مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۳ شماره ۴ صفحه های ۶۶۱ تا ۶۷۴ (۱۴۰۱)
مقاله پژوهشی

بهینه سازی تاثیر غلظت محیط کشت، ساکارز و pH بر تولید ریشه‌های مویین گیاه شابیزک (*Atropa belladonna* L.) با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) در شرایط درون شیشه ای[1]

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

بهنام کارجو، محمد فتاحی*[2]

چکیده

بهینه‌سازی محیط کشت تولید ریشه‌های مویین از نظر ترکیب‌ها و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت جهت رشد و بهینه‌سازی زیست توده ضروری است. بزرگترین مزیت ریشه‌های مویین این است که در مقایسه با گیاه مادری، اغلب توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. در این پژوهش، ریشه‌های مویین تراریخته در گیاه شابیزک به‌واسطه مایه‌کوبی با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه A7 تولید شدند. تایید مولکولی ریشه‌های مویین به‌وسیله PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* انجام گرفت. با استفاده از کدبندی‌های روش سطح پاسخ (RSM) اثر سه غلظت محیط کشت پایه مایع (MS، ۱/۲ MS و ۱/۴ MS) با غلظت‌های مختلف ساکارز (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم بر لیتر) و سه سطح pH (۵/۵، ۵/۸ و ۶/۱) بر رشد ریشه‌های مویین بررسی شد. وزن‌تر و خشک ریشه‌های مویین بعد از گذشت ۴ هفته اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از روش سطح پاسخ نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت با غلظت ۰/۵۶ (۱/۲MS≅) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به‌دست آمد. در شرایط بهینه ارزش مطلوبیت هر سه فاکتور محیط کشت، ساکارز و pH، ۰/۹۹۰ و وزن‌تر و خشک به‌ترتیب ۸/۵۸ و ۰/۳۱۷گرم بود. بر اساس نتایج GC/MS میزان آلکالوئید آتروپین در ریشه‌های مویین رشد یافته در مناسب‌ترین محیط کشت حدود ۶/۸۸ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: آتروپین، آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین، روش سطح پاسخ، محیط کشت.

مقدمه

گیاه شابیزک[3] یکی از گیاهان دارویی تیره سیب زمینی[4] است که دارای تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین می‌باشد (۲). تروپان آلکالوئیدها، از جمله آتروپین و اسکوپولامین، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که اثر قوی آنتی کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک داشته و به‌عنوان رفع اسپاسم، تسکین دهنده درد و اتساع مردمک چشم بکار برده می‌شوند (۲۲). بررسی‌ها نشان داده است که میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه طبیعی است و حتی یاخته‌های گیاهان کشت بافت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (۱۲). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین تولید متابولیت‌های

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰
۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (mo.fattahi@urmia.ac.ir).
۳- *Atropa belladonna* L. ۴- Solanaceae

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

دارویی با استفاده از گیاهان وحشی اقتصادی نبوده و بهتر است که برای تولید سریع و انبوه آنها از فنون کشت یاخته و بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود (۱۴). کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط *in vitro* ازطریق کشت سوسپانسیون یاخته‌ای و کشت اندام است (۲۰، ۳۱).

از آنجایی که ریشه محل بیوسنتز تروپان آلکالوییدها است، دست‌ورزی گیاهان دارای این ترکیب‌ها با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز[۱]، در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۴). امروزه، کشت ریشه‌های مویین، به دلیل رشد سریع، ثبات ژنتیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی، نداشتن زمین‌گرایی، سهولت نگهداری و قابلیت رشد در محیط‌های کشت فاقد هورمون و قابلیت تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، منبع مناسب و ارزشمندی برای تولید ترکیب‌های شیمیایی گیاهی، متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع و آنتی بادی‌های مونوکلونال است (۲۴). یکی از روش‌های مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم کشت بافت و تراریخته نمودن گونه‌های گیاهی، استفاده از سیستم ناقل اگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد (۲۱). این باکتری جزو باکتری‌های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه‌ای و گاهی گیاهان تک‌لپه‌ای را آلوده می‌کند (۳۶) و منجر به تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود. یاخته‌های ریشه‌های مویین حامل قطعه‌ی T-DNAی پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته‌ای خود می‌باشند (۱۰). استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز و کشت ریشه مویین به علت رشد سریع، کاهش زمان، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیب‌های شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (۱، ۹). یکی از بزرگترین محدودیت‌های استفاده از ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه، بازده کم تولید است. این مشکل را می‌توان با انتخاب لاین‌های ریشه مویین مناسب با راندمان بالای رشد و یا با بهینه کردن شرایط محیط کشت حل نمود (۳۴).

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهایی که پاسخ مورد نظر به واسطه تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به کار می‌رود. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و برهمکنش متغیرها، قابل برآورد هستند. در روش سطح پاسخ، سطح مورد نظر تحت تاثیر متغیرهای بسیاری قرار دارد و هدف، بهینه کردن پاسخ آنالیز است (۱۷). ابراهیمی و همکاران در یک پژوهش بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه گل میمونی بیابانی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که MSبهترین محیط کشت برای افزایش زیست توده ریشه‌های مویین است (۵). در پژوهشی دیگر اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و pH محیط کشت در کشت ریشه‌های مویین گیاه پنیر باد[۲] بررسی شد و نتایج نشان داد که در محیط کشت با pH ۵/۸ و ساکارز ۳ درصد بالاترین تجمع بیوماس به‌دست آمد (۲۶). در مطالعه‌ای تاثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های مویین گونه‌ای از گندم سیاه[۳]، مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین بیوماس و وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت MS ۱/۲ به‌دست آمد (۱۳). بهینه کردن عوامل شیمیایی با توجه به میزان و نوع قند، سطح نیترات، سطح فسفات، تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع تیمار با پیش ماده‌ها صورت می گیرد. همچنین عوامل کمی مانند pH، دما، اکسیژن، هوادهی، تکان خوردن در این امر موثر می‌باشند (۶). با توجه به منابع علمی قابل دسترس، تاکنون بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه مویین در گیاه شابیزک انجام نشده است. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه مویین که بتواند امکان کشت در مقیاس وسیع در یک سیستم بیوراکتور و تولید صنعتی متابولیت‌های مهم آن را فراهم کند، بسیار با اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، برای اولین بار بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه مویین گیاه شابیزک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها

بذرهای گیاه شابیزک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور تسریع جوانه زنی و شکست خواب، بذرها ابتدا به مدت ۱ ماه در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و سپس با اسید سولفوریک ۵۰ درصد به مدت ۲ دقیقه تیمارشدند.

۱- *Agrobacterium rhizogenes*
۲- *Withania somnifera*
۳- *Fagopyrum tataricum*

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

بذور تیمار شده، در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضد عفونی شدند و پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شدند. ریزنمونه ها پس از یک هفته برای تلقیح با باکتری آماده شدند.

آماده‌سازی باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها

به منظور القاء ریشه‌های موئین در شابیزک از سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز به روش تزریقی استفاده شد. به منظور آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح، باکتری در محیط کشت LB جامد حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک ریفامپیسین[۱] کشت و به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. در روش تزریقی، ریزنمونه‌های کوتیلیدونی یک هفته‌ای تهیه و با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به باکتری در LB جامد در بخش پشتی ریزنمونه‌های کوتیلدونی زخم‌هایی ایجاد شد. سپس ریزنمونه‌های تلقیح شده روی محیط کشت MS حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس به منظور حذف باکتری، ریز نمونه‌ها با آب مقطر استریل حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و در نهایت روی محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. هر هفته یکبار واکشت ریزنمونه‌ها انجام گرفت و در هر دوره واکشت، غلظت سفوتاکسیم به نصف کاهش داده می‌شد تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید. پس از حذف کامل ریزنمونه و آنتی‌بیوتیک، ریشه‌های مویین بدون آلودگی باکتریایی و با سرعت زیاد در محیط کشت MS جامد عاری از هورمون تکثیر یافتند.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین

برای تایید مولکولی، استخراج DNA از ریشه‌های مویین احتمالی به‌دست آمده در محیط جامد و ریشه حاصل از ریزنمونه تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) به روش CTAB (۱۶) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و همچنین روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. جهت تایید وضعیت تراریختی ریشه‌های مویین احتمالی، از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* B استفاده شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'- TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). برنامه PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی[۲] اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال[۳] آغازگرها در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، توسعه رشته‌های DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Cycler Veriti® 60-Well Thermal انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه ژل داک مدل[۴] Gel Logic 212 Pro (Carestream Health، آمریکا) مورد مشاهده و عکس برداری قرار گرفتند.

بررسی رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت‌های مختلف همراه با غلظت‌های مختلف ساکارز و pH های مختلف

پس از رشد مناسب ریشه‌ها در محیط کشت جامد و تایید مولکولی آنها به‌وسیله PCR، بهترین لاین از نظر میزان رشدی (انشعابات بیشتر در محیط جامد) انتخاب و برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از کدهای روش سطح پاسخ (RSM) اثر سه نوع محیط کشت MS، MS ۱/۲ و MS ۱/۴ و سه غلظت ساکارز ۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم بر لیتر و ۳ سطح pH ۵/۵، ۵/۸ و ۶/۱ روی میزان تولید ریشه مویین بررسی شد. در این آزمایش فاکتورهای X_1، X_2 و X_3 به‌ترتیب شامل محیط کشت، ساکارز و pH است که برای هر یک از این فاکتورها یک حد بهینه (۰)، یک حد بیشینه (۱+) و یک حد کمینه (۱-) تعریف شده است (جدول ۱). روش سطح پاسخ برای آزمایش‌های سه مولفه‌ای شامل ۱۵ نمونه آزمایشی (ارلن مایر) بود. بر اساس کد بندی‌های روش سطح پاسخ، حدود ۱ گرم از ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط MS جامد، وزن گردیده و در ارلن های

۱- Rifampicin ۲- Denaturation ۳- Annealing ۴- Gel Documentation

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

۲۵۰ میلی لیتری حاوی توری مخصوص شامل ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، کشت شدند و در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ rpm تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. هر هفته یک بار نیز عمل واکشت صورت می‌گرفت. پس از گذشت ۴ هفته، با استفاده از ترازوی دیجیتال حساس، وزن‌تر و خشک ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- سطوح فاکتورهای X_1، X_2 و X_3 و نحوه کدبندی برای روش سطح پاسخ.

Table 1. Components level of X1, X2 and X3 and their coding for response surface methodology.

مقدار Value / فاکتورها Factor	محیط کشت (X_1) Culture medium	ساکارز (X_2) g l^{-1} Sucrose	pH(X_3)
کمینه(-1) Minimum	¼ MS	15	5.5
بهینه (0) Optimum	½ MS	30	5.8
بیشینه(+1) Maximum	MS	45	6.1

استخراج آلکالوئید آتروپین

استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۵) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های مویین خشک، پودر شده و داخل ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شدند. سپس، کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵ درصد، به نسبت ۱۵: ۵: ۱ به نمونه‌های گیاهی اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۴۰ درجه سلسیوس التراسونیک[۱] شدند. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد، پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی لیتر کلروفرم، برای تبخیر فاز کلروفرمی از دستگاه روتاری اواپراتور[۲] (تبخیر کننده دوار) استفاده گردید. به عصاره باقی مانده و خشک شده ته بالن، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال اضافه شد و محلول حاصل به طور کامل به هم زده شد. در مرحله بعد، با ریختن مخلوط به‌دست آمده داخل قیف دکانتور دو فاز تشکیل شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها به یک بشر منتقل شد و pH آن روی یخ و به وسیله آمونیاک ۲۵ درصد تا ۱۰ تنظیم گردید. محلول قلیایی حاصل، به داخل قیف دکانتور ریخته شد و آلکالوئیدها یک مرتبه توسط ۲ میلی‌لیتر و دو مرتبه توسط ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. فاز کلروفرمی به‌دست آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک به منظور حذف آب موجود، از صافی عبور داده شده و کاغذ صافی توسط ۱ الی ۲ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول صاف شده به وسیله روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر و ماده جامد به‌دست آمده (آلکالوئید کل) در ۲- ۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد. در نهایت محلول به‌دست آمده جهت انجام آنالیز زیست‌شیمیایی داخل ویال‌های کوچک ریخته شد.

واکاوی آماری

آزمایش در قالب طرح روش سطح پاسخ (RSM) و با ۳ تکرار انجام گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودار از نرم افزار STATISTICA نسخه ۷ استفاده گردید.

نتایج

مشاهدات حاصل از طراحی آزمایش براساس روش سطح پاسخ (RSM) برای سه فاکتور محیط کشت (X_1)، ساکارز (X_2) و pH (X_3) در جدول ۲ نشان داده شده است.

۱- Ultrasonic

۲- Rotary Evaporator

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

جدول ۲- طراحی آزمایش نوع محیط کشت و نتایج حاصل از روش سطح پاسخ در ریشه‌های مویین گیاه شابیزک.

Table 2. Culture medium type experimental design and response surface methodology results in hairy roots of *Atropa Belladonna* L.

	فاکتورها (Factors)			مشاهدات (Observations)	
ردیف (Row)	X_1 محیط کشت (Culture medium)	X_2 ساکارز (Sucrose)	X_3 pH	وزن تر (گرم) Fresh weight (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)
1	0	0	0	8.59	0.321
2	0	0	0	8.45	0.311
3	0	0	0	8.34	0.308
4	0	-1	-1	3.63	0.142
5	0	-1	1	4.90	0.181
6	0	1	1	6.24	0.275
7	1	0	1	4.23	0.162
8	1	1	0	2.84	0.109
9	-1	0	1	5.15	0.192
10	-1	1	0	5.82	0.239
11	-1	0	-1	5.63	0.227
12	0	1	-1	7.13	0.285
13	1	0	-1	4.55	0.168
14	1	-1	0	3.94	0.149
15	-1	-1	0	3.43	0.136

برازش مدل پاسخ سطح در رشد ریشه‌های مویین

نتایج تجزیه واریانس و اشتباه آزمایشی برای مدل‌های RSM در جدول ۳ نشان داد که مدل‌های پیش بینی شده برای دو پاسخ سطحی به طور معنی‌داری دقیق هستند ($P<0.01$). R^2 و R^2 تصحیح شده (R^2–adj) نشانگر برازش مناسب مدل‌های RSM هستند. یک برازش مناسب با R^2 و P مقدار بالا، نشانگر این است که تغییرات در نمونه‌ها فقط به دلیل فاکتورهای انتخاب شده مدل و خطای خالص می‌باشد (۲۷). ضرایب برای پیش‌بینی مدل‌های وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) در جدول ۳ خلاصه شده است. عدد F به‌دست آمده از ضرایب پاسخ‌ها (متغیرهای وابسته) نشان داد که اغلب ضرایب خطی، ضرایب درجه دوم و ضرایب مربوط به برهمکنش در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. هرچه F به‌دست آمده برای یک متغیر بالا باشد سهم آن متغیر در معنی‌دار شدن بیشتر است.

بررسی تاثیرترکیبی نوع محیط کشت، pH و ساکارز روی وزن‌تر(FW) و وزن خشک (DW) ریشه‌های مویین بر اساس روش پاسخ سطحی (RSM)

نمودار سه بعدی برای وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) براساس متغیرهای X_1-X_3 در اشکال زیر نشان داده شده است. شکل نمودار طبیعت و میزان برهمکنش بین متغیرها را نشان می‌دهد (۲۵). بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با بهینه نقطه برهمکنش دو فاکتور است. بر اساس بر هم‌کنش X_1 (محیط کشت) و X_2 (ساکارز) که در شکل (۱و ۴) نشان داده شده است. بیشترین وزن‌تر و خشک ریشه مویین در مقدار بهینه محیط کشت (MS۰/۵۶ ≅ ۱/۲) و ساکارز (۳۰-۳۵ گرم بر لیتر) حاصل شده است به طوری که با افزایش غلظت محیط کشت و ساکارز تا حد بهینه میزان رشد ریشه‌های مویین نیز افزایش یافت و با افزایش غلظت محیط کشت (بیشتر از ۰/۵۶) و ساکارز (بیشتر از محدوده ۳۵-۳۰ گرم بر لیتر) به صورت توام رشد ریشه‌ها شروع به کاهش نمود. به نظر می‌رسد که ریشه‌های مویین این گیاه به غلظت‌های بالای نمک و ساکارز حساس بوده زیرا مشاهدات تجربی نشان داد که درغلظت بالای محیط کشت (مانند MS) و ساکارز، ریشه‌ها قهوه‌ای رنگ شده و دچار بافت مردگی می‌شدند (شکل ۷-الف). تاثیر برهمکنش X_1 (محیط کشت) و X_3 (pH) بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین نشان داد که بهترین رشد و بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت MS ۱/۲ و با غلظت ۰/۵۶ و pH ۷/۸-۵/۵ مشاهده شده است. مشاهدات تجربی نشان داد که رشد ریشه‌های مویین در غلظت پایین محیط کشت و pH کمتر و بیشتر از این حدود کاهش می‌یافت (شکل ۲و ۵). هم‌چنین بر اساس اثر برهمکنش X_2 (ساکارز) و X_3 (pH) بر وزن تر وخشک ریشه‌های مویین نشان داد

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

که با افزایش ساکارز تا محدوده ۳۵-۳۰ گرم بر لیتر و pH ۷/۸-۵/۵ وزن‌تر و خشک ریشه‌های مویین افزایش و بعد از آن کاهش یافته است به طوری که غلظت‌های بالای ساکارز باعث کاهش رشد ریشه‌های مویین و تغییردر ریخت‌زایی ریشه‌ها گردید همچنین میزان رشد ریشه‌های مویین در غلظت‌های پایین pH و ساکارز نیز بسیار کند بود (شکل ۳ و ۶).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت، ساکارز و pH بر رشد ریشه‌های مویین شابیزک بر اساس مدل RSM.

Table 3. Analysis of variance the effect of culture medium, sucrose, and pH on the growth of hairy roots *Atropa Belladonna* based on the RSM model.

منابع (Source)	درجه آزادی (Degrees of freedom)	وزن‌تر (گرم) Fresh weight (gr)			وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)		
		مجموع مربعات (sum of squares)	مقدار F F-value	مقدار P P-value	مجموع مربعات (sum of squares)	مقدار F F-value	مقدار P P-value
X_1: محیط کشت	1	2.49761	13.6677	0.014043	0.005304	9.36439	0.028098
X_2: ساکارز	1	19.10830	104.5665	0.000154	0.025800	45.54700	0.001084
X_3: pH	1	2.78300	15.2294	0.011381	0.007168	12.65386	0.016262
X_1X_2	1	13.80697	75.5560	0.000333	0.013645	24.08913	0.004443
X_1X_3	1	0.02212	0.1210	0.742078	0.000005	0.00893	0.928387
X_2X_3	1	4.08047	22.3296	0.005217	0.003732	6.58809	0.050234
X_1X_1	1	3.94579	21.5926	0.005598	0.007007	12.36946	0.016973
X_2X_2	1	0.00032	0.0017	0.968319	0.000071	0.12562	0.737476
X_3X_3	1	1.16640	6.3829	0.052759	0.000600	1.05966	0.350490
اشتباه آزمایشی (Experimental error)	5	0.91369			0.002832		
مجموع مربعات کل (Total sum of squares)	14	49.91977			0.072159		
R-Square-Adjusted R^2		0.9817-0.94875			0.96075-0.8901		

بر این اساس مدل‌های برازش شده بر حسب داده‌های آزمایشی برای هر یک از پاسخ‌ها را می‌توان به صورت زیر نوشت:

$$\mathbf{Y_{FW}} = ۸/۵۶۵۳۱ - ۱/۱۱۷۵۰X_1 + ۱/۲۱۰۲۶X_2 - ۰/۱۰۷۸۹X_3 - ۱/۹۳۳۴۲X_1X_2 - ۰/۰۱۷۳۳۷X_1X_3 - ۱/۰۸۰۰۰X_2X_3 - ۵X_1^2/۲۴۸۱۲ - ۳X_2^2/۸۶۷۵۰ - ۲X_3^2/۱۰۲۵۰$$

$$\mathbf{Y_{DW}} = ۰/۳۱۵۴۶۴ - ۰/۰۵۱۵۰۰X_1 + ۰/۰۶۱۴۲۱X_2 - ۰/۰۰۱۶۳۲X_3 - ۰/۰۸۱۴۷۴X_1X_2 + ۰/۰۰۸۲۱۱X_1X_3 - ۰/۰۲۴۵۰۰X_2X_3 - ۰X_1^2/۱۹۲۸۴۴ - ۰X_2^2/۱۲۱۵۸۳ - ۰X_3^2/۰۶۳۵۸۳$$

که Y پاسخ‌های پیش‌بینی شده و X_1، X_2 و X_3 به ترتیب محیط کشت، ساکارز و pH می‌باشد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

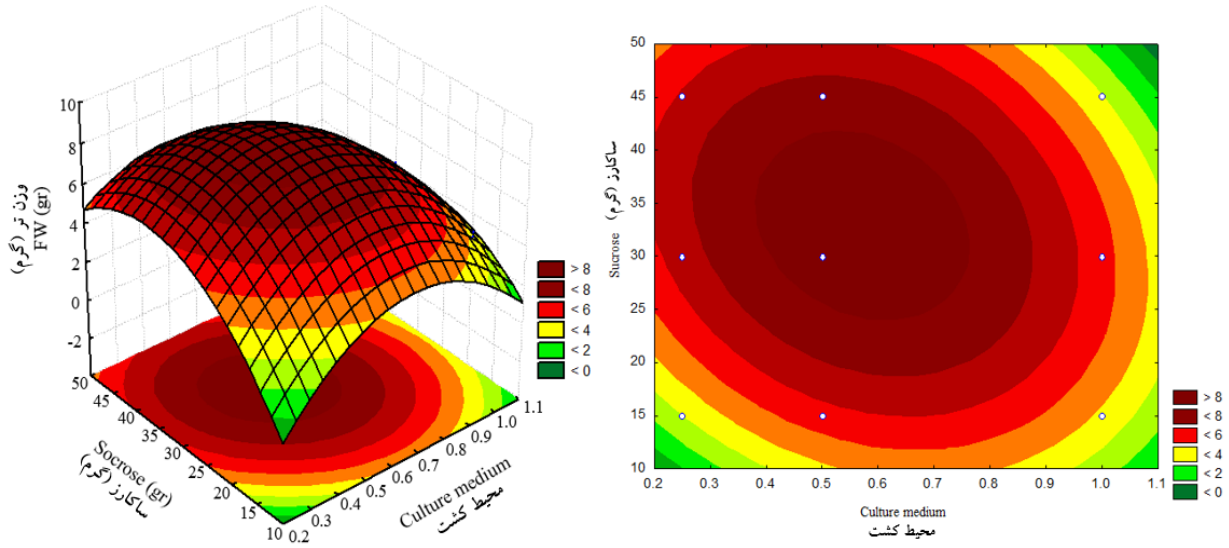

Fig. 1. The interaction of culture medium and sucrose on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۱- برهمکنش محیط کشت و ساکارز بر میزان وزن تر ریشه‌های مویین.

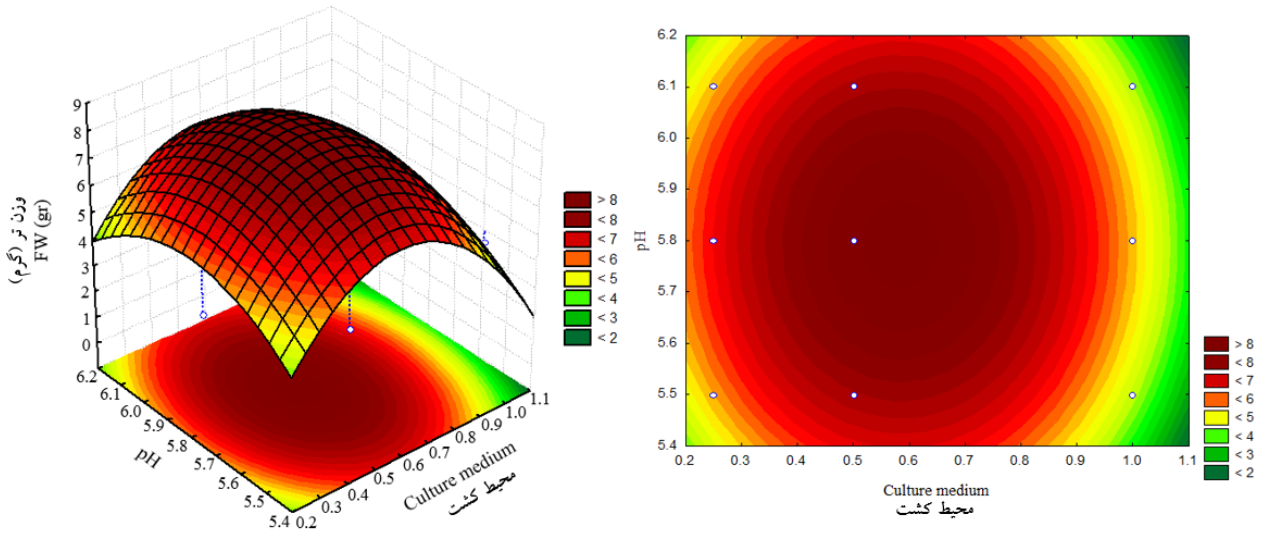

Fig. 2.The interaction of culture medium and pH on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۲- برهمکنش محیط کشت و pH بر میزان وزن تر ریشه‌های مویین.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

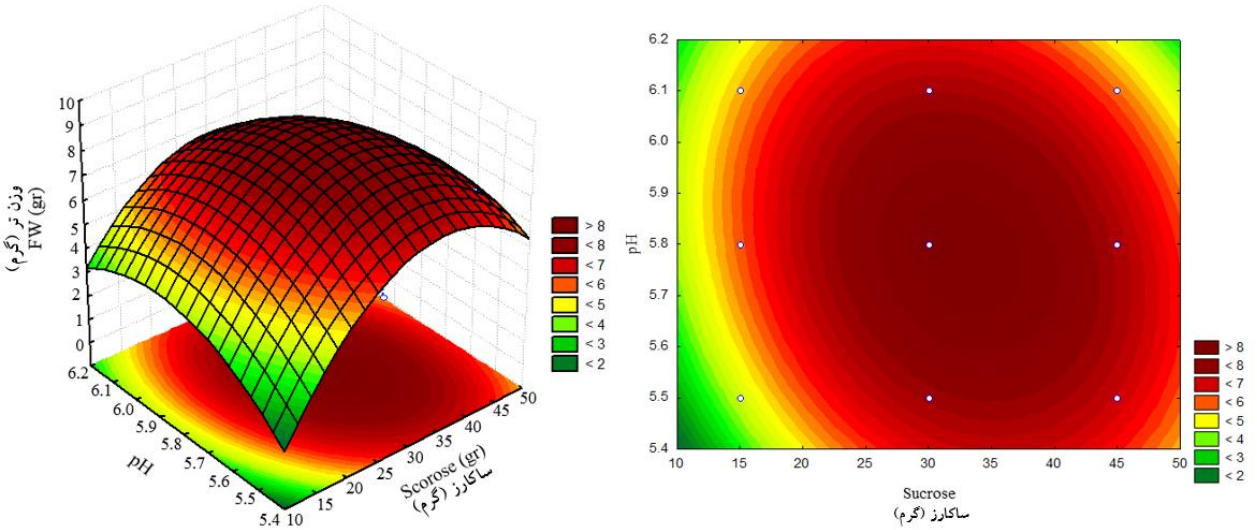

Fig. 3. The interaction of sucrose and pH on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۳- برهمکنش ساکارز و pH بر میزان وزن تر ریشه‌های مویین.

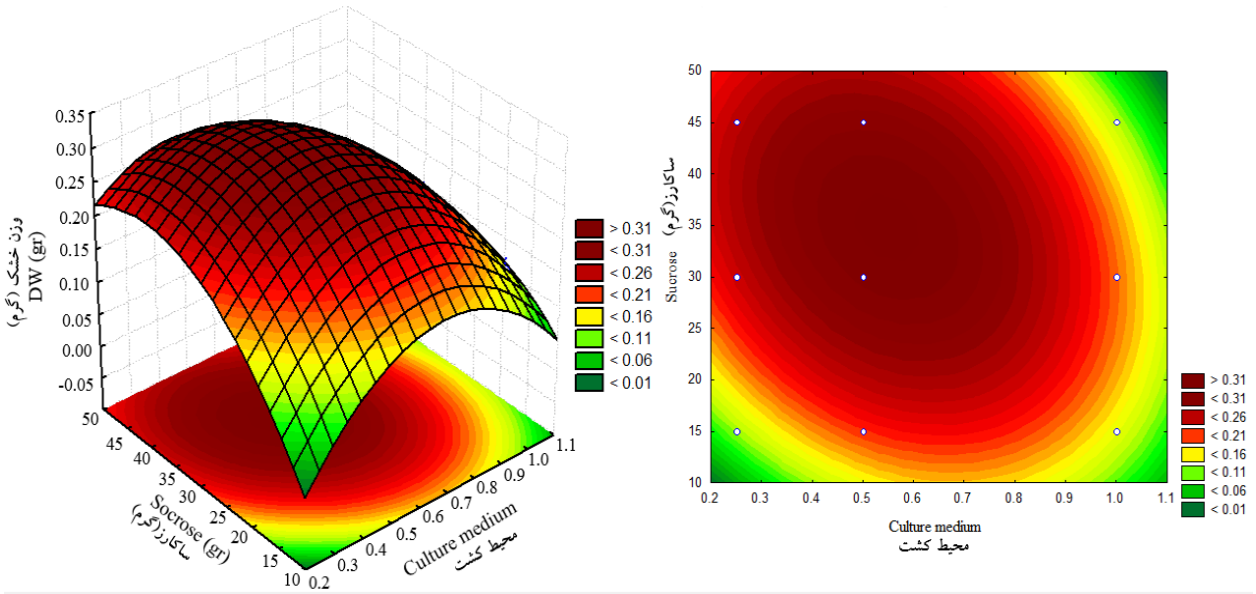

Fig. 4. The interaction of culture medium and sucrose on the dry weight of hairy roots.

شکل ۴- برهمکنش محیط کشت و ساکارز بر میزان وزن خشک ریشه‌های مویین.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

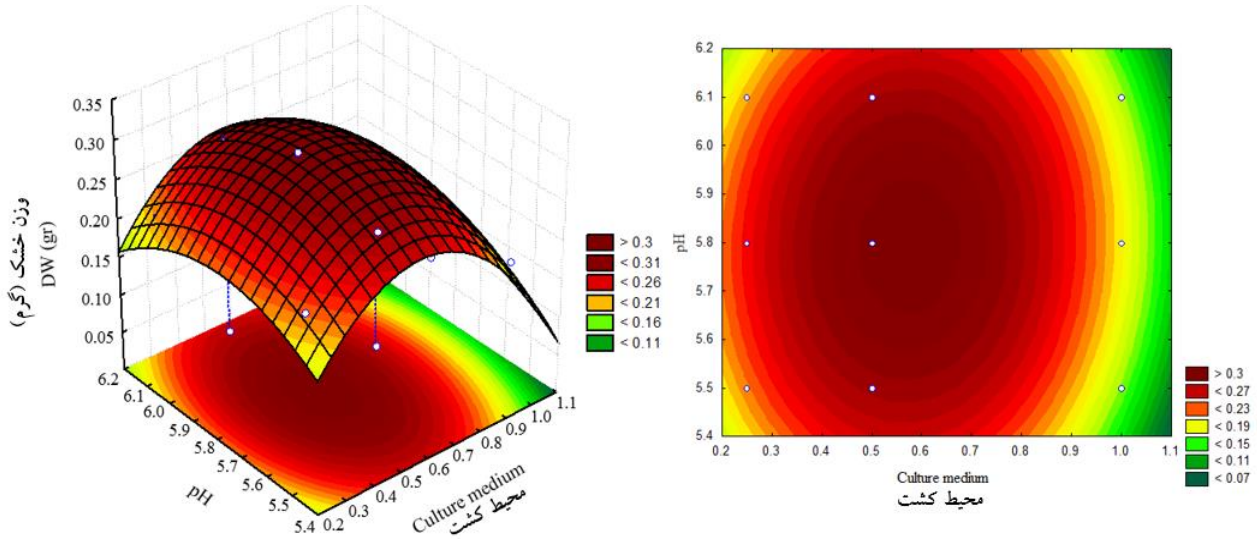

Fig. 5. The interaction of culture medium and pH on the dry weight of hairy roots.

شکل ۵- برهمکنش محیط کشت و pH بر میزان وزن خشک ریشه‌های مویین.

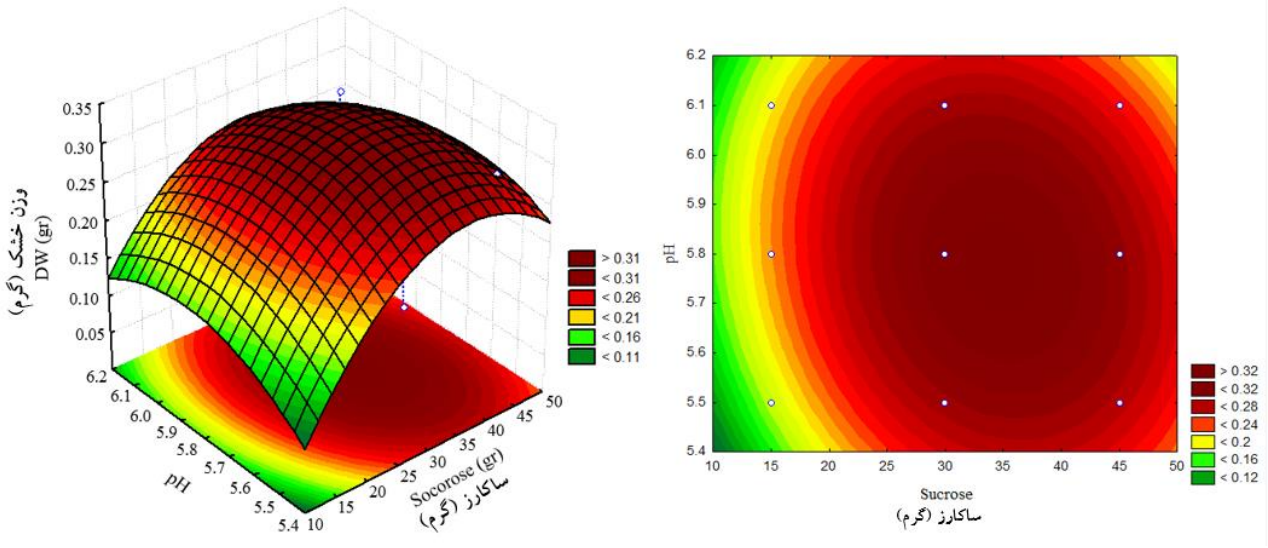

Fig. 6. The interaction of sucrose and pH on the dry weight of hairy roots.

شکل ۶- برهمکنش ساکارز و pH بر میزان وزن خشک ریشه‌های مویین.

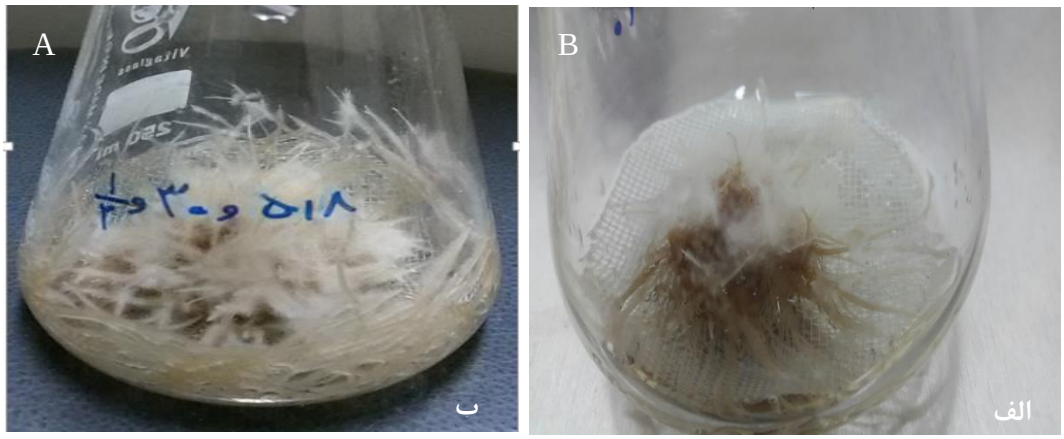

Fig. 7. A) The hairy roots grown in 1/2MS culture medium with 30 g l^{-1}sucrose and pH 5.8 B) The hairy roots grown in MS culture medium with 45 g l^{-1}sucrose and pH 5.8

شکل ۷- الف) ریشه مویین رشد یافته در محیط کشت MS با ۴۵ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ ب) ریشه مویین رشد یافته در محیط کشت MS ۱/۲ با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

بهینه‌سازی محیط کشت به صورت همزمان برای مقادیر با ارزش (وزن تر و خشک) در ریشه‌های مویین شابیزک

شکل ۸ مقدار بهینه محیط کشت را برای ارزیابی همزمان دو پاسخ وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، بهترین حالت ممکن برای ارزیابی همزمان دو پاسخ (وزن تر و خشک) در غلظت ۰/۵۶ محیط کشت (≅ ۱/۲MS) همرا با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به‌دست آمد. در شرایط بهینه ارزش مطلوبیت ۰/۹۹۰ بود که در این شرایط وزن‌تر و خشک به‌ترتیب ۸/۵۸ و ۰/۳۱۷گرم بود. بنابراین براساس نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از روش سطح پاسخ، محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به عنوان بهترین ترکیب محیط کشت انتخاب گردید.

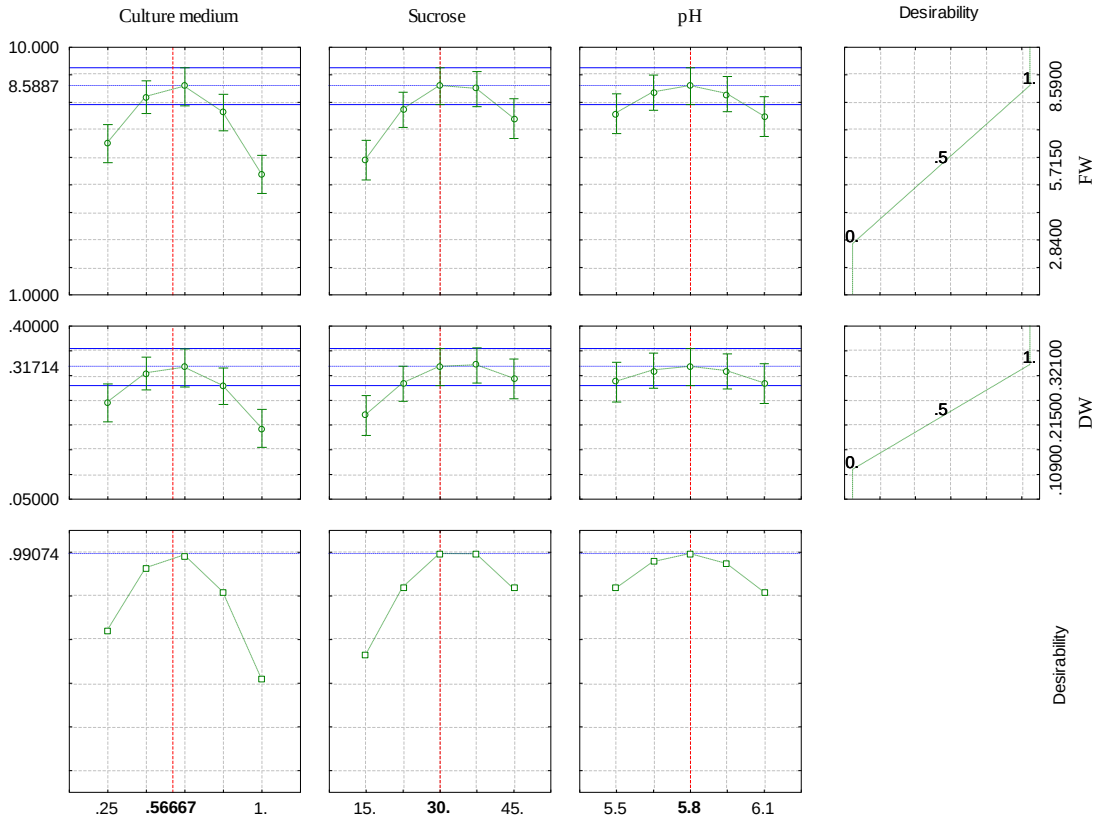

Fig. 8. Culture Medium Optimization for amounts with values (FW and DW) in hairy roots *Atropa Belladonna* L.

شکل ۸ – بهینه‌سازی محیط کشت برای مقادیر با ارزش (وزن تر و خشک) در ریشه‌های مویین شابیزک.

تایید تراریختی ریشه‌های مویین

به منظور تایید ملکولی ریشه‌های مویین تولید شده، یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد. وجود باند ۷۸۰ نوکلئوتیدی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان دهنده حضور ژن *rolB* و در نتیجه نشان دهنده این است که ریشه های تولید شده در اثر انتقال ژن با واسطه اگروباکتریوم رایزوژنز به وجود آمده اند (شکل۹).

تعیین میزان تولید آتروپین در محیط کشت بهینه سازی شده توسط دستگاه GC/MS

نتایج حاصل از دستگاه GC/MS نشان داد که میزان تولید آتروپین در بهترین ترکیب محیط کشت (۱/۲MS همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸)، ۶/۸۸ درصد بود. کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC/MS نمونه‌های ریشه مویین رشد یافته در محیط کشت مذکور در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

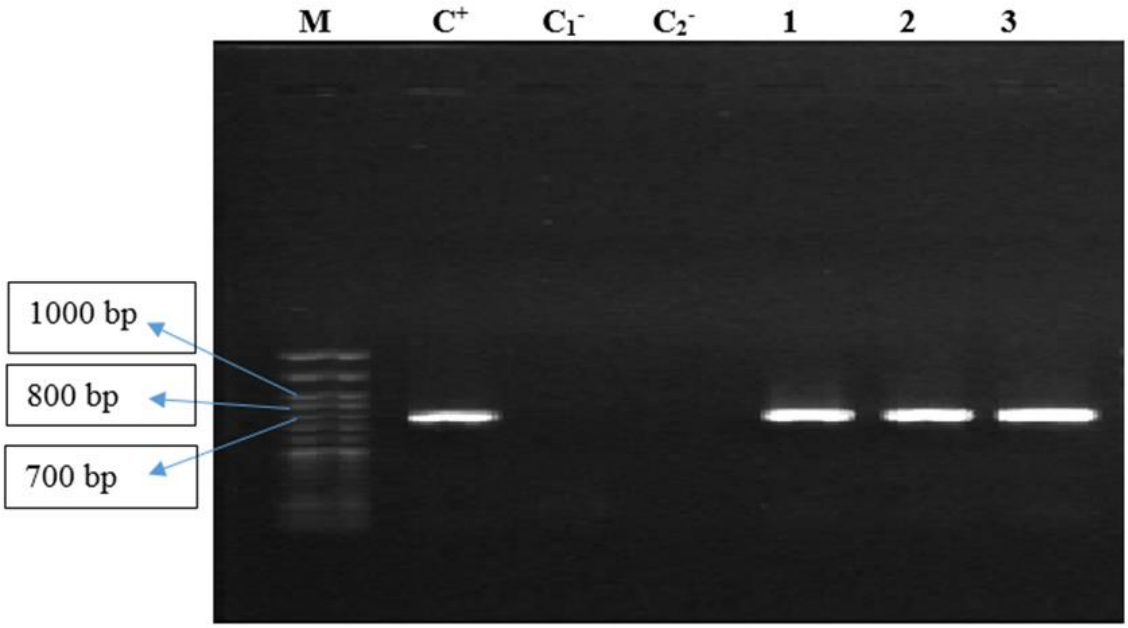

Fig.9. polymerase chain reaction analysis confirm the *rol* B gene in transgenic hairy roots of *Atropa Belladonna*. M: DNA marker 1kb (Fermentase), C^+: *Agrobacterium rhizogenes* A7 strains as a positive control, C_1^-: Non transgenic control roots as The first negative control, C_2^-: PCR reaction without DNA pattern as the second negative control, Lines 1 to 3: hairy roots leaf explants One-week induced by *Agrobacterium rhizogenes* A7 strain.

شکل۹ – آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت تایید حضور ژن *rol* B در ریشه‌های مویین تراریخته شابیزک. M: DNA مارکر 1kb (Fermentase)، C^+: اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A7 به عنوان کنترل مثبت، C_1^-: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی اول، C_2^-: واکنش PCR بدون الگوی DNA به عنوان کنترل منفی دوم، لاین ۱ تا ۳: ریشه‌های مویین القا شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای توسط سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز.

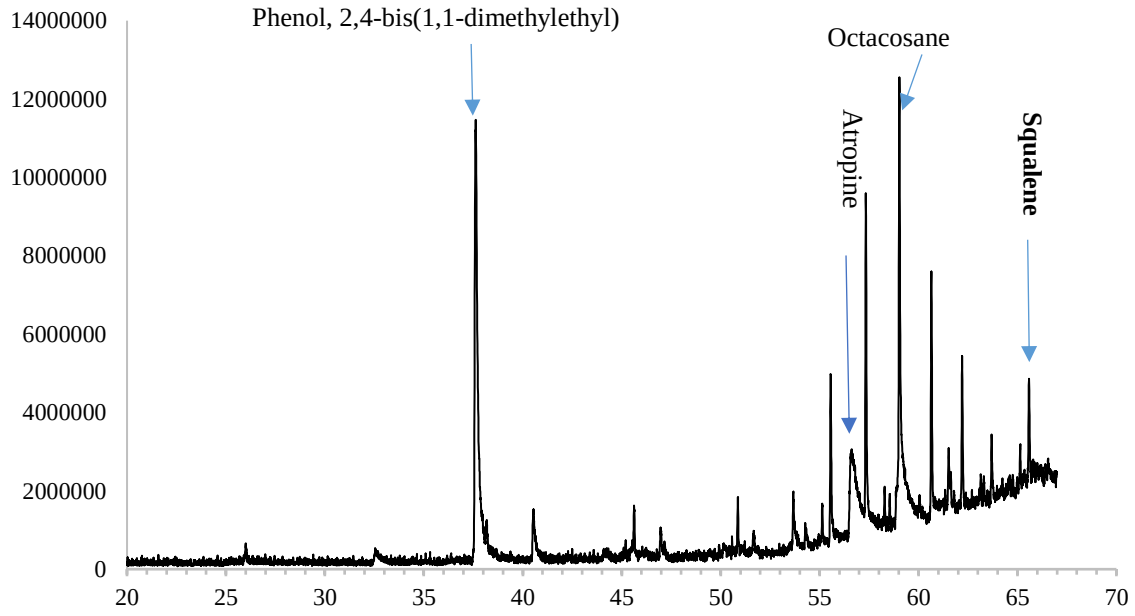

Fig. 10. Chromatogram hairy roots grown in the best culture medium.

شکل ۱۰- کروماتوگرام ریشه‌های مویین رشد یافته در بهترین محیط کشت.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

بحث

تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد ریشه‌های مویین دارد و غلظت و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت در میزان رشد ریشه مویین تاثیر بسزایی دارد. بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت به منظور رشد مطلوب و افزایش تجمع متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های مویین دارای اهمیت بسیار زیاد است (۳، ۲۶). نتایج این پژوهش نشان داد که ریشه‌های مویین در محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به خوبی رشد کرده و دارای بیشترین زیست توده هستند. مناسب بودن محیط کشت ۱/۲MS برای رشد و توسعه ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی به اثبات رسیده است (۲۳ و ۳۲). مشابه با نتایج پژوهش حاضر، در پژوهشی طی تاثیر سه نوع محیط کشت مختلف (MS مایع ، ۱/۲MS مایع و MS جامد) بر رشد ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)، بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت ۱/۲MSمایع به‌دست آمد (۸). با توجه به متفاوت بودن نوع و میزان عناصر ماکرو و میکرو در فرمولاسیون محیط کشت‌های مختلف، محیط کشت‌ها تفاوت اساسی با یکدیگر داشته و در نتیجه بر پاسخ‌های درون شیشه‌ای ریزنمونه تاثیرات اساسی دارند (۲۹). به عنوان مثال در محیط کشت MS و MS ۱/۲ غلظت نیتروژن متفاوت بوده به طوری که در محیط کشت MS غلظت بالای نیتروژن می‌تواند عامل محدود کننده رشد ریشه‌های مویین باشد در واقع افزایش نیتروژن تا یک حد بهینه اکسین درونی را افزایش داده اما افزایش بیشتر نیتروژن از طریق کاهش اکسین درونی باعث کاهش رشد ریشه می‌شود (۳۵). کمبود رشد ریشه در محیط کشت MS ۱/۴ می‌تواند به دلیل کمبود عناصر معدنی از جمله نیتروژن، فسفر، پتاسیم و روی باشد. همچنین تفاوت در پاسخ رشدی ریشه‌های مویین گیاهان مختلف به نوع محیط کشت را می‌توان به نوع ژنوتیپ گیاهی و تفاوت در نیازهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاه و همچنین نوع سویه باکتری مورد استفاده نسبت داد (۱۹). قندها علاوه بر منبع کربن و انرژی، در کشت ریشه‌های مویین همانند هورمون‌ها به عنوان ایجاد سیگنال در تولید و رشد متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کنند (۳۳). ساکارز یک منبع مهم کربن جهت کشت یاخته گیاهی و سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۲۸). در پژوهشی، Lourenço و همکاران (۱۸) تاثیر ساکارز در تجمع زیست توده[1] ریشه‌های مویین را بررسی و گزارش نمودند که غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه‌های مویین تاثیر گذار است و غلظت‌های ۳۵-۳۰ گرم بر لیتر ساکارز موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه‌های مویین گردید و با افزایش غلظت ساکارز رشد ریشه‌ها به تدریج شروع به کاهش نمود که با نتیجه‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. مطابق نظر Hamill و همکاران (۱۱) کاهش رشد و تغییر مورفولوژی و کالوسی شدن ریشه‌ها در غلظت‌های بالای ساکارز احتمالا ناشی از تنش اسمزی است. همچنین وقتی که میزان pH در محیط کشت پایین است سطح آلومینیم و هیدروژن برای سیستم ریشه مویین سمیت ایجاد می‌کند و اگر pH محیط کشت بالا باشد در این صورت ممکن است عناصر کم مصرف به شکل غیرقابل جذب در اختیار ریشه مویین قرار گیرد (۳۰). ژن *rol* B نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های مویین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن، ریشه مویین تولید نخواهد شد (۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان روشی مناسب در مدل‌سازی و بهینه‌سازی محیط کشت ریشه‌های مویین گیاه شابیزک مطرح گردد.

نتیجه‌گیری

امروزه، بهره‌گیری از کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیب‌های ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. در گام نخست یافتن مناسب‌ترین محیط کشت جهت افزایش زیست توده ریشه‌های مویین و در گام بعدی استفاده از عوامل محرک در محیط کشت بهینه‌سازی شده، می‌تواند موثرترین روش در تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه باشد. بنابراین در پژوهش حاضر، غلظت ۰/۵۶ محیط کشت (۱/۲MS) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها به عنوان بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های مویین گیاه شابیزک معرفی می‌گردد.

منابع

References

1. Banerjee, S., Singh, S. and Rahman, L.U. 2012. Biotransformation studies using hairy root cultures-a review. Biotechnol. Adv. 30(3): 461-468.

۱- Biomass

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

2. Çaksen, H., Odabaş, D., Akbayram, S., Cesur, Y., Arslan, Ş., Üner, A. and Öner, A.F. 2003. Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: an analysis of 49 children. Hum. Exp. Toxicol. 22(12): 665-668.
3. Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M.C., Sobolev, V.S. and Medina-Bolivar, F. 2010. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. Plant Physiol. Biochem. 48(5): 310-318.
4. Dechaux, C. and Boitel-Conti, M. 2005. A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 47(1): 101-107.
5. Ebrahimi, R., Jafari, M., Ghadimzadeh, M. and Abdollahi Mandoulakani B. 2015. Optimization of induction and culture conditions of transgenic hairy roots in the medicinal plant *Scrophularia deserti*. J. Agr. Biotech. 4: 1-20 (in Persian).
6. Ehsanpour, A. and Amini, F. 2003. Plant Cell and Tissue Culture. Jahad Daneshgahy of IUT, Iran, 184p.
7. El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J. and Ahmad, M. 2017. Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. Oxid. Med. Cell. Longev. 2: 10-17.
8. Fathi, R., Mohebodini, M. and Chamani, E. 2018. Optimization of Hairy Root Induction and Biomass Production of Chicory (*Cichorium intybus* L.). J. Hort. Sci. 32(3), 393-405 (in Persian).
9. Giri, A. and Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy root: recent trends and application. Biotechnol. Adv. 18: 1-22.
10. Häkkinen, S.T. and Oksman-Caldentey, K.M. 2018. Progress and prospects of hairy root research. Hairy roots: an effective tool of plant biotechnology. Springer Sci. Rev. pp.3-19.
11. Hamill, J. D., Parr, A. J., Rhodes, M. J., Robins, R. J. and Walton, N. J. 1987. New routes to plant secondary products. Biotechnol. 5(8): 800-804.
12. Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H. 2009. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. J. Med. Plants Stud. 8(29):1-190 (in Persian).
13. Huang, X., Yao, J., Zhao, Y., Xie, D., Jiang, X. and Xu, Z. 2016. Efficient rutin and quercetin biosynthesis through flavonoids-related gene expression in *Fagopyrum tataricum Gaertn*. hairy root cultures with UV-B irradiation. Front. Plant Sci. 7:63.
14. Ionkova, I. 2007. Biotechnological approaches for the production of lignans. Pharmacogn Rev. 1(1): 57-68.
15. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Rep. 5(4): 239-242.
16. Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T. and Abdin, M. Z. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. Afr. J. Biotechnol. 6(3): 175.
17. Li, J. W., Ding, S. D. and Ding, X. L. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. jinsixiaozao. J. Food Eng. 80(1): 176-183.
18. Lourenço, P. M., de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A. and Domingos, A. 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. Enzyme Microb. Technol. 31(3): 242-249.
19. Mehrotra, S., Kumar Kukreja, A., Singh Khanuja, S. P. and Nath Mishra, B. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electron. J. Biotechnol. 11(2): 69-75.
20. Mulabagal, V. and Tsay, H. S. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2(1): 29-48.
21. Nigutová, K., Kusari, S., Sezgin, S., Petijová, L., Henzelyová, J., Bálintová, M. and Čellárová, E. 2019. Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured Hypericum species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. J. Pharm. Pharmacol. 71(1): 46-57.
22. Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M. H. 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Mol. 13(8): 1722-1742.
23. Park, S.U., Li, X., Eom, S.H., Lee, C.Y. and Lee, S.Y. 2010. E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. Arch. Biol. Sci. 62:649-652.
24. Pawar, P. K. and Maheshwari, V. L. 2004. Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae.
25. Prakash, O., Talat, M., Hasan, S. H. and Pandey, R. K. 2008. Factorial design for the optimization of enzymatic detection of cadmium in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. Bioresour. Technol. 99(16):7565-7572.
26. Praveen, N. and Murthy, H.N. 2012. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. Ind. Crops Prod. 35: 241– 243.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

27. Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I. and Raso, J. 2011. Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. Food Chem. 126(3): 1482-1487.
28. Shinde, A. N., Malpathak, N. and Fulzele, D. P. 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. J. Nat. Med. 64(3): 346-353.
29. Singh, B. D. 2005. Plant tissue culture. Biotechnology fundamentals and application. New Dehli. Aust. J. Basic Appl. Sci. 14:332-425.
30. Sivakumar, G., Yu, K. W., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Curr. Sci. 89(4): 641-649.
31. Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Trop. J. Pharm. Res. 2: 243-253.
32. Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. and Putalun, W. 2009. Isoflavonoid production in a hairy roots culture of Pueraria candollei. Z. Naturforsch. C .64(9-10): 687-691.
33. Wang, Y. and Weathers, P. J. 2007. Sugars proportionately affect artemisinin production. Plant cell reports. 26(7): 1073-1081.
34. Woo, S. S., Song, J. S., Lee, J. Y., In, D. S., Chung, H. J., Liu, J. R. and Choi, D. W. 2004. Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis. Phytochem. 65(20): 2751-2761.
35. Wu, X., 2007. Establishment and chemical analysis of hairy roots of *Eucommia ulmoides*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College. 65pp.
36. Zafar, S., Dilshad, E., Ismail, H., Rizvi, C. B. and Mirza, B. 2019. Rol genes enhance content of artemisinin and other secondary metabolites in Shennong hybrid of *Artemisia annua*. Chin. Herb. Med. 11(2): 209-215.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 23 (4): 661-674 (2022)
Research article

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

B. Karjo and M. Fattahi*[1]

Optimization of the culture medium of hairy roots in terms of the composition and type of ingredients in the medium is essential for proper growth and optimal biomass production. The greatest advantage of culturing Hairy roots is that they are often capable of producing secondary metabolites compared to the mother plant. In this research, transgenic hairy root induction was established through the mediation of the A7 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Molecular confirmation of hairy roots was done by PCR using *rol*B gene-specific primers. With response surface methodology (RSM) coding, the effect of three types of basal liquid MS media (MS, ½ MS and ¼ MS) with different sucrose concentrations (15, 30, and 45 g l^{-1}) and three pH levels (5.5, 5.8 and 6.1) on the growth of hairy root was investigated. The fresh and dry weight of hairy roots was measured after 4 weeks. The obtained results of response surface methods showed that the highest dry weight of hairy roots in the culture medium with a concentration of 0.56 of MS (≅ 1/2MS), 30 g l^{-1} of sucrose, and pH of 5.8. In optimum conditions, the utility value was 0.990, and the fresh and dry weight of hairy roots, was 8.58gr and 0.317gr, respectively. According to GC/MS results, the amount of atropine alkaloid in hairy roots grown in optimum culture medium was about 6.88%.

Keywords: Atropine, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, Response Surface Methodology, Culture medium.

1. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran, respectively.
* Corresponding Author, Email: (mo.fattahi@urmia.ac.ir)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.4.8.2]