



Methyl Jasmonate and Chitosan Enhanced the Antioxidant Content of *Calotropis procera* Hairy Root

Fateme AliAskari ¹ | Manizheh Sabokdast Nodehi ² ✉ | Mohammadreza Naghavi ³

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: fateme.aliaskari@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: sabokdast@ut.ac.ir
3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: mnaghavi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: May 08, 2025
Revised: July 15, 2025
Accepted: July 19, 2025

Keywords:

Calotropis procera,
elicitor,
hairy root,
Rhizobium rhizogenes,
secondary metabolites.

Extended Abstract

Introduction. *Calotropis procera*, a prominent medicinal plant native to the dry regions of Asia and Africa, is widely recognized for its medicinal properties. The plant is a rich source of bioactive compounds, particularly flavonoids, phenolic acids, and alkaloids, which are known for their anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. Given the increasing demand for these valuable compounds, the development of efficient *in vitro* propagation systems, especially hairy root culture, is crucial for enhancing the production of secondary metabolites. This has led to significant interest in exploring sustainable methods to scale up production without relying on wild plant populations. In this study, we aimed to establish an effective method for inducing and maintaining hairy root cultures of *C. procera*, to evaluate the growth curve and assess the effects of different elicitors on secondary metabolite production, particularly focusing on phenolic and flavonoid content and antioxidant activity.

Materials and Methods. The first step in the study involved seed germination and the preparation of explants. Seeds of *C. procera* were germinated in MS medium, and 30-day-old seedlings were used to prepare explants from different parts, including leaves, stems and, roots. The explants were then subjected to inoculation as pretreatment with *Rhizobium rhizogenes* (formerly *Agrobacterium rhizogenes*), a bacterium known for its ability to induce hairy roots in plants. The induction process was further optimized by analyzing the effect of bacterial strains and explant types on the efficiency of root induction.

Results and Discussion. Among the bacterial strains tested, *R. rhizogenes* strain LBA9402 exhibited the highest efficiency in hairy root induction, with leaf explants showing the most significant response. Following inoculation, hairy roots were successfully induced and confirmed by PCR analysis, targeting the *rolB* gene, which is characteristic of transgenic hairy roots. PCR results showed that the *rolB* was amplified from the hairy roots, confirming the transgenic nature of the emerged roots. Results indicated that LBA9402 was the most effective strain, and leaf explants yielded the highest rate of root induction. The next phase of the study focused on the growth characteristics of the induced hairy roots. After several subcultures, the growth of the hairy roots was monitored in liquid MS medium containing 30 gL⁻¹ sugar, and fresh and dry weights were measured at regular intervals. The growth curve indicated that the highest fresh and dry weights of the hairy roots were recorded on days 28 and 24, respectively. These measurements were used to draw a growth curve for the selected hairy root line, which will be crucial for optimizing the production of secondary metabolites. In parallel with growth studies, the effects of two elicitors, chitosan and methyl jasmonate, on the production of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity in hairy root cultures were evaluated. The elicitors were applied at different concentrations and time intervals, and the total phenolic and flavonoid content were measured using standard assays. The results showed that methyl jasmonate at a concentration of 10 µM significantly increased the production of flavonoid compounds, especially within the first 24 hours. The results of total phenolic content measurement within 48 hours in the presence of 50 µM methyl jasmonate elicitor were higher (2927.22 µg GAE/g FW) than other groups and the highest antioxidant activity, as measured by the DPPH assay, was observed in the methyl jasmonate-treated roots, suggesting that this elicitor has a strong potential for enhancing the antioxidant properties of *C. procera* hairy roots.

Conclusion. This study contributes to the development of an efficient *in vitro* culture system for *C. procera*, providing insights into the optimization of conditions for hairy root induction and secondary metabolite production. The findings emphasize the role of bacterial strain selection, explant type, and elicitor treatments in enhancing the yield of valuable compounds. These results also suggest that methyl jasmonate is a potent elicitor for the production of phenolic and antioxidant compounds in *C. procera* hairy root cultures, making it a promising candidate for large-scale production of these bioactive metabolites. Further research is needed to explore the molecular mechanisms underlying the effects of elicitors on secondary metabolite biosynthesis and to optimize the production of other bioactive compounds in *C. procera*. These findings serve as an important prerequisite for future experiments in the field of hairy root cultivation, aimed at producing secondary metabolites in this valuable medicinal plant.

Cite this article: AliAskari, F., Sabokdast Nodehi, M., & Naghavi, M.R. (2025). Methyl jasmonate and chitosan enhanced the antioxidant content of *Calotropis procera* hairy root. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 56(4), 105-120. DOI: 10.22059/ijfcs.2025.390829.655131.



© The Authors.

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: [10.22059/ijfcs.2025.390829.655131](https://doi.org/10.22059/ijfcs.2025.390829.655131)



انتشارات دانشگاه تهران

علوم گیاهان زراعی ایران

شماره الکترونیکی: ۸۰۸۲-۲۴۲۳

Homepage: <https://ijfcs.ut.ac.ir/>

الیستورهای متیل جاسمونات و کیتوزان محتوای آنتی اکسیدانی ریشه مویین استبرق (*Calotropis procera*) را بهبود بخشید

فاطمه علی عسکری^۱ | منیژه سبکدست نودهی^۲ | محمدرضا نقوی^۳

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: fateme.aliaskari@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: sabokdast@ut.ac.ir

۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mnaghavi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۸ کلیدواژه‌ها: استبرق، الیستور، رایزوبیوم رایزوترنر، ریشه مویین، متابولیت‌های ثانویه.	استبرق (<i>Calotropis procera</i>) گیاهی دارویی و صنعتی است که در ایران می‌روید. هدف پژوهش حاضر، القای ریشه‌های مویین در این گیاه و استفاده از الیستور برای تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای است. عوامل بررسی شده برای القای ریشه شامل دو نوع ریزنمونه (برگ و ساقه) و دو سویه از باکتری <i>Rhizobium rhizogenes</i> (LBA9402 و A4) بود. همچنین، تأثیر دو الیستور متیل-جاسمونات (50 و $100 \mu\text{M}$) و کیتوزان (100 و 150 mgL^{-1}) به مدت 24 و 48 ساعت بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که القای ریشه‌مویین در ریزنمونه برگ سریع‌تر از ساقه و بیشترین درصد القای ریشه مربوط به برگ تلقیح‌شده با LBA9402 است. ماهیت تراریختی ریشه‌ها با استفاده از ردیابی بخشی از ژن <i>rolB</i> از طریق واکنش PCR تایید و کشت ریشه‌مویین منتخب در محیط کشت مایع $\frac{1}{2}$ MS انجام شد. نتایج اندازه‌گیری فنول تام در طی 48 ساعت، در حضور $50 \mu\text{M}$ الیستور متیل-جاسمونات بالاتر ($2927/22 \mu\text{g GAE/g FW}$) از سایر گروه‌ها بود؛ اما در 24 ساعت اول، تیمار $100 \mu\text{M}$ متیل‌جاسمونات بالاترین مقدار محتوای فلاونوئید تام ($19720/465 \mu\text{g QE/g FW}$) را نشان داد. همچنین، تیمار متیل‌جاسمونات ($50 \mu\text{M}$) بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را با مقدار $68/14\%$ ثبت کرد.

استناد: علی‌عسکری، ف.، سبکدست نودهی، م.، و نقوی، م.ر. (۱۴۰۴). الیستورهای متیل‌جاسمونات و کیتوزان محتوای آنتی‌اکسیدانی ریشه‌مویین استبرق (*Calotropis procera*) را بهبود بخشید. علوم گیاهان زراعی ایران، ۵۶(۴)، ۱۰۵-۱۲۰.

DOI: 10.22059/ijfcs.2025.390829.655131



© نویسندگان

ناشر: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

۱. مقدمه

طی هزاران سال، طبیعت منبع اصلی مواد دارویی بوده و بسیاری از داروهای امروزی از منابع طبیعی استخراج شده‌اند. گیاهان از دیرباز برای درمان بیماری‌ها به عنوان داروهای سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و محصولات مختلف طبیعی آن‌ها الهام‌بخش توسعه داروهای نوین بوده است. با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از تنوع زیستی جهانی هنوز کشف نشده است، محصولات طبیعی در تأمین نیازهای دارویی نقش حیاتی خواهند داشت (Chaachouay & Zidane, 2024). از آنجایی که داروهای گیاهی معمولاً اثرات جانبی کمی دارند، تمایل به استفاده از محصولات گیاهی در سراسر جهان به طور قابل توجهی رشد کرده است (Coopoosamy et al., 2023).

با توجه به اهمیت روزافزون گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و کاهش اثرات جانبی، گیاهان مختلفی همچون استبرق به عنوان منابع طبیعی دارویی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. استبرق با نام علمی *Calotropis procera*، گونه‌ای از گیاهان گلدار، چندساله و همیشه‌سبز است که به خانواده Apocynaceae تعلق دارد و به طور طبیعی در مناطق وسیعی از ایران، از جمله خوزستان، سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، فارس و بوشهر می‌روید (Avazzadeh et al., 2018; Kaur et al., 2021). استفاده از این گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی برای درمان سرماخوردگی، تب، جذام، آسم، روماتیسم، اگزما، سوء هاضمه، اسهال، بیماری‌های پوستی و اسهال خونی گزارش شده است (Al-Rowaily et al., 2020).

عصاره آبی ریشه استبرق حاوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی است و این ویژگی‌ها پیش‌تر شناسایی شده‌اند (Kumar et al., 2013). پوست ریشه این گیاه حاوی ترکیبات فنولی نظیر بنزوئیلینولون، بنزوئیل ایزوئیلینولون و ترکیبات مادرالبان و مادر فلوایل است (Oloumi, 2014). فلاون‌ها و ترکیباتی مانند هسپریدین، روتین و نرینجین به عنوان عوامل ضدالتهاب به شمار می‌روند و نمونه‌هایی از ترکیبات فعال زیستی موجود در شیره استبرق هستند (Farooq et al., 2017). تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی نشان داده است که ترکیباتی مثل وانیلین، اسیدکلروژنیک، اسیدگالیک و دایدزین، عمده ترکیبات فنولی موجود در عصاره این گیاه هستند (Nofal et al., 2024). مطالعات کیفی و کمی با استفاده از روش HPLC نشان داده‌اند که در برگ‌ها و پوست ریشه گیاه استبرق چندین اسید فنولی از جمله اسیدسیناپیک، اسیدوانیلیک و اسیدپروتکتاتچوئیک حضور دارند (Mehmood et al., 2020). همچنین، آنالیز GC-MS وجود ترکیبات تری‌ترین حلقوی پنج‌تایی مانند لوپتول، α -آمیرین، β -آمیرین و اسیداورسولیک را در عصاره متانولی پوست ریشه این گیاه تأیید کرده است. این ترکیبات پلی‌فنولی و آنتی اکسیدانی در عصاره پوست ریشه با فعالیت آنتی اکسیدانی قوی همراه بوده و می‌توانند در محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش مهمی ایفا کنند (Kyada et al., 2023). ترکیبات فلاونوئیدی ۳-O-روتینوزید کامپفرول، ایزورامنتین-۳-O-روتینوزید، فلاونوئید گلیکوزید ۵-هیدروکسی-۳، ۷-دی‌متوکسی فلاون-۴-O- بتا-D-گلوکوپیرانوزید و کوئرستین-۳-O-روتینوزید در بخش‌های هوایی لاتکس این گیاه گزارش شده است (Farooq et al., 2017). علاوه بر این گیاه حاوی ترکیبات استروئیدی کاردینولید مانند کالوتروپین است که در مطالعات مقایسه‌ای کمی و کیفی نمونه‌های برگ و لاتکس شناسایی و بررسی شده‌اند (Seiber et al., 1982). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که گیاه استبرق قادر به تولید گلیکوزیدهای قلبی است که این ویژگی در شرایط کشت بافت و سلول نیز مورد تأکید قرار گرفته است (Djerdjouri et al., 2024; EL-Bakry et al., 2011) و همچنین ژن‌های کاندید مسیر بیوسنتز این ترکیبات در این گیاه شناسایی شده‌اند (Pandey et al., 2016). علاوه بر این، گلیکوزید جدید پروسراید A^۱ از پوست ریشه این گیاه استخراج شده که در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضدسرطانی نشان داده است (Ibrahim et al., 2014). برای بهره‌برداری مؤثر از خواص گیاهان دارویی مانند استبرق، استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی و دستکاری ژنتیکی می‌تواند به تولید بیشتر و با کیفیت‌تر متابولیت‌های ثانویه کمک کند. این روش‌ها به افزایش بهره‌وری داروهای طبیعی و کاهش اثرات جانبی درمان‌های شیمیایی کمک می‌کنند (Biswas et al., 2023). امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای به واسطه کشت بافت گیاهی امکان‌پذیر بوده که این روش مستلزم دست‌ورزی ژنتیکی گونه‌های حاوی ترکیبات هدف با استفاده از سیستم ناقل طبیعی به نام

Rhizobium rhizogenes است. این باکتری دارای Ri-پلاسمید (پلاسمید القاکننده ریشه) است که ادغام ناحیه T-DNA^۲ آن به ژنوم گیاه میزبان باعث ظهور ریشه از قسمت آلوده گیاه شده که ریشه‌مویین (Hairy Root) نامیده می‌شوند (Biswas et al., 2023; Gutierrez-Valdes et al., 2020). ریشه‌های مویین به دلیل ویژگی‌هایی مانند پایداری ژنتیکی، تولید زیاد زیست‌توده و توانایی بالای تولید ترکیبات زیستی، به عنوان گزینه‌ای مناسب‌تر نسبت به کشت سوسپانسیون سلولی و کالوس برای تولید متابولیت‌های خاص شناخته می‌شوند. علاوه بر این، ریشه‌های مویین دارای رشد بسیار سریع‌تر بوده و قادرند متابولیت‌های ثانویه را برای مدت زمان طولانی‌تری تولید کنند (Gutierrez-Valdes et al., 2020). یکی از مزایای برجسته این نوع کشت، عدم وابستگی کامل آنها به شرایط فصلی و نوری است؛ به‌طوری‌که می‌توان کشت‌های ریشه‌مویین را در شرایط کنترل‌شده و بدون نیاز به نور طبیعی یا تغییرات اقلیمی انجام داد. این ویژگی، تولید مداوم و قابل پیش‌بینی ترکیبات زیستی را امکان‌پذیر می‌سازد و نیاز به برداشت گیاهان از محیط طبیعی را کاهش می‌دهد که به حفظ تنوع زیستی و پایداری منابع طبیعی کمک می‌کند (Murthy et al., 2014). همچنین ریشه‌های مویین می‌توانند متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید کنند که به‌طور معمول در ریشه‌های طبیعی گیاهان وجود ندارند (Stepanova et al., 2022). استفاده از الیستور یکی از کاربردی‌ترین و مؤثرترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های تخصصی در زیست‌فناوری و کشت‌بافت گیاهی است. الیستورها به دو گروه اصلی زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند. الیستورهای زیستی موادی با منشأ زیستی، مانند پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهی و میکروارگانیسم‌ها هستند. نمونه‌هایی از این گروه شامل کیتوزان و مخمر هستند. الیستورهای غیرزیستی نیز شامل عوامل فیزیکی (نور، تنش اسمزی، شوری، خشکی و دما) و شیمیایی (اسیدسالیسیلیک، متیل‌جاسمونات، پراکسید هیدروژن و انواع هورمون‌ها) هستند. هر دو نوع الیستور زیستی و غیرزیستی برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌بافت و سلول‌های گیاهی به‌کار می‌روند (Jalota et al., 2024; Rogowska & Szakiel, 2021).

کیتوزان یک پلی‌ساکارید است که از بسیارش^۳ گلوکزآمین و N-استیل‌گلوکزآمین و از استیل‌زدایی کیتین، یعنی یکی از فراوان‌ترین بسپارهای زیستی در طبیعت، به‌دست می‌آید (Mukarram et al., 2023). کیتین در دیواره‌های سلولی سخت‌پوستان، قارچ‌ها، حشرات و همچنین در برخی جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌ها و برخی جانوران بی‌مهره وجود دارد (Pellis et al., 2022). کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی، زیست‌سازگار، غیر سمی و زیست‌تخریب‌پذیر شناخته می‌شود و دارای ظرفیت کاربردی گسترده‌ای است که با تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه، قادر است تحمل گیاه را در برابر تنش‌های محیطی مختلف از جمله خشکی، دماهای شدید، شوری و سمیت فلزات سنگین افزایش دهد (Hidangmayum et al., 2019; Mukarram et al., 2023).

متیل‌جاسمونات، متیل‌استر اسیدجاسمونیک به‌عنوان یک مولکول فرار و پیام‌رسان اصلی در تنش‌های غیرزیستی و زیستی شناسایی شده و نقش مهمی در گیاهان ازجمله کارکردهای مولکولی و ریخت‌زایی دارد. با توجه به ماهیت فرار بودن آن و همچنین ظرفیت نفوذ از طریق غشاهای بیولوژیکی، به عنوان یک تنظیم‌کننده گیاهی مهم در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند ارتباطات درون و بین سلولی گیاهان را تسهیل کند. این ترکیب برخی پاسخ‌های دفاعی، به‌ویژه سامانه‌های مرتبط با دفاع آنتی-اکسیدانی را تنظیم می‌کند (Jeyasri et al., 2023; Wang et al., 2021). مطالعات پیشین روی *C. procera* نشان داده‌اند که القای پاسخ دفاعی ناشی از زخم از طریق پیام‌رسانی جاسمونات، موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Pandey et al., 2016). همچنین در مطالعه دیگر روی کشت کالوس گونه استبرق بزرگ (*C. gigantea*)، تأثیر متیل‌جاسمونات بر افزایش رونویسی ژن‌های مرتبط با متابولیسم ثانویه تأیید شده است (Singh et al., 2024). بر پایه بررسی‌های انجام‌شده در سیستم کشت ریشه‌مویین، متیل‌جاسمونات به عنوان رایج‌ترین الیستور استفاده‌شده شناخته می‌شود که بیشترین تأثیر را در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنولی، ترپنی و آلکالوئیدی

دارد. در این نوع سیستم کشت، بالاترین میزان تولید ترکیبات زیست فعال نیز در حضور متیل جاسمونات مشاهده شده است که این نشان دهنده نقش کلیدی این الیسیتور در تحریک تولید گسترده متابولیت های ثانویه می باشد (Alcalde et al., 2022). هدف این مطالعه، بررسی تأثیر دو الیسیتور زیستی کیتوزان و متیل جاسمونات بر افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ریشه-موین گیاه استبرق (*C. procera*) است. این پژوهش با تمرکز بر ارزیابی تغییرات کلی در محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به عنوان شاخص های اصلی فعالیت آنتی اکسیدانی انجام می شود تا نقش این الیسیتورها در بهبود خواص آنتی اکسیدانی مشخص شود. همچنین، نتایج این مطالعه می تواند راه گشای کاربرد این ترکیبات برای افزایش تولید مواد مؤثره گیاهی و بهبود کیفیت گیاهان دارویی باشد.

۳. روش شناسی پژوهش

۳-۱. ماده گیاهی

بذرهای استبرق (*C. procera*) از استان سیستان و بلوچستان (چابهار) جمع آوری و جهت به دست آوردن گیاهچه های سترون، به مدت دو تا سه دقیقه با آب لوله کشی شستشو داده شدند. در ادامه جهت انجام مراحل ضد عفونی در زیر هود لامینار، بذرها ابتدا به مدت ۶۰ ثانیه با الکل ۷۰٪ و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم (۲٪ کلر فعال) تیمار شدند. بین مراحل ذکر شده، بذرها ضد عفونی شده دو الی سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شسته و در نهایت روی کاغذ صافی سترون، خشک و در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت و در اتاقک رشد نگهداری شدند (دمای $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ، شدت نور ۳۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶-۸ ساعت).

۳-۲. آماده سازی محیط تلقیح

تعداد سه سویه مختلف از باکتری *Rhizobium rhizogenes* شامل ATCC15834، A4 و LBA9402 در محیط کشت LB^۴ مایع حاوی 50 mgL^{-1} پادزی ریفامپیسین کشت و در انکوباتور با دمای $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ با سرعت چرخش ۱۲۰ rpm جهت رسیدن به $\text{OD}_{600\text{nm}}$ برابر با ۰/۸-۰/۶، کشت شبانه شدند. سوسپانسیون حاصل از رشد باکتری با سرعت ۱۷۹۲ RCF به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ و بعد از حذف مایع روشناور در محیط تلقیح MS^{۱/۴} مایع، مجدداً به مدت پنج ساعت تجدید کشت شدند.

۳-۳. پیش تیمار القای ریشه

جهت انتخاب بهترین شرایط القای ریشه در گیاه استبرق، به عنوان آزمون پیش تیمار، دو نوع محیط کشت MS کامل و MS^{۱/۲} جامد (7 gL^{-1} آگار)، سه سویه باکتری *R. rhizogenes* (ATCC 15834، A4 و LBA9402) با سه نوع ریزنمونه برگ، ساقه و ریشه مورد آزمایش قرار گرفت. ریزنمونه های شاهد نیز در محیط تلقیح فاقد باکتری قرار گرفتند و با توجه به مشاهدات نتایج عینی این مرحله، آزمایش اصلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار جهت القای ریشه موین طراحی شد.

۳-۴. تراریزش گیاه استبرق با استفاده از *R. rhizogenes*

جهت تراریزش و با هدف القای ریشه های موین در استبرق، روش Sharafi et al. (2013) با اندکی تغییرات به کار رفت. بدین ترتیب دو سویه باکتری *R. rhizogenes* (A4، LBA9402) و دو ریزنمونه (برگ و ساقه) استفاده شد. ریزنمونه ها ابتدا توسط تیغه اسکالپل، زخمی و در محیط تلقیح MS^{۱/۴} مایع حاوی سویه های مختلف باکتری *R. rhizogenes* مایه کوبی شدند. بعد از گذشت حدود ۱۰ الی ۲۰ دقیقه، ریزنمونه ها روی کاغذ صافی آبیگری و به مدت ۴۸ ساعت در محیط هم کشت MS جامد در شرایط تاریک و دمای $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ قرار گرفتند.

بعد از گذشت ۴۸ ساعت، به منظور حذف آلودگی باکتری *R. rhizogenes* از ریزنمونه ها، شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده حاوی 500 mgL^{-1} پادزی سفوتاکسیم صورت گرفت. پس از آبیگری، ریزنمونه ها توسط کاغذ صافی سترون خشک و سپس به محیط کشت جامد حاوی پادزی سفوتاکسیم (500 mgL^{-1}) منتقل شدند (واکشت ها تا لحظه حذف کامل باکتری در محیط کشت

حاوی 300 mgL^{-1} و 200 mgL^{-1} سفوتاکسیم تکرار شد). طی مدت ۲۱ روز، سرعت ظاهر شدن ریشه و پس از روز ۲۱ ام درصد القای ریشه به عنوان صفات مورد مطالعه اندازه گیری شدند.

۵-۳. اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه ها

اثبات ماهیت تراریختی ریشه های ظاهر شده با آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، برای ژن *rolB* با استفاده از آغازگر اختصاصی رفت با توالی 3'- ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-5' و آغازگر اختصاصی برگشت با توالی 3'- TTAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-5' و همچنین از آغازگر اختصاصی رفت با توالی 3'- ATGTCGCAAGGACGTAAGCCGA-5' و آغازگر اختصاصی برگشت با توالی 3'- GGAGTCTTTTCAGCATGGAGCAA-5' برای ژن *virD* (جهت تشخیص آلودگی به باکتری *R. rhizogenes*) انجام شد. بدین منظور استخراج DNA ژنومی از ریشه های ظاهر شده و ریشه معمولی استبرق به روش CTAB (Khan et al., 2007) انجام شد. چرخه PCR برای تکثیر ژن های مورد نظر شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در 94°C (پنج دقیقه)، 34°C چرخه شامل 30 ثانیه مرحله واسرشت سازی در دمای 94°C ، 45 ثانیه مرحله اتصال در دمای 56°C ، 45 ثانیه مرحله گسترش در دمای 72°C و یک چرخه تکثیر نهایی در 72°C (به مدت پنج دقیقه) بود. در نهایت مشاهده و عکس برداری محصولات PCR، با استفاده از دستگاه ژل داک انجام شد.

۳-۶. اندازه گیری رشد

بعد از اثبات تراریختی ریشه های موین به دست آمده، به منظور دستیابی به کلون یکنواخت و تکثیر لاین منتخب، کشت در ظروف شیشه ای حاوی 30 mL محیط مایع ($\frac{1}{2} \text{ MS}$) شامل 30 gL^{-1} ساکارز (مرک، آلمان) انجام شد. به منظور ترسیم نمودار سرعت رشد ریشه موین، مقدار اولیه یک گرم از لاین ریشه موین منتخب به محیط کشت مذکور افزوده شد (توزین با استفاده از ترازوی دیجیتال در زیر هود لامینار انجام شد). اندازه گیری وزن تر و وزن خشک، هشت روز بعد از شروع آزمایش با فاصله زمانی هر چهار روز یکبار با استفاده از ترازوی دقیق صورت گرفت. سه تکرار آماری برای هر نمونه برداری در نظر گرفته شد.

۳-۷. استعمال الیستورها

به منظور مطالعه اثر الیستورهای متیل جاسمونات و کیتوزان بر تغییرات محتوای تام فنول و فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH)، در ریشه موین استبرق، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی و اجرا شد. پس از گذشت ۲۴ روز از کشت، تیمار متیل جاسمونات (دوختا، هلند) در دو سطح ۱۰ و $50 \mu\text{M}$ و غلظت کیتوزان (سیگما-آلدریج، آلمان) در دو سطح ۱۰۰ و 150 mgL^{-1} در شرایط تاریک اعمال و نمونه برداری پس از مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد، بدین ترتیب که ابتدا ریشه های موین تازه برداشت و به آرامی با آب مقطر شستشو داده شدند و پس از گرفتن رطوبت اضافی با استفاده از کاغذ صافی داخل فویل آلومینیومی (شکل ۹-ب) قرار گرفت و تا لحظه عصاره گیری در یخچال 80°C - نگهداری شد.

۳-۸. اندازه گیری فنول تام

محتوای فنول تام با استفاده از روش (Soland & Laima, 1999)، با اندکی تغییرات تعیین شد. ابتدا 0.1 g ریشه موین تازه در 5 mL اتانول ۹۵٪ همگن و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ و در تاریکی نگهداری شد. سپس، عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در RCF ۱۷۹۲ سانتریفیوژ شد. پس از آن، 1 mL از مایع رویی با 1 mL اتانول ۹۵٪، 1 mL محلول کربنات سدیم ۵٪، 3 mL آب دوبار تقطیر و 0.5 mL محلول ۵۰٪ معرف فولین-سیوکالتو (شرکت مرک، آلمان) مخلوط و همگن شد و به مدت نیم ساعت در دمای $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ در شرایط تاریکی قرار گرفت. سپس، جذب نوری نمونه ها در طول موج 725 nm قرائت شد. نتایج بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از رقت های مختلف اسید گالیک به صورت $\mu\text{g GAE.g}^{-1} \text{ FW}$ گزارش شد.

۳-۹. اندازه گیری فلاونوئید تام

محتوای فلاونوئید تام با تغییرات جزئی در روش (Meda et al., 2005) با استفاده از رنگ سنجی کلرید آلومینیوم بررسی شد. در این روش، 0.2 g بافت تازه ریشه موین با 3 mL متانول اسیدی (متانول: اسیداستیک گلسیال ۱:۹۹ v:v) مخلوط و همگن شد.

بعد از سانتریفیوژ در ۱۱۲۰۰ RCF به مدت ۱۵ دقیقه، ۵۰۰ μL از مایع رویی با ۱۰۰ μL محلول کلرید آلومینیوم ۱۰٪، ۱۰۰ μL استات پتاسیم ۱ M، ۱/۵ mL متانول ۸۰٪ و ۲/۸ mL آب دوبار تقطیر مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ در تاریکی نگهداری و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ nm نسبت به محلول تهی اندازه‌گیری شد. رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های مختلف کوئرستین (شرکت مرک، آلمان) حل شده در متانول به صورت $\mu\text{gQE.g}^{-1}\text{FW}$ رسم شد.

۳-۱۰. اندازه‌گیری DPPH

بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۵ (DPPH، سیگما) بر اساس روش (Wu & Wang, 2009) با تغییرات جزئی انجام شد. ابتدا، ۰/۲ g از ریشه مویین با ۳ mL متانول عصاره‌گیری شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۶۱۲۸ RCF و در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. سپس، ۲۰ μL از هر عصاره به ۱۸۰ μL از محلول متانولی ۱۰۰ μM از DPPH افزوده شد. محلول حاصل مخلوط و همگن و به مدت نیم ساعت در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ داخل فویل آلومینیوم نگهداری شد. جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ nm قرائت شد. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برحسب درصد با استفاده از رابطه ۱ به دست آمد.

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A_B - A_S}{A_B} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

که A_B میزان جذب تهی و A_S جذب هر یک از نمونه‌های تیمار شده است.

۳-۱۱. تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۷ (IBM Corp., 2020) و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (Microsoft Corp., 2019) استفاده شد.

۴. یافته‌های پژوهش و بحث

۴-۱. جوانه‌زنی و تهیه ریزنمونه

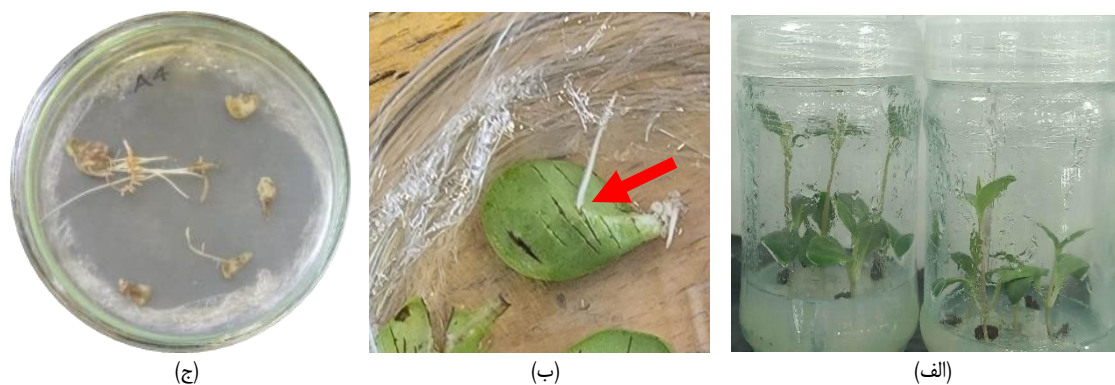
بذرهای استبرق حدود ۳-۵ روز بعد از کشت در محیط MS جوانه زدند. گیاهچه‌های ۳۰ روزه درون شیشه‌ای (شکل ۱-الف) جهت تهیه ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه استفاده شدند.

۴-۲. پیش تیمار القای ریشه

در این پژوهش، نتایج پیش تیمارهای صورت گرفته جهت القای ریشه در استبرق نشان داد که محیط MS کامل، دو سویه A4 و LBA9402 از باکتری *R. rhizogenes* و دو ریزنمونه برگ و ساقه بالاترین میزان القای ریشه را نشان دادند. ریزنمونه‌های ریشه به دلیل از بین رفتن بافت از تیمارها حذف و همچنین در ریزنمونه‌های شاهد هیچگونه القای ریشه مشاهده نشد.

۴-۳. القای ریشه مویین

براساس نتایج طرح آزمایشی صورت گرفته، حدود دو الی سه هفته پس از تلقیح، برخی از ریزنمونه‌ها متورم و در نهایت از محل زخم، ریشه‌های کرک‌دار سفید رنگ ظاهر شد (شکل ۱-ب). جهت حذف باکتری *R. rhizogenes*، واکشت‌های متوالی در محیط جامد انجام شد (شکل ۱-ج). براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تفاوت معنی‌داری بین دو سویه باکتری (A4 و LBA9402) (شکل ۲) در سطح ۵٪ و دو نوع ریزنمونه برگ و ساقه (شکل ۳) در سطح ۱٪ برای صفت القای ریشه‌های مویین کاندید مشاهده شد، همچنین اثر متقابل سویه باکتری در ریزنمونه، تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۴). سویه LBA9402 بالاترین میانگین فراوانی القای ریشه (۲۳/۳۳٪) نسبت به سویه A4 (۱۸/۳۳٪) و ریزنمونه برگ نیز بالاترین میانگین درصد القای ریشه (۲۷/۵٪) را نشان داد. همچنین نتایج صفت سرعت ظاهر شدن ریشه نشان داد که میانگین ظهور ریشه در ریزنمونه برگ (۱۴ روز) سریع‌تر از میانگین ریزنمونه ساقه (۱۶ روز) است (شکل ۵)، اما برای این صفت بین دو سویه باکتری (شکل ۶) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و به‌طور میانگین ۱۵ روز پس از تلقیح، ریشه‌ها از محل زخم ظاهر شدند (شکل ۷).

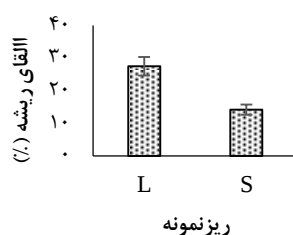


شکل ۱. گیاهچه‌های ۳۰ روزه درون شیشه‌ای استبرق (الف)، ظهور ریشه در محل زخم ریزنمونه برگ، فلش قرمز ظاهر شدن ریشه سفیدرنگ را نشان می‌دهد (ب)، رشد ریشه بعد از چندین بار واکشت در محیط MS کامل (ج).

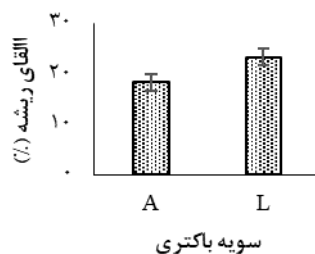
جدول ۱. تجزیه و تحلیل واریانس اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر سرعت ظاهر شدن و القای ریشه در استبرق.

منبع	درجه آزادی	سرعت (روز)	میانگین مربعات
القای ریشه (%)			
سویه باکتری	۱	۰	۷۵/۰۰۰*
ریزنمونه	۱	۱۲	۵۳۳/۳۳۳**
سویه باکتری × ریزنمونه	۱	۰	۱۳۳/۳۳۳*
خطا	۸	۰	۱۲/۵۰۰
ضریب تغییرات (%)	–	۶/۹۶	۴۱/۹۸

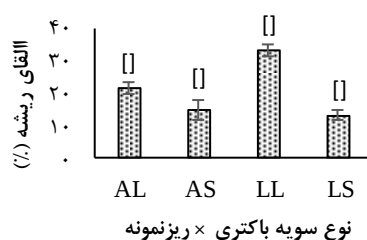
*, ** معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ است.



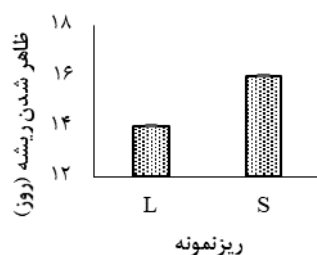
شکل ۲. اثر نوع ریزنمونه بر میزان القای ریشه در محیط کشت MS. L: ریزنمونه برگ، S: ریزنمونه ساقه.



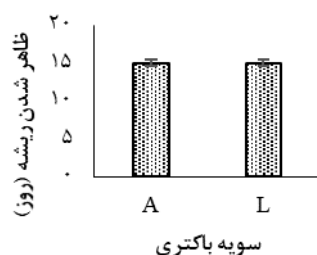
شکل ۳. اثر نوع سویه باکتری *R. rhizogenes* بر میزان القای ریشه در محیط کشت MS. L: سویه LBA9402، A: سویه A4



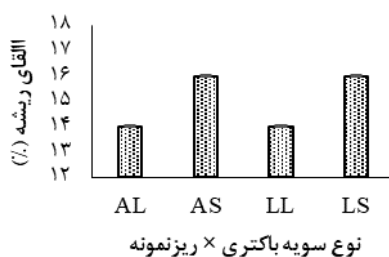
شکل ۴. نمودار اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه باکتری *R. rhizogenes* بر میزان القای ریشه در محیط کشت MS. AL: سویه A4 و ریزنمونه برگ، AS: سویه A4 و ریزنمونه ساقه، LL: سویه LBA9402 و ریزنمونه برگ، LS: سویه LBA9402 و ریزنمونه ساقه.



شکل ۵. اثر نوع ریزنمونه بر زمان ظاهر شدن ریشه در محیط کشت MS. L: ریزنمونه برگ، S: ریزنمونه ساقه.



شکل ۶. اثر نوع سویه باکتری *R. rhizogenes* بر زمان ظاهر شدن ریشه در محیط کشت MS. L: سویه LBA9402، A: سویه A4.

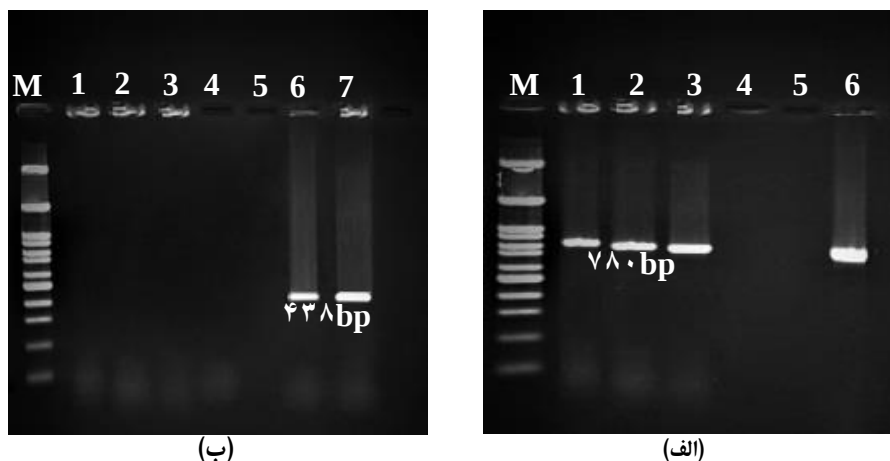


شکل ۷. اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه باکتری *R. rhizogenes* بر زمان ظاهر شدن ریشه در محیط کشت MS. AL: سویه A4 و ریزنمونه برگ، AS: سویه A4 و ریزنمونه ساقه، LL: سویه LBA9402 و ریزنمونه برگ، LS: سویه LBA9402 و ریزنمونه ساقه.

۴-۴. تایید تراریختی ریشه های مویین

اگرچه ریخت شناسی خاص و رشد با انشعابات جانبی انبوه ریشه های مویین القا شده توسط *R. rhizogenes* در محیط کشت فاقد هورمون، تا حدی نشان از درج T-DNA به ژنوم سلول های گیاهی و تراریختگی آنها است، اما ارزیابی ماهیت تراریختگی ریشه ها با آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) ضروری است. در این پژوهش ماهیت تراریختگی ریشه های مویین استبرق با آزمون

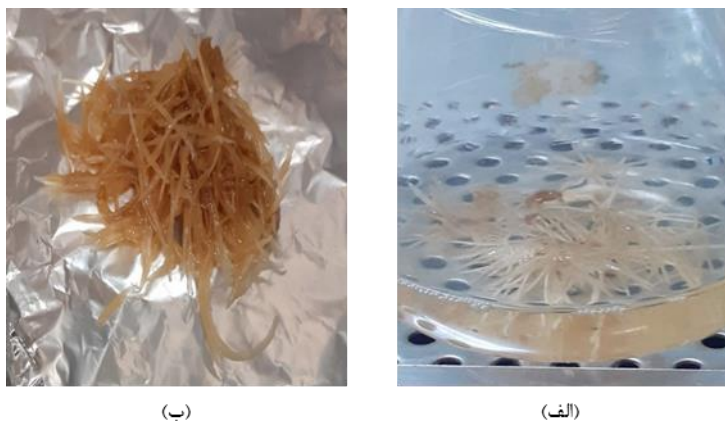
PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* تأیید شد. DNA استخراج شده از ریشه‌های موپین استبرق، برای *rolB* محصول PCR مورد انتظار به اندازه ۷۸۰ جفت‌باز را تکثیر کرد، اما برای ریشه‌های شاهد (DNA ریشه طبیعی)، هیچگونه قطعه‌ای از *rolB* تکثیر نشد (شکل ۸-الف)؛ بنابراین ماهیت تراریختی ریشه‌های موپین در گیاه دارویی استبرق با استفاده از تکثیر قسمتی از ژن *rolB* تأیید شد. همچنین هیچ محصول PCR مربوط به ژن *virD* به طول ۴۳۸ جفت‌باز در لاین‌های ریشه‌موپین استبرق مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی به باکتری *R. rhizogenes* است (شکل ۸-ب).



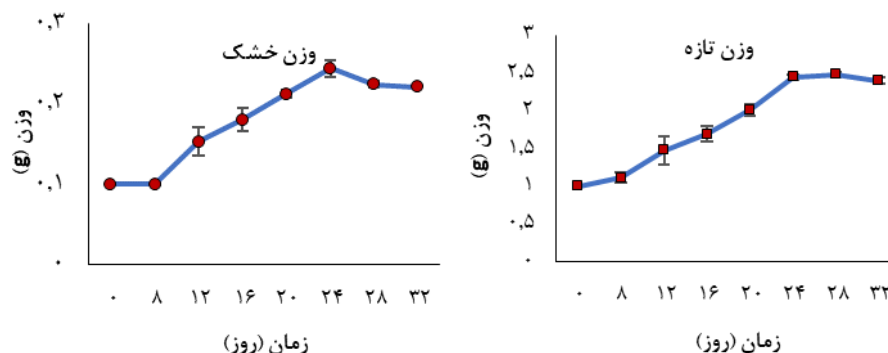
شکل ۸. محصول PCR ژن *rolB* (الف) و *virD* (ب). چاهک‌های ۱-۳: لاین‌های ریشه‌موپین کاندید جهت اثبات تراریختی ریشه‌های موپین، ۴: DNA ژنومی از ریشه طبیعی استبرق به‌عنوان کنترل منفی، ۵: آب مقطر، ۶ و ۷: Ri-پلاسمید، M: نشانگر اندازه (۱۰۰-۳۰۰۰ جفت‌باز، کیازن، ایران).

۴-۵. اندازه‌گیری رشد

بمنظور تکثیر ریشه‌های موپین تاییدشده استبرق، کشت لاین منتخب (شکل ۹-الف) در محیط کشت مایع MS $\frac{1}{2}$ حاوی 30 g L^{-1} ساکارز با چگالی تلقیح $33/33 \text{ g L}^{-1}$ انجام شد. با توجه به اینکه ریشه‌های موپین بعد از واکشت به دلیل برش خوردن دچار کندی رشد می‌شوند، اندازه‌گیری‌ها، از روز هشتم پس از شروع آزمایش به فاصله زمانی چهار روز با استفاده از ترازوی دقیق با سه تکرار صورت گرفت. براساس نتایج اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک، منحنی رشد لاین منتخب ریشه‌موپین استبرق برای دوره کشت ۳۲ روزه رسم شد (شکل ۱۰). بر اساس میانگین اندازه‌گیری‌شده، بیشترین میانگین وزن خشک و وزن تر ریشه‌موپین به‌ترتیب مربوط به روز ۲۴ام ($0.1 \pm 0.24 \text{ g}$) و ۲۸ام ($0.3 \pm 0.48 \text{ g}$) بود.



شکل ۹. رشد لاین منتخب ریشه‌موپین استبرق در محیط کشت مایع MS $\frac{1}{2}$ بدون هورمون در روز ۲۰ام (الف)، ریشه‌های موپین قبل از عصاره‌گیری (ب).



شکل ۱۰. نمودار رشد ریشه مویین استبرق با اندازه گیری وزن تر (سمت چپ) و وزن خشک (سمت راست).

۴-۶. محتوای فنول تام

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس اندازه گیری محتوای فنول تام در کشت های ریشه مویین *C. procera* تحت تیمار دو الیستور با دو غلظت متفاوت در دو زمان مختلف نشان داد که تفاوت معنی داری ($p < 0.01$) بین گروه های تیماری مختلف وجود دارد (جدول ۲). بر اساس نمودار مقایسه میانگین (شکل ۱۱-الف)، می توان گفت که متیل جاسمونات در غلظت های $10 \mu\text{M}$ و $50 \mu\text{M}$ (به ترتیب با $2681/82 \mu\text{g GAE/g FW}$ و $2115/15 \mu\text{g GAE/g FW}$) تأثیر بیشتری نسبت به کیتوزان در تحریک تولید ترکیبات فنولی در هر دو زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) دارد. به ویژه، در ۲۴ ساعت اول، میزان تولید در حضور $10 \mu\text{M}$ متیل جاسمونات بالاتر از سایر گروه ها در طی این مدت زمان بود. با گذشت زمان (۴۸ ساعت)، غلظت 150 mgL^{-1} کیتوزان ($2073/66 \mu\text{g GAE/g FW}$) تأثیر کمتری نشان داد که نشان دهنده اثرات طولانی مدت کیتوزان در مقایسه با $50 \mu\text{M}$ متیل جاسمونات ($2142/42 \mu\text{g GAE/g FW}$) است؛ ولی در نهایت تیمار شده با $10 \mu\text{M}$ متیل جاسمونات بعد از گذشت ۴۸ ساعت بالاترین میزان فنول تام ($2927/22 \mu\text{g GAE/g FW}$) را به خود اختصاص داد.

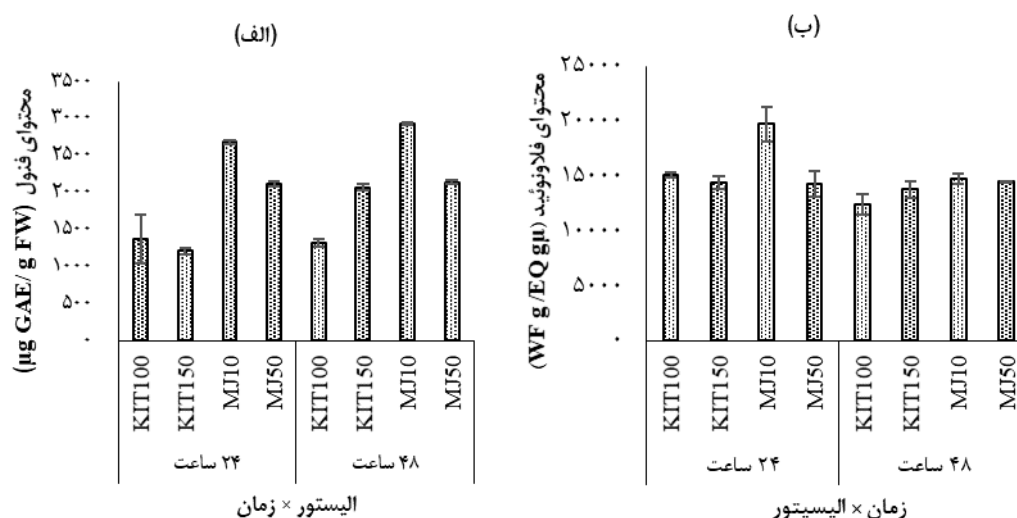
جدول ۲. تجزیه و تحلیل واریانس اثر زمان و نوع الیستور بر محتوای تام فنول و فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) در عصاره ریشه های مویین استبرق.

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
فنول تام	فلاونوئید	DPPH		
۴۳۶۴۳۲/۵۸۶**	۳۴۳۰۶۱۰۹/۹۰۰**	۱۸۲/۷۵۳**	۱	زمان
۲۴۲۵۳۵۷/۴۲۲**	۱۵۵۸۵۸۴۱/۷۶۲**	۲۰۳/۲۹۳**	۳	الیستور
۲۶۱۲۳۲/۷۳۸**	۷۹۰۹۶۰۴/۷۷۴*	۱۴/۵۲۹**	۳	زمان × الیستور
۴۴۳۵۲/۶۳۹	۲۱۹۲۷۰۳/۱۱۳	۰/۹۴۸	۱۶	خطای آزمایش
% ۱۰/۸	۱۵/۹۸	۱۰/۳۱	-	ضریب تغییرات (%)

*, ** معنی داری در سطح ۵٪ و ۱٪ است.

۴-۷. محتوای فلاونوئید تام

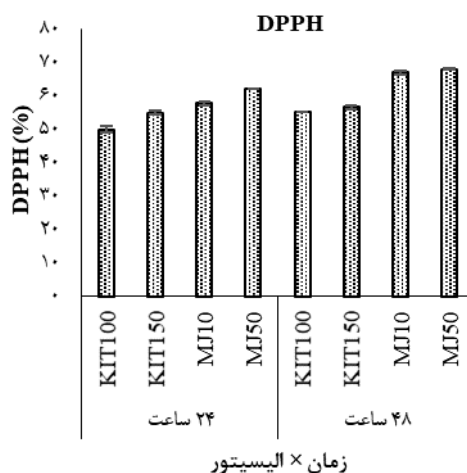
مطابق با نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) تفاوت های معنی داری در محتوای فلاونوئید تام بین گروه های تیمار مختلف وجود داشت ($p < 0.01$). بر این اساس در ۲۴ ساعت اول، متیل جاسمونات ($10 \mu\text{M}$) بالاترین مقدار محتوای فلاونوئید تام ($19720/465 \mu\text{g QE/g FW}$) را نشان داد که نسبت به دیگر گروه ها تفاوت قابل توجهی داشت. در همین مدت، کیتوزان (100 mgL^{-1}) نیز مقدار تولید قابل توجهی با $15100/4 \mu\text{g QE/g FW}$ داشت، اما بیشتر از متیل جاسمونات ($50 \mu\text{M}$) ($50 \mu\text{g QE/g FW}$) و کیتوزان ($14293/01 \text{ FW}$) و کیتوزان ($14293/01 \text{ FW}$) بود. طی ۴۸ ساعت، تفاوت ها افزایش یافته و مقادیر تولید در تمامی گروه ها به هم نزدیک تر شدند. به ویژه، کیتوزان 100 mgL^{-1} ($12409/10 \mu\text{g QE/g FW}$) و متیل جاسمونات $50 \mu\text{M}$ ($14495/47 \mu\text{g QE/g FW}$) نتایج غیرمشابهی را به دست آوردند که نشان دهنده اثرات کندتر و پایدارتر این ترکیبات است (شکل ۱۱-ب).



شکل ۱۱. محتوای فنول (الف) و فلاونوئید (ب) تام در کشت‌های ریشه‌مویین استبرق تحت تیمار با الیستورهای کیتوزان و متیل جاسمونات بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان اعمال تیمار (KIT100: کیتوزان (100 mgL^{-1}), KIT150: کیتوزان (150 mgL^{-1}), MJ10: متیل جاسمونات ($10 \mu\text{M}$) و MJ50: متیل جاسمونات ($50 \mu\text{M}$)).

۴-۸. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس (جدول ۲) برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف تیمار شده است ($p < 0.01$). نتایج به‌دست‌آمده بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان‌دهنده تأثیر متفاوت غلظت‌های کیتوزان و متیل جاسمونات بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل است. در مدت ۲۴ ساعت، متیل جاسمونات ($50 \mu\text{M}$) بالاترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی یعنی $62/2\%$ نشان داد که نسبت به دیگر تیمارها به‌ویژه کیتوزان 100 mgL^{-1} ($49/96\%$) قابل توجه بود. این نشان‌دهنده اثر بیشتر متیل جاسمونات نسبت به الیستور کیتوزان در مدت زمان مشابه است. در طی ۴۸ ساعت، به‌طور کلی، تمامی تیمارها افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تجربه کردند. طی این مدت، متیل جاسمونات ($50 \mu\text{M}$) همچنان بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را با مقدار $68/14\%$ ثبت کرد که به وضوح بیشتر از کیتوزان 150 mgL^{-1} ($56/62\%$) و دیگر غلظت‌های کیتوزان 100 mgL^{-1} ($55/14\%$) و متیل جاسمونات $10 \mu\text{M}$ ($67/04\%$) بود (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در عصاره حاصل از کشت‌های ریشه‌مویین استبرق تحت تیمار با الیستورهای کیتوزان و متیل جاسمونات بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان اعمال تیمار. (KIT100: کیتوزان (100 mgL^{-1}), KIT150: کیتوزان (150 mgL^{-1}), MJ10: متیل جاسمونات ($10 \mu\text{M}$) و MJ50: متیل جاسمونات ($50 \mu\text{M}$)).

نتایج تحقیق حاضر با بررسی بهینه سازی سیستم القای ریشه مویین در گیاه *C. procera* از طریق استفاده از سویه های مختلف باکتری *R. rhizogenes* انجام شد. براساس نتایج آزمایش ها، پس از دو الی سه هفته از زمان تلقیح و پس از انجام واکشت های متوالی برای حذف باکتری، ریشه های مویین از برخی ریزنمونه ها در محل زخم ظاهر شدند. در این پژوهش، برای اولین بار سویه LBA9402 بالاترین میانگین فراوانی القای ریشه را نشان داد و ریزنمونه برگ نیز عملکرد بهتری در درصد القای ریشه از خود نشان داد. نتایج این تحقیق با نتایج سایر مطالعات مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش *Adabavazeh et al.* (2023) به بررسی بهینه سازی سیستم القای ریشه مویین در گیاه *C. procera* پرداخته شده و تأثیر سه سویه مختلف *R. rhizogenes* (A4، k599 و ATCC 15834)، دو ریزنمونه گیاهی (ساقه و برگ) بر القای ریشه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج آن ها نشان داد که غوطه وری ریزنمونه برگ در سوسپانسیون حاوی باکتری سویه A4 بالاترین نرخ القای ریشه را نشان داد که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت داشت. با این حال، نتایج مربوط به نوع ریزنمونه برگ در این پژوهش با یافته های تحقیق فعلی تطابق داشت. در مطالعه *Dardan & Jafari* (2023)، تأثیر عوامل مختلف بر القای ریشه مویین در گیاه *C. procera* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که تنها در برخی از سویه های *R. rhizogenes* شامل A4، A7، A13، ATCC 15834، ATCC 11325 و K599 القای ریشه موفقیت آمیز بود. از بین این سویه ها، سویه K599 بهترین درصد القا را از خود نشان داد. همچنین نتایج آنها نشان داد که نوع ریزنمونه گیاهی (برگ و ساقه) تأثیر زیادی بر القای ریشه دارد؛ به طوری که بالاترین درصد القای ریشه (۵۰٪) در برگ های ۱۸ روزه در زمان تماس ۳۰ دقیقه ای با مایه تلقیح باکتری K599 به دست آمد. علاوه بر این، مدت زمان مایه کوبی (۱۵ و ۳۰ دقیقه) و سن اندام های گیاهی نیز بر میزان موفقیت آمیز بودن القا تأثیرگذار بودند. در کل این یافته ها نشان می دهند که انتخاب سویه مناسب *R. rhizogenes*، نوع اندام گیاهی، زمان تلقیح و محیط کشت می توانند تأثیرات قابل توجهی بر موفقیت در القای ریشه در *C. procera* داشته باشند.

ریشه های مویین توسط آلوده شدن بافت گیاهی با باکتری خاکزی و گرم منفی *R. rhizogenes* ایجاد می شوند. در واقع باکتری در پاسخ به ترشح ترکیباتی مانند استوسیرینگون از محل زخم در گیاه میزبان، از پلاسمید القاکننده ریشه (Ri) خود ناحیه ای انتقالی با نام T-DNA که حاوی ژن های *rol* و ژن های بیوسنتز ترکیبات اوپین^۶ است را با کمک آنزیم های تولید شده توسط ژن های بیماری زایی *vir*^۷ و *chv*^۸ که خارج از ناحیه T-DNA هستند در ژنوم گیاه میزبان درج می کند (*Biswas et al.*, 2023; *Zhu et al.*, 2024). پژوهشگران معتقدند که در میان ژن های *rol* موجود در *R. rhizogenes*، نقش ضروری در القای ریشه مویین دارد در حالی که ژن های *rolA*، *rolC* و *rolD* در القای ریشه های مویین نقش جانبی دارند. ژن *rolB* برای القای ریشه مویین به طور کامل ضروری بوده و حتی زمانی که این ژن به تنهایی بیان شود، می تواند تولید ریشه مویین قابل توجهی داشته باشد (*Mauro & Bettini*, 2021; *Shvets et al.*, 2024). این واقعیت که نه تمام سویه های باکتری *R. rhizogenes* قادر به انتقال ژن های القای ریشه مویین هستند و نه تمامی گیاهان قابلیت پذیرش ژن بیگانه از این باکتری را دارند، دلایل شناخته شده ای ندارد. این پدیده را می توان به اثرات متقابل بین گیاه و پاتوژن نسبت داد، به این معنا که یک رقم گیاهی ممکن است به نژادهای مختلف یک گونه بیماری زا واکنش های متفاوتی نشان دهد. در واقع ظرفیت سویه های مختلف باکتری *R. rhizogenes* به ساختار ژن های *vir* آن ها وابسته است (*Yazdanpanah et al.*, 2017).

یافته های ما نشان می دهد که تیمار متیل جاسمونات موجب افزایش معنی دار در محتوای تام فنول و فلاونوئید شده است. این نتایج با گزارش های قبلی هم راستا است که نشان داده اند متیل جاسمونات می تواند به عنوان یک الیسیتور زیستی، با ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS)، پاسخ های دفاعی گیاه را تحریک کرده و تولید متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را افزایش دهد (*Nabi et al.*, 2021). در این مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت های ریشه مویین استبرق با استفاده از روش اندازه گیری DPPH ارزیابی شد. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان به عنوان یکی از ویژگی های کلیدی در مقابله با تنش های محیطی مورد توجه قرار دارد. در مطالعه (*Adabavazeh et al.*, 2022) بیشترین میزان فلاونوئید با

6. Opines

7. Virulence

8. Chromosomal virulence

افزایش ۱۶۵٪ در ریشه‌های موئین استبرق تحت تیمارهای هم‌زمان 100 mgL^{-1} نانوذره Fe_3O_4 و $10 \text{ }\mu\text{M}$ اسیدسالیسیلیک گزارش شده است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که متابولیسم ترکیبات فلاونوئید و فنول می‌تواند تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی فعال شود. ترکیبات فنولی به عنوان بازیگران اصلی در سازوکارهای دفاعی گیاهان عمل می‌کنند و اثرات چندوجهی آن‌ها به انعطاف‌پذیری گیاهان در برابر چالش‌های محیطی کمک می‌کند. این ترکیبات، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ساختاری دارند و فیتوالکسین‌های فنولی از فنیل پروپانویدها برای مقابله با عوامل بیماری‌زا مفید هستند. به‌طور کلی، ترکیبات فنولی در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی و پاسخ‌های تنش گیاهی دخالت دارند (Adabavazeh et al., 2022; Saini et al., 2024). درک جامع از نقش ترکیبات فنولی در زیست‌شناسی گیاهی برای بهبود انعطاف‌پذیری گیاهان در شرایط محیطی پویا ضروری است. الیسیستورهای کیتوزان و متیل جاسمونات، به‌عنوان محرک‌های زیستی شناخته می‌شوند که قادر به تحریک تولید ترکیبات فنولی در گیاهان هستند. متیل جاسمونات و کیتوزان به‌طور خاص می‌توانند به‌عنوان الیسیستور عمل کرده و با افزایش تولید ترکیبات فنولی فرآیندهای متابولیکی گیاهان را تغییر دهند (Mukarram et al., 2023; Wang et al., 2021). در نتایج مطالعه (Adabavazeh et al., 2022) ذکر شده است که تیمار ریشه‌های موئین استبرق با 150 mgL^{-1} و 200 mgL^{-1} نانوذره Fe_3O_4 به‌همراه $10 \text{ }\mu\text{M}$ اسیدسالیسیلیک (SA) باعث افزایش محتوای فنولی و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده شد. علاوه‌براین، این اثر به‌طور قابل توجهی در ریشه‌های موئین که به‌طور هم‌زمان تحت تیمار نانوذرات Fe_3O_4 و SA قرار گرفته بودند، نسبت به کشت‌های ریشه‌موئین که به‌طور جداگانه تحت این تیمارها قرار داشتند، بیشتر بود (Adabavazeh et al., 2023). به‌طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که متیل جاسمونات بالاترین میزان تولید فنول و فلاونوئید تام را در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد. این نشان‌دهنده اثر فوری و قوی این ترکیب در تحریک تولید ترکیبات فنولی است. هرچند متیل جاسمونات در ابتدا تأثیر قوی‌تری بر تولید فنول‌ها نشان داد، اما کیتوزان در طول زمان ممکن است تأثیر بیشتری از خود نشان دهد.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به نقش حیاتی متابولیت‌های گیاهان دارویی و نیاز فزاینده به این ترکیبات، پژوهشگران در حال بررسی روش‌های نوآورانه برای افزایش میزان تولید آن‌ها هستند. استبرق یکی از گیاهان دارویی مهم در ایران است. هدف از انجام این پژوهش، القا و کشت ریشه‌موئین استبرق به‌منظور ارزیابی منحنی رشد و کاربرد الیسیستور جهت تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان این گیاه مهم بود. همچنین، اثر غلظت‌های مختلف دو الیسیستور زیستی و غیرزیستی کیتوزان (150 mgL^{-1} و 100 mgL^{-1}) و متیل جاسمونات ($50 \text{ }\mu\text{M}$ و $10 \text{ }\mu\text{M}$) برای اولین بار در این پژوهش روی ریشه‌های موئین استبرق بررسی شد. به‌طور کلی نتایج نشان داد تیمار با متیل جاسمونات منجر به بالاترین میزان تولید محتوای فنول و فلاونوئید تام شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این تیمار بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره ریشه‌موئین گیاه استبرق بود. این یافته‌ها پیش‌نیازی مهم برای آزمایش‌های آتی در زمینه کشت ریشه‌های موئین با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه دارویی ارزشمند هستند.

۶. منابع

- Adabavazeh, F., Pourseyedi, S., Nadernejad, N., & Razavizadeh, R. (2023). Hairy root induction in *Calotropis procera* and optimization of its phytochemical characteristics by elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155, 567-580.
- Adabavazeh, F., Pourseyedi, S., Nadernejad, N., Razavizadeh, R., & Mozafari, H. (2022). Evaluation of synthesized magnetic nanoparticles and salicylic acid effects on improvement of antioxidant properties and essential oils of *Calotropis procera* hairy roots and seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151, 133-148.
- Alcalde, M.A., Perez-Matas, E., Escrib, A., Cusido, R.M., Palazon, J., & Bonfill, M. (2022). Biotic elicitors in adventitious and hairy root cultures: A review from 2010 to 2022. *Molecules*, 27, 5253.
- Al-Rowaily, S.L., Abd-ElGawad, A.M., Assaeed, A.M., Elgamal, A.M., Gendy, A.E.N.G.E., Mohamed, T.A., Dar, B.A., Mohamed, T.K., & Elshamy, A.I. (2020). Essential oil of *Calotropis procera*: Comparative chemical profiles, antimicrobial activity, and allelopathic potential on weeds. *Molecules*, 25, 5203.

- Avazzadeh, A.M., Saeidi, H., & Bagheri, A. (2018). *Leaf morphological study of Calotropis procera (Aiton) R.br. in Iran*. Paper presented at the 20th National and 8th International Congress on Biology of Iran, Maragheh. <https://civilica.com/doc/850409>.
- Biswas, D., Chakraborty, A., Mukherjee, S., & Ghosh, B. (2023). Hairy root culture: A potent method for improved secondary metabolite production of solanaceous plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1197555.
- Chaachouay, N., & Zidane, L. (2024). Plant-derived natural products: A source for drug discovery and development. *Drugs and Drug Candidates*, 3, 184-207.
- Coopoosamy, R., Singh, K., Naidoo, K., & Nadasan, D.S. (2023). The role of phytomedicine: Bridging the gap between the past, present, and future. *Journal of Medicinal Plants for Economic Development*, 7, 7.
- Dardan, E., & Jafari, M. (2023). Optimization of induction, culture conditions and phytochemical analysis of hairy roots in the medicinal plant giant milkweed (*Calotropis procera*). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 39, 2383-2592.
- Djerdjouri, A., Abbad, M., Boumrah, Y., Malik, S., Makhzoum, A., & Lakhdar, K. (2024). Tapping the potential of *Calotropis procera* hairy roots for cardiac glycosides production and their identification using UHPLC/QTOF-MS. 3, *Biotech*, 14, 199.
- El-Bakry, A.A., Safia, M.G., & Abdrabou, H.A.A. (2011). Production of cardiac glycosides from *Calotropis procera* by cell suspension cultures. *Journal of Applied Sciences Research*, 1375-1385.
- Farooq, U., Nisar, S., Merzaia, A.B., & Azeem, M.W. (2017). Isolation of bioactive components from *Calotropis procera* plant latex: A review. *International Journal of Chemical and Biochemical Science*, 11, 95-101.
- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, 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.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., & Hemantaranjan, A. (2019). Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 313-326.
- Jalota, K., Sharma, V., Agarwal, C., & Jindal, S. (2024). Eco-friendly approaches to phytochemical production: Elicitation and beyond. *Natural Products and Bioprospecting*, 14, 5.
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S.H., & Ramesh, M. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: An updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 153, 447-458.
- Kaur, A., Batish, D.R., Kaur, S., & Chauhan, B.S. (2021). An overview of the characteristics and potential of *Calotropis procera* from botanical, ecological, and economic perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-13.
- Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T., & 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.
- Kumar, S., Gupta, A., & Pandey, A.K. (2013). *Calotropis procera* root extract has the capability to combat free radical mediated damage. *International Scholarly Research Notices*, 1, 691372.
- Kyada, A., Rahamathulla, M., Santani, D., Vadia, N., Baldaniya, L., Rana, M., Muqtader Ahmed, M., Farhana, S.A., & Pasha, I. (2023). Phytochemical analysis, in vitro free radical scavenging, and ldl protective effects of different solvent fractions of *Calotropis procera* (R.) br. root bark extract. *Journal of Food Biochemistry*, 6689595.
- Mauro, M.L., & Bettini, P.P. (2021). *Agrobacterium rhizogenes rolB* oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 10-18.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.
- Mehmood, T., Arshad, H., Nawaz, S., Ullah, A., Hafeez, A., Anwar, F., Ahmad, M.M., & Iqbal, M. (2020). Pharmaceutical potential and phenolics profiling of leaves and bark of *Calotropis procera* in relation to extraction solvents. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54, 631-641.
- Mukarram, M., Ali, J., Dadkhah-Aghdash, H., Kurjak, D., Kačik, F., & Đurković, J. (2023). Chitosan-induced biotic stress tolerance and crosstalk with phytohormones, antioxidants, and other signalling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-14.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murthy, H.N., Lee, E.J., & Paek, K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 1-16.

- Nabi, N., Singh, S., & Saffeullah, P. (2021). Responses of *in vitro* cell cultures to elicitation: Regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: A review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 341-355.
- Nofal, A.M., Hamouda, R.A., Rizk, A., El-Rahman, M.A., Takla, A.K., Galal, H., Alqahtani, M.D., Alharbi, B.M., Elkelish, A., & Shaheen, S. (2024). Polyphenols-rich extract of *Calotropis procera* alone and in combination with *Trichoderma* culture filtrate for biocontrol of *Cantaloupe* wilt and root rot fungi. *Molecules*, 29, 139-158.
- Oloumi, H. (2014). Phytochemistry and ethno-pharmaceutics of *Calotropis procera*. *Journal of Ethno-Pharmaceutical Products*, 1, 1-8.
- Pandey, A., Swarnkar, V., Pandey, T., Srivastava, P., Kanojiya, S., Mishra, D.K., & Tripathi, V. (2016). Transcriptome and metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. *Scientific reports*, 6, 34464.
- Pellis, A., Guebitz, G.M., & Nyanhongo, G.S. (2022). Chitosan: Sources, processing and modification techniques. *Gels*, 8.
- Rogowska, A., & Szakiel, A. (2021). Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures—simultaneous stimulation or competition? *Plants*, 10, 20-28.
- Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A.W., Bakshi, M., & Dhiman, Z. (2024). Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants: A comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 133, 102383.
- Sharafi, A., Sohi, H.H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, K., & Ntui, V.O. (2013). A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113, 1-9.
- Seiber, J.N., Nelson, C.J., & Lee, S.M. (1982). Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 21, 2343-2348.
- Shvets, D.Y., Berezhneva, Z., Musin, K.G., & Kuluev, B. (2024). Effect of rol genes of the A4, 15834, and K599 strains of *Agrobacterium rhizogenes* on root growth and states of the antioxidant systems of transgenic tobacco plants subjected to abiotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 71, 165.
- Singh, P., Pandey, A., Bilung, C.J., Jeet, A., Nimoriya, R., Nandan, S., Kanojia, S., Mishra, D.K., & Tripathi, V. (2024). Identification of methyl jasmonate-induced cardiac glycosides and related biosynthetic transcripts from callus culture of *Calotropis gigantea* using transcriptome and metabolite profiling. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 60, 575-587.
- Soland, S., & Laima, S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*, 1, 1-5.
- 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, 8040.
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., & Jin, B. (2021). Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8568.
- Wu, Y., & Wang, D. (2009). A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Proteome Research*, 8, 436-442.
- Yazdanpanah, M., Sedaghati, E., Khodygan, P., Alaei, H., & Raghmi, M. (2017). Optimizing of carrot hairy root induction and stabilization for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 48, 945-959. (In Persian).
- Zhu, Y., Zhu, X., Wen, Y., Wang, L., Wang, Y., Liao, C., Zhao, M., Li, T., Liu, D., & Li, B. (2024). Plant hairy roots: Induction, applications, limitations and prospects. *Industrial Crops and Products*, 219, 119104.