مقاله پژوهشی

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

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

مقدمه

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 (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-

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

Razzak, 2021; Chung *et al.*, 2016; Dejanovic *et al.*, 2021). شلغم دارای اندام ذخیره‌ای ریشه در اندازه‌ها و اشکال مختلف از کروی تا مثلثی، 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، ضدمیکروبی، 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 سنتی گیاهان در مزارع و باغات معایب مختلفی از جمله عملکرد کم، چرخه رشد کند و نوسانات کمّی 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 سنتی و دستیابی به محصولاتی با محتوای بیوشیمیایی غنی‌تر بسیار مؤثر باشد. یکی از این تکنیک‌ها، فناوری کشت درون شیشه‌ای (*In vitro*) ریشه مویین 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 مویین به عنوان علایم ناشی از تهاجم پاتوژن 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 عنوان عامل القاکننده سندرم ریشه مویین در گیاهان شناخته شد (Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020; Stepanova *et al.*, 2022). ریشه‌های مویین از محل زخم‌های آلوده به اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه منشأ می‌گیرند (Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020). در طی مکانیسم عفونت و تراریختی، قطعات خاصی از DNA باکتری (T-DNA) از پلاسمید مولد ریشه آن (پلاسمید Ri) به ژنوم گیاه منتقل و به طور تصادفی در آن ادغام می‌شود و پس از بیان، تمایز ریشه‌های مویین 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 رایزوژنز، 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 *rol* (*rol*A، *rol*B، و *rol*C) برای القا ریشه مویین ضروری است (Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020). از آنجایی که غیرفعال شدن ژن *rol*B باعث ایجاد اختلال در فرایند القا ریشه مویین در گیاه میزبان می‌شود، به نظر می‌رسد که مرتبط‌ترین ژن *rol* برای القا ریشه مویین، *rol*B باشد (Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020; Mirmazloum *et al.*, 2024). کشت‌های ریشه مویین 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).

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

و همکاران (۱۹۸۵) با استفاده از یک سویه اگروباکتریوم رایزوژنز (A4) در ریزنمونه دیسک ریشه غده‌ای گزارش شد. در مطالعات دیگر القای ریشه‌های مویین 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 مویین حاصل از شغلم به عنوان یک سامانه جدید برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی در مقایسه با ریشه مویین 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 مویین با نظر درگرفتن فاکتورهای مؤثر مانند نوع ریزنمونه و سویه آگروباکتری و همچنین گزینش لاین‌های برتر ریشه مویین از نظر خصوصیات رشدی و محتوی متابولیت ثانویه در شلغم در دسترس است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی امکان القا ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف برگرفته از شلغم (برگ، ساقه، هیپوکوتیل، گیاهچه بذری بدون ریشه) توسط سه سویه مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز شامل A13، ATCC 15834 و A7 و مقایسه پروفایل ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین در مقایسه با ریشه طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور مورد نیاز گیاه شلغم از شرکت پاکان بذر 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 آب‌مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه، غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۲ ٪ به مدت ۱۰ دقیقه، در نهایت شستشو و آبکشی با آب‌مقطر سترون به مدت ۱۵ دقیقه. بذرهای سترون‌شده در شیشه‌های کشت محتوی محیط آب-آگار (۸ گرم در لیتر) کشت شدند و در اتاق رشد با شرایط دمایی ۲ ± ۲۴ °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 برگ، هیپوکوتیل و گیاهچه بذری بدون ریشه (ریشه برش یافته) جهت القا ریشه مویین تهیه گردید.

سویه باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها برای القا ریشه مویین: برای القای ریشه مویین در شلغم به روش Amani و همکاران (۲۰۲۱) عمل شد. به منظور آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی جهت تلقیح، یک تک کلونی از کشت جامد (محیط‌کشت LB محتوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین) هر یک از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (A13، ATCC 15834 و A7) انتخاب و به ۳۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت LB مایع محتوی ریفامپسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردید. کشت‌ها تا زمان رسیدن به غلظت بهینه (OD_{600} = ۰/۵-۰/۸) بر روی شیکر انکوباتور (۲۰۰ rpm) با دمای ۲۸ °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 محیط‌کشت MS ½ 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 تلقیح‌شده پس از قرار گرفتن بر روی کاغذ صافی سترون جهت حذف باکتری‌های اضافی، به محیط هم‌کشتی (MS ½ بدون تنظیم‌کننده رشدی) منتقل شده و به مدت چهار روز در اتاقک رشد با شرایط تاریکی و دمای ۲۴ °C نگهداری شدند. پس از اتمام دوره هم‌کشتی، جهت نمایان شدن ریشه‌های مویین، ریزنمونه‌ها پس از شستشو با استفاده از محلول حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، بر روی محیط‌کشت جامد MS ½ 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 سوپانسیون باکتری در محیط‌کشت MS ½ فاقد باکتری غوطه‌ور شدند. به منظور ثبت دقیق مشاهدات القا ریشه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

مویین، بررسی کشت‌ها به صورت روزانه انجام گرفت. هر تک ریشه مویین القایی، پس از نام‌گذاری به عنوان یک لاین، جهت رشد بیشتر به محیط‌کشت جامد تازه MS ½ حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز اما با غلظت سفوتاکسیم کمتر منتقل شد. در نهایت لاین‌های ریشه مویین در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS ½ 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 ۱۲۰ rpm و تاریکی نگهداری شدند.

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین: DNA ژنومی ریشه‌های مویین 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 رایزوژنز هم به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین 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 مویین 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 مویین: پس از استقرار و تأیید مولکولی ریشه‌های مویین، 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 ½ (۳۰ گرم در لیتر ساکارز) منتقل شدند. کشت‌ها به مدت هفت هفته بر روی شیکر انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ ± ۲ °C قرار گرفتند. جهت مقایسه لاین‌ها و انتخاب بهترین لاین ریشه مویین، وزن تر (FW) (پس از آبگیری 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 ۶۰ °C) لاین‌ها به مدت هر هفته یکبار، اندازه گرفته شد. زمان دو برابرشدن (Doubling time; T_d) و شاخص رشد (Growth index; GI) با فرمول‌های زیر محاسبه شد (Nopo-Olazabal *et al.*, 2014):

$$\mu = \frac{ln\frac{DWi}{DW0}}{Dt}$$

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

$$T_d = \frac{ln(2)}{\mu} \qquad GI = \frac{(DWi - DW0)}{DW0}$$

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

تهیه عصاره متانولی جهت ارزیابی‌های بیوشیمیایی و فیتوشیمیایی ریشه‌های مویین: تهیه عصاره متانولی بر اساس روش Amani و همکاران (۲۰۲۱) با اندکی تغییر انجام گرفت. در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت خشک ریشه مویین پودرشده با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همونایز گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای ۳۰ °C قرار گرفت تا بافت ریشه مویین به طور کامل متلاشی گردد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C 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 مویین، ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی ریشه‌های مویین 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 آب‌مقطر اضافه شد. سپس لوله‌های شیشه‌ای به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگه‌داری شد. میزان جذب در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Dynamica (HALODB-20) خوانده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

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

ژن	آغازگر	توالی	منبع
rolA-B	F	5'-CTGTACCTCTACGTCGACT-3'	(Kiyokawa *et al.*, 1992)
	R	5'-TCAGTCGAGTGGGCTCCTTG-3'	
virD2	F	5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3'	(Tan *et al.*, 2003)
	R	5'- CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA-3'	

شد. مقدار جذب بدست آمده (Y) در معادله حاصل از کالیبراسیون (Y=0.0144X+0.2303) جایگذاری، و مقدار فنول کل (X) بر حسب میلی‌گرم 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 مویین، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت 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 طول‌موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از توسط کوئرستین و با استفاده از معادله حاصل از کالیبراسیون (Y=0.0094X+0.8712) میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم کوئرستین 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 مویین، 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 طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شده و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید(Chiou *et al*., 2007).

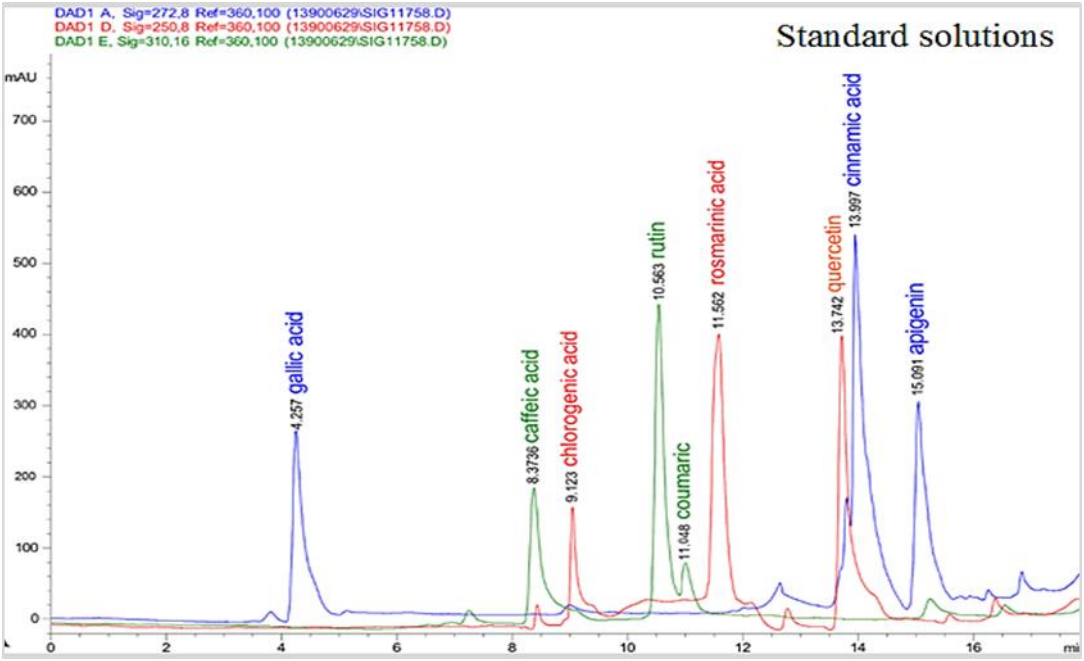
$$DPPH\ (\%) = [(AC-AS)/AC] \times 100$$

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 مویین پودرشده 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، آپیژنین 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 حلالی و آشکارساز آرایه دیودی صورت گرفت. جداسازی بر روی ستون اکتا دسیل 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 آب‌مقطر (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 مویین بر اساس زمان ماند و طیف UV استانداردهای معتبر در سه طول‌موج 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 شناسایی‌شده 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]



شکل ۱- منحنی‌های کالیبراسیون محلول‌های استاندارد ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

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.

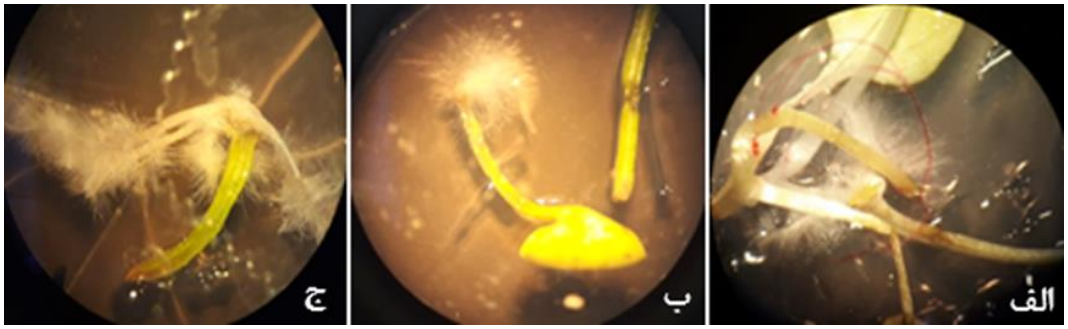
نتایج و بحث

تأثیر نوع سویه و ریزنمونه بر القا ریشه مویین: در نتیجه هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و گیاهچه بذری بدون ریشه با سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز (A13، ATCC 15834 و A7)، بافت ریشه‌های مویین 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 مویین در شلغم در شکل ۳ نشان داده شده است. اگرچه القا ریشه مویین در هر سه نوع ریزنمونه نمایان بود اما با این حال صفت درصد القا ریشه مویین به طور معنی‌داری بسته به نوع ریزنمونه و نوع سویه باکتری متغیر بود. حداکثر درصد القا ریشه مویین (۳۷ درصد) در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه A13 اگروباکتریوم رایزوژنز بدست آمد (شکل ۴). گیاهان مختلف نسبت به گونه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز واکنش متفاوتی بسته به برهمکنش خاص میزبان-پاتوژن نشان می‌دهند (Zhu *et al.*, 2024). القا موفقیت‌آمیز ریشه مویین با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز 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.

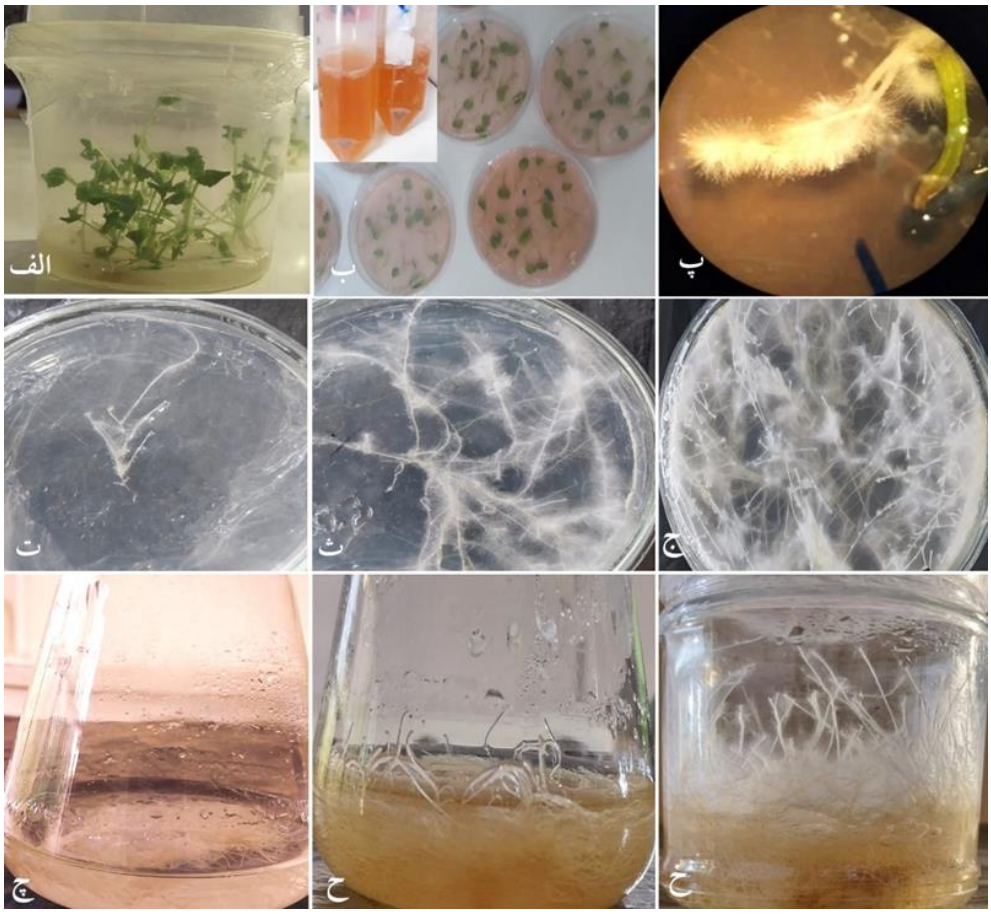
همسو با پژوهش حاضر، Chung و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کرده‌اند که در پی تلقیح ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و قطعات ریشه بدست‌آمده از دانهال‌های درون‌شیشه‌ای شلغم با سویه KTCC 2703 اگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه برگ با درصد القا ریشه مویین ۸۹٪ در مقایسه با ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۱۱٪) و ریشه (۰٪) مناسب‌ترین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

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین: در تحقیق حاضر تراریختی با استفاده از دو سویه اگروپین A7 و ATCC 15834 و یک سویه میکیموپین A13 اگروباکتریوم رایزوژنز انجام شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]



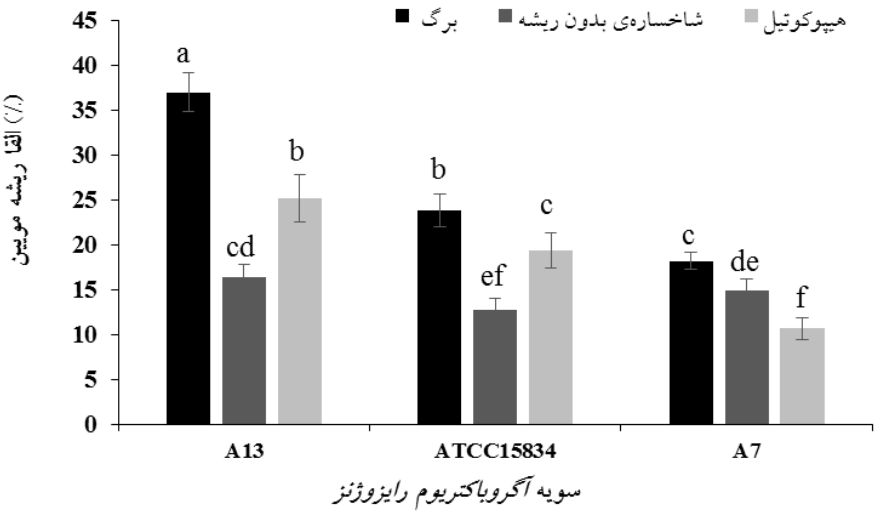
شکل ۲- القا ریشه مویین در گیاه شلغم در ریز نمونه‌های به ترتیب الف- گیاهچه بذری بدون ریشه، ب- برگ و ج- هیپوکوتیل.



شکل ۳- مراحل تولید ریشه مویین در شلغم. الف- تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به عنوان منبع تهیه ریزنمونه، ب- تهیه سوسپانسیون آگروباکتریوم رایزونژنز، تلقیح و هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، پ- القا و ظهور ریشه‌های مویین از محل آلودگی با باکتری، ت- لاین ریشه مویین 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 مویین در محیط‌کشت جامد MS ½، به ترتیب پس از چهار و شش هفته، چ- استقرار لاین ریشه مویین در محیط‌کشت مایع MS ½ و رشد سریع پس از یک هفته، ح و خ – رشد نمایی ریشه‌های مویین در محیط‌کشت مایع MS ½ و تولید زیست‌توده فراوان به ترتیب پس از چهار و پنج هفته.

بر خلاف سویه‌های اگروپین که دارای دو بخش TL-DNA و TR-DNA مستقل هستند، سویه‌های میکیموپین دارای T-DNA پیوسته هستند (Veena and Taylor, 2007). اگرچه سازوکار مولکولی القا ریشه مویین به درستی مشخص نشده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

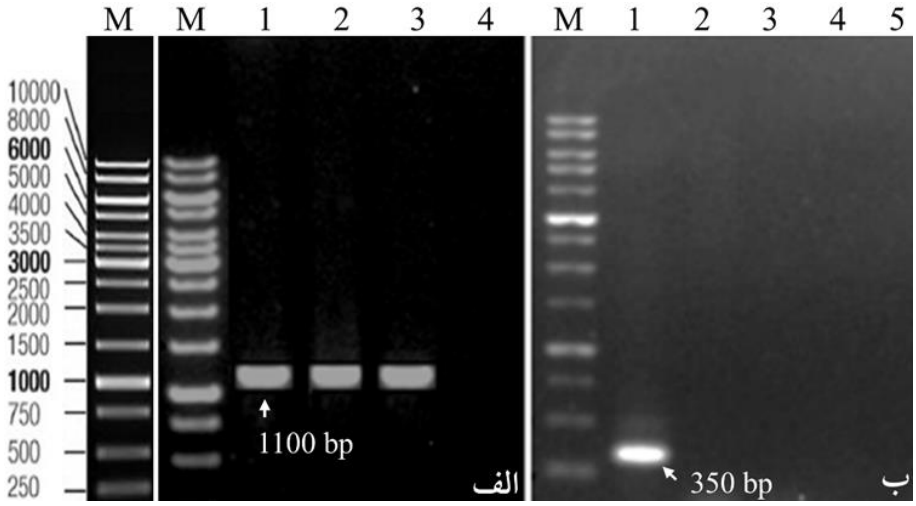


شکل ۴- تأثیر ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم رایزوژنز بر میزان القا ریشه در شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P ≤ ۰/۰۵).

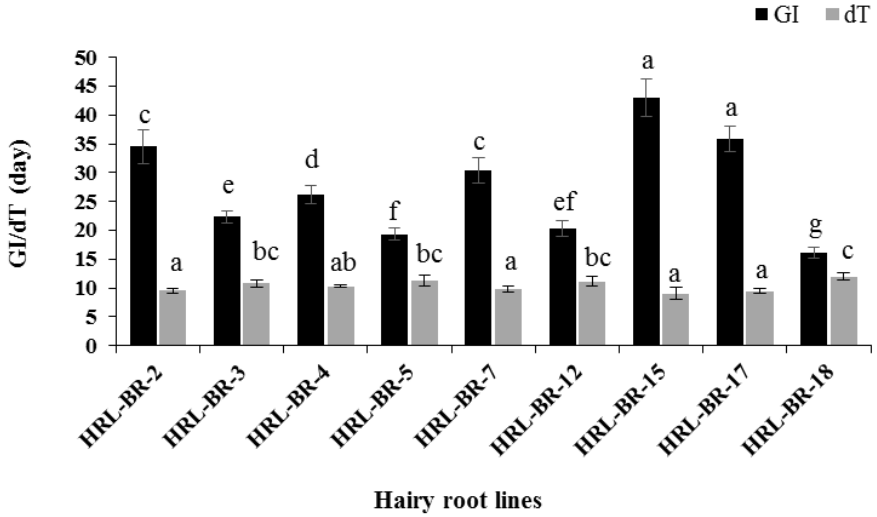
است، اما آنچه ثابت شده این است که انتقال ژن‌های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* که کلیدی‌ترین آنها ژن *rolB* است، نقش اساسی در القا سندروم ریشه مویین دارد (Georgiev *et al.*, 2012). بنابراین یکی از مراحل ضروری در فرآیند القا ریشه مویین، اطمینان از حضور ژن‌های *rol* به ویژه *rolB* در لاین‌های احتمالی ریشه مویین تراریخته است. آنالیز PCR حاضر با استفاده از آغازگرهای *rolA-B* در ریشه‌های مویین 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 اگروباکتریوم رایزوژنز) 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 مویین حاکی از عاری‌بودن ریشه‌های مویین از هر گونه آلودگی باکتریایی، در نتیجه ادغام موفقیت‌آمیز T-DNA در ژنوم لاین‌های ریشه مویین 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 مویین اغلب بهتر می‌توانند متابولیت‌های ثانویه را تولید و افزایش دهند (Zhong *et al.*, 2024).

نرخ رشد در لاین‌های مختلف ریشه مویین: لاین‌های ریشه مویین القاشده در شلغم دارای رشد سریع با انشعابات بسیار بودند. بین لاین‌های به دست آمده از نظر میزان تولید زیست‌توده تر تفاوت معنی‌داری (P ≤ ۰/۰۵) 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 مویین انتخاب شد. لاین‌های ریشه مویین 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 مویین نقش اساسی دارند (Zheleznichenko *et al.*, 2023).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]



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

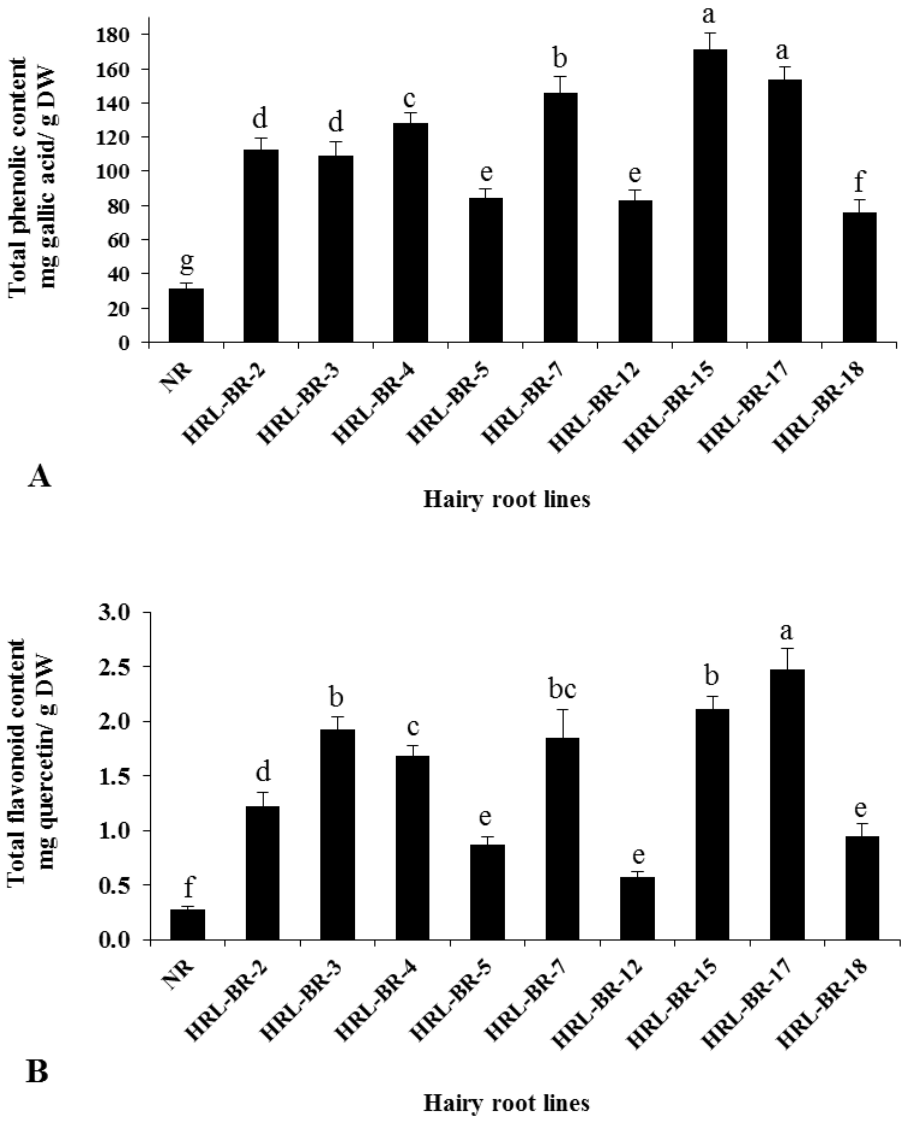


شکل ۶- شاخص رشد و زمان دو برابر شدن لاین‌های مختلف ریشه مویین شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P ≤ ۰/۰۵).

میزان فنول و فلاونوئید کل در لاین‌های مختلف ریشه مویین: بر اساس نتایج بدست‌آمده میزان فنول و فلاونوئید کل در لاین‌های مختلف ریشه مویین 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).

کشت‌های ریشه مویین 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 مویین در مقایسه با ریشه نرمال گزارش شده است (Thiruvengadam *et al.*, 2016;

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

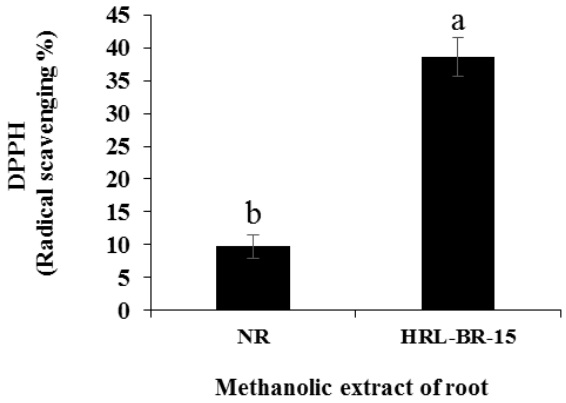


شکل ۷- میزان فنول کل (A) و فلاونوئید کل (B) در لاین‌های مختلف ریشه مویین شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P ≤ ۰/۰۵).

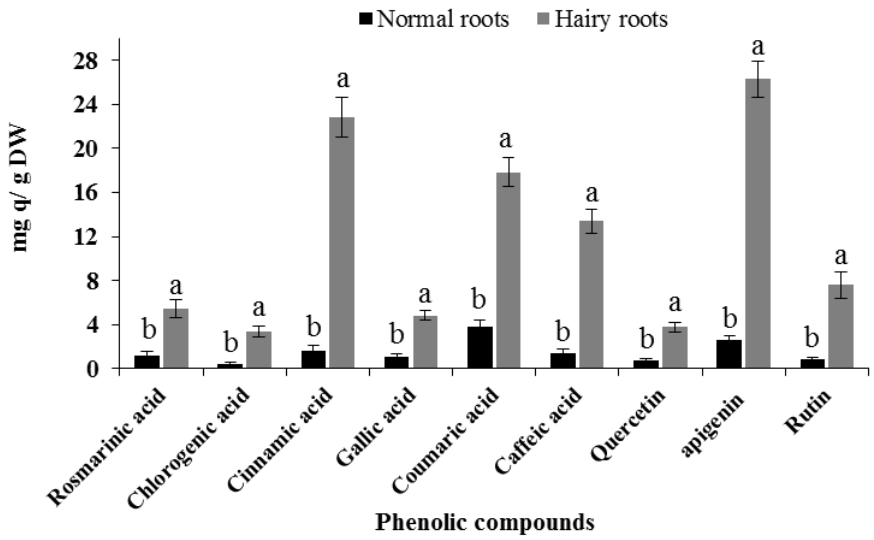
Weremczuk-Jezyna *et al.*, 2013). با توجه به نتایج این تحقیق و با تکیه بر مطالعات پیشین می‌توان اظهار نمود، نرخ رشد بالا توأم با توان بالای بیوسنتز ترکیبات مؤثره مشابه و در بعضی موارد متفاوت از گیاه مادری (Zhou *et al.*, 2011)، بزرگترین برتری کشت‌های ریشه مویین نسبت به سایر سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای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

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی لاین برتر ریشه مویین: با توجه به نتایج بدست آمده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس DPPH در لاین برتر ریشه مویین 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 مویین 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 مویین می‌تواند با محتوای فنول و فلاونوئید کل، همبستگی داشته باشد (Paradiso *et al.*, 2024). نتایج

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]



شکل ۸- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در لاین برتر ریشه مویین و ریشه نرمال. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P ≤ ۰/۰۵).



شکل ۹- محتوای کمّی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت‌های ریشه مویین و ریشه نرمال شلغم. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P ≤ ۰/۰۵).

حاضر با مطالعات پیشین ریشه مویین در سایر گونه‌های گیاهی مطابقت دارد. در کشت‌های ریشه مویین *Dracocephalum moldavica* (Weremczuk-Jezyna *et al.*, 2013)، *Momordica dioica* (Thiruvengadam *et al.*, 2016)، *Solanum trilobatum* (Shilpha *et al.*, 2015) و *Cucumis 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 مویین *Lactuca serriola* افزایش سطح فنول‌ها و فلاونوئیدها، باعث افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانی DPPH به میزان ۵۰-۳۱,۶ 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، آپیژنین و روتین در لاین برتر ریشه مویین و ریشه نرمال از طریق آنالیز HPLC انجام گرفت (شکل ۹). بنا بر نتایج بدست آمده میزان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

هر نه ترکیب مورد بررسی در لاین برتر ریشه مویین در مقایسه با ریشه نرمال به طور معنی‌داری بالاتر بود و این نتایج دور از انتظار نبود (شکل ۹). در طی فرآیند تراریختی ریشه مویین، 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 مویین *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 مویین گوجه‌فرنگی نیز گزارش شده است (Singh *et al.*, 2014). با توجه به نتایج اخیر با اطمینان می‌توان چنین نتیجه گرفت که تراریختی ریشه مویین با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز 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 اگروباکتریوم رایزوژنز و ریزنمونه برگ جهت القا و تولید ریشه مویین در شلغم کارایی مناسبی را به همراه خواهد داشت. لاین‌های ریشه مویین 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 مویین، می‌توان بازده سنتز متابولیت‌های ثانویه تا حد امکان تقویت نمود و با انجام مطالعات بیشتر امکان استفاده در سطح تجاری را نیز مقدور نمود.

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

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., & Guerineau, 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

Mirmazloum, 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., Kavikkuil, 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 H_2O_2. *Journal of Biotechnology, 123*(1), 43-49. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.023

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

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 Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 43*, 383-403. doi:https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8

Weremczuk-Jezyna, I., Grzegorczyk-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 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]

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

Farideh Babaloo[1], Rashid Jamei[1], 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-06-23]