journal*, 95, 37-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.006>
- Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Muller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: From plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 528-537. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001>
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1175-1185. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>
- Gutierrez-Valdes, N., Hakkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in Plant Science*, 11, 33. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
- Hirai, M., & Matsumoto, S. (2007). *Brassica rapa*. In: Vegetables. (ed. Kole, C.) Pp. 185-190. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-34536-7_5
- Hute, Y., Ekouna, J. P. E., Caron, A., Mezreb, K., Boitel-Conti, M., & Guérineau, F. (2014). Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots. *Biotechnology Letters*, 36, 181-90. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1335-y>
- Khan, S., Qureshi, M. I., Kamaluddin, A. T., & Abdin, M. Z. (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(3), 175-178. <https://doi.org/10.5897/AJB06.612>
- Kim, Y. K., Li, X., Xu, H., Park, N., Uddin, M. R., Pyon, J. Y., & Park, S. U. (2009). Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12, 53-57. doi: <https://doi.org/10.1007/s12892-009-0075-y>
- Kiyokawa, S., Kikuchi, Y., Kamada, H., & Harada, H. (1992). Detection of *rol* genes of Ri plasmids by PCR method and its application to confirmation of transformation. *Plant Tissue Culture Letters*, 9(2), 94-98. doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology1984.9.94>
- Lee, S. Y., Kwon, H., Kim, J. K., Park, C. H., Sathasivam, R., & Park, S. U. (2023). Comparative analysis of glucosinolate and phenolic compounds in green and red kimchi cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) hairy roots after exposure to light and dark conditions. *Horticulturae*, 9(4), 466. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040466>
- Mirmazloun, I., Slavov, A. K., & Marchev, A. S. (2024). The untapped potential of hairy root cultures and their multiple applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12682. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms252312682>
- Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L., & Medina-Bolivar, F. (2014) Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 50-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.035>
- Padilla, G., Cartea, M. E., Velasco, P., de Haro, A., & Ordas, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 68(4), 536-545. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.017>
- Paradiso, A., Durante, M., Caretto, S., & De Paolis, A. (2024). Establishment of *Dittrichia viscosa* L. hairy roots and improvement of bioactive compound production. *Plants*, 13(22), 3236. doi: <https://doi.org/10.3390/plants13223236>
- Serrano, C., Oliveira, M. C., Lopes, V., Soares, A., Molina, A. K., Paschoalinotto, B. H., & Barata, A. M. (2024). Chemical profile and biological activities of *Brassica rapa* and *Brassica napus* Ex Situ collection from Portugal. *Foods*, 13(8), 1164. doi: <https://doi.org/10.3390/foods13081164>
- Shilpha, J., Satish, L., Kavikkul, M., Largia, M. J. V., & Ramesh, M. (2015). Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti-oxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L. *Industrial Crops and Products*, 71, 54-64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.083>
- Singh, H., Dixit, S., Verma, P. C., & Singh, P. K. (2014). Evaluation of total phenolic compounds and insecticidal and antioxidant activities of tomato hairy root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2588-2594. doi: <https://doi.org/10.1021/jf405695y>
- Singh, S., Melo, J., Eapen, S., & D'souza, S. (2006). Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: Role of inherent peroxidase and H₂O₂. *Journal of Biotechnology*, 123(1), 43-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.023>

- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 29-43. doi:https://doi.org/10.1080/07388550601173918
- Stepanova, A. Y., Malunova, M. V., Gladkov, E. A., Evsyukov, S. V., Tereshonok, D. V., & Solov'eva, A. I. (2022). Collection of hairy roots as a basis for fundamental and applied research. *Molecules*, 27(22), 8040. doi:https://doi.org/10.3390/molecules27228040
- Tan, B. S., Yabuki, J., Matsumoto, S., Kageyama, K., & Fukui, H. (2003). PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 69, 258-266. doi:https://doi.org/10.1007/s10327-003-0044-0
- Tanaka, N., Hayakawa, M., Mano, Y., Ohkawa, H., & Matsui, C. (1985). Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 4, 74-77. doi: https://doi.org/10.1007/BF00269210
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., & Chung, I. M. (2016). Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. *Scientia Horticulturae*, 198, 132-141. doi:https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.035
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403. doi:https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8
- Weremczuk-Jezyna, I., Grzegorzczak-Karolak, I., Frydrych, B., Krolicka, A., & Wysokinska, H. (2013). Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: Rosmarinic acid content and antioxidant potential. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2095-2103. doi:https://doi.org/10.1007/s11738-013-1244-7
- Yoon, J. Y., Chung, I. M., & Thiruvengadam, M. (2015). Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities from transgenic hairy root cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *South African Journal of Botany*, 100, 80-86. doi:https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.05.008
- Zhang, N., Zhao, J., Lens, F., de Visser, J., Menamo, T., Fang, W., & Lin, K. (2014). Morphology, carbohydrate composition and vernalization response in a genetically diverse collection of Asian and European turnips (*Brassica rapa* subsp. *rapa*). *PLoS ONE*, 9(12), e114241. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114241
- Zheleznichenko, T., Voronkova, M., Asbaganov, S., Kukushkina, T., Filippova, E., Protsenko, M., & Novikova, T. (2023). Impact of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on secondary metabolites accumulation in *Nitraria schoberi* L. hairy roots and antiviral activity of their extracts against influenza virus of subtypes A (H5N1) and A (H3N2). In *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 59(3), 378-392. doi:https://doi.org/10.1007/s11627-023-10343-7
- Zhong, Y. J., Wu, S. F., Zhang, L., Yin, Z. P., Xie, Y. H., & Chen, J. G. (2024). In vitro strategy to enhance the production of bioactive polyphenols and caffeoylputrescine in the hairy roots of *Physalis peruviana* L. *Scientific Reports*, 14(1), 27600. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-024-77698-8
- Zhou, M. L., Zhu, X. M., Shao, J. R., Tang, Y. X., & Wu, Y. M. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1229-1239. doi:https://doi.org/10.1007/s00253-011-3228-0
- Zhu, Y., Zhu, X., Wen, Y., Wang, L., Wang, Y., Liao, C., & Li, B. (2024). Plant hairy roots: Induction, applications, limitations and prospects. *Industrial Crops and Products*, 219, 119104. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119104

Optimization of hairy root induction and evaluation of phenolic compound production in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*)

Farideh Babaloo¹, Rashid Jamei¹, Morad Jafari^{2*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

² Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2024/12/22, Accepted: 2025/02/04)

Abstract

The hairy root culture system has been endorsed as an excellent approach for the in vitro production of pharmaceutically important plant metabolites. This study was conducted in the Urmia University plant cell and tissue culture laboratory to optimize turnip hairy root cultures and assess the content of their phenolic compounds. To induce hairy roots, hypocotyl, cotyledon, and leaf explants from in vitro turnip seedlings were inoculated with three strains of *Agrobacterium rhizogenes*, including A7, A13, and ATCC 15834. Molecular confirmation of hairy roots was performed through polymerase chain reaction (PCR) analysis using *rolA-B* specific primers. Finally, the production of phenolic and antioxidant compounds in hairy root cultures was examined and compared with normal roots. Based on the results, the percentage of hair root induction was significantly affected by the type of bacterial strain and the type of explant. The maximum hairy root induction rate (37%) was obtained by inoculating leaf explants with *A. rhizogenes* strain A13. Significant differences were observed between hairy root lines regarding growth and biomass production. In hairy root lines, the biosynthesis rate of six types of phenolic acids (rosmarinic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, gallic acid, coumaric acid, and caffeic acid) and three types of flavonoids (quercetin, apigenin, and rutin) in HPLC analysis, and in general, the total phenol-flavonoid content and antioxidant activity, were significantly higher, compared to normal roots. According to the results, turnip hairy root culture can be considered an efficient system for the biosynthesis of secondary metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Antioxidant activity, Flavonoids, *In vitro* culture, Secondary metabolite production

Corresponding author, Email: m.jafari@urmia.ac.ir