

بهینه‌سازی القای ریشه‌های موئین در کاسنی (*Cichorium intybus* L.) و تأثیر اکسین و منبع کربن بر رشد آن‌ها

رقیه فتحی^۱، مهدی محب‌الدینی^{۲*} و اسماعیل چمنی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۵)

چکیده

کشت ریشه‌های موئین، روش مؤثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشد؛ زیرا ریشه‌های موئین از پایداری ژنتیکی و بیولوژیکی برخوردار بوده و قادر به تولید متابولیت‌ها، در زمان کوتاه و بدون نیاز به هورمون می‌باشند. کاسنی، از جمله گیاهان دارویی ارزشمند بوده و شامل ترکیبات دارویی مهمی می‌باشد. در این تحقیق، القای ریشه‌های موئین، توسط آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A₄ انجام شد. در آزمایش اول، تأثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی، بر کارایی القای ریشه‌های موئین بررسی شد. در آزمایش دوم، تأثیر سه نوع محیط کشت مختلف (موراشیک و اسکوگ جامد، مایع و ۱/۲ غلظت مایع) بر میزان رشد و تولید زیست‌توده در ریشه‌های موئین بررسی شد. در آزمایش سوم، تأثیر نوع و سن ریزنمونه، بر میزان فنل کل بررسی گردید؛ همچنین در آزمایش چهارم، تأثیر غلظت‌های مختلف نفتالین‌استیک‌اسید (۱/۵ و ۱ و ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز (۶ و ۵ و ۴ و ۳ درصد)، بر میزان تجمع زیست‌توده بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های موئین (۶۰ درصد) و تعداد ریشه (۱۱/۶۱ ریشه در هر ریزنمونه) در ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه، به‌دست آمد. همچنین محیط کشت ۱/۲ غلظت، بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های موئین بود و بیشترین میزان فنل کل، در ریشه‌های موئین حاصل از برگ ۲۸ روزه حاصل شد. همچنین محیط کشت حاوی ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۳ درصد ساکارز، بهترین تأثیر را در تجمع زیست‌توده نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ژن *rolB*، متابولیت‌های ثانویه، نفتالین‌استیک‌اسید، هم‌کشتی.

Optimization of hairy roots induction in chicory (*Cichorium intybus* L.) and effects of auxin and carbon source on their growth

Roghayeh Fathi¹, Mehdi Mohebodini^{2*} and Esmaeil Chamani³

1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: Jan. 20, 2017 - Accepted: Sep. 6, 2017)

ABSTRACT

Hairy root cultures are an effective method for production of secondary metabolites, because hairy roots are genetically and biologically stable and they are able to produce metabolite within a short time without need to use hormones. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is one of the important medicinal plants that contains a number of important medicinal compounds. In this research, hairy root induction was established through the mediation of the A₄ strain of *Agrobacterium rhizogenes*. In first experiment, the effects of type and age of explant and co-culture times on the efficiency of hairy root induction were investigated. In the second experiment, the effect of three different media (Murashige and Skoog solid, liquid and liquid half strength) were investigated on growth rate and biomass accumulation hairy roots. In third experiment, effects of type and age of explant were investigated on the total phenolic content of hairy roots. In fourth experiment, the effect of various concentrations of NAA (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) and sucrose (3, 4, 5 and 6%) were investigated on biomass accumulation. The obtained results showed maximum hairy root induction (60 percent) and number of roots (11.61 roots per explant) induced from 5-days-old cotyledons. The half strength medium of liquid Murashige and Skoog was the best medium for growth of hairy roots. Also, maximum total phenolic content in hairy roots was obtained by 28-days-old leaves. Medium supplemented with combination of 0.5 mg/l NAA and 3% sucrose showed the best effect on biomass accumulation.

Keywords: Co-culture, NAA, *RoIB* gene, Secondary metabolites.

* Corresponding author E-mail: mohebodini@uma.ac.ir

مقدمه

امروزه کشت ریشه‌های موپین، با داشتن سرعت رشدی بسیار زیاد، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در زمان کم، با بازده فراوان و بدون نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، راه‌کاری سودمند برای تولید ترکیبات دارویی می‌باشد. باکتری خاکزی *اگروباکتریوم رایزوزنز*^۱ از طریق درج قسمتی از ژن‌های خود موسوم به ناحیه T-DNA در ژنوم گیاهی، موجب القای ریشه‌های موپین در نزدیکی محل ورود خود به داخل گیاه می‌شود. بخش T-DNA، شامل ژن‌هایی است که آنزیم‌های سنتز هورمون‌های اکسین و سائیتوکینین را رمز می‌کنند و باعث القای ریشه‌های موپین می‌شود.

کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. گونه‌ای از تیره آستراسه^۲ می‌باشد که 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، شیکوریک‌اسید، سولفات و فسفات‌های سدیم، منیزیم، پتاسیم و نیترات‌پتاسیم است. ریشه دارای ۱۵-۱۱ درصد اینولین، قندهای مختلف از قبیل گلوکز، فروکتوز و ساکارز، شیکوریک‌اسید، پکتین، سسکویی‌ترین، لاکتون، اسیدتارتاریک می‌باشد. از ریشه این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی و التیام زخم، همچنین به‌عنوان اشتهاآور، محرک صفرا و کمک‌کننده به عمل هضم غذا و تب‌بر استفاده می‌شود (Yang et al., 2009). اینولین موجود در کاسنی تا حد زیادی از میزان تری‌گلیسریدها می‌کاهد و تا سه درصد در کاهش کلسترول خون مؤثر است (Ewa et al., 2002) همچنین تقویت‌کننده سیستم ایمنی بوده و بدن را در مقابل عوامل بیماری‌زا مقاوم می‌کند (Taper et al., 2002). شیکوریک‌اسید، خواص ضدویروس ایدز را داشته و همچنین با تحریک ترشح انسولین و جذب گلوکز، برای کاهش قند خون، مفید می‌باشد (Lee et al., 2010). با توجه به اهمیت کبد در تصفیه بدن از سموم، و کمبود داروهای کبدی در

کشور، اهمیت ریشه کاسنی در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی بیش از پیش مورد توجه است (Emad et al., 2011). روش‌های زراعی سنتی معمولاً به‌علت طول دوره رشد طولانی و همچنین خطر تغییرات آب و هوایی و آفات و بیماری‌ها، کارایی کمی در تولید متابولیت‌های گیاهی دارند؛ به‌همین دلیل، کشت بافت گیاهان دارویی و به‌ویژه کشت ریشه‌های موپین، به‌عنوان یک راه‌حل مناسب جهت تولید متابولیت‌های گیاهی باارزش می‌باشد (Hasanlu et al., 2009).

ترکیبات فنلی، در برگ‌گیرنده دامنه گسترده‌ای از موادی هستند که دارای حلقه آروماتیکی حامل یک گروه هیدروکسیلی بوده و اغلب آنها دارای منشأ گیاهی هستند. تمامی پلی‌فنل‌های گیاه توسط فنیل‌آلانین، آنزیم شیکیمات و از طریق مسیر شیکیمیک‌اسید تولید می‌گردند. ترکیبات فنولی، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی بوده و با مهار رادیکال‌های آزاد اکسینژن، موجب حفاظت بدن در مقابل عوامل بروز سرطان می‌شود. همچنین این ترکیبات، مانع پیری اندامک‌های سلولی می‌شود (Crozier et al., 2006).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، تأثیر مثبتی بر روی رشد ریشه‌های موپین نسبت به ریشه‌های غیرتراریخت (شاهد) دارد؛ و این امر به‌علت انشعابات زیاد ریشه‌های موپین و قابلیت جذب بهینه هورمون‌ها می‌باشد. در پژوهشی، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر روی رشد ریشه‌های موپین بررسی کرده و گزارش کردند که نفتالین‌استیک‌اسید (NAA)، بیشترین تأثیر را در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موپین گیاه *Plumbago indica* نسبت به جیبرلیک‌اسید (GA_3)، ایندول استیک‌اسید (IAA) و ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) داشته است (Gangopadhyay et al., 2011).

تحقیقات اندکی بر روی بهینه‌سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موپین در گیاه کاسنی انجام شده است. در پژوهشی، تأثیر سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم رایزوزنز* محیط هم‌کشتی Murashige Linsmaier & Skoog (LS) (1962) و (1965) و (1968) (Gamborg et al., 1968) B5 را بر القای

1. *Agrobacterium rhizogenes*
2. Asteraceae

ساکارز و ۵/۵ گرم در لیتر آگار کشت گردید و در اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل، در دو سن ۵ و ۱۲ روزه و برگ به‌علت اینکه دیرتر از کوتیلدون و هیپوکوتیل تشکیل می‌شود، در دو سن ۲۰ و ۲۸ روزه، جهت تلقیح با باکتری استفاده شد.

آزمایش اول: القای ریشه‌های موپین

به‌منظور القای ریشه‌های موپین، از اگروباکتریوم رایزوزنز سویه A₄ استفاده شد. تهیه سوسپانسیون باکتری به‌شرح زیر انجام شد. یک کلونی از باکتری در محیط کشت LB (Luria-Bertani) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، کشت گردید. کشت باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و با چرخش rpm ۱۲۰ به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. میزان OD₆₀₀ سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB، ۰/۶ در نظر گرفته شد. ریزنمونه‌ها پس از زخمی‌شدن سطحی توسط اسکالپل، در شرایط استریل در سوسپانسیون باکتری، به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شده و شیک شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی، برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS جامد، کشت و به‌مدت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح‌نشده نیز به‌عنوان شاهد در شرایطی مشابه با تیمار، کشت گردیدند. پس از سپری‌شدن مدت هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در آب‌استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، شستشو داده شدند و پس از خشک‌شدن نسبی در روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انتقال داده شدند. پس از گذشت چهار هفته از ظهور ریشه‌ها، درصد القای ریشه موپین، میانگین تعداد و طول ریشه‌ها و مدت لازم برای ظهور ریشه‌ها محاسبه گردید.

ریشه‌های موپین، در ریزنمونه کوتیلدون^۱ هشت روزه کاسنی بررسی کردند و گزارش کردند که سویه A13 در محیط کشت MS، بیشترین کارایی را در القای ریشه‌های موپین، در ریزنمونه‌های کوتیلدونی هشت روزه داشته‌است (Kabirnetaj *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری، میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در دودمان‌های مختلف ریشه‌های موپین حاصل از تلقیح برگ‌های چهار هفته‌ای کاسنی با سویه A₄، بررسی شد و نتایج نشان داد که دودمان‌های مختلف ریشه‌های موپین، که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده بود، تفاوت معنی‌داری از لحاظ توانایی رشد و تولید متابولیت ثانویه نسبت به یکدیگر دارند (Azarmehr *et al.*, 2012).

در تحقیق حاضر تأثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر القای ریشه‌های موپین در گیاه کاسنی بررسی گردید. همچنین تأثیر نوع محیط کشت، نفتالین استیک‌اسید و ساکارز بر تجمع زیست‌توده، در لاین‌های پررشد ریشه‌های موپین بررسی شد؛ در ادامه تأثیر نوع و سن ریزنمونه بر میزان محتوای فنل کل بررسی گردید. تا به‌حال مقایسه تأثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر القای ریشه‌های موپین این گیاه بررسی نشده است و این اولین گزارش در این مورد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذور کاسنی، از شرکت پاکان‌بذر اصفهان تهیه شد؛ و به‌منظور تهیه گیاهچه استریل، به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول بنومیل ۲ درصد قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر استریل، به داخل هود لامینار انتقال داده و ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، در دو مرحله و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه (و یک دقیقه آبکشی در بین دو مرحله) شستشو داده شد و پس از چند بار آبکشی، در نهایت با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۹۰ ثانیه ضدعفونی گردید و پس از ۱۵ دقیقه شستشو با آب استریل، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد

۱. برگ بذری (Coteledone)

تأیید مولکولی ریشه‌های موپین

تشخیص ریشه‌های موپین از ریشه‌های نابجا، علاوه بر استفاده از صفات مورفولوژیکی ریشه‌ها (از جمله زمان القاء، محل خروج ریشه، تعداد ریشه، میزان رشد ریشه‌ها)، از طریق تأیید مولکولی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *roIB* نیز انجام شد. استخراج DNA به روش CTAB (Khan *et al.*, 2007) از ریشه‌های موپین و همچنین ریشه‌های نابجای حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح‌نیافته به‌عنوان شاهد انجام شد. پلاسمید *A. rhizogenes* سویه A₄ نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Qantarus، با آغازگرهای اختصاصی ژن *roIB* بر روی DNA استخراج‌شده انجام شد. توالی ژن *roIB* از بانک ژن سایت NCBI گرفته شد و برای طراحی آغازگر استفاده گردید. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود:

5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCACCGA-3'
(آغازگر مستقیم) و

5'-TAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3'
(آغازگر معکوس). برنامه RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR، پس از الکتروفورز، در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل‌داک مدل ATP SN:G089301، مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، طبق روش Williams *et al.* (1990) برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۰/۸ میکرولیتر (۵۰ mM MgCl₂)، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ mM) dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، ۰/۲ میکرولیتر DNA پلیمرز تک، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۱ mM) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل انجام شد.

آزمایش دوم: مقایسه تأثیر نوع ریزنمونه و محیط کشت، بر وزن تر و خشک لاین برتر ریشه‌های موپین ابتدا برای انتخاب بهترین لاین ریشه‌های موپین،

لاین‌های 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 rpm ۱۲۰ و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند؛ پس از سه هفته، لاینی از ریشه موپین که بیشترین رشد (افزایش وزن) را داشت، با استفاده از توزین ریشه‌ها انتخاب شد (داده‌ها آورده نشده است). در مرحله بعد، به‌منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت در رشد ریشه‌ها، ۱۰۰ میلی‌گرم از نوک ریشه‌های لاین برتر، جدا و در محیط کشت‌های MS جامد، MS مایع و MS ۱/۲ مایع، در ظروف شیشه‌مربا کشت گردید؛ هر تکرار شامل ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بود. ریشه‌های کشت‌شده در محیط مایع بر روی شیکر با دور rpm ۱۰۰ در تاریکی قرار گرفتند و ریشه‌های کشت‌شده در محیط کشت جامد، در جای ثابت و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از پنج هفته، وزن تر و وزن خشک ریشه‌ها بر حسب گرم در فلاسک اندازه‌گیری شد.

آزمایش سوم: استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

کل

محتوای ترکیبات فنلی کل ریشه‌های موپین و ریشه‌های شاهد غیرتراریخت، با استفاده از روش Folin-Ciocalteu (Sonald & Laima, 2001) اندازه‌گیری شد. ۰/۰۱ گرم از بافت‌های خشک‌شده ریشه‌ها را که پودر شده بود با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد؛ سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۰۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه، در سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌رویی حاصل اضافه شده و حجم محلول، با آب مقطر، به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل، ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد و به مدت

مربوط به تأثیر سطوح مختلف هورمون NAA و ساکارز بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن محاسبه گردید و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

اولین ریشه‌ها، ۹ روز پس از انتقال به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم ظاهر شدند. این در حالی بود که در ریزنمونه‌های غیرتراریخت (شاهد)، ظهور ریشه‌ها به ندرت و فقط در ریزنمونه‌های برگ و دیرتر از ریشه‌های مویین اتفاق افتاد (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی، بر درصد تولید ریشه‌های مویین معنی‌دار نبوده است؛ اما اثرات اصلی آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. همچنین اثر متقابل نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر میانگین طول ریشه‌های مویین و مدت لازم برای القای ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده و بر تعداد ریشه‌های مویین در هر ریزنمونه، در سطح ۵ درصد، معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ روزه با ۶۰ درصد تراریختی، بیشترین توانایی را در القای ریشه‌های مویین داشته‌اند (شکل ۲) که دلیل این امر، جوان بودن کوتیلدون‌ها می‌باشد. بیشترین میانگین تعداد ریشه نیز ۱۱/۶۱ عدد در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی کوتیلدون ۵ روزه به دست آمد؛ و بیشترین میانگین طول ریشه (۱۰/۵۹) در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگی ۲۰ روزه حاصل شد (جدول ۱). سن ریزنمونه، عاملی تأثیرگذار در القای ریشه‌های مویین می‌باشد؛ و هرچه ریزنمونه از گیاهچه جوان‌تر تهیه شود درصد القای ریشه‌های مویین بیشتر خواهد بود (Zhi-Bi & Min, 2006).

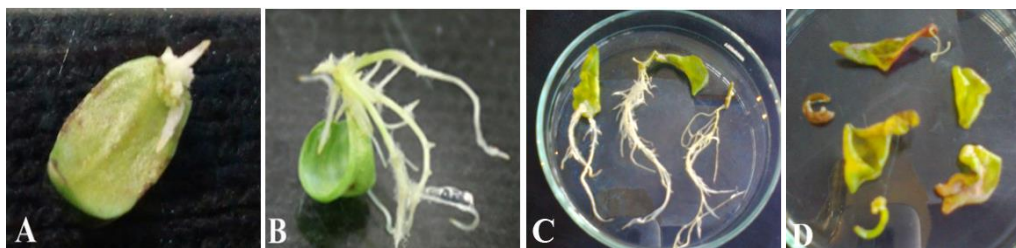
یک ساعت در تاریکی نگهداری شد؛ سپس شدت جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت ترکیبات فنلی، با استفاده از منحنی استاندارد گالیک‌اسید محاسبه گردید. اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل با ۳ تکرار انجام شد.

آزمایش چهارم: تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن و بر کشت ریشه‌های مویین

در این آزمایش، ریشه‌های به دست آمده از کوتیلدون‌های ۵ روزه، به دلیل اینکه بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین و رشد ریشه را داشتند؛ به عنوان ماده آزمایشی استفاده شدند. نوک ریشه‌ها به قطعاتی به طول دو سانتی‌متر برش داده شدند؛ زیرا قطعات کوچک‌تر ریشه، هوادهی بهتری در شیکر داشته و رشد بیشتری خواهند داشت. در هر تکرار، ۵۰ میلی‌گرم ریشه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ظروف شیشه‌مربا کشت گردید. هورمون NAA در چهار غلظت (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز به عنوان منبع کربن برای رشد ریشه‌های مویین در چهار غلظت (۶ و ۵، ۴، ۳ درصد)، به تنهایی یا به صورت ترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت، شیشه‌ها در شیکر با دور ۱۰۰ rpm نگهداری شدند. بعد از چهار هفته، وزن تر ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. پس از خشک کردن ریشه‌ها در آون، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

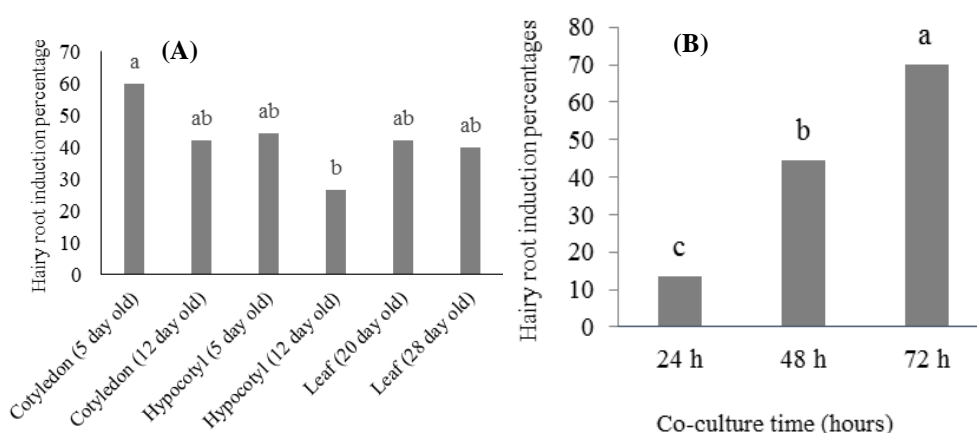
آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش مربوط به بررسی تأثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر میزان القای ریشه‌های مویین به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش مربوط به تأثیر نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آزمایش مربوط به تأثیر نوع و سن ریزنمونه بر میزان محتوای فنل کل ریشه‌های مویین، به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد و آزمایش



شکل ۱. القای ریشه‌های موپین توسط آگروباکتریوم رایزوترنز: در گیاه کاسنی. A: ظهور ریشه‌های موپین یک هفته پس از تلقیح، B: افزایش تعداد ریشه‌های موپین سه هفته پس از تلقیح، C: رشد ریشه‌های موپین پنج هفته پس از تلقیح، D: القای کم ریشه‌های غیرتراریخت در ریزنمونه‌های برگ به‌عنوان شاهد (پنج هفته پس از کشت).

Figure 1. Hairy roots induction by *A. rhizogenes* in Chicory, A: Hairy root induction one week after infection, B: Increase in hairy roots number three weeks after infection, C: Hairy root growth five weeks after infection D: Low non-transformed root induction on leaf explants as control (5 weeks after culture).



شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر نوع و سن ریزنمونه (A) و مدت هم‌کشتی (B) بر روی درصد القای ریشه‌های موپین

Figure 2. Mean comparisons of the effects of type and age of explant (A) and co-culture time (B) on hairy roots induction percentages

جدول ۱. مقایسه میانگین تأثیر نوع و سن ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر روی برخی صفات ریشه‌های موپین

Table 1. Mean comparisons of the effects of type and age of explant and co-culture time on some characteristic of hairy roots

Explant type	Explant age (day)	Co-culture time (hours)	Number of root	Length of root (cm)	Time to root induction (days)
Cotyledon	5	24	2.5 ^{ghi}	2.2 ^c	20.24 ^c
		48	7.7 ^{cd}	5.9 ^b	16.18 ^b
		72	11.61 ^a	10.4 ^a	12.13 ^a
	12	24	2.66 ^{ghi}	2.06 ^c	20.31 ^c
		48	7.53 ^{cd}	6.23 ^b	16.08 ^b
		72	10.8 ^{ab}	9.5 ^a	12.10 ^a
Hypocotyl	5	24	0.51 ^{hi}	0.49 ^c	12.39 ^a
		48	1.8 ^{hi}	2.1 ^c	11.95 ^a
		72	6.5 ^{de}	2.5 ^c	9.97 ^a
	12	24	0.33 ⁱ	0.48 ^c	12.84 ^a
		48	2.5 ^{ghi}	2.3 ^c	12.46 ^a
		72	4.2 ^{fg}	2.86 ^c	10.59 ^a
Leaf	20	24	2.16 ^{ghi}	2.7 ^c	20.96 ^c
		48	5.23 ^{ef}	6.2 ^b	16.42 ^b
		72	9.56 ^{abc}	10.59 ^a	12.81 ^a
	28	24	2.03 ^{ghi}	2.8 ^c	21.12 ^c
		48	4.94 ^{ef}	6 ^b	16.21 ^b
		72	9.2 ^{bc}	9.67 ^a	12.64 ^a

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

شد؛ همان‌طور که پژوهش‌های دیگری نیز گزارش کردند که مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی، بیشترین تأثیر را در القای ریشه‌های موپین نسبت به ۱ تا ۶ روز هم‌کشتی داشت (Kodjo *et al.*, 2013). همچنین در گیاه *Berberis aristata* DC. نیز ۴۸ ساعت هم‌کشتی، کارایی بهتری نسبت به ۲۴ ساعت هم‌کشتی داشته است (Brijwal & Tamta, 2015). از بین سویه‌های مختلف *A. rhizogenes*، سویه A₄ به‌طور وسیعی برای القای ریشه‌های موپین استفاده می‌شود و در بسیاری از گیاهان، کارایی بیشتری نسبت به سویه‌های دیگر در القای ریشه‌های موپین داشته است (Sujatha *et al.*, 2013).

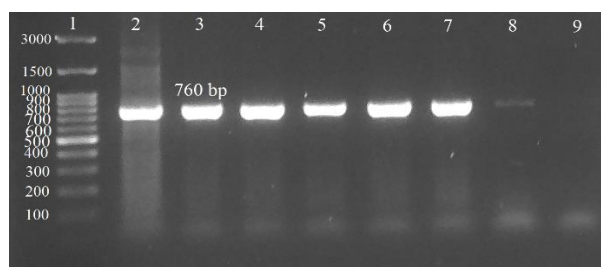
انتقال و درج ناحیه T-DNA در سلول‌های گیاه میزبان، به‌صورت تصادفی اتفاق می‌افتد؛ لذا تنوع رشدی و مورفولوژی زیادی بین هر لاین ریشه‌های موپین، که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده‌اند، مشاهده می‌شود. در واقع، تنوع در تعداد نسخه‌های درج‌شده از T-DNA و میزان بیان ژن‌های موجود در آن، از جمله ژن *rol* نقش بسزایی در تنوع رشدی لاین‌های مختلف ریشه‌های موپین دارد (Cho *et al.*, 1998).

تأیید مولکولی ریشه‌های موپین

نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار ۷۶۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rolB* را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (پلاسمید باکتری) هم‌اندازه بود؛ اما برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح‌نشده، نواری تکثیر نشد (شکل ۳).

تأثیر *A. rhizogenes* بر القای ریشه‌های موپین، به عوامل مختلفی از جمله سویه باکتری، نوع گیاه، سن ریزنمونه، نوع ریزنمونه، مدت هم‌کشتی و نوع محیط کشت بستگی دارد (Samadi *et al.*, 2012). برخی گونه‌های گیاهی مستعد القای ریشه‌های موپین هستند و برخی دیگر از گونه‌ها، به‌سختی می‌توانند ریشه‌های موپین تولید کنند. همچنین درصد القای ریشه‌های موپین در ریزنمونه‌های با سن پایین‌تر، بیشتر بود به‌طوری که در کوتیلدون‌های ۵ روزه، ۶۰ درصد، اما در کوتیلدون‌های ۱۲ روزه، ۴۲/۲۲ درصد، مشاهده شد. مطابق با این نتایج، در گیاه *Gmelina arborea* Roxb. نیز درصد القای ریشه‌های موپین در کوتیلدون ۵ روزه، تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از کوتیلدون ۲۵ روزه گزارش شده است (Dhakulkar *et al.*, 2005). از نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که ریزنمونه کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیل و برگ، از توان تولید ریشه‌های موپین بیشتری برخوردار است؛ لذا می‌توان گفت بسته به گونه‌های گیاهی، نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های موپین تأثیرگذار است.

تراریخت‌سازی توسط اگروباکتریوم رایزوزنز، از طریق انتقال و درج ناحیه 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، از بین سه مدت هم‌کشتی مختلف، بیشترین درصد القای ریشه‌های موپین، در اثر ۷۲ ساعت هم‌کشتی حاصل



شکل ۳. تکثیر قطعه DNA به‌اندازه ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA ریشه‌های موپین. 1: نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت بازی، 2: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* سویه A₄ به‌عنوان کنترل مثبت، 3-8: ریشه‌های موپین، 9: ریشه‌های نابجای حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به‌عنوان شاهد منفی.

Figure 3. PCR amplified DNA fragments in size (760 bp) using specific primers for *rolB* gene on hairy roots DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2: *A. rhizogenes* plasmid A₄ strain as positive control, 3-8: hairy roots, 9: Adventitious roots raised from non-transformed explant as negative control.

۱/۲MS و MS مشاهده شد و محیط کشت N6، کمترین تأثیر را نشان داد (Pakdin Parizi *et al.*, 2014)، همچنین در آزمایشی طی مقایسه اثر نوع محیط کشت ۱/۲MS، MS و B5 بر رشد ریشه‌های موپین در گیاه علف خنازیر آبی^۲، محیط کشت MS ۱/۲، مناسب‌ترین محیط کشت برای رشد ریشه‌ها معرفی شد (Park *et al.*, 2010).

ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل در ریشه‌های موپین، نسبت به نمونه شاهد، براساس نوع و سن ریزنمونه استفاده شده جهت القای ریشه‌های موپین، تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۵). محتوای فنل کل، در ریشه‌های موپین بیشتر از ریشه‌های شاهد بوده و در ریشه‌های موپین حاصل از برگ‌های ۲۸ روزه، بیشتر از ریشه‌های موپین حاصل از سایر ریزنمونه‌ها مشاهده شد.

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن بر کشت ریشه‌های موپین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل NAA و غلظت‌های مختلف ساکارز بر وزن تر و خشک و شاخص رشدی ریشه‌های موپین، در سطح احتمال ۱ درصد، معنی‌دار شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۱/۹۳ و ۰/۱۳ گرم در فلاسک) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز به‌دست آمد و بعد از آن، بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۱/۰۲ و ۰/۰۷ گرم در فلاسک) متعلق به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵ درصد ساکارز بود (جدول ۳). مطابق با نتایج حاصل، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم NAA، بیشترین تأثیر را در تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاه *Plumbago indica* به اکسین‌های دیگر داشته است (Gangopadhyay *et al.*, 2011). همچنین استفاده از منبع مناسب برای کربن، در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه، حائز اهمیت

مقایسه تأثیر نوع ریزنمونه و محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های موپین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک و شاخص رشد ریشه‌های موپین، در سطح ۱ درصد، معنی‌دار می‌باشد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۲/۲۶ و ۰/۱۷ گرم در فلاسک) و شاخص رشد (۲۱/۴) در ریشه‌های حاصل از کوتیلدون، که در محیط کشت MS ۱/۲ کشت شد، حاصل شد (شکل ۵). به‌نظر می‌رسد نوع و غلظت محیط کشت، تأثیر بسزایی بر رشد ریشه‌های موپین دارد؛ به‌همین دلیل بهینه‌سازی محیط کشت، به‌منظور رشد مطلوب و تولید متابولیت‌های ثانویه، حائز اهمیت است (Shinde *et al.*, 2012). برای تعیین شاخص رشد از رابطه ۱ استفاده شد:

$$(۱) \quad \frac{\text{وزن خشک اولیه}}{\text{وزن خشک نهایی}} = \text{شاخص رشد}$$

وزن خشک اولیه، همان وزن خشک ریشه در ابتدای انجام تیمار بوده و وزن خشک نهایی، از طریق خشک‌کردن ریشه‌های موپین برداشت‌شده در انتهای دوره رشد به‌دست آمد.

استفاده از محیط کشت مناسب، از عوامل تأثیرگذار در استقرار و رشد ریشه‌های موپین می‌باشد (Yu *et al.*, 1996; Lourenco *et al.*, 2002; Sivakumar *et al.*, 2005) و بهینه‌سازی محیط کشت، برای رشد مطلوب و تولید متابولیت‌های ثانویه، حائز اهمیت است (Shinde *et al.*, 2010). نتایج این تحقیق نشان داد که محیط کشت MS ۱/۲، مناسب‌ترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های موپین می‌باشد. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در تعدادی از گیاهان دیگر نیز، محیط کشت MS ۱/۲، بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های موپین گزارش شده است (Sujatha *et al.*, 2013)، اما در پژوهش دیگری، رشد ریشه‌های موپین حاصل از گیاه سنبل‌الطیب^۱ در محیط کشت‌های MS، MS ۱/۲، B₅، B₅ و N6 مورد مطالعه قرار گرفت که بعد از سه هفته، بیشترین تجمع زیست‌توده در ریشه‌های موپین کشت‌شده در محیط کشت B₅ و بعد از آن به‌ترتیب در B₅ ۱/۲،

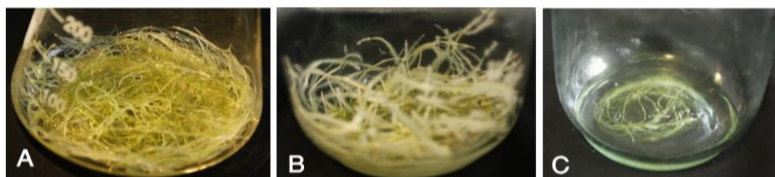
است (Wu *et al.*, 2006). ساکارز به عنوان منبع کربن، نقش بسزایی در رشد و افزایش انشعابات ریشه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Malamy & Ryan, 2001). البته در برخی از موارد، افزایش غلظت ساکارز موجب بازدارندگی از رشد ریشه شده است که احتمالاً به علت تنش اسمزی می‌باشد (Nguyen *et al.*, 1992).

جدول ۲. تأثیر نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت بر روی وزن تر و خشک ریشه‌های مویین
Table 2. The effects of explant and medium types on fresh and dry weight of hairy roots

Explant	Medium type	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Grow index
Cotyledon	Solidified MS	0.5 ^e	0.03 ^f	2.73 ^f
	Liquid MS	1.3 ^{bc}	0.09 ^{de}	10.24 ^{de}
	Liquid 1/2 MS	2.26 ^a	0.179 ^a	21.4 ^a
Hypocotyl	Solidified MS	0.45 ^e	0.04 ^f	3.97 ^f
	Liquid MS	0.9 ^d	0.07 ^e	7.74 ^e
	Liquid 1/2 MS	1.39 ^b	0.12 ^{bc}	13.99 ^{bc}
Leaf	Solidified MS	0.48 ^e	0.042 ^f	4.2 ^f
	Liquid MS	1.01 ^{cd}	0.099 ^{cd}	11.37 ^{cd}
	Liquid 1/2 MS	1.41 ^b	0.126 ^b	14.74 ^b

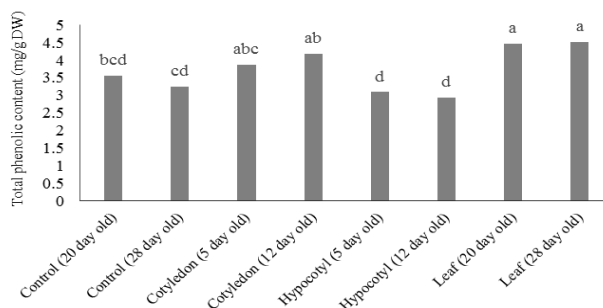
اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).



شکل ۴. رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت‌های مختلف: A: کشت ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع، B: کشت ریشه‌های مویین در محیط کشت جامد، C: کشت ریشه‌های غیرتراریخت در محیط کشت مایع.

Figure 4. Hairy roots growth on different media, A: Hairy root cultures established in liquid medium, B: Hairy root cultures established in solid medium, c: non-transformed root cultures established in liquid medium.



شکل ۵. مقایسه میانگین تأثیر نوع و سن ریزنمونه بر روی محتوای فنول کل در ریشه‌های مویین و شاهد.

Figure 5. Means comparison of effects of type and age of explants on total phenolic contents in hairy roots and controls.

جدول ۳. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف NAA و ساکارز بر روی وزن تر و خشک و شاخص رشدی ریشه‌های مویین
Table 3. Means comparison of effects of different level of NAA and sucrose on fresh and dry weight and growth index of hairy roots

NAA (mg/l)	Sucrose (g/l)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Grow index
0	30	0.98 ^b	0.066 ^b	14.65 ^b
0	40	0.51 ^{cde}	0.034 ^d	7.09 ^{cde}
0	50	0.67 ^{bcd}	0.044 ^{bcd}	9.68 ^{bcd}
0	60	0.92 ^b	0.063 ^{bc}	13.65 ^b
0.5	30	1.93 ^a	0.133 ^a	29.73 ^a
0.5	40	0.38 ^e	0.023 ^e	5.13 ^e
0.5	50	1.02 ^b	0.07 ^b	15.29 ^b
0.5	60	0.74 ^{bcd}	0.05 ^{bcd}	10.85 ^{bcd}
1	30	0.55 ^{cde}	0.036 ^{cde}	7.83 ^{cde}
1	40	0.46 ^{de}	0.026 ^e	6.4 ^{de}
1	50	0.46 ^{de}	0.026 ^e	6.35 ^{de}
1	60	0.43 ^{de}	0.026 ^e	5.87 ^{de}
1.5	30	0.43 ^{de}	0.026 ^e	5.92 ^{de}
1.5	40	0.77 ^{bcd}	0.05 ^{bcd}	11.32 ^{bcd}
1.5	50	0.85 ^{bc}	0.056 ^{bcd}	12.54 ^{bc}
1.5	60	0.83 ^{bc}	0.056 ^{bcd}	12.27 ^{bc}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

ریشه‌های شاهد بوده و در ریشه‌های موپین حاصل از برگ‌های ۲۸ روزه، بیشتر از ریشه‌های موپین حاصل از سایر ریزنمونه‌ها مشاهده شد. همچنین نتایج آزمایش مربوط به بررسی تأثیر NAA و سطوح مختلف ساکارز بر افزایش زیست‌توده ریشه‌ها نشان داد که محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش زیست‌توده داشته است.

نتایج کلی آزمایش‌ها نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون ۵ روزه گیاه کاسنی، در اثر تلقیح با *A. rhizogenes* سویه A₄، بیشترین کارایی را در تولید ریشه‌های موپین و تعداد و طول ریشه‌ها دارد. همچنین محیط کشت MS ۱/۲ مایع، نسبت به MS مایع و MS جامد، بیشترین تأثیر را در رشد و تجمع زیست‌توده داشت. محتوای فنل کل در ریشه‌های موپین بیشتر از

REFERENCES

1. Azarmehr, B., Karimi, F., Taghizade, M. & 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 Farsi)
2. Brijwal, A. & Tamta, S. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus*, 2015(4), 443-453.
3. Cho, H. J., Widholm, J. M., Tanaka, N., Nakanishi, Y. & Murooka, Y. (1998). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus Sinicus* (Chinese milk). *Plant Science*, 138, 53-65.
4. Crozier, A., Ashihara, H. & Clifford, M. N. (Eds). (2006) *Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing.
5. Dhakulkar, S., Ganapathi, T., Bhargava, S. & Bapat, T. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science*, 169, 812-818.
6. Emad, M., Garibi, F., Rasuli, S. & Khanjanzadeh, S. (2013). *Medicinal-industrial plant chicory*. Noandish.
7. Ewa, C., Aneta, K. & Werner, P. (2002). Functional properties of fructans. In: *Proceedings of Ninth seminar on inulin*, 18-19 April., Budapest, Hungary, p. 122-131.
8. Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(2), 151-158.
9. Gangopadhyaya, M., Dewanjeeb, S., Chakraborty, D. & Bhattacharyya, S. (2011). Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Industrial Crops and Products*, 33, 445-450.
10. Hasanlu, T., Rezazadeh, S. & Rahnema, H. (2008). Hairy roots sources for the production of valuable pharmaceutical compounds. *Journal of Medicinal Plants*, 29, 1-17. (in Farsi)
11. Kabirnetaj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G. A. & Shokri, E. (2012). Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus* L.) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Iranian journal of agricultural biotechnology*, 4, 61-75. (in Farsi)
12. Khan, S., Irfan, Q. M., Kamaluddin, A. T. & Abidin, 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, 175-178.
13. Kodjo, D., Atsou, V. A., Melin, C., Bland, N., Oudin, A., Courdavault, V., Creche, J. & 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.
14. Lee, J. & Scagel, C. F. (2010). Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. *Journal of Functional Foods*, 2, 77-84.
15. Linsmaier, E. M. & Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 18, 100-127
16. Lourenco, P. M. L., Castro, S. D., Martins, T. M. & 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.
17. Malamy, J. E. & Ryan, K. S. (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127, 899-909.
18. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum* 15, 473-476.

19. Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. & Giri, A. (1992). Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*, 11, 424-427.
20. Pakdin Parizi, A., Farsi, M., Nematzadeh, G. A. & Mirshamsi, A. (2014). Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L. *Acta agriculturae Slovenica*, 103, 299-305.
21. Park, S. U., Li, X., Eom, S. H., Lee, C. Y. & Lee, S. Y. (2010). E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. *Archives of Biological Sciences*, Belgrade, 62, 649-652.
22. Samadi, A., Carapetian, J., Heidary, R., Jafari, M. & Hssanzadeh, A. (2012). Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. an anti-tumor lignans production plant. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 125-131.
23. Shinde, A., Malpathak, N. & Fulzele, D. (2010). Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Natural Medicines*, 64, 346-353.
24. Sivakumar, G., Yu, K.W. & Paek, K. Y. (2005). Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Engineering in Life Science*, 5, 333-342.
25. Sonald, S. F. & Laima, S. K (2001). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agric*, 1, 1-5.
26. Sujatha, G., Zdravkovic-Korac, S., Calic, D., Flamini, G. & 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.
27. Taper, H. S. & Roberfroid, M. B. (2002). Inulin/oligofructose and anticancer therapy. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 283-286.
28. Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2006). Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, 49, 193-199.
29. Yang, Y. (2009). Process Optimization of Extracting Phenols from *Cichorium intybus* cv. Puna with Response Surface Methodology. *Journal of Northwest Forestry University*, 24, 118-120.
30. Yu, S., Kwok, K. H. & Doran, P. M. (1996). Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 238-243.
31. Zhi-Bi, H. & Min, D. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121-127.