ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳
صفحه ۱۷۱ - ۱۵۹

بهینه‌سازی القای ریشه‌های تغییریافته ژنتیکی با Ri–پلاسمید در زرین‌گیاه

Optimization of Genetically pRi-transformed roots induction in *Dracocephalum kotschyi* Boiss.

مهدی قربانی[۱]، منصور امیدی*[۲]، علی اکبرشاه‌نجات بوشهری[۲]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۲- استاد تمام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

Ghorbani M[1], Omidi M*[2], Shahnejat Bushehri AA[2]

1- PhD student of Agricultural Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, University of Tehran, Iran
2- Full Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, University of Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۷)

چکیده

زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.)، گیاه دارویی چندساله، بومی ایران و در فهرست گیاهان درحال انقراض است که به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه ارزشمند بسیار حائز اهمیت است. به‌دلیل کمیاب بودن گونه وحشی این گیاه در طبیعت و برداشت بی‌رویه آن، نیاز است یک رویکرد جایگزین برای تولید ترکیبات باارزش این گیاه به‌کار گرفته شود. با توجه به اهمیت دارویی زرین‌گیاه، پژوهش حاضر با هدف دستیابی به ریشه‌های مویین (تغییریافته ژنتیکی) با غربال‌گری بهترین سویه باکتری *Rhizobium rhizogenes* (شامل ATCC 15834، A4 و MSU440) و ریزنمونه (برگ، گره و میانگره)، بهینه‌سازی القای ریشه تغییریافته ژنتیکی این گیاه با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ با بهره‌گیری از مقادیر بهینه از چهار عاملِ غلظت ال-آرژنین، استوسیرینگون، ساکارز و نوع محیط‌کشت و در نهایت انتخاب بهترین لاین ریشه تغییریافته ژنتیکی با Ri–پلاسمید انجام شد. براساس نتایج ما سویه MSU440 و ریزنمونه برگ بالاترین میانگین میزان القای ریشه را نشان دادند (به‌ترتیب ۶۲ ٪ و ۵۲ ٪). نتایج بهینه‌سازی فراوانی القای ریشه به‌ترتیب، میزان اسیدآمینه ال-آرژنین، استوسیرینگون و ساکارز را در حدود ۱ mM – ۰/۵، ۱۱۰ µM -۸۵ و ۲۰ g/L -۱۵ نشان داد. همچنین با بررسی سرعت رشد لاین‌های ریشه با ماهیت تراریخته مربوط به لاین به‌دست آمده از سویه MSU440 رشد یافته در محیط MS $\frac{1}{4}$ جامد انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی

روش شناسی سطح پاسخ
ریشه تغییریافته ژنتیکی
ریشه مویین
زرین‌گیاه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

مقدمه

زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.)، گیاهی چندساله از خانواده نعناعیان (Lamiaceae)، بومی ایران و در فهرست گیاهان درحال انقراض است (Jalili and Jamzad 1999; Maskani Sereshkeh et al. 2019). این گیاه ۲۰ کروموزومی (۲n=۲x=۲۰)، ساقه‌هایی به طول بین ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر دارد و به‌خاطر غنی بودن از ترکیبات مختلف اسانس، فلاونوئید و ترکیبات ارزشمند ازجمله زانتومیکرول، آپیژنین و اسید رزمارینیک بسیار حائز اهمیت است (Heydari et al. 2019). اخیراً فلاونوئیدهای این گیاه در مبارزه با سرطان توجه محققان را به خود جلب کرده است (Zamani et al. 2016). بخشی مهمی از داروی ضدسرطان اسپینال-زد (Spinal-Z) که اثر ضدتوموری خود را بر سرطان معده به اثبات رسانده است، از این گیاه به‌دست می‌آید (Jahaniani et al. 2005).

با افزایش سطح سلامت، تقاضای بازار برای داروهای گیاهی در سال‌های اخیر به سرعت در حال افزایش است. گیاهان دارویی منبعی سرشار از انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات زیست‌فعال طبیعی هستند که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند. با این حال، مقادیر پایین این متابولیت‌ها در گیاهان، کمیاب بودن برخی از گونه‌های گیاهان وحشی در طبیعت و برداشت بی‌رویه می‌تواند چالش‌های مهم زیست‌محیطی ایجاد کند؛ بنابراین، نیاز است یک رویکرد موثر برای تولید ترکیبات مهم طبیعی به‌کار گرفته شود. به‌تازگی، تولید این ترکیبات با استفاده از روش‌های زیست فناوری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. زیست فناوری، به‌ویژه روش‌های کشت بافت گیاهی، رویکرد جدیدی از تجارت گیاهان در خطر انقراض و ترکیبات شیمیایی تولید شده توسط آن‌ها را فراهم کرده است (Khan et al. 2018; Li and Wang 2021; Nourozi et al. 2019).

ریشه مویین توسط انتقال T-DNA از پلاسمید القاگر ریشه (Ri پلاسمید) از باکتری *Rhizobium rhizogenes* (نام جدید *Agrobacterium rhizogenes*) به درون ژنوم گیاه ایجاد می‌شود. در طبیعت، زمانی‌که در ناحیه ریشه و طوقه گیاهان زخم ایجاد می‌شود، ترکیباتی مانند استوسیرینگون ترشح می‌شود که باعث جذب باکتری *R. rhizogenes* به میزبان می‌شوند (به این حالت کموتاکسی گفته می‌شود) و به‌دنبال آن ناهنجاری ریشه مویین ایجاد می‌شود. امروزه دانشمندان با حذف این باکتری از محیط کشت با بهره‌گیری از کشت ریشه مویین در محیط فاقد هورمون، آن را به ابزاری موثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در ریشه یا حتی اندام‌های هوایی گیاهان بالغ سنتز می‌شوند تبدیل نموده‌اند (Li and Wang 2021). کشت ریشه مویین مزیت بزرگی برای تولید این متابولیت‌ها و ترکیبات زیست‌فعال در مقادیر زیاد در مقایسه با کشت‌های سوسپانسیون سلولی دارد، زیرا دارای ویژگی‌هایی مانند تمایز، پایداری ژنتیکی، تولید زیست‌توده بالا و ظرفیت بیوسنتزی کارآمد است (Gutierrez-Valdes et al. 2020). پیش‌نیاز تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع، با بهینه‌سازی و مدل‌سازی ریاضی در شرایط درون‌شیشه امکان‌پذیر است. در واقع، مدل‌سازی ریاضی، برازش داده‌های تجربی، روابط بین عوامل دخیل در آزمایش و تأثیر آن‌ها بر زیست‌توده و عملکرد متابولیت ثانویه را توصیف می‌کند. روش‌شناسی سطح پاسخ[1] (RSM) روشی نوین برای توسعه، بهبود و بهینه‌سازی فرآیندهایی است که می‌توان چندین متغیر را در یک زمان بررسی و پاسخ آن‌ها را بهینه نماید و نیاز به تعداد آزمایش زیاد را کاهش دهد (Amdoun et al. 2021).

با توجه به اهمیت دارویی و ارزش بسیار بالای متابولیت‌های ثانویه زرین‌گیاه و قرار داشتن آن در فهرست گیاهان در معرض انقراض، پژوهش حاضر به‌منظور بهینه‌سازی القای ریشه‌های تغییریافته ژنتیکی با استفاده از Ri-پلاسمید صورت گرفت. این هدف با بهره‌گیری از روش‌شناسی سطح پاسخ (RSM) و طرح بهینه نوع D، با استفاده از غلظت‌های مختلف ال-آرژنین، استوسیرینگون و ساکارز در محیط هم‌کشت دنبال شد.

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی

برای به‌دست آوردن گیاهچه‌های سترون، بذرهای *Dracocephalum kotschyi* Boiss. (خریداری شده از شرکت پاکان بذر، استان اصفهان) در شرایط *in vitro* کشت شدند. شرایط

[1] Response Surface Methodology

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

ضدعفونی بذرها به این ترتیب بود که ابتدا به مدت ۵ دقیقه تیمار با اسید سولفوریک ۸۰ ٪ صورت گرفت، سپس با الکل ۷۰ ٪ و مدت زمان ٦۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم (۲ ٪ کلر فعال) به مدت ۱۰ دقیقه فرآیند ضدعفونی در زیر هود لامینار انجام شد. بین کلیه مراحل ذکر شده، بذرها دو الی سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده آبکشی و در نهایت بر روی کاغذ صافی سترون، خشک و در محیط کشت MS پایه کشت شدند (شرایط دمایی اتاقک رشد: °C ۲۵، دوره نوری ١٦–۸ ساعت).

آماده نمودن باکتری *Rhizobium rhizogenes*

سویه‌های مختلف باکتری *Rhizobium rhizogenes* (اهدایی از دکتر هوشنگ علیزاده، دانشگاه تهران) شامل ATCC 15834، A4 و MSU440 در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپین (۵۰ mg/L) در انکوباتور °C ۲۸ با سرعت چرخش rpm ۱۲۰ جهت رسیدن به OD برابر با ۰/٦ کشت شد.

القای ریشه مویین

غربال‌گری بهترین سویه و ریزنمونه

جهت القای ریشه‌های مویین، مرحله اول آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به‌صورت فاکتوریل جهت تعیین بهترین نوع ریزنمونه (برگ، گره و میانگره) و سویه باکتری *Rhizobium rhizogenes* (ATCC 15834، A4، MSU440) با سه تکرار انجام شد. ریزنمونه‌ها توسط زخمی کردن با سرنگ انسولین آغشته به رسوب باکتری (شرایط سانتریفیوژ: rpm ٤۰۰۰، زمان ۵ دقیقه، دما °C ٤) تلقیح و روی محیط کشت $\frac{1}{2}$ **MS** (عناصر ماکرو به‌صورت نیمه‌غلظت) به مدت ٤۸ ساعت در شرایط تاریکی و دمای °C ۲۵ هم‌کشت شدند. همچنین ریزنمونه‌های شاهد با سرنگ آغشته به محیط LB مایع فاقد باکتری زخمی شدند. بعد از گذشت ٤۸ساعت، انتقال به محیط حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (mg/L ۵۰۰) جهت حذف باکتری صورت گرفت (واکشت‌ها تا لحظه حذف باکتری در محیط کشت حاوی mg/L ٤۰۰، mg/L ۳۰۰ و mg/L ۲۰۰ سفوتاکسیم تکرار شد). بعد از گذشت ۲۱ روز، صفت درصد القای ریشه به‌عنوان پاسخ اندازه‌گیری شد.

بهینه‌سازی محیط القای ریشه مویین

جهت بهینه‌سازی اثر چهار عامل اسیدآمینه ال-آرژنین، استوسیرینگون، ساکارز و نوع محیط‌کشت ($\frac{1}{4}$ MS و $\frac{1}{2}$ MS) جامد حاوی ۸ گرم در لیتر آگار، آزمایش طرح بهینه نوع D (D-optimal Design) از روش سطح پاسخ با استفاده از نسخه آزمایشی نرم‌افزار Design-Expert® 13.0 طراحی و اجرا شد (جدول ۱). همچنین مطابق با نتایج مرحله قبلی آزمایش، از برگ به‌عنوان بهترین ریزنمونه و از MSU440 به‌عنوان بهترین سویه باکتری با بالاترین درصد القای ریشه استفاده شد. بعد از گذشت ۲۱ روز، درصد القای ریشه به‌عنوان متغیر پاسخ (Y) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- عامل‌های مورد مطالعه در طرح بهینه نوع D

متغیر	واحد	سطح	
		+۱	-۱
L- آرژنین (A)	mM	۲	۰
استوسیرینگون (B)	µM	۲۰۰	۰
ساکارز (C)	g/L	۳۰	۱۰
محیط کشت (D)	-	$\frac{1}{4}$ MS	$\frac{1}{2}$ MS

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌ها

اثبات ماهیت تراریختی ریشه‌های ظاهرشده با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، انجام شد. استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های ظاهر شده به روش CTAB (Khan et al. 2007) و الکتروفورز محصولات نهایی PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد.

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول
rolC	RolC F	5-CTCCTGACATCAAACTCGTC-3	٦۲٦ bp
	RolC R	5-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3	
virD	VirD F	5-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCGA-3	٤۳۸ bp
	VirD R	5-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3	

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

استقرار ریشه‌های مویین

بعد از اثبات ماهیت تراریختی ریشه‌ها، سه نمونه از ریشه‌های مویین تایید شده (L1، L2 و L3) در دو نوع محیط‌کشت (MS $\frac{1}{4}$ و MS $\frac{1}{2}$) جامد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند. در این مرحله، شمارش تعداد نوک ریشه به‌عنوان متغیر وابسته مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت برای به‌دست آوردن کلون یکدست از بهترین لاین، کشت در محیط کشت مایع MS $\frac{1}{4}$ صورت گرفت.

نتایج و بحث

غربالگری بهترین سویه و ریزنمونه

گیاهچه‌های زرین‌گیاه *Dracocephalum kotschyi* Boiss. حدود دو هفته بعد از کشت در محیط MS جامد جوانه زدند (شکل ۹). ریزنمونه‌های برگ، میانگره و گره از گیاهچه‌های حدود یک ماهه جهت تلقیح با سه سویه از باکتری *R. rhizogenes* (ATCC 15834، A4 و MSU440) مورد مطالعه قرار گرفتند. حدود دو الی سه هفته پس از تلقیح و بعد از انجام واکشت‌های متوالی جهت حذف باکتری، برخی از ریزنمونه‌ها متورم و در نهایت از محل زخم ریشه‌های کرکی سفید رنگ ظاهر شد (شکل ۹). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) تفاوت معنی‌داری بین سه سویه باکتری (A4، ATCC 15834 و MSU440) و سه نوع ریز نمونه (برگ، میانگره و گره) در سطح ۱٪ برای صفت القای ریشه نشان داد (شکل ۱ و ۲) اما اثر متقابل سویه در ریزنمونه تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳).

جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس اثر سویه باکتری و ریزنمونه بر القای ریشه در زرین‌گیاه

منبع تغییر	میانگین مربعات	
	درجه آزادی	درصد القای ریشه
ریزنمونه	۲	۸۹۰/۱۵٤ **
سویه باکتری	۳	٤٥۲/۲٥٦ **
ریزنمونه * سویه باکتری	٦	۷/۸۲ ns
خطای آزمایش	۲٤	۹/۸۷
ضریب تغییرات (٪)	-	٪ ۲۲/٤

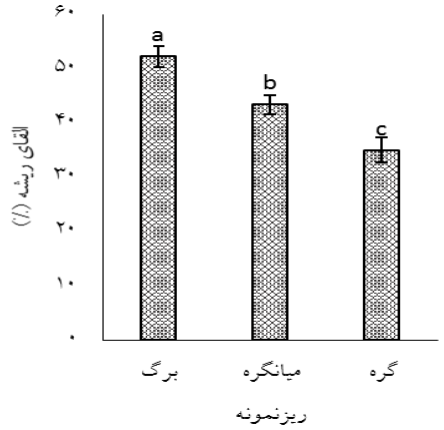
ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪

توانایی القای ریشه در زرین‌گیاه در میان سویه‌های مختلف *R. rhizogenes* با فراوانی بین محدوده ۰-٦٦٪ متفاوت بود. سویه MSU440 بالاترین میانگین فراوانی القای ریشه (٦۲ ٪) و ریزنمونه برگ نیز بالاترین میانگین درصد القای ریشه (٥۲ ٪) را نشان داد. از سوی دیگر، ریزنمونه گره پایین‌ترین نرخ القای ریشه (۳٥ ٪) را نشان داد. همچنین، ریزنمونه‌های شاهد به طور میانگین ۳۷ ٪ القای ریشه طبیعی داشتند که پس از یک هفته علائم نکروز در نوک آن مشاهده شد. فرض بر این است که وجود جوانه جانبی و همچنین هورمون‌های گیاهی درون‌زاد در ریزنمونه‌ها باعث ظاهر شدن این ریشه‌ها شده است. در مطالعه Castellanos-Arevalo et al. (2020) مشاهده شده است که ریزنمونه‌های تولیدکننده ریشه در گروه‌های شاهد غیرتراریخت، درصد القای ریشه معادل یا حتی بیشتر از درصد ریزنمونه‌های تولیدکننده ریشه در تیمارهای آلوده به *R. rhizogenes* بوده است. این ممکن است به این معنا باشد که در شرایط کنترل‌شده و بدون دخالت عوامل خارجی، توانایی تولید ریشه در برخی گیاهان به‌طور طبیعی بالا است (Castellanos-Arévalo et al. 2020). پاسخ متنوع از بافت‌های مختلف گیاهی به نوع سویه *R. rhizogenes* گزارش شده است. در زمینه ریشه مویین زرین‌گیاه، شرفی و همکاران (۲۰۱٤) پنج سویه *R. rhizogenes*، یعنی A4 (٥۲ ٪)، A13 (٦ ٪)، LBA9402 (٤۸ ٪)، MSU440 (۸۹ ٪) و ATCC 15834 (۸۰ ٪) را مورد آزمایش قرار دادند و شرایط بهینه را برای القای ریشه مویین مشخص نمودند که در این میان سویه MSU440 بیشترین اثر را در القای ریشه داشته است که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد (Sharafi et al. 2014). نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه Ahmadi Pozveh et al.

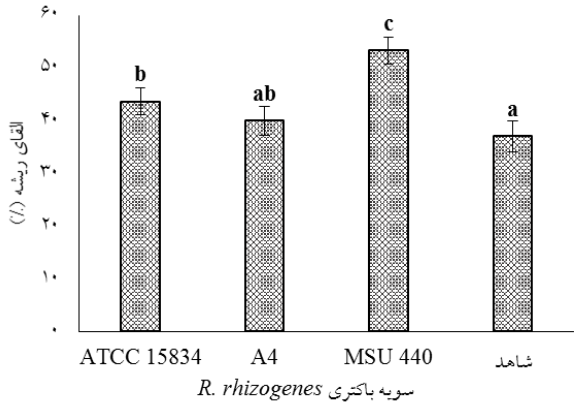
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

(2023) نیز تطابق داشت که نشان داد سویه MSU440 و سن برگ چهار هفته‌ای نیز به‌طور معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی تأثیرگذار هستند (Ahmadi Pozveh et al. 2023).

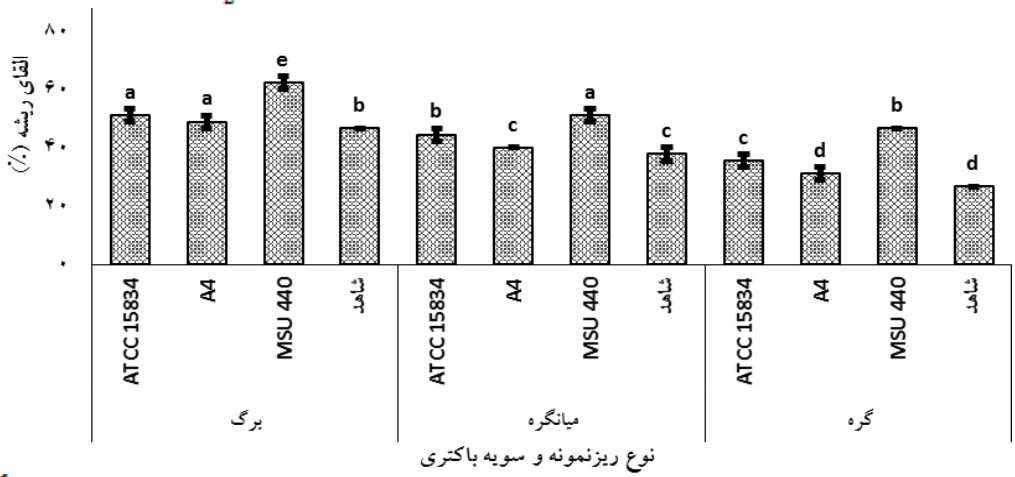
در پژوهشی که با هدف بررسی تأثیر مواد بافری و آنتی‌اکسیدانی بر شاخص رشد و خصوصیات بیوشیمیایی ریشه‌های مویین زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) انجام گرفت نشان داده شد که ریزنمونه‌های حاوی کوتیلدون‌های دو هفته‌ای به‌عنوان بهترین نوع ریزنمونه برای تولید ریشه‌های مویین با استفاده از سویه ATCC 15834 استفاده شدند (Naseri et al. 2020). همچنین در مطالعات دیگری با استفاده از سویه LBA9402 (Fattahi et al. 2013) و سویه ATCC15834 (Nourozi et al. 2019) تولید ریشه‌های مویین زرین‌گیاه مورد بررسی قرار گرفته‌است. براساس گزارش Fattahi et al. (2013)، بالاترین درصد القای ریشه با کمک ۲ mg/L ایندول بوتیریک اسید (IBA) مربوط به ریزنمونه ساقه (۸۵ ٪) است که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت داشت. همچنین محیط‌کشت القای ریشه در مطالعه Nourozi et al. (2019) در مرحله حذف باکتری، محیط $\frac{1}{2}$ MS شامل ۲ mg/L ایندول بوتیریک اسید گزارش شده است.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر میزان القای ریشه در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نوع سویه باکتری *R. rhizogenes* بر میزان القای ریشه در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه باکتری *R. rhizogenes* بر میزان القای ریشه در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS

کشت ریشه‌های مویین *Dracocephalum forrestii*، با استفاده سویه A4 باکتری *R. rhizogenes*، اهمیت نوع و سن ریزنمونه را در دستیابی موفقیت‌آمیز به ریشه‌های مویین این گیاه برجسته کرد. در این مطالعه، ریزنمونه گره چهار هفته‌ای بیشترین فراوانی القای ریشه (۸۲ ٪) را داشتند. در مقابل، ریزنمونه‌های گره و برگ به‌ترتیب ۶۳ و ۲۹ درصد میزان القای کمتری را نشان دادند که این

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

نتایج با پژوهش حاضر مغایرت داشت. این نشان می‌دهد که انتخاب ریزنمونه برای بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین بسته به نوع گونه گیاهی حیاتی است و بافت‌های جوان‌تر، مانند آن‌هایی که از شاخه‌های کشت‌شده در شرایط آزمایشگاهی به‌دست می‌آیند، به تغییر شکل واکنش بیشتری نشان می‌دهند (Weremczuk-Jeżyna et al. 2016).

بهینه‌سازی محیط القای ریشه مویین

در این مطالعه به‌منظور بهینه‌سازی شرایط القای ریشه مویین (ال-آرژنین (A)، استوسیرینگون (B)، ساکارز (C) و نوع محیط‌کشت (D)) بر درصد القای ریشه، از روش سطح پاسخ و طرح بهینه نوع D (D-Optimal Design) استفاده شد. جدول ٤ نتایج مقادیر به‌دست آمده از این آزمایش‌ها را نشان می‌دهد. در ادامه، جدول تجزیه واریانس برای بررسی معناداری اثرات خطی، درجه دوم و متقابل ضرایب معادله رگرسیون برای پاسخ مورد استفاده قرار گرفت (جدول ٤). نتایج نشان داده شده در این جدول حاکی از آن است که اثرات خطی مربوط به غلظت اسیدآمینه ال-آرژنین و نوع محیط‌کشت در سطح ۱٪ و ساکارز در سطح ۵٪ تاثیر معناداری بر درصد القای ریشه داشتند اما اثر خطی مربوط به عامل غلظت استوسیرینگون فاقد اثر معنی‌دار بر میزان القای ریشه می‌باشد. از طرفی اثرات متقابل برخی از متغیرها از جمله A*B و B*D معنی‌دار نبود. همان‌طوری که در جدول ۵ نشان داده شده است، عدم برازش برای پاسخ موردنظر در سطح اطمینان ۹۵ ٪ معنی‌دار نبود؛ بنابراین صحت معادله را برای برازش داده‌ها تأیید می‌کند.

جدول ٤- اجرا و نتایج آزمایش

Run	L- آرژنین (mM)	استوسیرینگون (µM)	ساکارز (mg/L)	محیط کشت	پاسخ: القای ریشه (٪)
۱	۲	۰	۳۰	۱/۲ MS	۱۰
۲	۰/۷٦	۲۰۰	۱۷/۵	۱/٤ MS	۲۰
۳	۲	۸۸	۳۰	۱/٤ MS	۰
٤	۰/۷۷	۷۷	۱۷/۵	۱/۲ MS	۹۰
۵	۲	۲۰۰	۳۰	۱/۲ MS	۰
٦	۰/٤	۹۰	۳۰	۱/۲ MS	۹۰
۷	۲	۲۰۰	۱۰	۱/٤ MS	۱۰
۸	۲	۰	۱۰	۱/٤ MS	۱۰
۹	۰	۰	۱۰	۱/۲ MS	۱۰
۱۰	۰/۹۲	۲۰۰	۱۰	۱/۲ MS	۰
۱۱	۰/۹۲	۰	۱۹/٤	۱/٤ MS	۲۰
۱۲	۰	۰	۳۰	۱/٤ MS	۱۰
۱۳	۰/۱٦	۱۰۰	۲۲/٤۳	۱/٤ MS	۱۰۰
۱٤	۱/۲۵	۱۰۰	۱۱/٦	۱/٤ MS	۹۰
۱۵	۱/۲٦	۱۸۹	۲۹	۱/٤ MS	۲۰
۱٦	۲	۲۰۰	۱۰	۱/٤ MS	۰
۱۷	۲	۰	۳۰	۱/۲ MS	۱۰
۱۸	۲	۹۰	۱٤	۱/۲ MS	۹۰
۱۹	۰/۹۲	۲۰۰	۱۰	۱/۲ MS	۱۰
۲۰	۰	۱۱٦	۱۰	۱/٤ MS	۸۰
۲۱	۰	۰	۱۰	۱/۲ MS	۰
۲۲	۲	۲۰۰	۳۰	۱/۲ MS	۲۰
۲۳	۰	۲۰۰	۱۹/۲۷	۱/۲ MS	۱۰
۲٤	۰	۲۰۰	۳۰	۱/٤ MS	۱۰

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

با تجزیه رگرسیون این داده‌ها، معادله متغیرهای ال-آرژنین (A)، استوسیرینگون (B)، ساکارز (C) برای هر یک از محیط‌های کشت بر میزان القای ریشه به‌صورت رابطه‌های زیر بیان شد:

القای ریشه (%) = محیط‌کشت ۱/۲ MS

$-43.2+54.4A+1.02B+6.02C+0.03A * B-1.2A * C+0.005B * C-13.7A^{۲} -0.006B^{۲}-01C^{۲}$

القای ریشه (%) = محیط‌کشت ۱/٤ MS

$+4.4+29.1A+1.1B+3.7C+0.0A * B-1.2A * C+0.005B * C-13.7A^{۲}-0.006B^{۲}-0.1C^{۲}$

همان‌طور که از جدول تجزیه واریانس مشخص است، عبارت‌هایی که ارزش P آن‌ها کمتر از ۰/۰۵ باشد، از لحاظ آماری می‌تواند داده‌ها را با خطای کمتر از ۵ ٪ را پیش‌بینی کنند. در واقع هرچه ارزش P یک عبارت کوچک‌تر باشد معنای آن عبارت در معادله بیشتر خواهد بود. همچنین مقادیر بالای $R^{۲}$ (۰/۹۷)، $R^{۲}$ تعدیل شده (۰/۹۳) و$R^{۲}$ پیش‌بینی شده (۰/۷۱) نشان‌دهنده مناسب بودن معادله است.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم برای درصد القای ریشه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل**	۲۹٤٥۲/۲۹	۱۳	۲۲٦٥/٥٦	۲٦/۸٦	۰/۰۰۰۱
ال-آرژنین (A) **	٦۷٥/٦٥	۱	٦۷٥/٦٥	۸/۰۱	۰/۰۱۷۸
استوسیرینگون (B)	۱٦۳/٥٦	۱	۱٦۳/٥٦	۱/۹٤	۰/۱۹٤۰
ساکارز (C) *	٤۲۰/٦۱	۱	٤۲۰/٦۱	٤/۹۹	۰/۰٤۹٦
محیط کشت (D) **	۹٥۹/٥۷	۱	۹٥۹/٥۷	۱۱/۳۸	۰/۰۰۷۱
^{ns}AB	۱۱٤/۰٤	۱	۱۱٤/۰٤	۱/۳٥	۰/۲۷۱۹
**AC	۱٥۱۸/۲۹	۱	۱٥۱۸/۲۹	۱۸/۰۰	۰/۰۰۱۷
**AD	۱۸۲۹/٤۸	۱	۱۸۲۹/٤۸	۲۱/٦۹	۰/۰۰۰۹
*BC	۳۹۱/٦۱	۱	۳۹۱/٦۱	٤/٦٤	۰/۰٥٦٦
^{ns}BD	۲۷۳/۳٦	۱	۲۷۳/۳٦	۳/۲٤	۰/۱۰۲۰
**CD	۱٦۸۸/۱۰	۱	۱٦۸۸/۱۰	۲۰/۰۱	۰/۰۰۱۲
*$A^{۲}$	٦۱۱/۳۸	۱	٦۱۱/۳۸	۷/۲٥	۰/۰۲۲٦
**$B^{۲}$	۱٦۳۷٥/۱٥	۱	۱٦۳۷٥/۱٥	۱۹٤/۱۲	۰/۰۰۰۱
$^{ns}C^{۲}$	۳۷۸/۹٦	۱	۳۷۸/۹٦	٤/٤۹	۰/۰٦۰۱
باقی‌مانده	۸٤۳/٥٥	۱۰	۸٤/۳٥	–	–
عدم برازش	٤۹۳/٥٥	٥	۹۸/۷۱	۱/٤۱	۰/۳٥۷٦
خطای خالص	۳٥۰/۰۰	٥	۷۰/۰۰	–	–
کل	۳۰۲۹٥/۸۳	۲۳	–	–	–

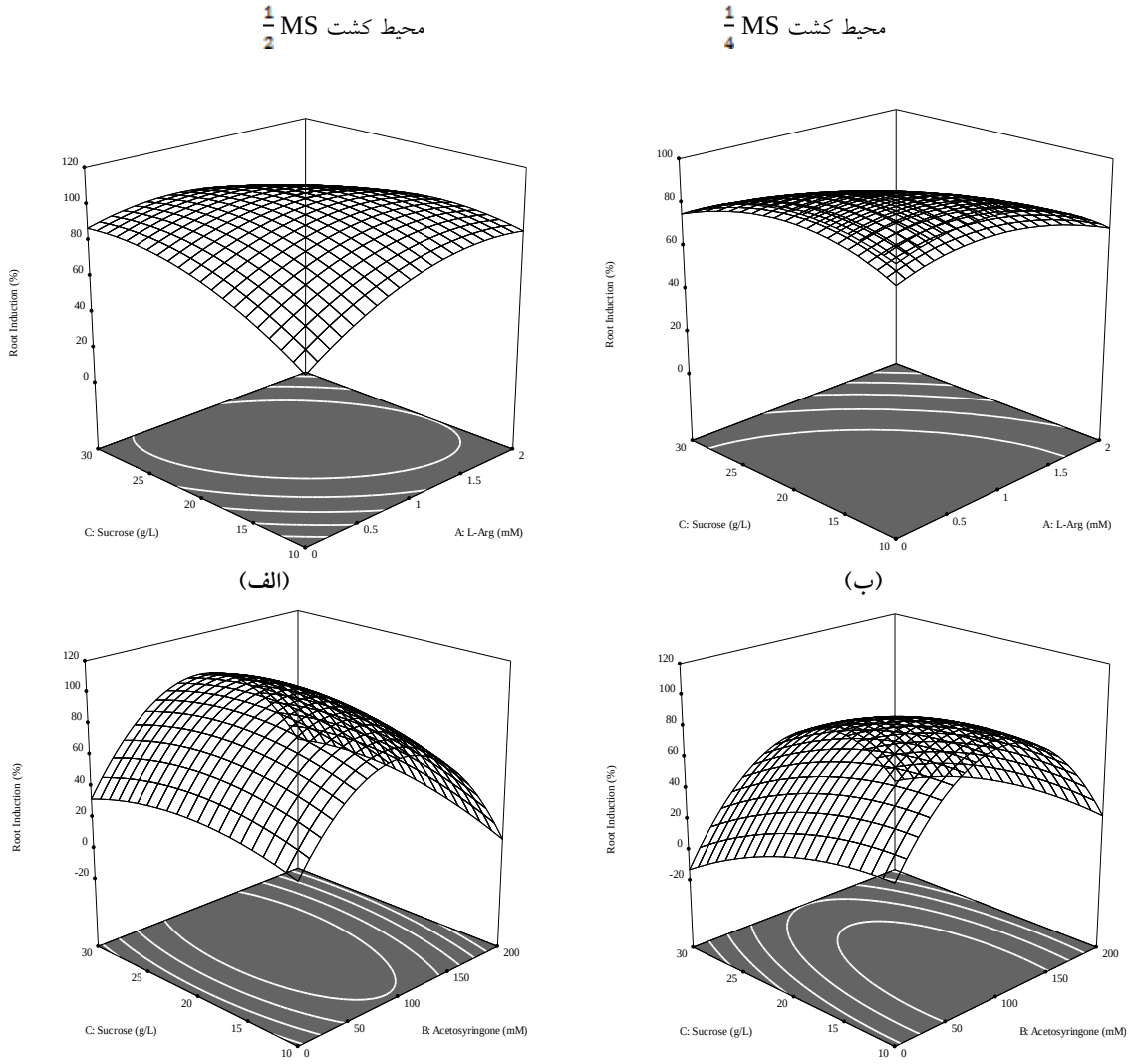
* و ** به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪

برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مستقل و پاسخِ مشاهده شده از رسم نمودار سه بعدی سطح پاسخ استفاده شد (شکل ٤). در هر نمودار اثر دو متغیر در حالتی‌که متغیر سوم در نقطه مرکزی قرار دارد، بررسی شده است. با نگاه به این نمودارها می‌توان دریافت که بیشترین میزان درصد القای ریشه مربوط به محدوده‌ای می‌باشد که میزان اولیه اسیدآمینه ال-آرژنین محیط در حدود mM ۰/۵ – ۱، غلظت استوسیرینگون در حدود µM ۸۵ –۱۱۰ و میزان ساکارز در حدود g/L ۱۵–۲۰ است. همان‌طور که از نمودارها مشخص است با افزایش یا کاهش مقادیر عامل‌های ذکر شده، شاهد کاهش یا افزایش میزان درصد القای ریشه خواهیم بود (شکل ٤).

اسیدهای آمینه و نیتروژن‌های آلی در بهبود کشت مؤثر هستند. اسیدهای آمینه نوع اِل به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارند. با توجه به نقش اسیدآمینه ال- آرژنین در ریشه‌زایی (Sayed-Tabatabaei and Omidi 2021)، مطالعات نشان داده است که افزودن ال-آرژنین نه تنها منجر به افزایش فراوانی تراریختی ریشه مویین می‌شود بلکه کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های زخم شده را به دنبال دارد (Henzi et al. 2000; Sharafi et al. 2014). مطالعات همچنین اثر اسیدآمینه L-گلوتامین بر القای ریشه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

زرین‌گیاه را نشان داده است. ال-گلوتامین می‌تواند به‌طور مؤثری فرآیند ریشه‌زایی را تقویت کند و بهبود چشمگیری در درصد ریشه‌زایی زرین‌گیاه ایجاد کند (Ahmadi Pozveh et al. 2023). Sharafi et al. (2014) مطالعه قابل توجهی با هدف بهینه‌سازی اثرات همزمان محیط‌های هم‌کشت و سویه‌های مختلف باکتریایی انجام دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که فراوانی القا به‌طور قابل توجهی با اصلاح اجزای شیمیایی از جمله حذف برخی از مواد درشت‌مغذی مانند NH_4NO_3، KH_2PO_4 و $CaCl_2$ از محیط هم‌کشت افزایش یافته است (Sharafi et al. 2014). در پژوهش کارجو و فتاحی (۱۴۰۱)، نتایج به‌دست‌آمده از بهینه‌سازی غلظت ساکارز و pH محیط‌کشت با استفاده از RSM نشان داد که بیشترین وزن خشک ریشه‌های مویین در گیاه شابیزک شامل محیط‌کشت MS $\frac{1}{2}$ حاوی ۳۰ g/L ساکارز و pH برابر با ۵/۸ بود (Fattahi and Karjo 2022).



شکل ٤- نمایش نمودارهای سه‌بعدی اثر همزمان ال-آرژنین (A)، استوسیرینگون (B) و ساکارز (C) بر میزان درصد القای ریشه در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ (سمت چپ: الف و ج) و MS $\frac{1}{4}$ (سمت راست: ب و د). محور عمودی صفت میزان القای ریشه (٪) برای همه نمودارها و محورهای پایه مربوط به اثر متقابل (AC) و (BC) است.

کاربرد روش سطح پاسخ (RSM) در بهینه‌سازی شرایط کشت به‌طور گسترده در سال‌های اخیر برای مطالعات القای کالوس (Amdoun et al. 2020; Bagherieh-Najjar and Nezamdoost 2016; Erst et al. 2022; Fathil et al. 2017; Li et al. 2022; Tandon et al. 2021)، کشت سوسپانسیون سلولی (Bansal et al. 2017; Chattopadhyay et al. 2002)، باززایی (Chakraborty et

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

al. 2010) و کشت ریشه مویین (Amdoun et al. 2010; Ryad et al. 2010a) مورد بررسی قرار گرفته است و کارایی و تطبیق‌پذیری روش RSM در بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت گیاهی را نشان می‌دهد. در مجموع، این مطالعات توانایی RSM را برای اصلاح جنبه‌های مختلف کشت بافت، از شرایط رشدی گرفته تا ترکیب محیط و عوامل محیطی نشان می‌دهد.

در پژوهش Sabokdast et al. (2021) روش بهینه‌سازی القای ریشه مویین به‌صورت طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در زرین‌گیاه انجام شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داده است، تولید ریشه مویین در زرین‌گیاه تحت تاثیر نوع، سن ریزنمونه و همچنین محیط‌کشت است. بیشترین درصد القای ریشه مویین در محیط کشت نیمه‌غلظت MS حاوی ۱ mM اسیدآمینه L- آرژنین (۴۶/۹۳ درصد) و ریزنمونه هیپوکوتیل دوهفته‌ای (۷۳/۵۵ درصد) و کمترین درصد در ریزنمونه برگ پنج هفته‌ای (۱۴/۶۶ درصد) گزارش شده است (Sabokdast et al. 2021). در مطالعه Amdoun و همکاران (۲۰۱۰)، بهترین غلظت‌های مؤلفه‌ها در کشت ریشه مویین شابیزک در محیط کشت B5 به‌صورت ۷۹/۱ mM ([NO3−])، ۱۱/۴ mM ([Ca2+]) و ۴۲/۹ mg/L ساکارز به‌دست آمده است که با استفاده از شرایط بهینه‌سازی‌شده، سطح هیوسیامین تولید شده نسبت به شرایط شاهد تقریباً دو برابر افزایش یافته است (Ryad et al. 2010b).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کاربرد روش RSM به‌خاطر توانایی آن در بررسی تاثیر هم‌زمان میان متغیرها و ضرورت انجام آزمایش‌های کمتر، می‌تواند به طرز مؤثری به بهینه‌سازی فرایندها در مطالعات زیستی کمک کند.

یافتن نقاط بهینه

به‌منظور یافتن نقاط بهینه شرایط کشت برای میزان القای ریشه، رابطه‌ی ۱ با قرار دادن مقادیر متغیرهای مستقل در محدوده بهینه (انتخاب گزینه in range در نسخه آزمایشی نرم‌افزار Design-Expert® 13.0) و قرار دادن مقدار پاسخ درصد القای ریشه در محدوده بیشترین میزان (maximize) حل شد. اولین راه‌حل این معادله با نقطه مطلوبیت ۰/۹۹۷ نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه (۹۹/۷۲ ٪) در شرایط غلظت ۱ mM ال-آرژنین، µM ۹۳/۹۷ استوسیرینگون و g/L ۲۰ ساکارز و محیط کشت MS ۱/۲ به‌دست خواهد آمد. بقیه راه‌حل‌ها در جدول ۵ ارائه شده است.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

ماهیت تراریختگی ریشه‌های مویین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی ژن *rolC* تأیید شد. DNA استخراج‌شده از ریشه‌های مویین، محصول PCR مورد انتظار به طول ۶۲۶ جفت‌باز را تکثیر کرد. هیچ محصول PCR به طول ۴۳۸ جفت باز مربوط به ژن *virD* در ریشه‌های مویین تحت مطالعه مشاهده نشد که نشان‌دهنده فقدان آلودگی باکتریایی است. در نهایت، برای ریشه‌های غیرتراریخت و کنترل منفی (DNA ژنومی از ریشه طبیعی)، هیچ قطعه تکثیر شده از ژن *rolC* شناسایی نشد (شکل ۵). ریشه‌های مویین توسط آلوده شدن بافت گیاهی با *R. rhizogenes* تولید می‌شوند (Guillon et al. 2006). در واقع باکتری در پاسخ به ترشح ترکیبات فنولی مثل استوسیرینگون ترشح شده از محل زخم، میزبان گیاهی خود را آلوده و ناحیه‌ای انتقالی T-DNA از پلاسمید القا کننده ریشه (Ri) که حاوی ژن‌های *rol* و ژن‌های سنتز اوپین می‌باشد را با کمک ژن‌های عامل بیماریزایی *vir* و *chv* که خارج از ناحیه T-DNA است در ژنوم آن ادغام می‌کند (Biswas et al. 2023).

استقرار ریشه‌های مویین

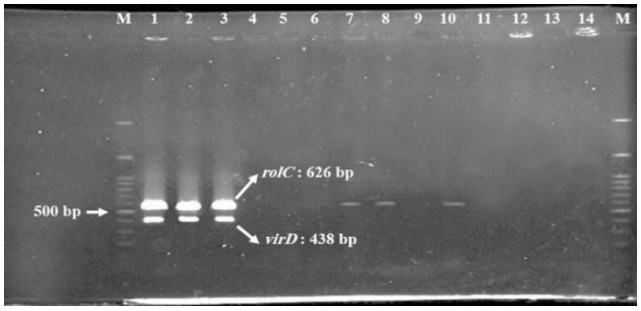
به‌منظور انتخاب محیط‌کشت مناسب برای مقایسه رشد لاین‌های ریشه مویین تایید شده دو نوع محیط کشت با سه لاین مورد بررسی قرار گرفتند که براساس تجزیه و تحلیل نتایج، تفاوت معنی‌داری بین دو نوع محیط‌کشت در سطح ۵ ٪ مشاهده شد (شکل ۶) اما هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مورد آزمایش وجود نداشت (شکل ۷).

همچنین اثر متقابل لاین و محیط کشت در سطح ۵ ، معنی‌دار بود (شکل ۸). براین‌اساس بالاترین تعداد نوک ریشه مربوط به لاین شماره ۲ رشد یافته در محیط $\frac{1}{4}$ MS با ۸۵ عدد نوک ریشه شمارش شده همراه بود. در پژوهش Duran and Yu (1994)، نتایج نرخ رشد ویژه بر اساس تعداد نوک ریشه‌های مویین *Atropa belladonna* محاسبه شده است. این موضوع نشان‌دهنده وجود رابطه میان تعداد نوک ریشه و سرعت رشد ریشه‌ها است (Yu and Doran 1994).

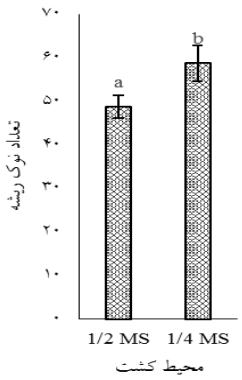
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

جدول ۵- راه‌حل‌های ارائه شده جهت پیش‌بینی نقاط بهینه

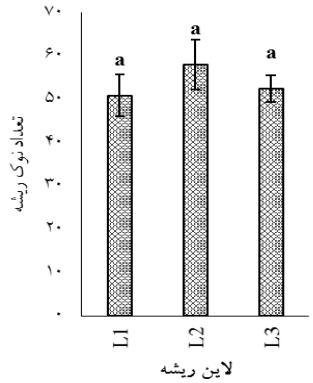
شماره	ال-آرژنین (mM)	استوسیرینگون (µM)	ساکارز(g/L)	محیط-کشت	القای ریشه (٪)	مطلوبیت
۱	۱/۰۰۰	۹۳/۹۷٤	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۹/٦۳٦	۰/۹۹۷
۲	۱/۰۰۰	۹٤/۰٦٥	۱۹/۸٤۳	۱/۲ MS	۹۹/٦۰۳	۰/۹۹٦
۳	۱/۰۰۰	۹۸/۲۸٤	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۹/٥٥۰	۰/۹۹٦
٤	۰/۹٦۷	۹٤/۳۳۹	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۹/۳۳۳	۰/۹۹٥
٥	۰/۹۳٥	۹٥/۸٥٤	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۹/۲۲۲	۰/۹۹۳
٦	۰/۹٥۳	۱۰۰/۱۲۹	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۹/۱٦۱	۰/۹۹۲
۷	۱/۰۰۰	۸٥/٤٤٦	۱۹/۷۷٦	۱/۲ MS	۹۹/۰٦۷	۰/۹۹۲
۸	۱/۰۰۰	۸۳/۷۰٦	۱۹/۹۹۳	۱/۲ MS	۹۸/٤۱٤	۰/۹۹۱
۹	۰/۸٦۲	۱۰۱/٥۲۸	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۸/۲۸۸	۰/۹۸٤
۱۰	۰/۸٥۳	۸٥/۰۲۹	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۸/۱۷۰	۰/۹۸۳
۱۱	۰/۸۰۲	۸۹/۷۱٦	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹۸/۱٦٤	۰/۹۸۲
۱۲	۱/۰۰۰	۱۰۹/۷٤۸	۲۰/۰۰۰	۱/۲ MS	۹٤/۱۲۲	۰/۹۸۲
۱۳	۰/٥۰۰	۹۷/۲۳۷	۱٥/٤۳۱	۱/٤ MS	۹٤/۱۱٦	۰/۹٤۱
۱٤	۰/٥۰۲	۹٦/٥٦۸	۱٥/۲۸۱	۱/٤ MS	۹۹/٦۳٦	۰/۹٤۱



شکل ۵- تصویر حاصل از الکتروفورز ژل آگارز ۱ ٪. چاهک ۳-۱: Ri-پلاسمید از سویه‌های رایزوبیوم رایزوژنز (به‌ترتیب از چپ به راست: ATCC 15834، A4 و MSU440) به‌عنوان کنترل مثبت، چاهک ۱۲-٤: لاین‌های کاندید جهت اثبات تراریختی ریشه‌های مویین، چاهک شماره ۷ و ۸ مربوط به DNA ژنومی ریشه مویین به‌دست آمده از ریزنمونه برگ و چاهک شماره ۱۰ از ریزنمونه میانگره هستند. ۱۳: آب‌مقطر، ۱٤: DNA ژنومی از ریشه طبیعی به‌عنوان کنترل منفی، لدر: (۱۰۰-۳۰۰۰ جفت باز، سیناکلون، ایران)، (محصولات PCR: ژن rolC (٦۲٦ جفت‌باز) و virD (٤۳۸ جفت‌باز)).

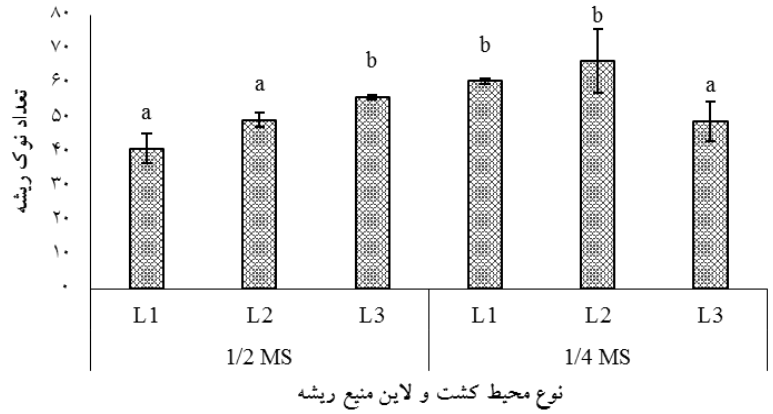


شکل ٦- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت ($\frac{1}{4}$ MS و $\frac{1}{4}$ MS) بر تعداد نوک ریشه

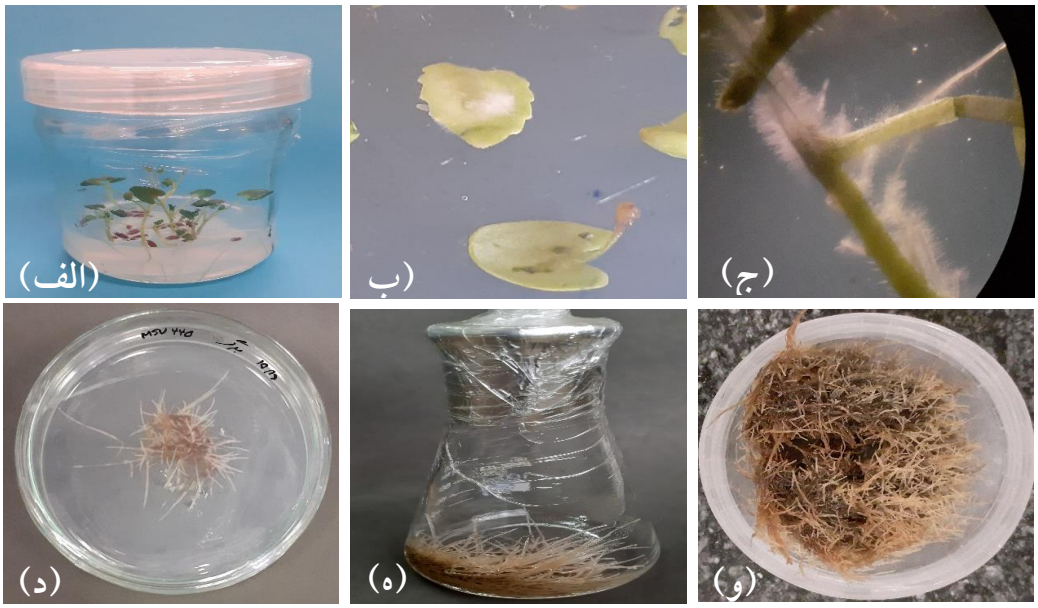


شکل ۷- مقایسه میانگین اثر لاین ریشه مویین (L1، L2 و L3) به‌دست آمده از سویه MSU440 بر تعداد نوک ریشه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت و لاین ریشه مویین بر صفت اندازه‌گیری شده تعداد نوک ریشه



شکل ۹- (الف) گیاهچه‌های زرین‌گیاه کشت شده در محیط MS کامل. (ب) ظهور ریشه در محل آلودگی به *رایزوبیوم رایزوژنز* بر روی ریزنمونه برگ (بزرگ‌نمایی: ۱۰×) و (ج) ریزنمونه میانگره (بزرگ‌نمایی: ۲۰×). (د) رشد ریشه‌های قطع شده از ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS $\frac{1}{4}$ فاقد تنظیم کننده‌های رشد در پتری دیش. (ه) رشد در محیط کشت مایع MS $\frac{1}{4}$ فاقد تنظیم کننده‌های رشد. (و) لاین ریشه مویین تایید شده حاصل از ریزنمونه برگ و سویه MSU440.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه طرح بهینه نوع D از روش‌شناسی سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی القای ریشه‌های تغییر یافته ژنتیکی با Ri-پلاسمید در *Dracocephalum kotschyi* Boiss استفاده شد. طرح آزمایشی بر غلظت‌های مختلف اسیدآمینه ال-آرژینین، استوسیرینگون به‌عنوان یک فنول طبیعی، منبع کربن ساکارز و دو نوع محیط کشت، تمرکز داشت. این عوامل برای به حداکثر رساندن میزان القای ریشه با حداقل تعداد آزمایش انتخاب شدند. نتایج ما نشان می‌دهد که ترکیب‌های خاص ال-آرژنین و ساکارز با غلظت بهینه به‌طور قابل‌توجهی بر فراوانی القای ریشه مویین زرین‌گیاه تأثیر می‌گذارد. استفاده از RSM امکان توسعه یک معادله پیش‌بینی را فراهم کرد که به طور موثر شرایط بهینه را برای افزایش بازده شناسایی می‌کند. همچنین با توجه به بررسی سرعت رشد لاین‌های ریشه تراریخته، لاین به‌دست آمده از سویه MSU440 که در محیط جامد MS $\frac{1}{4}$ رشد کرده بود، انتخاب شد. به‌طورکلی این پژوهش به بررسی اثرات ترکیبات مذکور در بهبود کارایی القای ریشه‌های مویین پرداخته و راهکار نوآورانه‌ای را

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

برای بهینه‌سازی این فرآیند که منجر به غربالگری بهترین لاین ریشه مویین می‌شود ارائه می‌دهد.

منابع

Ahmadi Pozveh A, Talebi M, and Sayed Tabatabaei BE (2023) The effect of L-glutamine and medium culture on hairy root culture of Dracocephalum kotschyi Boiss. Plant Process and Function 12:285-298.

Amdoun R, Benyoussef EH, Benamghar A, Sahli F, Bendifallah N, Khelifi L (2021) Approaches for Modeling and Optimization of the Secondary Metabolite Production by Plant Biotechnology Methods. Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications 803-836.

Amdoun R, Khelifi L, Khelifi-Slaoui M, Amroune S, Asch M, Assaf-Ducrocq C, and Gontier E (2010) Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited Datura stramonium L. hairy roots using the response surface methodology (RSM). International journal of molecular sciences 11: 4726-4740.

Amdoun R, Sahli F, Hamadache K, Ouzzane AH, Khelifi-Slaoui M, Moustafa K, Hefferon K, Makhzoum A, and Khelifi L (2020) Optimization of caulogenesis in Populus nigra under lead (Pb) stress via response surface methodology (RSM) and desirability function analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 142:41-50.

Bagherieh-Najjar MB, and Nezamdoost T (2016) Optimization of shikonin production in Onosma dichroantha callus using response surface methodology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126:399-409.

Bansal M, Sudhakara Reddy M, and Kumar A (2017) Optimization of cell growth and bacoside-A production in suspension cultures of Bacopa monnieri (L.) Wettst. using response surface methodology. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 53:527-53.

Biswas D, Chakraborty A, Mukherjee S, and Ghosh B (2023) Hairy root culture: a potent method for improved secondary metabolite production of Solanaceous plants. Frontiers in Plant Science 14:1197555.

Castellanos-Arévalo AP, Estrada-Luna AA, Cabrera-Ponce JL, Valencia-Lozano E, Herrera-Ubaldo H, De Folter S, Blanco-Labra A, and Délano-Frier JP (2020) Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of grain (Amaranthus hypochondriacus) and leafy (A. hybridus) amaranths. Plant Cell Reports 39:1143-1160.

Chakraborty D, Bandyopadhyay A, Bandopadhyay S, Gupta K, and Chatterjee A (2010) Use of response surface methodology for optimization of a shoot regeneration protocol in Basilicum polystachyon. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 46:451-459.

Chattopadhyay S, Srivastava A, and Bisaria V (2002) Optimization of culture parameters for production of podophyllotoxin in suspension culture of Podophyllum hexandrum. Applied biochemistry and biotechnology 102: 381-393.

Erst AA, Petruk AA, Erst AS, Krivenko DA, Filinova N V, Maltseva SY, Kulikovskiy MS, and Banaev EV (2022) Optimization of biomass accumulation and production of phenolic compounds in callus cultures of Rhodiola rosea L. using design of experiments. Plants 1:124-1.

Fathil NAM, Puad NIM, Amid A, Azmi AS, and Ibrahim, R (2017) Optimization of plant growth regulators for Citrus suhuiensis callus induction. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 25:75-81.

Fattahi M, and Karjo B (2022) Optimization of the Effect of Culture Medium and Sucrose Concentration and pH on the Production of Hairy Roots of Atropa belladonna L. Using the Response Surface Methodology (RSM) Under In Vitro Condition. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 23:661-674.

Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Zamani Z, Palazon J (2013) A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of Dracocephalum kotschyi Boiss. Industrial Crops and Products 50:256-263.

Gutierrez-Valdes N, Häkkinen ST, Lemasson C, Guillet M, Oksman-Caldentey KM, Ritala A, and Cardon F (2020). Hairy Root Cultures-A Versatile Tool With Multiple Applications. Frontiers in Plant Science 11.

Henzi MX, Christey MC, and McNeil DL (2000) Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli (Brassica oleracea L. var. italica). Plant Cell Rep 19:994-999.

Heydari P, Yavari M, Adibi P, Asghari G, Ghanadian SM, Dida GO, and Khamesipour F (2019) Medicinal properties and active constituents of Dracocephalum kotschyi and its significance in Iran: a systematic review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2019.

Jahaniani F, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, and Mahmoudian M (2005) Xanthomicrol is the main cytotoxic component of Dracocephalum kotschyii and a potential anti-cancer agent. Phytochemistry 66:1581-1592.

Jalili A, and Jamzad Z (1999). Red data book of plant species of Iran.

Khan S, Qureshi MI, Alam T, and Abdin M (2007) Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology 6:175-178.

Khan SA, Siddiqui MH, and Osama K (2018). Bioreactors for hairy roots culture: a review. Current Biotechnology 7:417-427.

Li C, Wang M (2021) Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. Current pharmaceutical biotechnology 22:592-608.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]

Li Y, Saravana Kumar P, Liu Y, Qiu J, Ran Y, Yuan M, Fang X, Tan X, Zhao R, and zhu J (2022) Tailoring enhanced production and identification of isoflavones in the callus cultures of Pueraria thomsonii Benth and its model verification using response surface methodology (RSM): A combined in vitro and statistical optimization. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 11:37.

Maskani Sereshkeh F, Azizi A, and Noroozisharaf A (2019) Structure of genetic diversity among and within populations of the endemic Iranian plant Dracocephalum kotschyi. Horticulture, Environment, and Biotechnology 60:767-777.

Naseri F, Hosseini B, and Naseri L (2020) Effects of buffer materials and antioxidants on growth rate and biochemical characteristics of Dracocephalum kotschyi Boiss. hairy roots. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 35:977-990.

Naseri F, Hosseini B, Naseri L (2020) Effects of buffer materials and antioxidants on growth rate and biochemical characteristics of Dracocephalum kotschyi Boiss. hairy roots. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 35:977-990.

Nourozi E, Hosseini B, Maleki R, and Mandoulakani BA (2019) Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in Dracocephalum kotschyi hairy roots elicited by SiO2 nanoparticles. Industrial Crops and Products 133:435-446.

Ryad A, Lakhdar K, Majda KS, Samia A, Mark A, Corinne AD, and Eric G (2010a) Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited Datura stramonium L. hairy roots using the Response Surface Methodology (RSM). International journal of molecular sciences 11:4726-4740.

Ryad A, Lakhdar K, Majda KS, Samia A, Mark A, Corinne AD, and Eric G (2010b) Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited Datura stramonium L. hairy roots using the Response Surface Methodology (RSM). Int J Mol Sci 11:4726-40.

Sabokdast M, Kiani H, Omidi M, Asadi Aghbolaghi M (2021) Optimization of hairy root induction in Dracocephalum kotschyi Boiss and the effect of L-arginine on their growth. In" Fifth International Congress on Agricultural and Environmental Development with emphasis on the United Nations Development Program", Tehran.

Sayed-Tabatabaei BE, Omidi M (2021) "Plant tissue and cell culture," University of Tehran Press (UTP) Publication.

Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, and Sharafi AA (2014) Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant Dracocephalum kotschyi. Physiology and Molecular Biology of Plants 20:257-262.

Tandon B, Anand U, Alex BK, Kaur P, Nandy S, Shekhawat MS, Sanyal R, Pandey DK, Koshy EP, and Dey A (2021) Statistical optimization of in vitro callus induction of wild and cultivated varieties of Mucuna pruriens L. (DC.) using response surface methodology and assessment of L-Dopa biosynthesis. Industrial Crops and Products 169:113626.

Weremczuk-Jeżyna I, Skała E, Olszewska MA, Kiss AK, Balcerczak E, Wysokińska H, and Kicel A (2016) The identification and quantitative determination of rosmarinic acid and salvianolic acid B in hairy root cultures of Dracocephalum forrestii WW Smith. Industrial Crops and Products 91:125-131.

Zamani SS, Hossieni M, Etebari M, Salehian P, and Ebrahimi SA (2016) Pharmacokinetics of calycopterin and xanthmicrol, two polymethoxylated hydroxyflavones with anti-angiogenic activities from Dracocephalum kotschyi Bioss. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 24: 1-10.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-25]