



The impact of sucrose feeding on augmenting growth and phenolic compounds bio-production in adventitious root culture of *Echinacea purpurea* (L.) Monech

SeyyedeH Mohadeseh Hosseini¹, Seyyed Ali Andi^{2*}, Amir Sahraroo³ and
Mohammad Bagher Farhangi⁴

1- M.Sc. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

2*- Corresponding author, Faculty of Medicinal Plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

E-mail: a.andi@ausmt.ac.ir

3- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

4- Department of Soil Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

Received: August 2023

Revised: January 2024

Accepted: May 2024

Abstract

Background and objectives: Adventitious root cultures of medicinal plants represent a bountiful reservoir of valuable secondary metabolites. The esteemed medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Monech is highly sought after for its phytochemical properties, with a traditional use of its roots in herbal medicines and dietary supplements as an immune system stimulant for treating inflammatory, viral, and respiratory diseases. However, the heterogeneous synthesis of bioactive compounds in natural environments and the limitations of conventional plant production methods necessitate exploring alternative approaches for obtaining active plant substances and organs. Among various *in vitro* cultivation techniques, the cultivation of differentiated tissues, specifically roots, consistently demonstrates the ability to yield higher quantities of metabolites than undifferentiated tissues such as callus and suspension cells.

Methodology: The primary aim of this study was to accurately determine the ideal combination of plant explants and plant growth regulators that would facilitate the successful establishment of adventitious root suspension cultures. Three distinct plant explants, namely leaf, petiole, and root, were carefully evaluated in this study. These explants were subjected to varying concentrations (0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg.L⁻¹) of two types of plant growth regulators: indole-3-butyric acid (IBA) and 1-naphthalene acetic acid (NAA). After six weeks, the number of adventitious roots developed by the explants under different concentrations of plant growth regulators was measured. The impact of different sucrose concentrations (10, 20, 30, 40, 50, and 60 grams per liter) in the culture medium was investigated over a four-week cultivation period. Various dynamic characteristics of root growth, including fresh weight, dry weight, volume of the remaining medium, electrical conductivity, and pH, were closely examined. Furthermore, phytochemical properties such as total phenol, total flavonoid, and antioxidant activity were assessed. To administer the sucrose treatments, 0.35 grams of adventitious roots were placed inside 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of half MS culture medium, 1 mg.L⁻¹IBA, and varying concentrations of sucrose, maintaining a pH of 5.8. Measurements were taken from three flasks of each treatment weekly. The experiments followed a Completely Randomized Factorial Design, with statistical analysis conducted using SPSS software.



Results: Leaf explants exhibited superior root formation to root and petiole explants. The average number of adventitious roots in leaf explants reached 3.37, while petiole and root explants produced only 0.23 and no adventitious roots, respectively. The most effective root formation occurred in MS medium with 1 mg.L⁻¹ IBA, resulting in an average of 4 roots per explant. Hormone concentrations of 0 and 2 mg.L⁻¹ did not induce root formation. In the fourth week of cultivation, the highest fresh weight recorded was 29.8 grams per liter, marking a remarkable 3.4-fold increase from the initial inoculation weight. The culture medium's electrical conductivity and pH decreased as the cultivation progressed. Cultivation weeks did not significantly impact total flavonoid production and related antioxidant activity in adventitious roots. However, the cultivation period significantly affected the total phenol content at 57.56 mg of gallic acid per gram of dry weight. Altogether, lower sucrose concentrations proved more efficient for biomass production, bioactive compound content, and antioxidant activity. The highest biomass accumulation and total phenol content occurred at 3% sucrose. In comparison, in the fourth week of cultivation, the highest total flavonoid content and the highest free radical inhibition percentage were observed at 2% and 1% sucrose, respectively. Notably, a negative correlation was observed between the electrical conductivity of the remaining culture medium and root biomass in lower sucrose concentrations as the culture duration increased.

Conclusion: In light of the immense potential harbored by adventitious root suspension cultures of *E. purpurea* as an alternative source for the production of secondary metabolites, particularly caffeic acid derivatives, the discoveries made in this research have the potential to advance the field of mass production for active root organs, thereby facilitating the synthesis of these precious compounds through the implementation of appropriate laboratory bioreactor systems.

Keywords: Purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Monech), sucrose feeding, adventitious root culture, biomass, phenolic compounds.

اثر تغذیه ساکارز بر افزایش رشد و تولید ترکیبات فنولی در کشت ریشه نابجا سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Monech)

سیده محدثه حسینی^۱، سیدعلی اندی^{۲*}، امیر صحرارو^۳ و محمدباقر فرهنگی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران، پست الکترونیک: a.andi@ausmt.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- استادیار، گروه خاک‌شناسی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: ریشه نابجا در گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه باارزش هستند. سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Monech)) یک گیاه دارویی مهم است و به‌طور گسترده در صنعت دارویی استفاده می‌شود. ریشه‌ها به‌طور سنتی در داروهای گیاهی و مکمل‌های غذایی به‌عنوان یک محرک سیستم ایمنی در درمان بیماری‌های التهابی، ویروسی و تنفسی استفاده می‌شوند. ناهمگنی سنتز ترکیبات مؤثره در محیط طبیعی، عملکرد پایین تولید گیاه در کنار عوامل دیگر از جمله علل جست‌وجو برای رویکردهای جایگزین تولید مواد و اندام مؤثره گیاه هستند. در میان تکنیک‌های مختلف کشت‌های درون شیشه‌ای، کشت بافت‌های تمایز یافته همانند ریشه، معمولاً مقادیر بالاتری از متابولیت‌ها را نسبت به بافت‌های تمایز نیافته مانند کالوس و سلول‌های کشت مایع سلولی تولید می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، هدف اولیه انتخاب بهترین ریزنمونه گیاهی و شناسایی دقیق مؤثرترین ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بود که بتواند استقرار موفقیت‌آمیز کشت مایع ریشه نابجا را تسهیل کند. این بررسی شامل ارزیابی سه ریزنمونه گیاهی متمایز برگ، دم‌برگ و ریشه بود. این ریزنمونه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی ایندول-۳ - بوتیریک اسید (IBA) و ۱- نفتالن استیک اسید (NAA) قرار گرفتند. تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی پس از شش هفته اندازه‌گیری شد. در آزمایش مجزای دیگری، اثر غلظت‌های مختلف ساکارز شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم در لیتر محیط کشت بر روی ویژگی‌های دینامیکی رشد (وزن تر و خشک، حجم محیط باقیمانده، هدایت الکتریکی (EC) و pH) و فیتوشیمیایی (فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی) ریشه در طول چهار هفته کشت، بررسی شد. برای اعمال تیمارهای ساکارز، مقدار ۰/۳۵ گرم وزن تر از ریشه‌های نابجا در داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر نصف محیط کشت MS، یک میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه غلظت‌های مختلف ساکارز با pH= 5.8 قرار داده شدند. محتوای سه فلاسک هر تیمار در هر هفته برای اندازه‌گیری استفاده شد. مطالعات در قالب آزمایش فاکتوریل به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شدند و مورد تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS قرار گرفتند.

نتایج: ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌های برگ بسیار مؤثرتر از ریزنمونه‌های ریشه و دم‌برگ بودند. میانگین تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه برگ ۹۳/۵٪ بود، در حالی که ریزنمونه‌های دم‌برگ و ریشه به ترتیب ۶/۵ و صفر درصد ریشه نابجا تولید کردند. محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA حداکثر تعداد ریشه را با میانگین ۳۳/۳٪ ایجاد کرد، در حالی که غلظت‌های صفر و دو میلی‌گرم در لیتر از هر دو هورمون استفاده شده ریشه‌ای تولید نکردند. بیشترین وزن تر با میزان ۲۹/۸ گرم در لیتر در هفته چهارم کشت مشاهده شد که این میزان ۴/۳ برابر وزن تلقیح اولیه بود. با پیشرفت مدت زمان کشت، میزان EC و pH محیط کشت کاهش یافت. البته افزایش زمان کشت، تأثیر قابل توجهی بر تولید فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط در ریشه‌های نابجا نداشته

است. با وجود این، فنول کل با میزان ۵۶/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک در هفته چهارم تحت تأثیر افزایش معنی‌دار مدت زمان کشت فرار گرفت. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که غلظت‌های کمتر ساکارز برای تولید زیست‌توده و محتوای ترکیبات مؤثره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کارآمدتر هستند. بالاترین تجمع زیست‌توده و محتوای فنول کل، بیشترین مقدار از محتوای فلاونوئید کل و بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد به ترتیب با به‌کارگیری غلظت‌های سه، دو و ۱٪ ساکارز در هفته چهارم کشت اندازه‌گیری گردید. در کل، همبستگی معکوسی بین میزان EC محیط کشت باقیمانده و زیست‌توده ریشه‌ها در غلظت‌های پایین‌تر ساکارز با افزایش مدت زمان کشت مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که کشت مایع ریشه نابجا *E. purpurea* به‌عنوان یک منبع جایگزین بالقوه برای تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه مشتقات کافئیک اسید (Caffeic acid) شناسایی می‌شوند، یافته‌های این پژوهش ممکن است به مطالعات تولید انبوه اندام مؤثره ریشه و به دنبال آن، این ترکیب‌های خیلی با ارزش با استفاده از سیستم‌های بیوراکتور مناسب آزمایشگاهی کمک کند.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل (*E. purpurea* (L.) Monech)، تغذیه ساکارز، کشت ریشه نابجا، زیست‌توده، ترکیبات فنولی.

مقدمه

جنس اکیناسه (سرخارگل) گیاهانی چندساله از خانواده Asteraceae را دربرمی‌گیرد که بومی آمریکای شمالی می‌باشد. ۱۱ گونه در این جنس وجود دارد که سه گونه از آنها شامل *Echinacea purpurea* (L.) Monech و *Echinacea pallida* و *Echinacea angustifolia* DC. Nutt. (Nutt.) در حال حاضر برای مصارف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Waidyanatha et al., 2020). اندام‌های هوایی و به‌ویژه ریشه‌های گیاه *E. purpurea* و فرآورده‌های آنها به‌عنوان تقویت‌کننده سیستم ایمنی بدن توجه زیادی را در پژوهش‌های علمی به خود جلب کرده‌اند. مطالعات فارماکولوژیک مدرن روی این گیاه، برخی از فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد تومور را تأیید کرده است (Xu et al., 2001; Zhang et al., 2021). امروزه بیش از ۱۰۰۰ محصول حاوی عصاره گیاه سرخارگل در پایگاه برچسب‌گذاری مکمل‌های غذایی فهرست شده است (Fu et al., 2021).

اثرهای دارویی گسترده گیاه به‌ویژه افزایش سیستم ایمنی بدن، درمان سرماخوردگی، آنفلوآنزا و عفونت‌های دستگاه تنفسی و مجاری ادراری عمدتاً به متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites) ریشه و اندام‌های هوایی گیاه از قبیل مشتقات کافئیک اسید از جمله

شیکوریک اسید (Chicoric acid)، اکیناکوزاید (Echinacoside) و ... آلکیل‌آمیدها و پلی‌ساکاریدها نسبت داده می‌شود (Xu et al., 2022; Bauer, 1999). از دیگر ترکیبات گزارش شده در این گیاه، می‌توان به گلیکوپروتئین‌ها، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین و اسانس در ریشه و ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها، آنتوسیانین و اسیدهای فنولی و اسانس در اندام‌های هوایی اشاره کرد (Bauer, 1999).

برای تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی، معمولاً از مواد گیاهی کشت شده در مزرعه استفاده می‌شود، اما کیفیت این محصولات ممکن است تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی، آلاینده‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات قرار گیرد که می‌تواند منجر به از دست دادن شدید عملکرد و تغییر فرآورده‌های دارویی مورد نظر شود (Verpoorte et al., 2002). سرخارگل‌های کشت شده عمدتاً به‌عنوان ماده خام در استخراج ترکیبات مؤثره و ساخت دارو در نظر گرفته می‌شوند. با وجود این، تولید و کشت این گیاه به دلایل متعددی از قبیل مشکل در جمع‌آوری بذر، سرعت جوانه‌زنی پایین بذر و فرایند اصلاح ناکارآمد برای افزایش عملکرد و کیفیت اندام‌های مؤثره، نیاز بازار را برآورده نکرده است (Wang et al., 2017).

کشت سلول‌ها و اندام‌های گیاهی، فناوری‌های

درون شیشه‌ای، غلظت ساکارز بر رشد ریشه‌های نابجا نیز تأثیر می‌گذارد. غلظت ساکارز بهینه از گیاهی به گیاه دیگر به دلیل توانایی آنها در جذب و استفاده از منبع کربن متفاوت است. بنابراین، غلظت بهینه ساکارز برای القاء و تکثیر ریشه‌های نابجا بستگی به گیاه مورد نظر دارد (Liu *et al.*, 2014; Baque *et al.*, 2010).

در این مطالعه، در آزمایش اول، بهترین ریزنمونه گیاهی و مؤثرترین غلظت از تنظیم‌کننده رشد گیاهی مناسب بر تعداد ریشه‌های نابجا در محیط کشت جامد بررسی گردید و پس از آن در آزمایش دوم، اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مدت زمان کشت در کشت مایع ریشه نابجا روی تجمع زیست‌توده و تولید ترکیبات فنولی بررسی شد. هدف این مطالعه، ارائه یک محیط کشت مناسب برای مطالعه بیشتر در آینده به منظور دستیابی به یک فرمولاسیون بهینه نهایی برای تولید انبوه ریشه‌های نابجا از گیاه دارویی سرخارگل در کشت بیوراکتور است.

مواد و روش‌ها

القای دانها

بذر گیاه سرخارگل از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه با آب جاری شسته شدند. در ادامه، پس از غوطه‌ور کردن بذرها در داخل اتانول ۷۰٪ حجمی به حجمی به مدت ۳۰ ثانیه، سه مرتبه و هر بار ۵ دقیقه عمل شست‌وشو به وسیله آب مقطر استریل انجام گردید. در مرحله نهایی و قبل از کشت، بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ حجمی به حجمی به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و همانند آنچه که در مرحله قبل گفته شده است، شست‌وشو انجام شد. بذرها ضدعفونی شده در محیط کشت MS حاوی ۳٪ ساکارز، ۷/۰٪ آگار و بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی با pH= 5.8 کشت شدند. داخل هر شیشه کشت ۵ عدد بذر قرار گرفت و نمونه‌ها در داخل دستگاه فیتوترون با شرایط دمایی ۱/۲۴±۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته در شرایط تاریکی و بعد دو هفته دیگر در شرایط

امیدوارکننده‌ای برای بدست آوردن متابولیت‌های ارزشمند گیاه هستند. کشت سلول و اندام نسبت به گیاهان کشت شده در مزرعه سرعت متابولیسم بالاتری دارند، چون شروع رشد سلول و اندام در کشت منجر به تکثیر سریع سلول‌ها، اندام‌ها و افزایش تعداد چرخه بیوسنتزی مورد نظر می‌شود. علاوه بر این، کشت سلول/ اندام گیاهی توسط شرایط محیطی، اکولوژیکی و آب و هوایی محدود نمی‌شود و سلول‌ها/ اندام‌ها می‌توانند با میزان رشد بالاتری نسبت به کل گیاه در کشت تکثیر یابند (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). در مقایسه با گیاهان کشت شده در مزرعه، توسعه کشت ریشه نابجا (Adventitious root culture)، بستر مناسبی را برای تولید زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه در مقیاس انبوه فراهم می‌کند (Ali & Abbasi, 2013). این روش کشت، به دلیل رشد سریع و ثبات تولید اندام مؤثره ریشه و متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با کشت سلولی (Cell culture) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Sivakumar, 2006). علاوه بر این، کشت ریشه نابجا به دلیل آسانی در تولید و ایمن بودن ریشه‌های تولیدی آن نسبت به کشت ریشه مؤین (Hairy root culture) ترجیح داده می‌شود (Gaosheng & Jingming, 2012).

در این تکنیک، عوامل مختلفی مانند نوع ریزنمونه و اثر نوع محیط روی القاء و تکثیر ریشه‌های نابجا، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، غلظت ساکارز و نسبت تلقیح برای کشت موفق ریشه‌ها در شرایط کنترل شده باید بهینه شوند (Devi *et al.*, 2021). انواع مختلفی از ریزنمونه‌ها برای القای درون شیشه‌ای ریشه‌های نابجا از گیاهان دارویی استفاده شده‌اند و مشخص شده است که انتخاب ریزنمونه مناسب می‌تواند همبستگی معنی‌دار مثبتی با الگوی دینامیکی و متابولیکی کشت‌های تولید شده داشته باشد (Min *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2005). ساکارز به‌طور گسترده به‌عنوان منبع انرژی در بیشتر محیط‌های کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. مشابه سایر محیط‌های کشت

برای هر تیمار ساکارز در هر هفته سه فلاسک ارلن‌مایر و در مجموع برای هر غلظت ساکارز در طول مدت چهار هفته ۱۲ فلاسک در نظر گرفته شد. کشت ریشه نابجا همانند آنچه که در بالا به آن اشاره شده است، نگهداری گردید. محتوای سه فلاسک هر تیمار در هر هفته برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک، میزان حجم باقیمانده از محیط کشت، pH، EC، فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. این قسمت از مطالعه نیز در قالب آزمایش فاکتوریل به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای رشد ریشه‌های نابجا برای تعیین وزن تر ریشه‌های نابجا، در فاصله زمانی هر هفته (کشت چهار هفته‌ای)، محتویات ریشه سرخارگل از سه فلاسک در هر نقطه زمانی (چهار نقطه زمانی) برداشت شد (شکل ۱-D). سپس به‌طور کامل با آب مقطر استریل شسته و آب اضافی با استفاده از کاغذ صافی استریل قبل از توزین وزن تر به حداقل مقدار ممکن رسید. نمونه‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای تعیین وزن خشک ثابت در داخل آون قرار گرفتند. حجم محیط کشت فیلتر شده به‌وسیله یک استوانه مدرج ثبت شد و اندازه‌گیری pH و EC محیط کشت باقیمانده به‌ترتیب توسط یک دستگاه pH متر و EC متر انجام گردید.

آماده‌سازی عصاره ریشه‌های نابجا

برای تهیه عصاره اتانولی، به ۲۰ میلی‌گرم از پودر ریشه‌های نابجا ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۸٪ اضافه شد و نمونه‌های مورد نظر به مدت هفت روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال قرار گرفتند و در طول این مدت روزی سه بار ورتکس شدند. پس از آن، لوله‌های فالدکون به مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و از قسمت روشن‌تر آنها برای اندازه‌گیری صفات فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Ahmad et al., 2021). عصاره‌های استخراج شده تا زمان آنالیز بیشتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

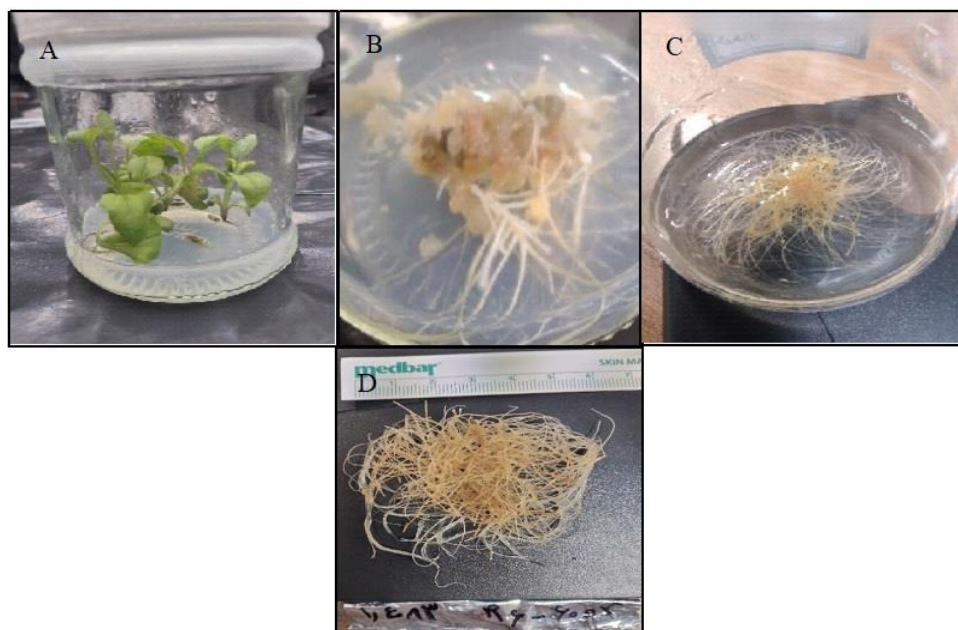
نوری ۸/۱۶ ساعت (روز/شب) ایجاد شده به‌وسیله دو لامپ فلورسنت F40 خنک نگهداری گردیدند.

انتخاب ریزنمونه

چهار هفته پس از رشد گیاهچه‌ها (شکل ۱-A) از آنها ریزنمونه برگ به مساحت ۰/۵ سانتی‌متر مربع و ریزنمونه‌های دم‌برگ و ریشه هر یک به اندازه یک سانتی‌متر تهیه و در محیط کشت MS جامد حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از منابع اکسینی ایندول بوتیریک اسید (IBA) و آلفا-فتالن استیک اسید (NAA) در چهار تکرار کشت گردیدند. به منظور القای ریشه‌زایی، ریزنمونه‌های کشت شده در دمای 24 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. برای انتخاب بهترین ریزنمونه برای استقرار کشت مایع ریشه نابجا، تعداد ریشه‌های نابجای ریزنمونه‌ها پس از شش هفته اندازه‌گیری گردید. این قسمت از مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

کشت ریشه‌های نابجا و اعمال تیمارهای ساکارز

تعداد ۴ تا ۵ ریشه نابجا القاء شده از بهترین ریزنمونه (برگ) (شکل ۱-B) به اندازه تقریبی ۱ تا ۲ سانتی‌متر وارد فلاسک‌های ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر نصف محیط کشت MS شامل ۳٪ ساکارز و یک میلی‌گرم در لیتر IBA با pH= 5.8 شدند. کشت‌ها به مدت چهار هفته در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر دوار با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری گردیدند. عمل واکشت ریشه‌ها هر چهار هفته در محیط کشت مشابه تازه انجام شد. پس از واکشت سوم (شکل ۱-C) و برای اعمال تیمارهای ساکارز، مقدار ۰/۳۵ گرم وزن تر از ریشه‌های نابجا در داخل ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر نصف محیط کشت MS، یک میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه غلظت‌های مختلف ساکارز (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم در لیتر) با pH= 5.8 قرار داده شد. به منظور بررسی اثر مدت زمان کشت،



شکل ۱- استقرار کشت ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*): A: القای دانه‌ها از بذر، B: انتقال ریزنمونه برگ به محیط ریشه‌زایی (1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA) و تشکیل ریشه‌های نابجا، C: تکثیر ریشه‌های نابجا در محیط کشت مایع (1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA) و D: برداشت ریشه‌های نابجا

Figure 1. Establishment of adventitious roots culture of *Echinacea purpurea*; A: seedling induction from seed, B: transfer of leaf explant to rooting medium (1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA) and adventitious roots formation, C: propagation of adventitious roots in liquid culture medium (1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA), and D: adventitious roots harvest

میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. محتوای فنول کل عصاره ریشه برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک ریشه (mg GA.g⁻¹ DW) محاسبه شد.

ارزیابی محتوای فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش Hamrouni-Sellami و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تغییرات استفاده شد. بدین ترتیب، هر ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره ریشه رقیق شده با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با ۷۵ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۵٪ وزنی به حجمی مخلوط شد. پس از شش دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر سود یک نرمال به مخلوط واکنش اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر بر روی دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمونه شاهد شامل

ارزیابی محتوای فنول کل

محتوای فنول کل در ریشه‌های نابجا تیمار شده با استفاده از روش Andi و همکاران (۲۰۱۹) با تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر عصاره نمونه با یک میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتو ۲ نرمال مخلوط و پس از پنج دقیقه تکان دادن، ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد و بعد به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر بر روی دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. نمونه شاهد شامل تمامی ترکیبات ذکر شده بجز عصاره مورد نظر بود. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های مختلف استاندارد تجاری گالیک اسید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰

استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره اتانولی تهیه شده با ۰/۳ میلی‌لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH و ۲/۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و توسط متانول به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر رسید. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای محیط نگهداری شد. نمونه کنترل شامل تمام اجزای محیط بجز عصاره اتانولی تهیه شده بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر بر روی دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH} = \left[\frac{\text{عدد جذب کنترل} - \text{عدد جذب نمونه}}{\text{عدد جذب کنترل}} \right] \times 100$$

در سطح احتمال ۱٪ بر تعداد ریشه‌های نابجای تولید شده داشتند (جدول ۱). همانگونه که در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است، میزان القای ریشه‌های نابجا به‌طور قابل توجهی به نوع ریزنمونه و هورمون مورد استفاده بستگی داشت. ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌های برگ بسیار مؤثرتر از ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ ایجاد شدند. میانگین تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه برگ ۹۳/۵٪ بود، در حالی که ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه به‌ترتیب ۶/۵ و صفر درصد ریشه نابجا تولید کردند (شکل ۲) که این مقایسه حکایت از وجود اختلاف معنی‌دار ریزنمونه برگ برای تولید ریشه‌های نابجا نسبت به دو ریزنمونه دیگر دارد.

تمامی ترکیبات ذکر شده بجز عصاره مورد نظر بود. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های مختلف استاندارد تجاری کوئرستین (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. محتوای فلاونوئید کل عصاره ریشه برحسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک ریشه ($\text{mg quercetin.g}^{-1} \text{DW}$) محاسبه شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد از روش Hamrouni-Sellami و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییرات

تجزیه و تحلیل آماری

تمام تجزیه و تحلیل داده‌های نرمال شده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۹ انجام شد. تفاوت‌های معنی‌دار براساس آزمون آماری چند دامنه‌ای دانکن در $P \leq 0.05$ مقایسه شدند. تمام اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد.

نتایج

آزمایش اول: بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد ریشه‌های نابجا ریزنمونه‌های مختلف گیاه *E. purpurea* تجزیه و تحلیل واریانس دوطرفه تأثیر سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی و ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های نابجا گیاه سرخارگل در محیط کشت جامد نشان داد که هر دو فاکتور به تنهایی و اثرهای متقابل آنها تأثیر معنی‌دار آماری

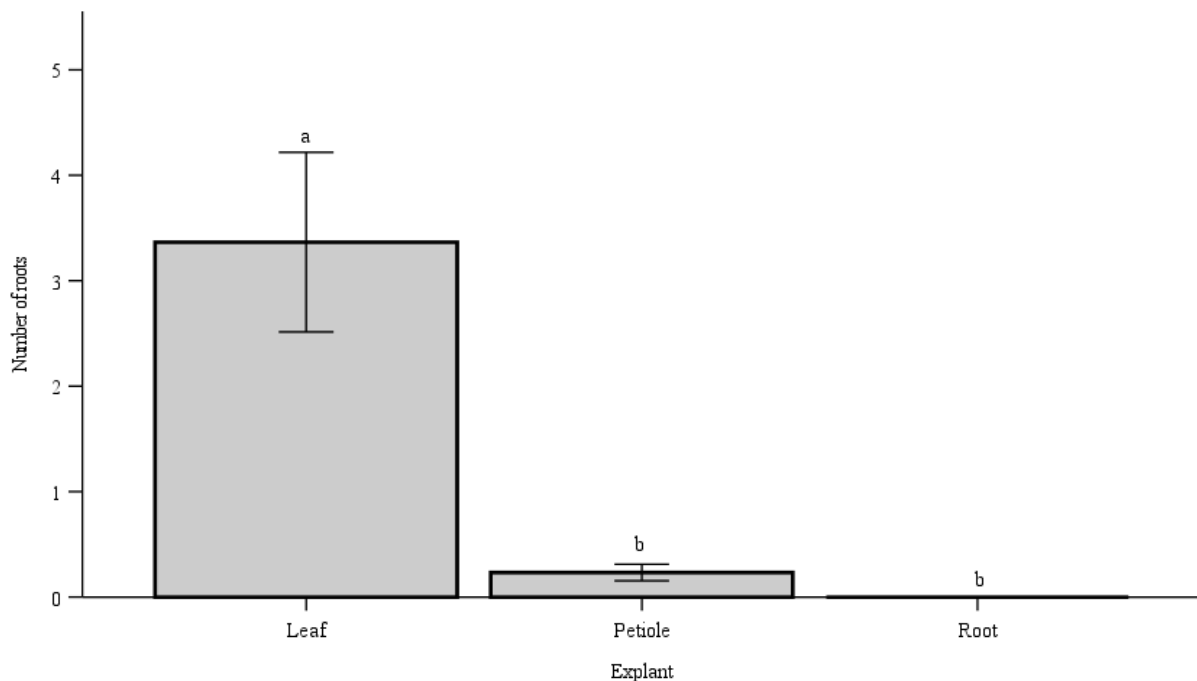
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر هورمون‌های اکسینی و ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

در محیط کشت جامد 1/2MS

Table 1. ANOVA of auxin hormones and explant effects on number of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in 1/2MS solid culture medium

S.O.V.	d.f.	M.S.
Hormone (A)	9	17.03**
Explant (B)	2	106.03**
A × B	18	16.54**
Experimental error	60	3.09
C.V. (%)		20.47

** : significant at 1% probability level.



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

در محیط کشت جامد 1/2MS حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون‌های IBA و NAA

Figure 2. Means comparison of explant effects on number of *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS solid culture medium containing different concentrations of IBA and NAA

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

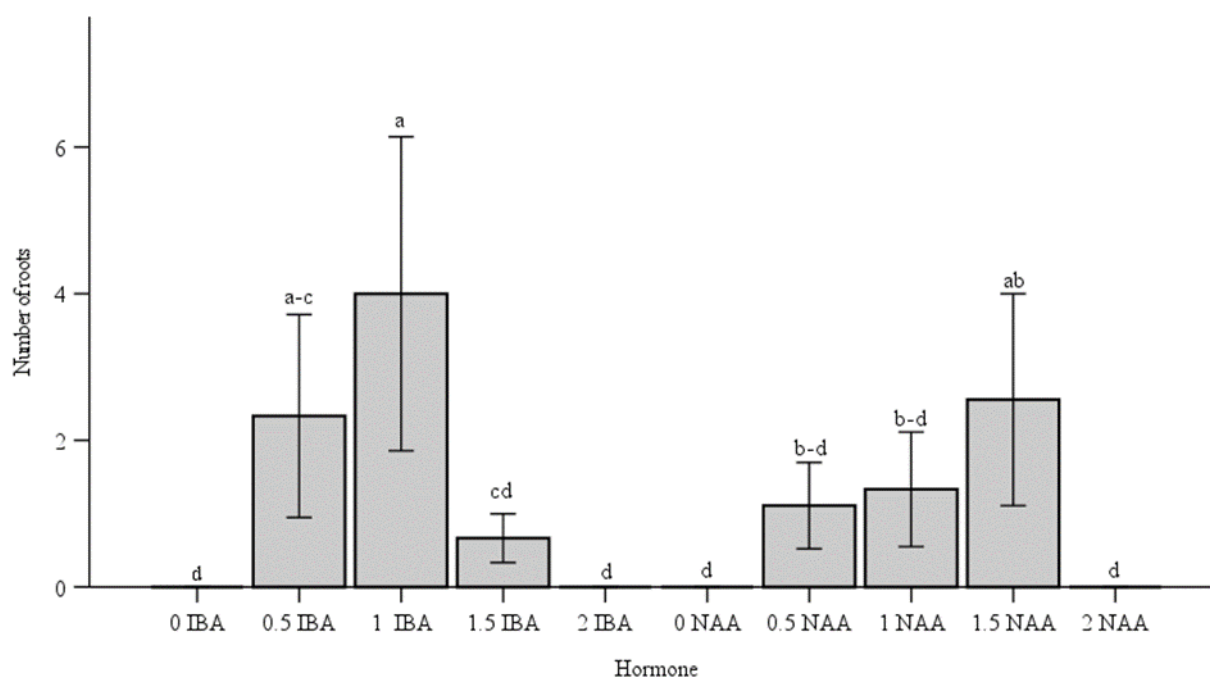
برگ به‌عنوان بهترین سطوح از فاکتورهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ریزنمونه برای انجام مطالعات بیشتر معرفی شدند.

آزمایش دوم: بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مدت زمان کشت بر صفات دینامیکی و فیتوشیمیایی کشت

ریشه نابجا *E. purpurea*

تجزیه و تحلیل واریانس چندگانه دوطرفه تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و مدت زمان کشت بر صفات دینامیکی و فیتوشیمیایی کشت ریشه نابجا گیاه سرخارگل نشان داد که اثر فاکتور مدت زمان کشت بر تمامی صفات دینامیکی رشد ریشه شامل وزن تر، حجم محیط باقیمانده، EC و pH در سطح ۱٪ و وزن خشک در سطح ۵٪ معنی‌دار بود، در حالی که اثر معنی‌داری از این فاکتور بر صفات فیتوشیمیایی فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده نشد.

ظهور ریشه‌های نابجا و تعداد آنها روی ریزنمونه‌های مختلف با توجه به نوع و غلظت هورمون‌های اکسینی اضافه شده به محیط شامل IBA و NAA تفاوت معنی‌داری نشان داد. محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA حداکثر تعداد ریشه را با میانگین ۳/۳٪ ایجاد کرد، در حالی که غلظت‌های صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر دو هورمون استفاده شده ریشه‌ای تولید نکردند (شکل ۳) که این مورد می‌تواند بر تأثیر معکوس غلظت‌های بالاتر از هورمون‌های ریشه‌زایی اکسینی بر القای ریشه‌های نابجا دلالت داشته باشد. از آنجایی که هدف از مطالعه در این مرحله بدست آوردن لاین ریشه‌ای بود که بتواند تعداد ریشه‌های بیشتر و به دنبال آن زیست‌توده بالایی تولید کند، بنابراین ریشه‌های القاء شده در محیط‌های حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA برای استقرار کشت مایع ریشه نابجا انتخاب شدند. همانطور که اثرهای متقابل دو فاکتور در شکل ۴ نشان می‌دهد، ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه



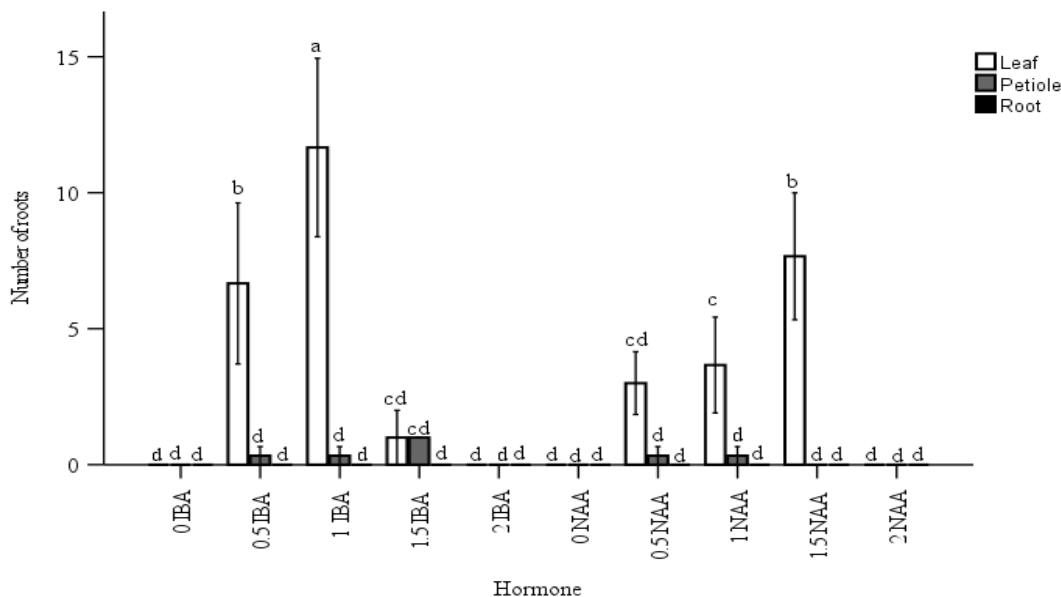
شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و NAA بر تعداد ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*) در محیط کشت جامد 1/2MS

Figure 3. Means comparison of different concentrations of IBA and NAA effects on number of *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS solid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

با توجه به شکل ۵، نتایج مطالعه تأثیر معنی‌دار مدت زمان کشت را بر وزن تر و خشک کشت ریشه نابجا در گیاه سرخارگل نشان داد. با افزایش مدت زمان کشت، افزایش قابل توجه و تدریجی در وزن تر ریشه‌های نابجا مشاهده شد. بیشترین وزن تر با میزان ۲۹/۸ گرم در لیتر در هفته چهارم کشت مشاهده شد که این میزان ۴/۳ برابر وزن تلقیح اولیه بود. با وجود این، روند افزایشی محتوای وزن تر ریشه‌های نابجا در میزان وزن خشک آنها مشاهده نشده است، به طوری که بیشترین وزن خشک با میزان ۳/۹۹ گرم در لیتر در هفته دوم کشت ثبت شد. علاوه بر این، یافته‌های این پژوهش تأثیر قابل توجه مدت زمان کشت را بر میزان EC و سطوح pH محیط‌های کشت ریشه نابجا نشان داد. به طور کلی، سطوح EC و pH با افزایش زمان کشت کاهش یافتند (شکل ۶).

با وجود این، محتوای فنول کل از اثر مدت زمان کشت به طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ تأثیر پذیرفت. غلظت‌های مختلف فاکتور ساکارز بر صفات دینامیکی رشد ریشه بجز وزن خشک تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان دادند و در مورد صفات فیتوشیمیایی اندازه‌گیری شده اگرچه میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر معنی‌دار این فاکتور در سطح احتمال ۵٪ قرار گرفتند، اثر معنی‌داری آن بر صفت فلاونوئید کل در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. با وجود اینکه اثر متقابل دو فاکتور مورد مطالعه ساکارز و مدت زمان کشت بر صفات فیتوشیمیایی تأثیر معنی‌داری نداشت، اثرهای معنی‌داری از آن بر صفات دینامیکی مربوط به رشد ریشه بجز وزن خشک در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد (جدول‌های ۲ و ۳).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون‌های IBA و NAA × ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های نابجای

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) در محیط کشت جامد 1/2MS

Figure 4. Means comparison of IBA and NAA × explant interaction on number of *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS solid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

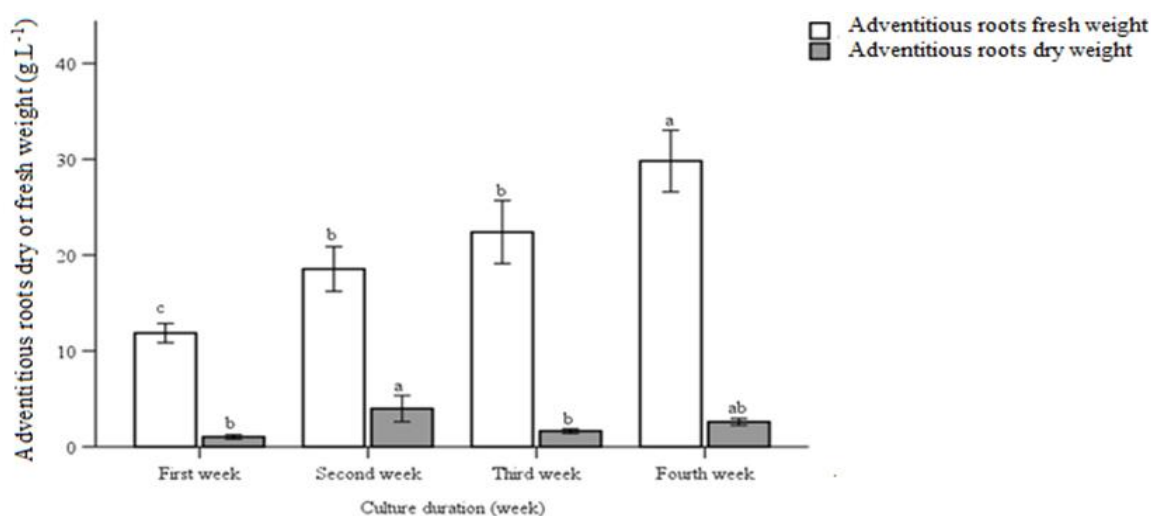
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ساکارز و مدت زمان کشت بر صفات دینامیکی و فیتوشیمیایی کشت مایع ریشه‌های نابجای

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) در محیط کشت 1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA

Table 2. ANOVA of sucrose and culture duration effects on dynamic and phytochemical characteristics of suspension-cultured *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA

S.O.V.	d.f.	M.S.							
		Adventitious roots fresh weight	Adventitious roots dry weight	Remaining medium volume	Electrical conductivity	pH	Total phenols	Total flavonoids	DPPH activity
Culture duration (A)	3	674.22**	19.84*	2.24**	1.78**	0.29**	0.02*	0.01 ^{ns}	152.66 ^{ns}
Sucrose (B)	5	262.60**	6.14 ^{ns}	8.12**	2.55**	0.31**	0.01*	0.27**	405.50*
A × B	15	103.28**	7.50 ^{ns}	5.34**	0.67**	0.07**	0.01 ^{ns}	0.12 ^{ns}	198.78 ^{ns}
Experimental error	48	32.41	5.57	0.48	0.03	0.00	0.01	0.07	171.10
C.V. (%)		23.31	29.91	4.37	19.83	4.89	0.16	0.08	23.63

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

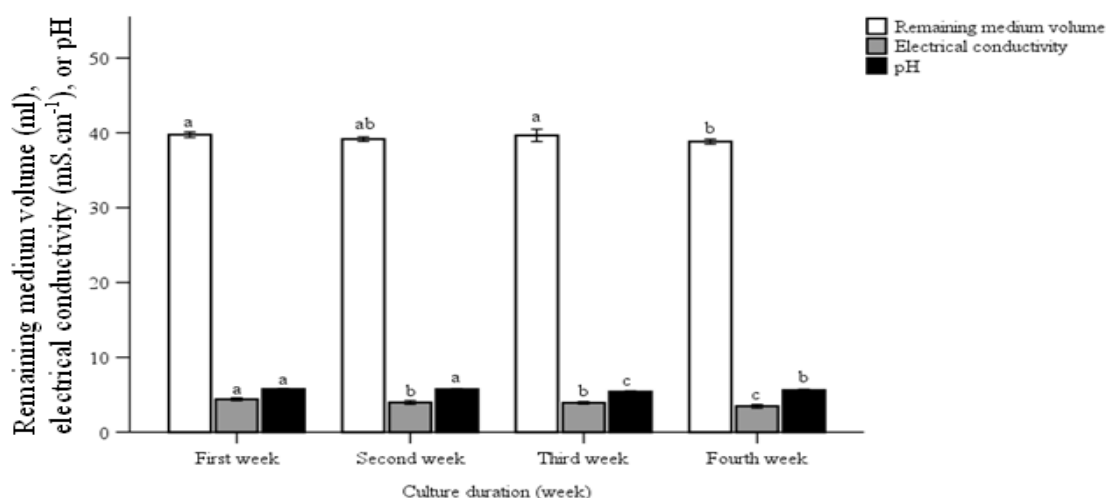


شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

در محیط کشت مایع 1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA

Figure 5. Means comparison of culture duration effects on *Echinacea purpurea* adventitious roots fresh or dry weight in 1/2MS suspension culture medium containing 1 mg.L⁻¹ IBA

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان کشت بر میزان EC و pH محیط کشت مایع (1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA)

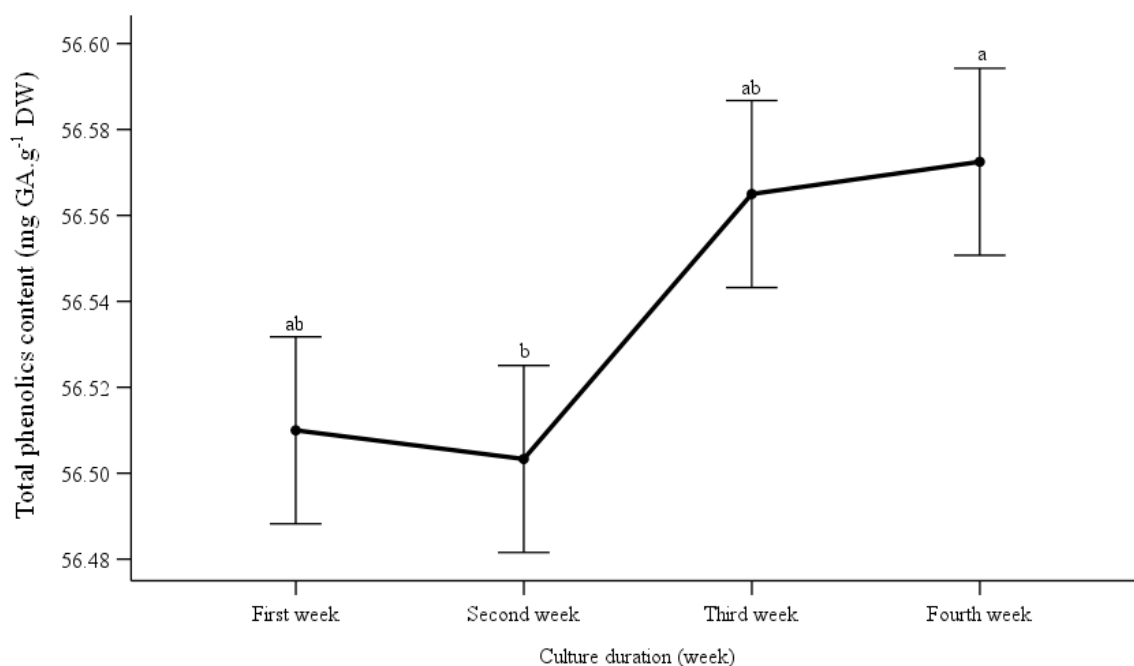
ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

Figure 6. Means comparison of culture duration effects on EC and pH of *Echinacea purpurea* adventitious roots suspension culture medium (1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA)

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

چهارم کشت اندازه‌گیری شد که در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار با محتوای فنول کل در هفته‌های ابتدایی نشان داد (شکل ۷).

در این مطالعه اگرچه اثر معنی‌داری از مدت زمان کشت بر محتوای فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کشت ریشه نابجا مشاهده نشده است، بیشترین میزان فنول کل در هفته



شکل ۷- مقایسه میانگین تأثیر مدت زمان کشت بر محتوای فنول کل ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

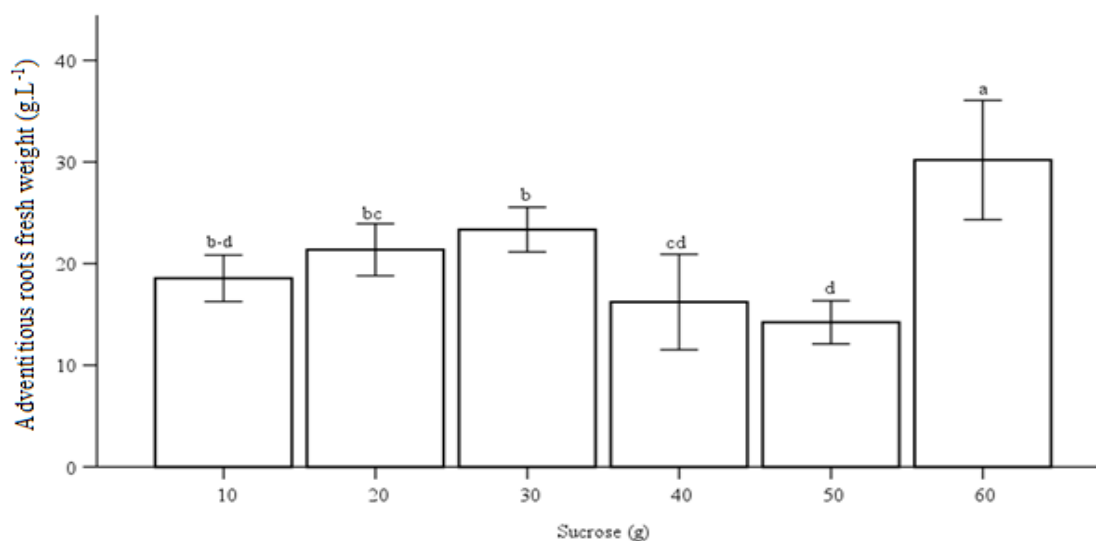
در محیط کشت مایع 1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA

Figure 7. Means comparison of culture duration effects on total phenols content of *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS suspension culture medium containing 1 mg.L⁻¹ IBA
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

است. کمترین میزان EC و بالاترین مقادیر pH که نزدیک به pH تنظیم شده در محیط کشت ابتدایی بود، همچنین حجم محیط کشت باقیمانده بیشتر در غلظت‌های کمتر ساکارز اندازه‌گیری شد (شکل ۹). اگرچه مقادیر صفات فیتوشیمیایی کشت ریشه نابجا تیمار شده با غلظت‌های مختلف ساکارز تفاوت قابل توجهی از خود نشان ندادند، بالاترین محتوای فنول کل (۵۶/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک)، فلاونوئید کل (۳۹۰/۱ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۹/۶٪) به ترتیب در غلظت‌های پایین‌تر ۳، ۴ و ۱ درصد وزنی به حجمی ساکارز مشاهده شدند (شکل ۱۰ - A, B, C).

نتایج نشان داد که سطوح مختلف ساکارز بر وزن تر ریشه، حجم محیط باقیمانده، EC و pH محیط کشت تأثیر معنی‌داری داشتند. با وجود این، بر وزن خشک ریشه‌های نابجا تأثیر معنی‌داری نشان ندادند. همانطور که در شکل ۸ نشان داده شده است، وزن تر ریشه‌های نابجا از غلظت ۱۰ تا ۳۰ گرم ساکارز یک روند افزایشی را نشان می‌دهد و این روند از غلظت ۳۰ تا ۵۰ گرم ساکارز کاهش پیدا می‌کند تا اینکه در غلظت ۶۰ گرم ساکارز ریشه‌ها به حداکثر رشد خود برابر ۳۰/۲ گرم در لیتر می‌رسند.

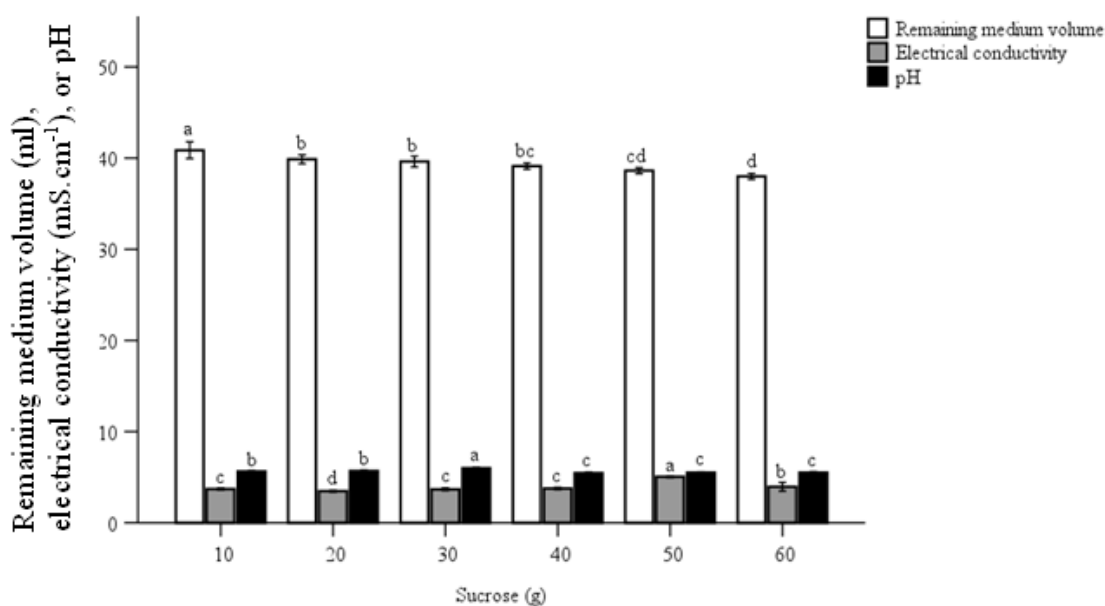
حداکثر وزن خشک ریشه (۳/۳۷ گرم در لیتر) در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۳٪ ساکارز مشاهده شده



شکل ۸- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر وزن تر ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

در محیط کشت مایع 1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA

Figure 8. Means comparison of sucrose different concentrations effects on *Echinacea purpurea* adventitious roots fresh weight in 1/2MS suspension culture medium containing 1 mg.L⁻¹ IBA
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



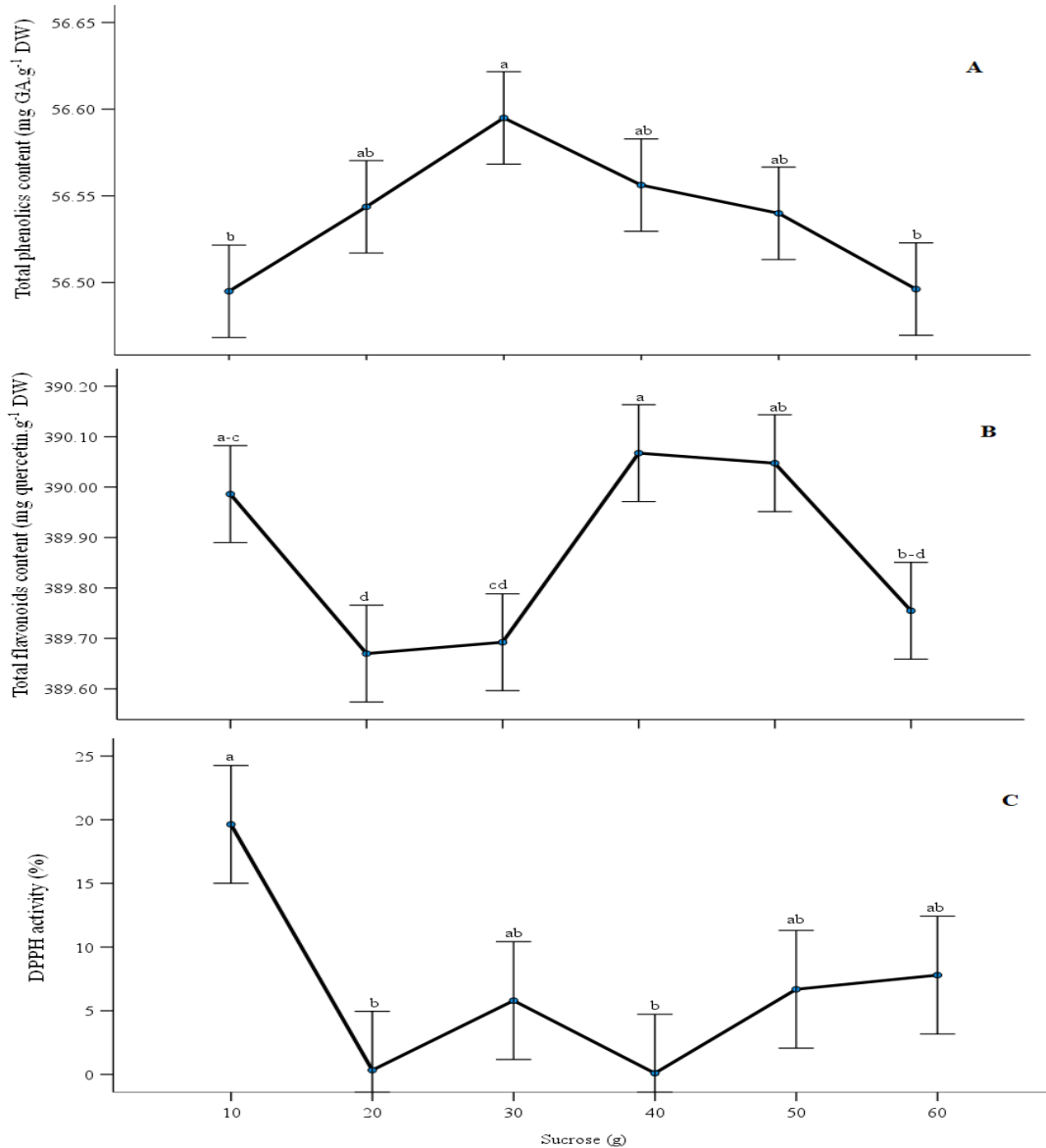
شکل ۹- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان حجم محیط باقیمانده، EC و pH

محیط کشت مایع (1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA) ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

Figure 9. Means comparison of sucrose different concentrations effects on remaining medium volume, EC, and pH of suspension culture medium (1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA) of *Echinacea purpurea* adventitious roots
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز در هفته چهارم کشت بیشترین وزن تر ریشه نابجا را به خود اختصاص داد، بنابراین به علت جذب بیشتر مولکول‌های آب و یون‌های موجود در محیط از حجم محیط باقیمانده، EC و pH پایین‌تری برخوردار بود.

همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، اگرچه اثر متقابل مدت زمان کشت و غلظت‌های مختلف ساکارز بر صفات فیتوشیمیایی تأثیر معنی‌داری نداشت، اثرهای معنی‌دار آن در سطح ۱٪ بر وزن تر ریشه نابجا، حجم محیط باقیمانده، EC و pH محیط کشت مشاهده شد؛ به طوری که



شکل ۱۰- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر (الف) محتوای فنول کل، (ب) محتوای فلاونوئید کل و

(ج) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*) در محیط کشت مایع 1/2MS

حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA

Figure 10. Means comparison of sucrose different concentrations effects on (A) total phenols content, (B) total flavonoids content, and (C) antioxidant activity of *Echinacea purpurea* adventitious roots in 1/2MS suspension culture medium containing 1 mg.L⁻¹ IBA

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ساکارز × مدت زمان کشت بر وزن تر ریشه‌های نابجا، میزان حجم محیط باقیمانده، EC و pH محیط کشت مایع (1/2MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA) ریشه‌های نابجای سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

Table 3. Means comparison of sucrose × culture duration interaction on adventitious roots fresh weight, remaining medium volume, EC, and pH of suspension culture medium (1/2MS containing 1 mg.L⁻¹ IBA) of *Echinacea purpurea* adventitious roots

Treatment [Week + Sucrose (g.L ⁻¹)]	Adventitious roots fresh weight (g.L ⁻¹)	Remaining medium volume (ml)	Electrical conductivity (mS.cm ⁻¹)	pH
First week + 10	12.62 ^{d-h}	40 ^{c-e}	4.04 ^c	5.83 ^{b-e}
First week + 20	16.41 ^{c-h}	40 ^{c-e}	3.84 ^{cd}	5.85 ^{b-d}
First week + 30	14.94 ^{c-h}	42 ^b	4.04 ^c	5.93 ^b
First week + 40	9.04 ^{gh}	39 ^{d-g}	3.98 ^c	5.57 ^{f-h}
First week + 50	8.22 ^h	38.5 ^{e-h}	5.40 ^a	5.69 ^{e-g}
First week + 60	10.00 ^{e-h}	39 ^{d-g}	5.14 ^{ab}	5.76 ^{c-e}
Second week + 10	16.28 ^{c-h}	39.5 ^{c-f}	3.41 ^{ef}	5.82 ^{b-e}
Second week + 20	23.60 ^{c-e}	38 ^{f-h}	3.12 ^f	5.81 ^{b-e}
Second week + 30	26.00 ^{b-d}	39 ^{d-g}	3.34 ^{ef}	5.83 ^{b-e}
Second week + 40	8.75 ^{gh}	40.5 ^{b-d}	3.93 ^c	5.86 ^{b-d}
Second week + 50	12.84 ^{d-h}	39.5 ^{c-f}	4.93 ^b	5.45 ^{hi}
Second week + 60	23.86 ^{cd}	38.5 ^{e-h}	5.15 ^{ab}	5.69 ^{e-g}
Third week + 10	22.13 ^{c-g}	45 ^a	3.88 ^{cd}	5.25 ^{kl}
Third week + 20	24.51 ^{b-d}	41 ^{bc}	3.42 ^{ef}	5.43 ^{h-j}
Third week + 30	26.88 ^{bc}	38.5 ^{e-h}	4.00 ^c	5.91 ^{bc}
Third week + 40	9.63 ^{f-h}	38.5 ^{e-h}	3.91 ^c	5.25 ^{kl}
Third week + 50	13.66 ^{c-h}	37.5 ^{gh}	4.98 ^b	5.38 ^{i-k}
Third week + 60	37.63 ^{ab}	37.5 ^{gh}	3.37 ^{ef}	5.37 ^{i-k}
Fourth week + 10	23.24 ^{c-f}	39 ^{d-g}	3.52 ^{de}	5.71 ^{d-f}
Fourth week + 20	20.98 ^{c-h}	40.5 ^{b-d}	3.53 ^{de}	5.74 ^{de}
Fourth week + 30	25.61 ^{b-d}	39 ^{d-g}	3.34 ^{ef}	6.32 ^a
Fourth week + 40	37.52 ^{ab}	38.5 ^{e-h}	3.28 ^{ef}	5.19 ^l
Fourth week + 50	22.22 ^{c-g}	39 ^{d-g}	4.89 ^b	5.55 ^{gh}
Fourth week + 60	49.32 ^a	37 ^h	2.22 ^g	5.29 ^{j-l}

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بحث

(Devi et al., 2021). (۱۰۰۰۰ لیتر) استفاده شده است

بدین منظور، در این پژوهش در قدم نخست اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد ریشه‌های نابجا ریزنمونه‌های مختلف گیاه *E. purpurea* به منظور دستیابی به بهترین ترکیب از غلظت هورمون مناسب و ریزنمونه بررسی گردید و پس از آن اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مدت زمان کشت بر صفات دینامیکی و صفات فیتوشیمیایی کشت مایع ریشه نابجا ارزیابی شد.

نتایج آزمایش اول بر اهمیت در نظر گرفتن هر دو عامل تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ریزنمونه و اثر متقابل آنها هنگام بهینه‌سازی تولید ریشه‌های نابجا به منظور استقرار کشت مایع ریشه در این گونه گیاهی تأکید می‌کند. بیشترین تعداد ریشه نابجا پس از استفاده از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه برگی اتفاق افتاد.

کشت ریشه نابجا در شرایط آزمایشگاهی و صنعتی برای تولید زیست‌توده و مواد شیمیایی گیاهی به دلیل ثبات ژنتیکی بالاتر، رشد سریع و تولید پایدار ترکیبات مؤثره نسبت به کشت‌های سلولی و ریشه موئین بررسی شده‌اند. قبل از تولید ریشه‌ها و به دنبال آن متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بزرگ‌تر، فاکتورهای مختلفی از قبیل نوع ریزنمونه، قدرت محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ساکارز، نسبت تلقیح، نوع و غلظت محرک باید بهینه شوند. گزارش‌هایی منتشر شده‌اند که از ایده استفاده از ریشه‌های نابجا به‌عنوان روشی پایدار برای تولید متابولیت‌های گیاهی با ارزش تجاری حمایت می‌کنند. یکی از آنها گیاه *Panax ginseng* است که در آن ریشه‌های نابجا با موفقیت برای تولید جین‌سنوزیدها (Ginsenosides) در مقیاس صنعتی

Hypericum (Jaisi et al., 2013) *Plumbago indica* *Oldenlandia perforatum* (Gaid et al., 2016) و *umbellata* (Krishnan & Siril, 2018) وجود دارد. با این حال، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده برای القای ریشه‌های نابجا برای گونه‌های مختلف متفاوت بود. Gao و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که محیط‌های اضافه شده با هورمون اکسینی 2,4-D منجر به تشکیل کالوس می‌شوند، در حالی که محیط‌های دارای IBA توسعه ریشه‌های نابجا را در *Panax notoginseng* سرعت می‌بخشد. Praveen و Murthy (۲۰۱۴) گزارش کردند که IBA یک اکسین بالقوه برای توسعه و نمو ریشه‌های نابجا در گیاه *Withania somnifera* است. Dohare و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین تعداد تشکیل ریشه‌های نابجا را در محیط‌های MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA و بیشترین طول ریشه‌ها را در محیط‌های MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA در گیاه *Plumbago zeylanica* گزارش کردند. در مطالعه‌ای بر روی گیاه سرخارگل (*E. purpurea*) از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA و NAA هر یک در پنج غلظت ۰/۱، ۰/۵، ۰/۸، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه برگی برای ایجاد ریشه نابجا استفاده شده است و نتایج نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی مربوط به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA ریزنمونه برگی بود (Etminan Rafsanjani & Moeini, 2014).

در توافق با نتایج آزمایش دوم، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که مدت زمان کشت طولانی‌تر می‌تواند باعث رشد بیشتر ریشه و تجمع بالاتر وزن تر در گونه‌های مختلف جنس سرخارگل از قبیل *E. purpurea* (Jeong et al., 2009) *E. angustifolia* (Wu et al., 2006)؛ Cui et al., 2013) و *E. pallida* (Gao et al., 2018) شود. با وجود این، روند افزایشی محتوای وزن تر ریشه‌های نابجا در میزان وزن خشک ریشه‌ها مشاهده نشده است، به طوری که بیشترین وزن خشک با میزان ۳/۹۹ گرم در لیتر در هفته دوم کشت ثبت شد. یک توضیح احتمالی برای این مشاهدات، این است که با افزایش زمان کشت، کشت‌های

ریشه‌های نابجا را می‌توان در شرایط درون شیشه‌ای از ریزنمونه‌های مختلف از جمله برگ، ریشه، ساقه، دمبرگ و کالوس القاء کرد. ریشه‌های نابجای *Panax ginseng* از ریزنمونه‌های ریشه پس از تولید کالوس اولیه ایجاد شده است (Kim et al., 2003؛ Yu et al., 2000). با این حال، در *Panax vietnamensis* ریزنمونه‌های برگ نسبت به ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه، میزان بالاتری از القاء و تکثیر ریشه نابجا را نشان دادند (Tam et al., 2012؛ Trinh et al., 2015). ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه‌چه به‌عنوان مؤثرترین ریزنمونه‌ها در القای ریشه‌های نابجای گیاه *Glycine max* گزارش شدند (Kim, 2017). گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که ریزنمونه‌های برگ بهترین منبع برای القای ریشه‌های نابجا و تولید ترکیبات فعال زیستی در گونه‌های مختلف از جمله *E. purpurea* (Hahn et al., 2008) *Hypericum perforatum* (Cui et al., 2010) *Morinda citrifolia* (Baque et al., 2010) *somnifera* (Praveen & Murthy, 2014) و *Castilleja tenuiflora* (Gómez-Aguirre et al., 2012) هستند. علاوه بر این، در پژوهشی دیگر که تأثیر ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه را بر تولید ریشه نابجا در گیاه سرخارگل بررسی کرده است، مشخص شد که بیشترین میزان ریشه نابجا مربوط به ریزنمونه برگی بوده است (Murthy et al., 2014). این نتایج نشان می‌دهند که بافت برگ سرخارگل ممکن است حاوی عوامل یا شرایط خاصی باشد که باعث افزایش تشکیل ریشه نابجا می‌شود.

اکسین‌ها معمولاً برای القای ریشه‌های نابجا از گونه‌های مهم دارویی استفاده می‌کنند. هورمون‌هایی که به صورت برون‌زا به گیاه و یا ریزنمونه‌های گیاهی در محیط درون شیشه‌ای داده می‌شوند می‌توانند فرایند تمایز و مسیرهای القایی را تحریک کنند. گزارش‌های مختلفی از القای ریشه‌های نابجا توسط تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی با منبع اکسینی در گیاهانی مانند *Withania somnifera* (Praveen & Murthy, 2014) *Periploca sepium* (Yin et al., 2013) *Prunella vulgaris* (Fazal et al., 2014)؛

افزایش پیدا کرده است (Jeong *et al.*, 2009). به نظر می‌رسد که در کنار فاکتور مدت زمان کشت عوامل دیگری مانند بررسی تنوع ژنتیکی و انتخاب بهترین ژنوتیپ‌ها برای استقرار کشت ریشه نابجا، شرایط کشت، یا نیاز به محرک‌ها یا عوامل استرس‌زای خاص ممکن است برای افزایش تولید ترکیبات زیست فعال مورد نیاز باشند. بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل به ترتیب با مقادیر ۵۶/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک و ۳۸۹/۹ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک در هفته چهارم رشد اندازه‌گیری شد. گزارش‌های مشابهی از حداکثر مقدار تولید ترکیبات فنول کل و فلاونوئید کل پس از چهار تا پنج هفته در کشت مایع ریشه نابجای گونه‌های مختلف جنس *Echinacea* وجود دارد (Gao *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2018).

ساکارز به‌عنوان یک منبع انرژی و پیش‌ساز کربن در کشت بافت، سلول و اندام گیاهی می‌تواند رشد و عملکرد متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهد (Gould *et al.*, 1981).

در توافق با یافته‌های این مطالعه، Karataş (۲۰۲۳) گزارش کرد که در کشت ریشه نابجا در *Ocimum basilicum* محتوای وزن تر ریشه‌های نابجا با افزایش غلظت ساکارز از ۲٪ تا ۵٪ به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند. با وجود این، افزایش تجمع وزن تازه با غلظت ۷٪ ساکارز در کشت مایع ریشه نابجا در *E. angustifolia* (Wu *et al.*, 2006) و با ۵٪ آن در *Panax ginseng* (Yu *et al.*, 2000) نیز گزارش شده است. این نتایج نشان می‌دهند که غلظت اولیه ساکارز در محیط کشت برای رشد ریشه‌های نابجا گیاه مهم است و تأثیر آن به گونه‌های گیاهی و ژنوتیپ‌های خاص از آنها بستگی دارد. وزن خشک ریشه که فاکتور تعیین‌کننده‌تری نسبت به وزن تر ریشه می‌باشد تا غلظت معینی از ساکارز (از ۱٪ تا ۳٪) افزایش پیدا کرده و پس از آن با افزایش غلظت ساکارز به‌طور کلی روند کاهشی از خود نشان می‌دهد. در کشت مایع ریشه نابجا در *Podophyllum* (Karataş, 2023) *Ocimum basilicum*

سلول یا اندام همانند ریشه نابجا ممکن است دچار تغییرات فیزیولوژیکی یا متابولیکی شوند. این تغییرات می‌تواند منجر به تغییر جهت منابع به سمت جذب آب و رشد، به جای تجمع زیست‌توده شود. همچنین ممکن است برخی فرایندهای متابولیکی، مانند افزایش طول سلول یا سازوکارهای احتباس آب، به افزایش وزن تازه و کاهش وزن خشک کلی کمک کنند. کاهش وزن خشک می‌تواند نشان‌دهنده کاهش تجمع اجزای ساختاری و متابولیت‌های اولیه، مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و دیواره‌های سلولی و تغییر مسیر متابولیکی برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های نابجا باشد (Murthy *et al.*, 2014; Andi *et al.*, 2018). رابطه معکوس بین افزایش وزن خشک ریشه‌های نابجا در هفته دوم و کاهش محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در همین هفته مشاهده شده است.

با افزایش زمان کشت میزان EC و pH محیط کشت کاهش یافت. این کاهش در EC و pH را می‌توان به افزایش جذب مواد مغذی موجود در محیط کشت توسط ریشه‌های در حال رشد در طول زمان نسبت داد که منجر به غلظت کمتر نمک‌ها و یون‌ها در محیط می‌شود. همانطور که در این مطالعه مشاهده شده است (شکل‌های ۵ و ۶)، EC با وزن تر ریشه‌های نابجا همبستگی معکوس دارد که احتمالاً به دلیل جذب یون‌های معدنی توسط سلول‌ها می‌باشد (Gao *et al.*, 2018). نتایج مشابهی از کاهش EC و pH با افزایش مدت زمان کشت به ترتیب در کشت ریشه نابجا در *Oplopanax elatus* (Jiang *et al.*, 2015) و کشت مایع سلولی *Vitis vinifera* (Andi *et al.*, 2019) گزارش شده است. Gao و همکاران (۲۰۱۸) کاهش معنی‌دار EC را در طی ۵۰ روز از کشت ریشه نابجا در *E. pallida* در بیوراکتور مشاهده کردند. افزایش زمان کشت تأثیر قابل‌توجهی بر تولید فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط در ریشه‌های نابجا نداشته است. با وجود این، میزان فنول کل تحت تأثیر معنی‌دار دوره کشت قرار گرفته است. به‌طور کلی و در توافق با مطالعات قبلی بر روی *E. purpurea* محتوای ترکیبات فنولی ریشه‌های نابجا با افزایش مدت زمان کشت

Ellis, 1985) و کشت کالوس *Satureja hortensis* (Tepe & Sökmen, 2007) مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تأثیر غلظت اولیه ساکارز بر محتوای زیست‌توده و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌تواند در بین گونه‌های مختلف متفاوت باشد. Zhong و همکاران (۱۹۹۶) دریافتند که ۴/۵٪ ساکارز برای تولید آنتوسیانین در کشت مایع سلول‌های گیاه *Perilla frutescens*، بهترین غلظت است. گزارش شده است که افزایش غلظت اولیه ساکارز بالاتر از سطح نرمال ۲٪ یا ۳٪ باعث افزایش محتوای ساپونین و پلی‌ساکارید در کشت سلولی *Panax ginseng* (Zhang et al., 1996) می‌شود. غلظت ساکارز بالاتر از ۵٪ باعث افزایش تجمع فنول‌ها، فلاونوئیدها و اسید کلروژنیک (Chlorogenic acid) در کشت مایع ریشه نابجای گیاه *angustifolia* (Wu et al., 2006) و کشت جنینی گیاه *Eleutherococcus sessiliflorus* (Shohael et al., 2006) شده است. بنابراین، هنگامی که غلظت ساکارز به یک سطح بهینه افزایش می‌یابد، قدرت اسمزی محیط را افزایش می‌دهد که می‌تواند منجر به افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه شود بدون اینکه روی رشد ریشه تأثیر بگذارد، اما فراتر از سطح بهینه منجر به یک حالت شوک اسمزی شده که ممکن است رشد ریشه و تولید متابولیت‌ها را مهار کند (Deepthi & Satheeshkumar, 2017). در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ریشه‌های نابجای کشت شده گیاه *Mirinda citrifolia* در غلظت‌های پایین‌تر ساکارز، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بالاتری از خود نشان دادند (Baque et al., 2012). حد اکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت مایع سلولی *Prunella vulgaris* در غلظت ۲۰ تا ۲۵ گرم در لیتر ساکارز بدست آمد (Fazal et al., 2016). در کشت ریشه نابجای *Ocimum basilicum* تیمار شده با غلظت‌های مختلف ساکارز، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های مختلف DPPH، ABTS و FRAP در کمترین غلظت ساکارز مورد استفاده (۲٪) اندازه‌گیری شد (Karataş, 2023). مقایسه یافته‌های این مطالعه با منابع دیگر نشان می‌دهد که اثر غلظت ساکارز بر

Hypericum hexandrum (Rajesh et al., 2014)، *perforatum* (Cui et al., 2010a) و کشت ریشه مؤثین *Withania somnifera* (Sivanandhan et al., 2012) به ترتیب غلظت‌های ساکارز ۳، ۲، ۳ و ۲٪ بالاترین وزن خشک را تولید کردند. یافته‌ها حکایت از کاهش رشد زیست‌توده در غلظت‌های نسبتاً بالاتر ساکارز دارد که ممکن است به دلیل فشار اسمزی نسبتاً بالاتر در ریشه‌های کشت شده در این شرایط و جذب مواد مغذی کمتر باشد (Cui et al., 2010b; Baque et al., 2014).

تغییرات مقادیر EC، pH و حجم محیط باقیمانده به خوبی با نتیجه تغییر زیست‌توده ریشه‌های نابجا مطابقت داشت. EC در محیط کشت منعکس‌کننده رشد و نیازهای تغذیه‌ای کشت است. کاهش ارزش EC در غلظت‌های کمتر ساکارز احتمالاً به دلیل جذب یون‌های معدنی توسط سلول‌های گیاهی در طول مدت کشت می‌باشد (Hahlbrock & Kuhlen, 1972). بنابراین، با توجه به همبستگی معکوس بین EC محیط و زیست‌توده، تجمع زیست‌توده کشت را می‌توان به سرعت با خواندن مقدار EC از الکتروود EC متصل به سیستم‌های تولید انبوه در بیوراکتور که برای کنترل زیست‌توده در تولید صنعتی بسیار کاربردی است، بدست آورد (Gao et al., 2018).

در غلظت‌های بالاتر ساکارز محتوای متابولیت‌های فنولی روند کاهشی از خود نشان داد. Baque و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که غلظت ۱٪ ساکارز اضافه شده به محیط کشت حاوی ریشه‌های نابجای گیاه *Mirinda citrifolia*، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و مشتقات آنتراکینون (Anthraquinone) را به‌طور معنی‌داری افزایش داد و غلظت‌های بالاتر ساکارز سبب کاهش محتوای این ترکیبات شدند. ریشه‌های نابجای تیمار شده با غلظت ۲٪ ساکارز در کشت مایع گیاه *Ocimum basilicum*، بالاترین مقادیر از زمارینیک اسید، فنول کل و فلاونوئید کل را تولید کردند (Karataş, 2023). نتایج مشابهی از تأثیر بهینه غلظت کمتر ساکارز (۳٪) بر محتوای ترکیبات فنولی در کشت مایع سلولی گیاه *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul &

پایین‌تر به‌عنوان یک عامل استرس مشاهده شد. با وجود این، محتوای فنول کل (۳۰/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک)، فلاونوئید کل (۶/۶ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۸۴٪) در مطالعه آنها بسیار کمتر از یافته‌های این پژوهش بود که می‌تواند اهمیت بالای تحقیق در زمینه تولید ریشه‌های نابجا در گیاه دارویی سرخارگل و دیگر گیاهان دارویی با اندام مؤثره ریشه را آشکار سازد. علاوه بر این، ریشه‌های نابجا تولید شده به نسبت ریشه‌های مویین که ترکیبات اپین تولید می‌کنند از ایمنی بالاتری برخوردارند. با در نظر گرفتن این عوامل، نتایج این مطالعه می‌تواند ما را به سمت نتایج برای تولید زیست‌توده بالای ریشه و تجمع بالاتر ترکیبات فنولی به‌ویژه مشتقات کافئیک اسید در این گیاه ارزشمند دارویی سوق دهد. از آنجایی که کشت ریشه نابجای *E. purpurea* به‌عنوان یک منبع جایگزین بالقوه برای تولید ترکیبات افزایش‌دهنده سیستم ایمنی بدن شناسایی می‌شوند، تولید در مقیاس انبوه را می‌توان پس از مطالعات بیشتر در سیستم‌های بیوراکتور مناسب کسب کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل به دلیل حمایت‌هایشان در اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌کنند.

رشد و محتوای متابولیت‌های ثانویه براساس نوع ترکیب هدف، گونه گیاهی، ژنوتیپ‌های مختلف، روش کشت و لاین سلولی می‌تواند متفاوت باشد (Li et al., 2016).

در نتیجه، یافته‌های قابل‌توجهی در تجمع زیست‌توده و تولید ترکیبات فنولی در پاسخ به تغذیه با غلظت‌های متفاوت ساکارز در طی چهار هفته کشت ریشه نابجای *E. purpurea* مشاهده شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که محیط تقویت‌شده با یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه برگ مناسب‌ترین پارامترها به منظور تولید ریشه‌های نابجا با حداکثر رشد هستند. محیط‌های حاوی غلظت مشابه IBA همراه با غلظت‌های پایین‌تر ساکارز بهترین نتایج را در رابطه با تجمع زیست‌توده، تولید ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند، به‌طوری که بالاترین تجمع زیست‌توده و محتوای فنول کل، بیشترین مقدار از محتوای فلاونوئید کل و بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد به‌ترتیب در غلظت‌های ۳، ۲ و ۱ درصد ساکارز در هفته چهارم کشت اندازه‌گیری شدند. کشت ریشه نابجا در مقایسه با گیاهان مزرعه می‌تواند با سرعت رشد بالاتری تکثیر شود، در مقایسه با کشت مایع سلولی پایدارتر است و قابل انجام برای مطالعات به منظور تولید انبوه می‌باشد. Asadi-Sanam و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده‌اند که در شرایط مزرعه، تراکم بالای بوته به‌عنوان یک عامل تنش‌زا می‌تواند عملکرد متابولیت‌های ثانویه گیاه سرخارگل را افزایش دهد، همانند آنچه که در این مطالعه از نقش ساکارز در غلظت‌های

References

- Ahmad, N., Rab, A., Sajid, M., Ahmad, N., Fazal, H., Ali, M. and Egertsdotter, U., 2021. Sucrose-dependent production of biomass and low-caloric steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Industrial Crops and Products*, 164: 113382.
- Ali, M. and Abbasi, B.H., 2013. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products*, 49: 400-406.
- Andi, S.A., Gholami, M. and Ford, C.M., 2018. The effect of methyl jasmonate and light irradiation treatments on the stilbenoid biosynthetic pathway in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Natural product research*, 32(8): 909-917.
- Andi, S.A., Gholami, M., Ford, C.M. and Maskani, F., 2019. The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and

- secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 199: 111625.
- Asadi-Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Sefidcan, F. and Nematzadeh, G., 2016. Effect of planting date and density on dry matter and antioxidant capacity of purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench] root. Journal of Plant Process and Function, 5(15): 57-74.
 - Baque, M.A., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2010. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. Plant Biotechnology Reports, 4: 109-116.
 - Baque, M.A., Elgirban, A., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. Acta Physiologiae Plantarum, 34: 405-415.
 - Baque, A., Murthy, H.N. and Paek, K.Y., 2014. Adventitious root culture of *Morinda citrifolia* in bioreactors for production of bioactive compounds. Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology, 185-222.
 - Bauer, R., 1999. Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals: 41-88. In: Wagner, H. (Ed.) Immunomodulatory Agents from Plants. Progress in Inflammation Research, Birkhäuser, Basel, 372p.
 - Cui, H.Y., Abdullahil Baque, M., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2013. Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. Plant biotechnology reports, 7: 297-308.
 - Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2010a. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. Bioresource technology, 101(12): 4708-4716.
 - Cui, X.H., Murthy, H.N., Wu, C.H. and Paek, K.Y., 2010b. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 103: 7-14.
 - De-Eknamkul, W. and Ellis, B.E., 1985. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Reports, 4: 46-49.
 - Deepthi, S. and Satheeshkumar, K., 2017. Effects of major nutrients, growth regulators and inoculum size on enhanced growth and camptothecin production in adventitious root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. Biochemical Engineering Journal, 117: 198-209.
 - Devi, J., Kumar, R., Singh, K., Gehlot, A., Bhushan, S. and Kumar, S., 2021. In vitro adventitious roots: a non-disruptive technology for the production of phytoconstituents on the industrial scale. Critical Reviews in Biotechnology, 41(4): 564-579.
 - Dohare, B., Jain, K., Jain, B. and Khare, S., 2012. Rapid clonal propagation of an endangered medicinal plant *Plumbago zeylanica* Linn. International Journal of Pharmacy & Life Sciences, 3(8): 1883-1887
 - Etminan Rafsanjani, A. and Moeini, A., 2014. Exploring the effect of auxin hormone on the induction of adventitious root formation in *Echinacea purpurea* medicinal plant. 1st International and 13th Iranian Crop Science Congress and 3rd Iranian Seed Science and Technology Conference. Karaj, Iran, 24-26 August, 1-3.
 - Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M. and Ali, S., 2016. Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 124: 573-581.
 - Fazal, H., Abbasi, B.H. and Ahmad, N., 2014. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. Applied biochemistry and biotechnology, 174: 2086-2095.
 - Fu, R., Zhang, P., Jin, G., Wang, L., Qi, S., Cao, Y., Martin, C. and Zhang, Y., 2021. Versatility in acyltransferase activity completes chicoric acid biosynthesis in purple coneflower. Nature Communications, 12(1): 1563.
 - Gaid, M., Haas, P., Beuerle, T., Scholl, S. and Beerhues, L., 2016. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. Journal of Biotechnology, 222: 47-55.
 - Gao, X., Zhu, C., Jia, W., Gao, W., Qiu, M., Zhang, Y. and Xiao, P., 2005. Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. Biotechnology letters, 27: 1771-1775.
 - Gao, Y., Wu, C.H., Piao, X.C., Han, L., Gao, R. and Lian, M.L., 2018. Optimization of culture medium components and culture period for production of adventitious roots of *Echinacea pallida* Nutt. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 135: 299-307.
 - Gaosheng, H. and Jingming, J., 2012. Production of useful secondary metabolites through regulation of

- biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. *Recent advances in plant in vitro culture*: 197-210.
- Gómez-Aguirre, Y.A., Zamilpa, A., González-Cortazar, M. and Trejo-Tapia, G., 2012. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Industrial Crops and Products*, 36: 188-195.
 - Gould, A.R., Everett, N.P., Wang, T.L. and Street, H.E., 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells: I. Effects of nutrient limitation and nutrient starvation. *Protoplasma*, 106: 1-13.
 - Hahlbrock, K. and Kuhlen, E., 1972. Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium. *Planta*, 108: 271-278.
 - Hahn, E.J., Wu, C.H. and Paek, K.Y., 2008. Production of root biomass and secondary metabolites through adventitious root cultures of *Echinacea purpurea* in bioreactors. *Proceeding of VI International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, 829: 73-78.
 - Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F.Z., Rebey, I.B., Bourgou, S., Limam, F. and Marzouk, B., 2013. Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3): 806-817.
 - Jaisi, A., Sakunphueak, A. and Panichayupakaranant, P., 2013. Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by gamma ray irradiation. *Pharmaceutical Biology*, 51(8): 1047-1051.
 - Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2009. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 91-98.
 - Jiang, Y.J., Piao, X.C., Liu, J.S., Jiang, J., Lian, Z.X., Kim, M.J. and Lian, M.L., 2015. Bioactive compound production by adventitious root culture of *Oplopanax elatus* in balloon-type airlift bioreactor systems and bioactivity property. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123: 413-425.
 - Karataş, İ., 2023. Optimization of sucrose concentration to promote root proliferation and secondary metabolite accumulation in adventitious root cultures of *Ocimum basilicum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*: 59(3): 365-377.
 - Kim, Y.S., Hahn, E.J., Yeung, E.C. and Paek, K.Y., 2003. Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39: 245-249.
 - Kim, Y.E., 2017. Biosynthesis of isoflanovones and coumestrol from adventitious root and callus in *Glycine max*. Master thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea.
 - Krishnan, S.S. and Siril, E.A., 2018. Elicitor mediated adventitious root culture for the large-scale production of anthraquinones from *Oldenlandia umbellata* L. *Industrial Crops and Products*, 114: 173-179.
 - Li, H., Piao, X.C., Gao, R., Jin, M., Jiang, J. and Lian, M.L., 2016. Effect of several physicochemical factors on callus biomass and bioactive compound accumulation of *Reynoutria sachalinensis* bioreactor culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52: 241-250.
 - Liu, H., Wang, J., Gao, W., Wang, Q., Zhang, L. and Man, S., 2014. Optimization and quality assessment of adventitious roots culture in *Panax quinquefolium* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 713-719.
 - Min, J.Y., Jung, H.Y., Kang, S.M., Kim, Y.D., Kang, Y.M., Park, D.J., Prasad, D.T. and Choi, M.S., 2007. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource technology*, 98(9): 1748-1753.
 - Murthy, H.N., Lee, E.J. and 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.
 - Praveen, N. and Murthy, H.N., 2014. Production of withanolides from cell and organ cultures of *Withania somnifera* L. *Dunal*: 285-315. In: Paek, K.Y., Murthy, H.N., Zhong, J.J. (Eds.), *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer, Dordrecht, 709p.
 - Rajesh, M., Sivanandhan, G., Arun, M., Vasudevan, V., Theboral, J., Girija, S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, A., 2014. Factors influencing podophyllotoxin production in adventitious root culture of *Podophyllum hexandrum* Royle. *Acta physiologiae plantarum*, 36: 1009-1021.
 - Ramachandra Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2): 101-153.
 - Shohael, A.M., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2006. Enhancement of Eleutherosides production in embryogenic cultures

- of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose induced osmotic stress. *Process Biochemistry*, 41: 512-518.
- Sivakumar, G., 2006. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(12): 1419-1427.
 - Sivanandhan, G., Rajesh, M., Arun, M., Jeyaraj, M., Dev, G.K., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi A., 2012. Optimization of carbon source for hairy root growth and withaferin A and withanone production in *Withania somnifera*. *Natural Product Communications*, 7(10): 1271-1272.
 - Tam, H.T., Nam, N.B., Chien, H.X., Cuong, L.K., Tai, N.T., Cuong, N.V., Huy, N.P., Huong, T.T., Hieu, T., Linh, N.T.N. and Nhut, D.T., 2015. Optimization of culture conditions and medium composition for adventitious root induction from leaves of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 13: 865-873.
 - Tepe, B. and Sökmen, A., 2007. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Natural Product Research*, 21(13): 1133-1144.
 - Trinh, T.H., Tam, H.T., Ngan, H.T.M., Tai, N.T., Huy, N.P., Chien, H.X., Nam, N.B., Luan, V.Q., Hien, V.T., Huong, N.T.T., Ngoc, P.B., Ha, C.H. and Nhut, D.T., 2012. Influence of explant source, explant size and auxin in vitro adventitious shoot regeneration ability of Ngoc Linh ginseng *Panax vietnamensis*. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 10: 877-886.
 - Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1: 13-25.
 - Waidyanatha, S., Pierfelice, J., Cristy, T., Mutlu, E., Burbach, B., Rider, C.V. and Ryan, K., 2020. A strategy for test article selection and phytochemical characterization of *Echinacea purpurea* extract for safety testing. *Food and Chemical Toxicology*, 137: 111125.
 - Wang, H.Q., Li, H., Wu, C.H., Piao, X.C. and Lian, M.L., 2017. Effect of several factors on adventitious root biomass and bioactive compound accumulation of *Echinacea pallida*. *Agricultural Sciences*, 45: 125-128.
 - Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, 49: 193-199.
 - Wu, S.Q., Lian, M.L., Gao, R., Park, S.Y. and Piao, X.C., 2011. Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47: 719-724.
 - Xu, W., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W. and Qian, H., 2022. Effects of geographical location and environmental factors on metabolite content and immune activity of *Echinacea purpurea* in China based on metabolomics analysis. *Industrial Crops and Products*, 189: 115782.
 - Xu, W., Zhu, H., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W. and Qian, H., 2021. Echinacea in hepatopathy: A review of its phytochemistry, pharmacology, and safety. *Phytomedicine*, 87: 153572.
 - Yin, S., Gao, W., Wang, J., Zhang, J., Man, S., Jing, S.S. and Liu, H., 2013. Effects of dynamic changes of nutrients on adventitious roots growth and periplocin accumulation in culture of *Periploca sepium* Bunge. *Acta physiologiae plantarum*, 35: 3085-3090.
 - Yu, K.W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2000. Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. *Korean Journal of Plant Tissue Culture (KJPTC)*, 27: 309-315.
 - Zhang, Y.H., Zhong, J.J. and Yu, J.T., 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of medium sucrose. *Journal of Biotechnology*, 51: 49-56.
 - Zhang, Y., Liu, K. and Li, W.U., 2001. Advances in studies on *Echinacea* Moench. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 32: 852-855.