Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (cichorium intybus l.) and enhancement of secondary metabolites

Mehdi Mohebodini

*Associate Professor, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran. Email: mohebodini@uma.ac.ir

Roghayeh Fathi

Phd student, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran. Email: fathi.r@uma.ac.ir

Abstract

Objective

Chicory (Cichorium intybus L.) is an important medicinal plant from Asteraceae family; contain a number of valuable medicinal compounds. Hairy root induction by Agrobacterium rhizogenes are an effective method for production of secondary metabolites.

Materials and methods

In this study, through first experiment, different concentrations of macro elements (0.5x, 1x, 1.5x, 2x, 2.5x and 3x concentrations of MS base medium) were investigated. In second experiment inoculation time was examined to establish an efficient transformation system for chicory. Molecular confirmation of transgenic hairy roots was done with PCR using gene-specific primers for rolB gene and also growth rate of hairy root lines obtained from different explants were investigated. Also the effect of hormonal elicitor and carbon source were studied in hairy roots growth.

Results

The results show that maximum chicory hairy roots induction was observed by using 1x KNO_3, 1.5x NH_4NO_3, 1x and 1.5x $MgSO_4$, 1.5x $CaCl_2$ and 0.5x KH_2PO_4 (45.66, 53.33, 46.66, 53.33 and 66.66). The highest phenolic content was obtained by using 1x KNO_3,

www.SID.ir

Archive of SID

2x NH_4NO_3, 1.5x $MgSO_4$, 1.5x $CaCl_2$ and 0.5x KH_2PO_4 (4.21, 4.33, 4.6, 4.58 and 4.84). Also 1.5x KNO_3, 2x NH_4NO_3, 1x $MgSO_4$, 1.5 $CaCl_2$ and 0.5x KH_2PO_4showed maximum flavonoid content (17.25, 18.52, 17.22, 18.3, 17.96 mg g DW respectively).The observation confirmed that grow of hairy root lines were significantly different and Line C showed higher biomass (0.36 g). Also the results of experiments revealed that 1.5 mg l^{-1} NAA in combination with 3 and 4% sucrose were superior for highest fresh (1.96 and 1.72 g) weight.

Conclusions

Hairy roots culture was developed as the innovative path for bulky production of secondary metabolites which find relevance in the pharmaceutical, food and flavor industries. The results indicated significant increases in hairy root induction and total metabolites content by ATCC15834 strain and 0.5x KH_2PO_4 co-culture MS medium.

Keywords: Inoculation, KH_2PO_4, Medium, Phenolic, RolB gene.

Citation: Mohebodini M, Fathi R (2020) The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (cichorium intybus l.) and enhancement of secondary metabolites. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 67-90.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 67-90.
DOI: 10.22103/jab.2020.15606.1215
Received: July 2, 2019; Accepted: August 16, 2020
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر ترکیبات محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین در کاسنی (Cichorium intybus L.) و افزایش متابولیت‌های ثانویه

مهدی محب‌الدینی

*نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران، ایمیل: mohebodini@uma.ac.ir

رقیه فتحی

دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران، ایمیل: fathi.r@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰٤/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲٦

چکیده

هدف: کاسنی گیاه دارویی مهمی از خانواده‌ی گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) بوده و دارای ترکیبات دارویی ارزشمندی می‌باشد. القای ریشه‌های مویین با استفاده از Agrobacterium rhizogenes یکی از روش‌های کاربردی برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، در آزمایش اول، تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر ماکرو محیط کشت بر کارایی القای ریشه‌های مویین در کاسنی بررسی شد. تائید مولکولی ریشه‌های مویین به وسیله‌ی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن rolB انجام شد. در آزمایش دوم میزان رشد لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین کاسنی بررسی شد و همچنین تاثیر الیسیتور هورمونی و منبع کربن و بر رشد ریشه‌های مویین بررسی شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین در غلظت ۱x پتاسیم نیترات، ۱/۵x نیترات آمونیوم، ۱x و ۱/۵x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات (به‌ترتیب ۴۶/۶۶، ۵۳/۳۳، ۴۶/۶۶، ۵۳/۳۳ و ۶۶/۶۶ درصد) مشاهده شد. بیشترین میزان فنول کل در غلظت ۱x پتاسیم نیترات، ۲x نیترات آمونیوم، ۱/۵x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات (به‌ترتیب ۴/۲۱، ۴/۳۳، ۴/۲۶، ۴/۵۸ و ۴/۸۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به‌دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۲x نیترات آمونیوم، ۱x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات بالاترین میزان فلاونوئید را داشتند (به‌ترتیب ۱۷/۲۵، ۱۸/۵۲، ۱۷/۲۲، ۱۸/۳ و ۱۷/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک). لاین C بیشترین افزایش زیست‌توده (۰/۳۶ گرم) را نشان دادند همچنین بیشترین وزن تر (۱/۹۶ و ۱/۷۲ گرم در فلاسک) به ترتیب در ریشه‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد و ۴ درصد ساکارز به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: کشت ریشه‌های مویین یک فرآیند نوین برای تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح وسیع است که قابل استفاده در صنایع داروسازی و غذایی می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از سویه‌ی ATCC15834 و محیط هم‌کشتی حاوی KH_2PO_4 ۰/۵ x باعث افزایش میزان القای ریشه‌های مویین و متابولیت‌های گیاه کاسنی شد.

کلمات کلیدی: تلقیح، پتاسیم فسفات، ژن rolB، فنول، محیط کشت.

مقدمه

گیاهان دارویی به‌علت داشتن ترکیبات دارویی متنوع مورد توجه همه‌ی جوامع هستند (Pereira et al. 2019). جمع‌آوری یا کشت گیاهان دارویی نیازمند زمانی طولانی است و دارای محدودیت‌های گوناگون می‌باشد. به همین دلیل در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای ایجاد روش‌های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی انجام شده است. کشت بافت گیاهی روش مناسب و راهگشایی برای تولید متابولیت‌های گیاهی است (Tripathi et al. 2019). استفاده از کشت سلول‌های گیاهی به‌علت بی‌ثباتی در تولید، کارایی کمتری در تولید متابولیت‌های ثانویه دارد همچنین تولید برخی متابولیت‌ها فقط در اندام‌های تمایز یافته تولید می‌شوند. تولید ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح گیاه با Agrobacterium rhizogenes روش کارآمد و مؤثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ثبات بیوشیمیایی و ژنتیکی می‌باشند (Singh et al. 2018). ریشه‌های دست آمده می‌توانند منبع مناسب و ارزشمندی جهت تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی در مقیاس وسیع، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و گیاه پالایی به شمار آیند (Kumar et al. 2006). از ویژگی‌های ریشه‌های مویین می‌توان به رشد سریع و پلاژیوتروپیک، ثبات ژنتیکی، توانایی رشد و تولید زیست‌توده‌ی فراوان بدون نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی با سرعت و مقدار بیشتر اشاره کرد (Kabirnetaj et al. 2012). همچنین در سال‌های اخیر از روش تولید DNA نوترکیب و تولید پروتئین‌های انسانی از طریق انتقال ژن با Agrobacterium برای تولید ترکیبات دارویی استفاده می‌شوند (Elkin et al. 2012). کاسنی از اعضای خانواده‌ی گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) و گیاهی یک ساله یا دو ساله دارای گل‌های آبی یا سفید رنگ و برگ‌های تقریباً گرد با بریدگی‌هایی در کناره‌ها می‌باشد. این گیاه دارای ترکیبات متعدد از جمله اینولین، کومارین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، شیکوریک‌اسید و سزکوئی‌ترپن‌لاکتون‌ها است و در درمان بیماری‌های کبدی، کلیه و فشارخون بالا نقش

www.SID.ir

Archive of SID

دارد (Saeed et al. 2017). ترکیبات فنولی موجود در کاسنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و در جلوگیری از سرطان‌ها مؤثر است (Degl innoocenti et al. 2008). گیاهان در شرایط تنش، ترکیبات ثانویه‌ی گیاهی از جمله فنول و فلاونوئید تولید می‌کنند (Conforti et al. 2009). شیکوریک اسید از مشتقات فنول بوده و از جمله اثرات آن می‌توان به اثر ضددیابتی، ضد ایدزی، ضد آنزیم هیالورونیداز اشاره کرد. از این ترکیب در تولید داروهای ضد ایدز استفاده می‌شود زیرا مانع بیان ژن ویروس HIV در بدن انسان می‌شود. همچنین باعث افزایش تولید انسولین شده و در مهار علائم دیابت نقش دارد. اینولین موجود در کاسنی به‌علت داشتن قند طبیعی، برای مصرف افراد دیابتی مناسب بوده و همچنین در بهبود جذب کلسیم و منیزیم نقش دارد (Pereira et al. 2019). تحقیقات اندکی بر روی بهینه‌سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی انجام شده است. در پژوهشی تأثیر سویه‌های مختلف A. rhizogenes و محیط هم‌کشتی MS (Murashige and Skoog 1962)، LS (Linsmaier and Skoog 1965) و B5 (Gamborg et al. 1968) را بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ی کوتیلدون هشت روزه‌ی کاسنی بررسی کردند و گزارش کردند که سویه‌ی A13 در محیط کشت MS بیشترین کارایی را در القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی هشت روزه داشته‌اند (Kabirnetaj et al. 2012). در پژوهش دیگری میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در دودمان‌های مختلف ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح برگ‌های چهار هفته‌ای کاسنی با سویه‌ی A4، بررسی شد و نتایج نشان داد که دودمان‌های مختلف ریشه‌های مویین که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده است تفاوت معنی‌داری از لحاظ توانایی رشد و تولید متابولیت ثانویه نسبت به یکدیگر دارند (Azarmehr et al. 2013). در پژوهشی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌عنوان محرک رشد ریشه‌های مویین گیاه کاسنی، مثبت و مؤثر ارزیابی شده و توانایی جذب هورمون توسط ریشه‌های مویین تراریخت را بیشتر از ریشه‌های غیر تراریخت گزارش شد (Fathi et al. 2018). به‌طور معمول، القای ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی با استفاده از سویه‌ی ATCC15834 دشوار و با درصد پایین القای ریشه در ریزنمونه‌ها همراه است (Kabirnetaj et al. 2012). به‌همین منظور، در تحقیق حاضر، بهینه‌سازی القا و کشت ریشه‌های مویین از طریق بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر القای ریشه بررسی گردید. همچنین تأثیر مدت آلوده‌سازی گیاه با باکتری و نوع محیط هم‌کشتی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین از لحاظ میزان رشد و تولید زیست توده بررسی شدند. ترکیبات محیط کشت از عوامل تأثیرگذار در بهینه‌سازی القا و رشد ریشه‌های مویین است. در پژوهشی تأثیر محیط هم‌کشتی را بر القای ریشه مویین در زرین گیاه مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که استفاده از MS فاقد NH_4NO_3، KH_2PO_4، KNO_3 و $CaCl_2$ به‌عنوان محیط هم‌کشتی منجر به افزایش راندمان القای ریشه‌های مویین در این گیاه شد (Sharafi et al. 2014). همچنین حذف $CaCl_2$ از محیط کشت MS باعث افزایش تولید ریشه‌های مویین در گیاه Hevea brasiliensis گردید (Montoro et al. 2000). در پژوهشی نیز تأثیر مثبت حذف ترکیبات معدنی از محیط کشت در افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

کارایی A. rhizogenes در تراریخته سازی گیاه Ginkgo biloba تائید شد (Dupre et al. 2000). بسته به نوع گیاه، وجود یا عدم حضور یون‌ها در محیط هم‌کشتی باکتری و گیاه، تأثیر مستقیم در میزان تراریخته‌سازی گیاه دارد (Aycan et al. 2019). برخی پژوهشگران تأثیر منفی Ca^{+2} و برخی دیگر تأثیر منفی PO_4 را در القای ریشه‌های مویین گزارش کرده‌اند (Sharafi et al. 2014). در بررسی اثر متقابل محیط هم‌کشتی و سویه بر فراوانی ریشه مویین، بالاترین فراوانی القای ریشه را مربوط به محیط MS حاوی ۶ درصد ساکارز و سویه A4 دانستند (Moradi et al. 2019). در پژوهشی که با هدف بررسی تأثیر عناصر محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین با استفاده از سویه‌ی A_4 از A. rhizogenes در کاسنی انجام شد پژوهشگران دریافتند که حذف KNO_3 از محیط هم‌کشتی تأثیر مثبتی در افزایش درصد القای ریشه‌های مویین شد (Fathi et al. 2019). اما تا به حال تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر ماکرو محیط کشت بر میزان القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه بررسی نشده است و این اولین پژوهش در این زمینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تأثیر ترکیبات محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین: بذور کاسنی به منظور استریل شدن به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و بلافاصله با آب شستشو داده شد. سپس ۲۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم پنج درصد قرار گرفتند. در نهایت سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شده و در محیط‌کشت MS کشت شدند. داخل هر شیشه ۲۰ عدد بذر کشت گردید و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۸:۱۶ نگهداری شدند. در این آزمایش، باکتری A. rhizogenes سویه‌ی ATCC15834، در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (فن‌آوران سهند) با دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۰۰ rpm نگه‌داری شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی بین ۰/۷ تا ۰/۸ در OD600 تنظیم شد. این باکتری برای آلوده نمودن گیاه کاسنی مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌ی مزبور از مرکز ملی مهندسی ژنتیک تهیه شد. ریزنمونه‌ها پس از زخم شدن سطحی توسط اسکالپل، در شرایط استریل در سوسپانسیون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شده و در شیکرانکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS جامد حاوی نیترات پتاسیم (KNO_3)، نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)، پتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، منیزیوم سولفات ($MgSO_4$) و کلسیم کلرید ($CaCl_2$) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت MS منتقل شدند و در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به عنوان شاهد در شرایطی مشابه در محیط کشت LB بدون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شده. پس از سپری شدن مدت ۴ روز، ریز

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها در آب استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک شدن نسبی در روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انتقال داده شدند. پس از چهار هفته، درصد القای ریشه‌ی مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول و فلاونوئید کل اندازه‌گیری شد.

تهیه عصاره پلی فنلی و اندازه‌گیری فنل و فلاوونوئید: برای این منظور ابتدا مقدار ۲ گرم از بافت ریشه‌های مویین در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و فرمیک اسید به نسبت ۹۹:۱ سائیده شد و سپس عصاره‌ی به دست آمده برای اندازه‌گیری فنول و فلاونوئید استفاده گردید. برای سنجش فنل کل از روش Sonald and Laima (2001) استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی پلی‌فنلی و ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد سپس ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ برابر رقیق شده و ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم به آن اضافه گردید. پس از افزودن ۳ میلی لیتر آب مقطر و نگهداری محلول در شرایط تاریکی به مدت ۹۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. از منحنی استاندارد گالیک اسید برای محاسبه‌ی فنول کل استفاده گردید. برای سنجش فلاونوئید کل نیز از روش .Heimler et al (2009) استفاده شد. برای سنجش فلاونوئید کل ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره پلی فنلی، ۷۵ میکرولیتر سدیم نیترات ۵ درصد، 75میکرولیتر محلول تازه تهیه شده آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکساید ۱مولار با هم مخلوط شد و سرانجام حجم نهایی محلول با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۲/۵ میلیلیتر رسانده شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آنها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد.

سنجش شیکوریک اسید توسط HPLC : سنجش شیکوریک اسید به روش .Heimler et al (2009) انجام شد. بدین منظور از دستگاه HPLC (Knauer, pump K -1001) و ستونی با مشخصات (C18: ۱۲۵mm × ۴mm ID) استفاده شد. آب اسیدی حاوی فرمیک اسید یک درصد به عنوان حلال A و متانول به‌عنوان حلال B در نظر گرفته شد. گرادیان شامل ۵ درصد از حلال B که طی ۲۵ دقیقه به ۴۰ درصد حلال B در دقیقه رسید و به مدت ۵ دقیقه بصورت ایزوکراتیک ادامه یافت. میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌ی گیاهی در هر بار تزریق استفاده شد. میزان ماده‌ی شیکوریک اسید در ریشه‌های شاهد و ریشه‌های مویین القا شده در محیط کشت حاوی غلظت ۱x و ۰/۵x پتاسیم فسفات و با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده به وسیله شیکوریک اسید استاندارد (Sigma) محاسبه گردید.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین : به منظور تایید مولکولی درج ناحیه‌ی T-DNA موجود در پلاسمید القا کننده‌ی ریشه‌ی A. rhizogenes محتوای ژنتیکی ریشه‌های مویین احتمالی با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle 1987). برای تایید وجود ژن باکتریایی در ریشه‌های مویین، از آغازگرهای اختصاصی ژن rolB (ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA) استفاده گردید و واکنش PCR با هدف تکثیر ژن rolB انجام

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

شد. همچنین از پرایمر VirD نیز با توالی ´5- ATGTCGCAAGGACGTAAGCCGA-3´ و 5´- GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۳۸ bp استفاده شد. برنامه‌ی PCR شامل واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه به صورت واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه‌ی سانتی گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط به‌مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ بارگزاری شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد در دستگاه ژل داک عکس‌برداری شدند.

ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین: برای ارزیابی لاین‌های ریشه‌های مویین از نظر میزان رشد، تعداد ۱۵ لاین مختلف ریشه مویین از ریزنمونه‌های مختلف انتخاب شد. لازم به ذکر است که لاین‌های تراریخته مستقل از هم انتخاب شدند و مبنای انتخاب، استفاده از لاین‌های ریشه مویین با محل القای متفاوت بر روی ریزنمونه‌ها بود. به‌طور طبیعی چنین لاین‌هایی با احتمال بسیار بالا از نظر تعداد نسخه‌های تراژن و محل درج آن‌ها از هم متفاوت بوده، از اینرو لاین‌های تراریخته مستقل از هم به حساب می آیند. ریشه‌های مویین انتخاب شده در محیط کشت MS مایع کشت شدند. پس از چهار هفته، وزن تر و وزن خشک برای هر لاین اندازه‌گیری شد و داده‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

تاثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن و بر کشت ریشه‌های مویین: در این آزمایش ریشه‌های به‌دست آمده از لاین برتر به عنوان ماده‌ی آزمایشی استفاده شدند. نوک ریشه‌ها به قطعاتی به طول دو سانتی‌متر برش داده شدند زیرا قطعات کوچک‌تر ریشه، هوادهی بهتری در شیکر داشته و رشد بیشتری خواهند داشت. در هر تکرار ۵۰ میلی‌گرم ریشه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ظروف شیشه مربا کشت گردید. هورمون NAA در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و ساکارز به عنوان منبع کربن برای رشد ریشه‌های مویین در چهار غلظت (۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) به تنهایی یا به صورت ترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت، شیشه‌ها در شیکر با دور ۱۰۰ rpm نگهداری شدند. بعد از چهار هفته، وزن تر ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش مربوط به بررسی تأثیر ترکیبات محیط کشت بر میزان القای ریشه‌های مویین، آزمایش مربوط به تأثیر نوع لاین‌های ریشه‌های مویین بر میزان زیست‌توده و تاثیر هورمون NAA و منبع کربن، همگی به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. داده‌ها قبل از تجزیه و تحلیل، از نظر نرمال بودن بررسی شدند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

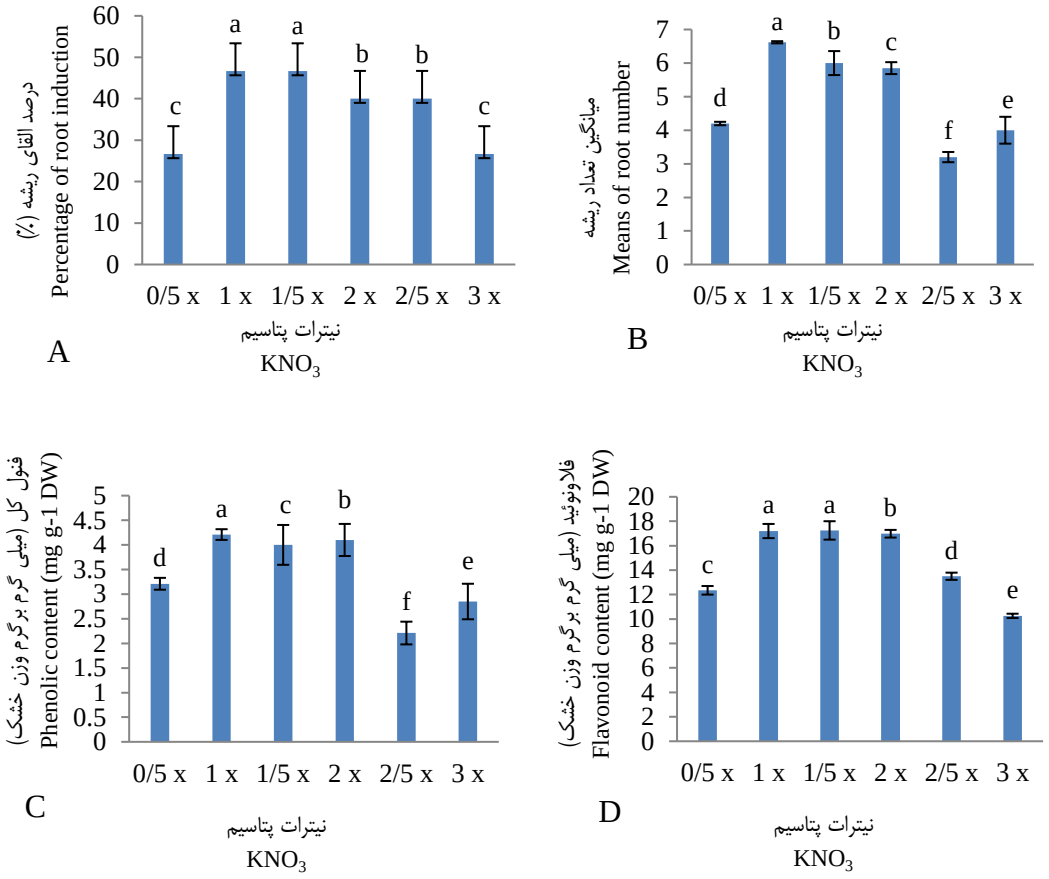
نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف نیترات پتاسیم بر القای ریشه‌های مویین: اولین ریشه‌های مویین پس از گذشت ۱۰ روز در ریزنمونه‌های برگ مشاهده گردید. ریزنمونه‌های تراریخته، ریشه‌های طویل با انشعابات زیاد تولید کردند در حالی که ریزنمونه‌های غیر تراریخته درصد ریشه‌دهی پایین داشته و با تاخیر ظاهر شدند (شکل ۱۱). نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات بر میزان القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول و فلاونوئید کل در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۴۶/۶۶ درصد) و میزان فلاونوئید کل (۱۷/۲۵ و ۱۷/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات مشاهده شد (شکل ۱ A و B). همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲) و فنول کل (۴/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱x پتاسیم نیترات به‌دست آمد (شکل ۱ C و D). با افزایش میزان پتاسیم نیترات از ۰/۵x به ۱x و ۱/۵x میزان پذیرش گیاه برای تراریختی توسط باکتری و احتمالاً توانایی باکتری در درج و بیان ژن‌های خود در سلول‌های محل زخم گیاه افزایش یافته است. اما با افزایش پتاسیم نیترات از غلظت ۱/۵x به بالاتر، درصد القای ریشه‌های مویین کاهش یافت بنابراین می‌توان گفت که غلظت‌های بالای نیترات پتاسیم تأثیر مهارکننده بر القای ریشه‌های مویین در کاسنی و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین این گیاه دارد (Young-Amet al. 2000). نیتروژن ازجمله عناصر ضروری برای رشد رویش گیاهان دارد و به صورت نیترات و آمونیوم وجود دارد. شکل قابل استفاده‌ی نیتروزن برای گیاهان، نیترات است که از طریق سلول‌های گیاه جذب شده و بر فرآیندهای مختلف مربوط به رشد گیاه تأثیر مثبت دارد (Shanjani 2003). در این پژوهش سطوح کمتر نیترات پتاسیم (۰/۵x) باعث کاهش القای ریشه‌های مویین (۲۶/۶۶ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۴/۲)، میزان فنول کل (۲۱/ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ۳) و فلاونوئید کل (۳۵/ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ۱۲) شد اما در پژوهشی که توسط Shirin et al. (2015) انجام شد بیشترین میانگین تعداد شاخساره در گیاه آکاسیا (Saraca asoca) در محیط کشت حاوی نیترات پتاسیم به غلظت یک چهارم میزان آن در محیط کشت MS پایه به‌دست آمد که نشان از تفاوت موجود در شرایط متابولیکی گیاهان مختلف دارد. همچنین در گیاه Prosopis alba نیز بیشترین تولید شاخه در سطوح پایین نیتروژن حاصل شد (Tabone et al. 1986). همچنین Fathi et al. (2019) گزارش کردند که برخی سویه‌های A. rhizogenes در محیط کشت حاوی سطوح پایین نیتروژن عملکرد بهتری در تراریخته‌سازی گیاه کاسنی دارند و برخی سویه‌ها نیز از جمله ATCC15834 بیشترین توانایی تراریخته‌سازی را در محیط حاوی مقادیر پایین فسفر دارند که به دلیل تفاوت در ساختار و عملکرد سویه‌های مختلف این باکتری است.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم بر صفات ریشه‌های مویین

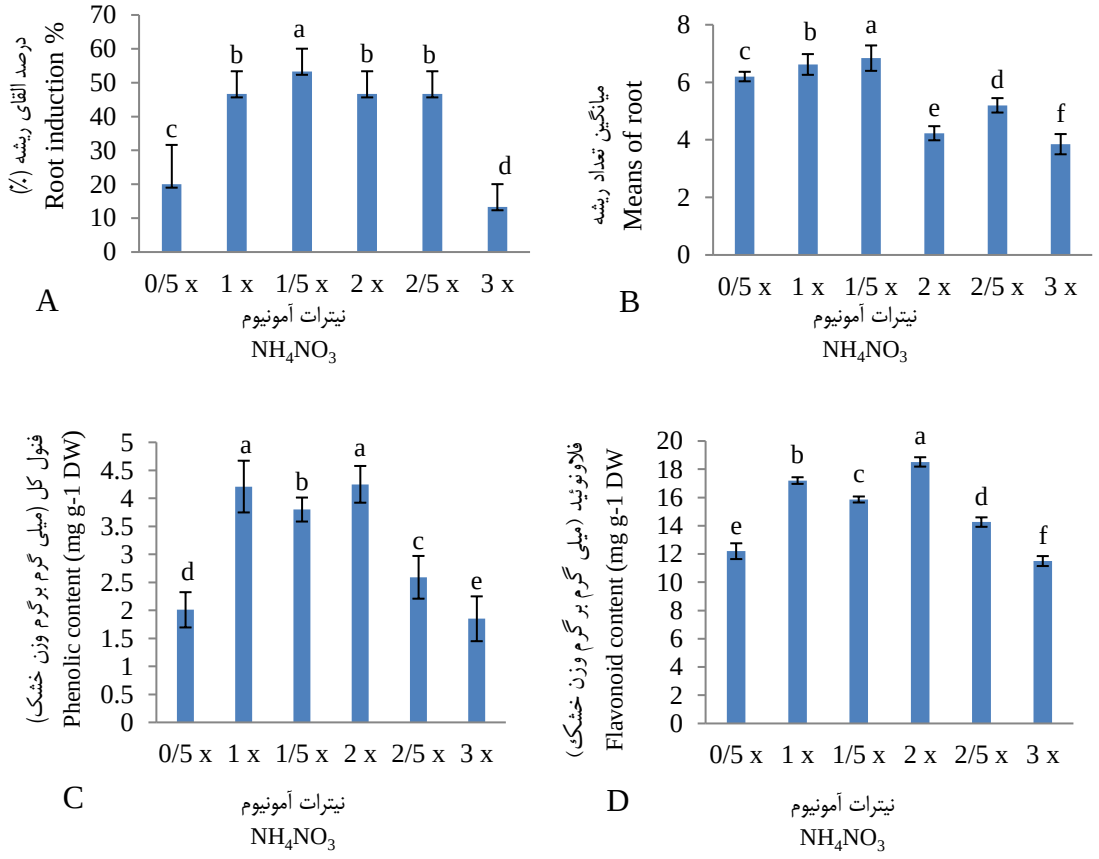
Figure 1. The effects of different concentration of KNO_3 on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف نیترات آمونیوم بر القای ریشه‌های مویین: نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت) بر القای ریشه‌های مویین در کاسنی نشان داد که این نمک تأثیر مستقیم بر صفات مورد بررسی دارد. بیشترین میزان القای ریشه‌های مویین (۵۳/۳۳ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۶/۸۴ عدد) در محیط کشت حاوی ۱/۵x نیترات آمونیوم به‌دست آمد و بیشترین میزان فنول (۴/۲۵ و ۴/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم ۱x و ۲x حاصل شد و بیشترین میزان فلاونوئید کل (۱۸/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم ۲x حاصل شد (شکل ۲ A، B، C و D). در تمام صفات اندازه‌گیری شده، کمترین مقدار در درصد القای ریشه‌های مویین (۱۳/۳۳ درصد)، میانگین تعداد ریشه‌ها (۳/۸۵ عدد)، فنول کل (۱/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید (۱۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به غلظت ۳x نیترات آمونیوم بود که نشان از اثر سمیت غلظت بسیار بالای این نمک است (شکل ۲). نیترات آمونیوم نیز از منابع نیتروژن مورد نیاز گیاه بوده و از طریق افزایش تولید پلی‌آمین‌ها (Chen et al. 2011) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش سنتز مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نقش

www.SID.ir

Archive of SID

دارد (Shehata et al. 2014). همچنین اثبات شده است که سطوح بالای آمونیوم در اندام زایی و زنده‌مانی بافت‌های گیاهی نقش دارد (Alturki et al. 2010). Fan et al. (1998) نیز گزارش کردند که افزایش آمونیوم باعث افزایش سنتز شیکمیک‌اسید شد اما برخلاف نتایج به‌دست آمده، در پژوهشی اثبات شد که غلظت‌های پایین نیترات آمونیوم تأثیر مثبتی در افزایش تولید جنسینوزید در گیاه جینسنگ شده است (Zhong and Wang 1998).



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر صفات ریشه‌های مویین

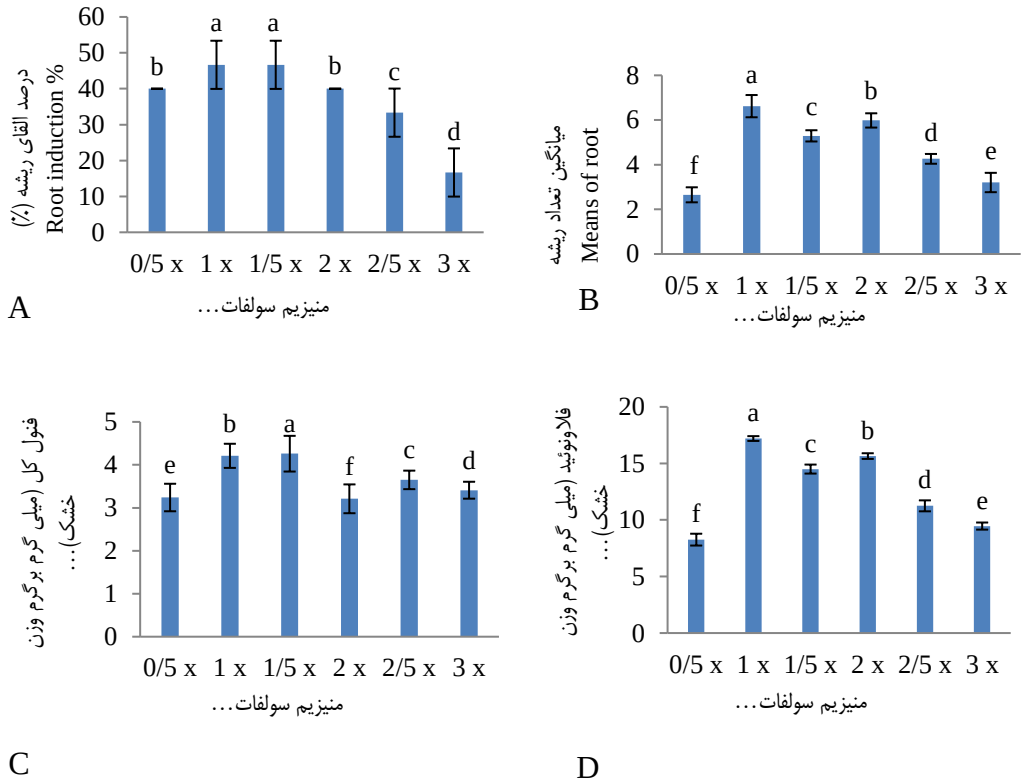
Figure 2. The effects of different concentration of NH_4NO_3 on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف منیزیم سولفات بر القای ریشه‌های مویین: برطبق شکل ۳ تأثیر محیط کشت‌های حاوی سطوح مختلف منیزیم سولفات بر میزان القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول کل و فلاونوئید کل بررسی گردید. در محیط کشت حاوی ۱x و ۱/۵x منیزیم سولفات بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۴۶/۶۶ درصد) مشاهده شد (شکل ۳ A) همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲ عدد) در تیمار ۱x به‌دست آمد (شکل ۳ B). بیشترین میزان فنول (۴/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱/۵x منیزیم سولفات به‌دست آمد (شکل ۳ C). همچنین غلظت ۱x

www.SID.ir

Archive of SID

موجب تولید بیشترین میزان فلاونوئید (۱۷/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) شد (شکل ۳ D). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۱x و ۱/۵x برای بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه مناسب است. تا به حال پژوهش‌های اندکی در مورد تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر میزان القای ریشه‌های مویین و رشد ریشه‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. در پژوهشی که در مورد القای ریشه‌های مویین و تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاه شابیزک انجام شد نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین افزایش وزن تر ریشه‌ها در محیط کشت حاوی سطوح بالای منیزیم سولفات به‌دست آمد و میزان هیوسیامین در اثر استفاده از ۱۲۵ میلی‌گرم منیزیم سولفات بیشترین مقدار بود و بیشترین سطح اسکوپولامین در تیمار هزار میلی‌گرم منیزیم سولفات مشاهده شد (Hank et al. 2003). در کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل نیز بیشترین میزان تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت حاوی ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر منیزیم سولفات به دست آمد (Abdoli et al. 2013). در کشت ریشه‌های مویین گیاه تنباکوی هندی، بیشترین میزان تولید بیوماس در محیط کشت B5 حاوی یک گرم در لیتر منیزیم سولفات حاصل شد همچنین تولید متابولیت لوبلین در محیط کشت حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کلرید، بیشترین مقدار (۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشت. آن‌ها در نهایت گزارش کردند که ترکیب بهینه از مواد غذایی برای تولید لوبلین (Lobeline)، محیط کشت B5 پایه به‌همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم سولفات است (Balvanyos et al. 2003).



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر صفات ریشه‌های مویین

Figure 3. The effects of different concentration of $MgSO_4$ on hairy root characteristics

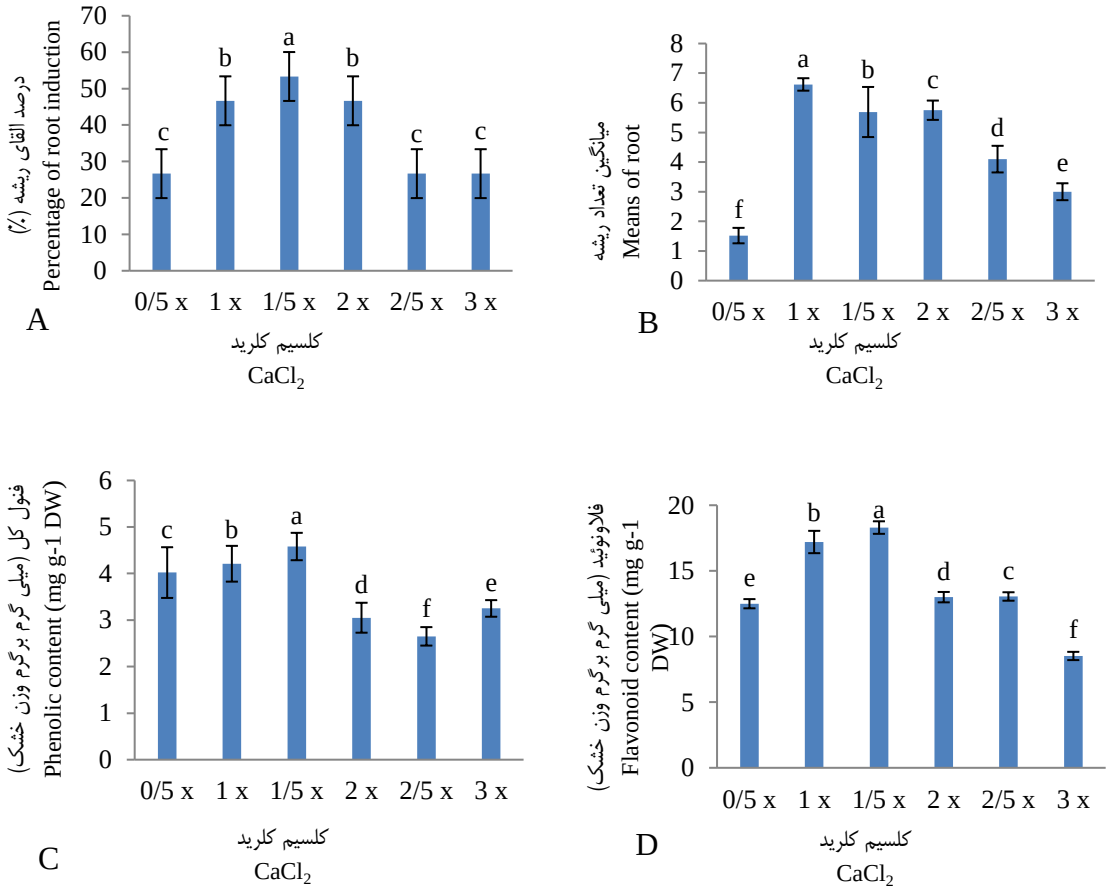
www.SID.ir

تأثیر سطوح مختلف کلسیم کلرید بر القای ریشه‌های مویین: تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر صفات مختلف ریشه‌های مویین کاسنی نشان داد که غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x با ۴۶/۶۶، ۵۳/۳۳ و ۴۶/۶۶ درصد القای ریشه‌های مویین، بیشترین تأثیر را نسبت به غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر داشتند (شکل ۴ A). بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲ عدد) نیز در محیط کشت حاوی غلظت ۱x کلسیم کلرید حاصل شد (شکل ۴ B). میزان فنول کل در سه تیمار ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x به ترتیب با ۴/۰۲، ۴/۱ و ۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیشتر از غلظت‌های ۲x، ۲/۵x و ۳x بود (شکل ۴ C)که نشان از اثرات منفی غلظت‌های بالای این نمک دارد. بیشترین میزان فلاونوئید نیز در غلظت‌های ۱x و ۱/۵x با میانگین ۱۷/۲ و ۱۸/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود (شکل ۴ D). افزایش غلظت کلسیم کلرید در محیط کشت موجب افزایش آنزیم پراکسیداز در گیاه و تجزیه‌ی متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Ajungla et al 2009) لذا در این پژوهش نیز میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت حاوی سطوح بالای کلسیم کلرید کم بود همانطور که در پژوهش .Abdoli et al (2013) نیز اثر منفی سطوح بالای کلسیم کلرید در رشد ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل اثبات شد. در مطالعه‌ای گزارش شد که محیط کشت دارای مقادیر بالای کلسیم کلرید موجب کاهش رشد و زرد شدن بافت گیاه پروانش در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای گردید (Siddiqui and Mujib 2012). همچنین مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کلرید در محیط کشت استقرار گیاه Brugmansia candida نیز موجب نتیجه‌ی مشابه شد (Pitta Alvarez et al 2000).

تأثیر سطوح مختلف پتاسیم فسفات بر القای ریشه‌های مویین: نتایج مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف پتاسیم نیترات بر القای ریشه‌های مویین در گیاه کاسنی نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۵x پتاسیم فسفات بیشترین میزان القای ریشه‌های مویین (۶۶/۶۶ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۷/۲ عدد)، میزان فنول کل (۴/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۱۷/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشت. کمترین درصد القای ریشه‌های مویین (۲۶/۶۶)، میانگین تعداد ریشه (۴/۷۹ عدد)، میزان فنول کل و فلاونوئید (به ترتیب ۲/۱۳ و ۸/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی پتاسیم فسفات ۳x مشاهده شد (شکل ۵ A، B، C و D).که نشان از ایجاد سمیت فسفات است. نتایج بررسی میزان شیکوریک اسید در ریشه‌های شاهد غیر تراریخته، ریشه‌های مویین القا شده در محیط کشت MS حاوی غلظت ۱x و ۰/۵x پتاسیم فسفات نشان داد که بیشترین محتوای شیکوریک اسید (۲۴/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۰/۵x پتاسیم فسفات حاصل شد (شکل ۶). فسفر در بسیاری از فرآیندی گیاهی از جمله فتوسنتز، ذخیره‌ی انرژی و تقسیم سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد اما در تعدادی از پژوهش‌ها گزارش شده که فسفر تأثیر منفی در تراریخته‌سازی گیاه توسط A. rhizogenes دارد (Azadi et al 2010) و محدود کردن میزان فسفات محیط کشت گیاهی موجب افزایش فعالیت ژن بیماری‌زای Vir در گیاه و افزایش درصد القای ریشه‌های مویین شده است (Palmer et al 2004).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤. تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر صفات ریشه‌های مویین

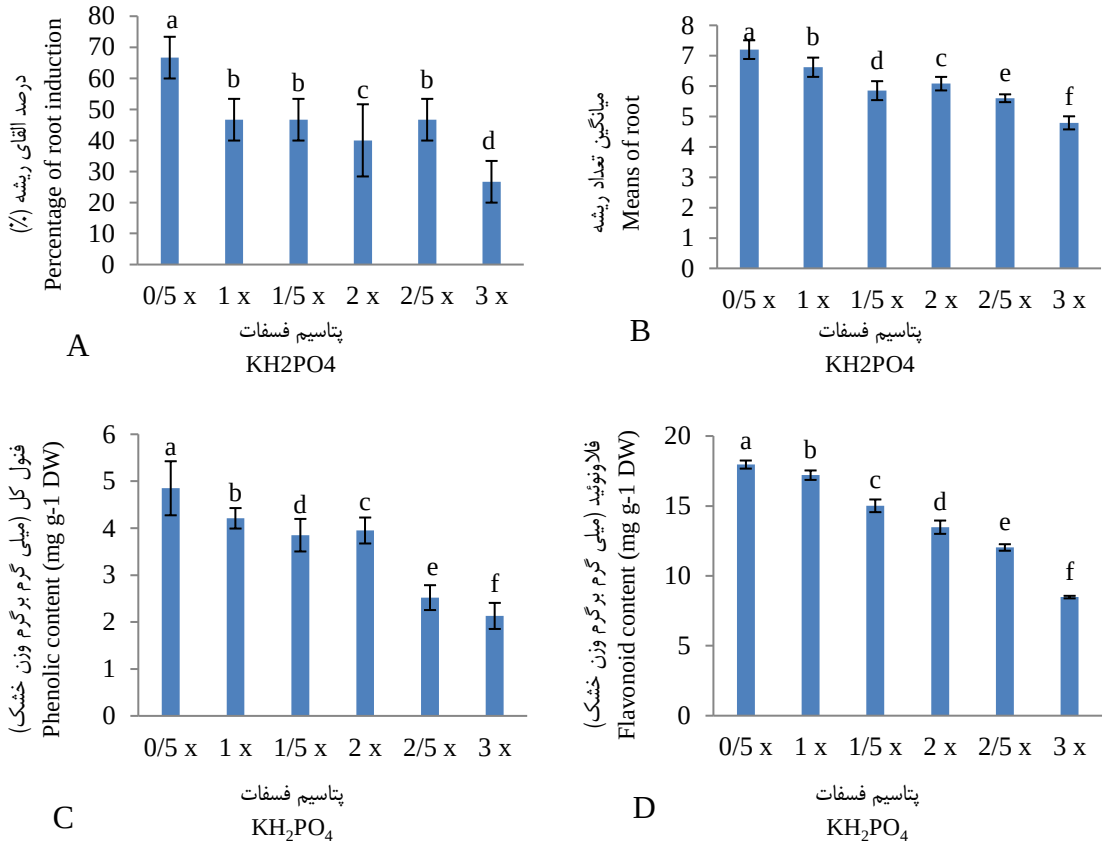
Figure 4. The effects of different concentration of $CaCl_2$ on hairy root characteristics

از طرفی Danhorn et al. (2004) گزارش کردند که حذف فسفات از محیط کشت موجب افزایش توانایی A. rhizogenes در اتصال به گیاه میزبان و انتقال ناحیه‌ی موسوم به T-DNA از باکتری به ژنوم گیاه می‌شود. در مقابل، Kahrizi et al. (2017) نیز در پژوهشی گزارش کردند که سطوح بالای پتاسیم فسفات در محیط کشت موجب افزایش رادیوزید در گیاه استویا گردید. برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای ژن rolB استفاده شد. با توجه به این که طول توالی تکثیرشونده با این آغازگر bp ۷۶۰ می‌باشد، تکثیر قطعه‌ای با این مشخصات درگیاهان تراریخت حضور حداقل یک نسخه از ژن را در آن‌ها تأیید می‌کند. قطعه مورد نظر در باکتری به‌عنوان کنترل مثبت تکثیر شد و ریشه‌ی شاهد به‌عنوان کنترل منفی تکثیری نشان نداد. همچنین پرایمر virD نیز تکثیری نشان نداد که نشانه‌ی عدم وجود آلودگی سطحی A. rhizogenes در سطح ریشه‌ها است (شکل ۷).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

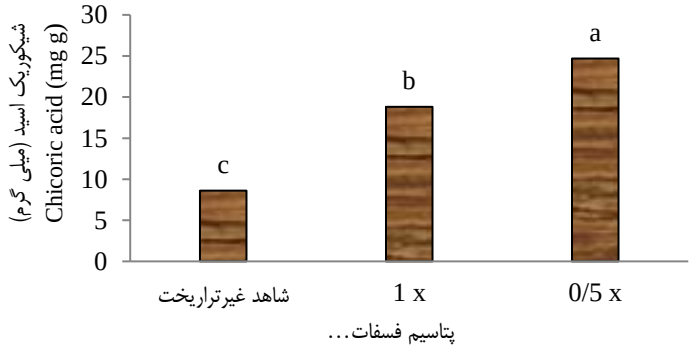
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم فسفات بر صفات ریشه‌های مویین

Figure 5. The effects of different concentration of KH_2PO_4 on hairy root characteristics



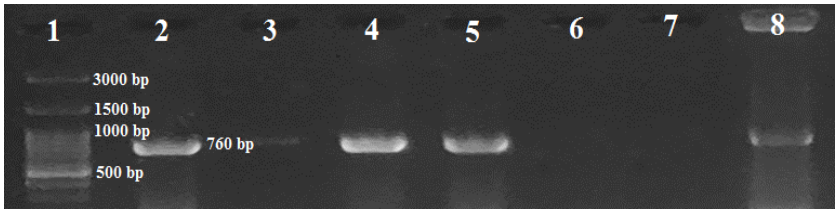
شکل ٦. مقایسه میانگین تأثیر غلظت پتاسیم فسفات بر میزان شیکوریک‌اسید در ریشه‌های مویین

Figure 6. Mean comparison of the effect of KH_2PO_4 concentration on chicoric acid content in hairy roots

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. تکثیر قطعه‌ی DNA به اندازه‌ی ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن rolB بر روی DNA ریشه‌های مویین: 1: نشانگر اندازه‌ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، 2-5: ریشه‌های مویین، 6: ریشه‌های شاهد حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی، 7: پرایمر virD، 8: پلاسمید باکتری A. rhizogenes به‌عنوان شاهد مثبت

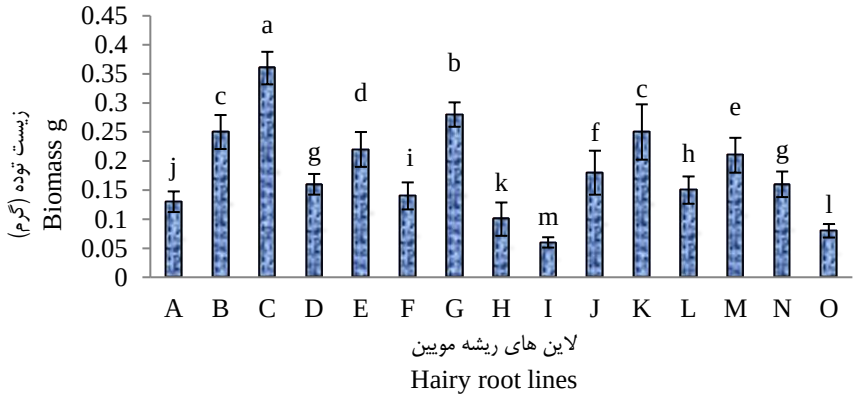
Figure 7. PCR amplified DNA fragments (760 bp) using specific primers for rolB gene of A. rhizogenes on chicory hairy root DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2-5: hairy roots, 6: Adventitious root raised form non-transformed explant as negative control, 7: virD primer, 8: A. rhizogenes plasmid as positive control

ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین: برای این آزمایش از ریشه‌های حاصل از غلظت ۰/۵x پتاسیم فسفات استفاده شد. ریشه‌ها از ریزنمونه‌ها جدا شد و ۱۵ لاین ریشه به طور جداگانه در محیط کشت مایع کشت گردید. لاین‌های مورد نظر نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری را در میزان رشد و افزایش زیست‌توده نشان دادند. این تفاوت به‌علت درج تصادفی باکتری و میزان بیان متفاوت ژن باکتریایی در ریزنمونه‌های مختلف است. بیشترین میزان زیست‌توده در لاین C (۰/۳۶ گرم) بدست آمد و کمترین میزان زیست‌توده در لاین I ریشه‌های مویین (۰/۰۶ گرم) مشاهده گردید (شکل ۸). همچنین بیشترین محتوای فنول کل (۴/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در لاین K مشاهده شد و کمترین میزان فنول کل (۰/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در لاین E به‌دست آمد (شکل ۹). در این پژوهش تنوع زیادی از لحاظ میزان رشد در بین لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین مشاهده شد که احتمالاً به‌علت تنوع در تعداد نسخه‌های T-DNA درج شده در ژنوم گیاه و همچنین میزان بیان ژن انتقال یافته می‌باشد (Bathoju et al 2017). همچنین طبق مشاهدات معلوم شد که همبستگی کاملی بین میزان زیست‌توده و فنول کل وجود ندارد به‌طور مثال لاین C بیشترین میزان افزایش زیست‌توده را داشت اما بیشترین میزان فنول کل به آن متعلق نیست. در پژوهشی میزان متابولیت‌های ثانویه در ۸ لاین مختلف ریشه‌های مویین گیاه گل راعی بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که میزان فلاونوئید در بین لاین‌ها از ۱/۴ در لاین D تا ۴/۷ میلی‌گرم بر گرم در لاین E متغییر بود (Nigutova et al 2016). نتایج پژوهش Hezelyov et al. (2018) نشان داد که تعداد نسخه‌های ژن rolC در لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین از ۱/۰۱ در لاین اول تا ۷/۱۸ نسخه در لاین هفتم متفاوت بود. این تفاوت با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت و نشان از درج

www.SID.ir

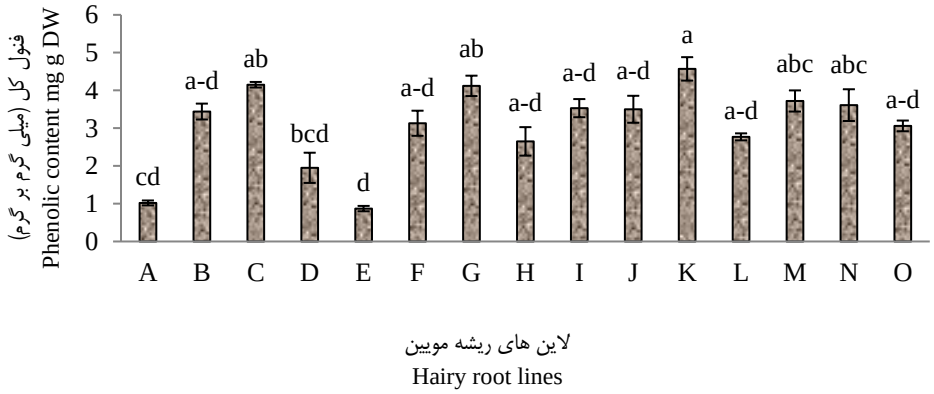
Archive of SID

تصادفی و متفاوت T-DNA باکتری در ژنوم گیاهان است. در آزمایش بررسی تاثیر هورمون NAA و منبع کربن، مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر ریشه‌های مویین (۱/۹۶ و ۱/۷۲ گرم در فلاسک) به ترتیب در ریشه‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد و ۴ درصد ساکارز به‌دست آمد (شکل ۱۰). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تاثیر مثبتی بر روی رشد ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد) دارد. و این امر به علت انشعابات زیاد ریشه‌های مویین و قابلیت جذب بهینه‌ی هورمون‌ها می‌باشد. در پژوهشی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد را بر روی رشد ریشه‌های مویین بررسی کرده و گزارش کردند که NAA بیشترین تاثیر را در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین گیاه Plumbago indica نسبت به جیبرلیک اسید، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) داشته است (Gangopadhyaya et al 2011).



شکل ۸. مقایسه‌ی زیست‌توده در لاین‌های ریشه‌های مویین

Figure 8. Comparison of biomass in hairy root lines

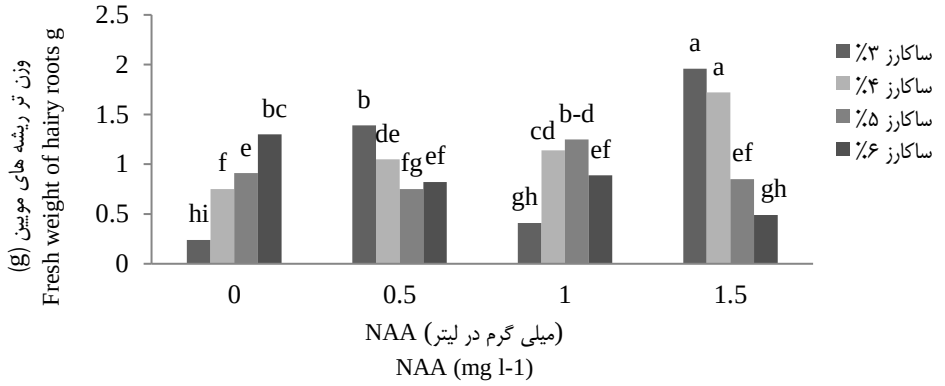


شکل ۹. مقایسه‌ی میزان فنول در لاین‌های ریشه‌های مویین

Figure 9. Comparison of phenolic content in hairy root lines

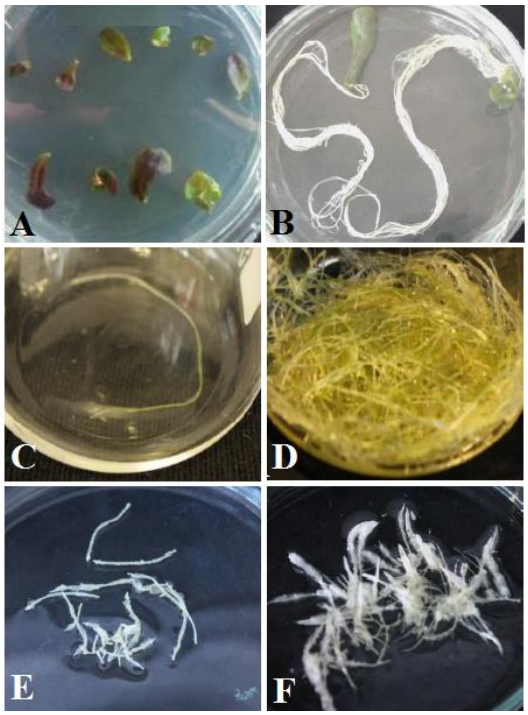
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰. مقایسه‌ی تأثیرNAA و منبع کربن بر میزان زیست‌توده در ریشه‌های مویین

Figure 10. Comparison of the effect of NAA and carbon source on biomass of hairy root



شکل ۱۱. القای ریشه‌های مویین توسط A. rhizogenes: در گیاه کاسنی. A: ریزنمونه‌های غیر تراریخت به‌عنوان شاهد، B: ریزنمونه‌های تراریخته شده توسط A. rhizogenes، C: رشد ریشه‌های شاهد در محیط کشت مایع، D: رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع، E: رشد لاین کم‌رشد ریشه‌های مویین، F: رشد لاین پررشد ریشه‌های مویین

Figure 11. Hairy roots induction by A. rhizogenes in Chicory, A: Non-transformed explants as control, B: The explants Transformed by A. rhizogenes, C: Control root growth in liquid medium D: Hairy root growth in liquid medium, E: The grow of low growing hairy root lines, F: The grow of fast growing hairy root lines

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: نتایج کلی آزمایش‌ها نشان داد که القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه در کاسنی تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت قرار دارد بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین در غلظت ۱x پتاسیم نیترات، ۱/۵x نیترات آمونیوم، ۱x و ۱/۵x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات به‌دست آمد که نشان می‌دهد بیشتر عناصر در غلظت برابر با میزان آن در محیط کشت MS پایه یا ۱/۵ برابر آن بیشترین کارایی را در تراریخته‌سازی گیاه کاسنی دارند به استثنای نمک KH_2PO_4 که غلظت بهینه‌ی آن، ۰/۵ برابر میزان آن در محیط کشت MS پایه و در این تیمار بالاترین درصد القای ریشه‌های مویین و محتوای فنول کل به‌دست آمد. بیشترین میزان فنول کل در هر تیمار، در غلظت ۱x پتاسیم نیترات، ۲x نیترات آمونیوم، ۱/۵x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات به‌دست آمد. غلظت ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۲x نیترات آمونیوم، ۱x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۰/۵x پتاسیم فسفات نیز بالاترین میزان فلاونوئید را داشتند. به‌منظور بررسی تفاوت احتمالی در توان رشدی و تجمع متابولیت‌ثانویه در لاین‌های مختلف ریشه مویین، ۱۵ لاین پر رشد این ریشه‌ها در محیط کشت مایع مورد آزمون قرار گرفتند لاین‌های مختلف، میزان تجمع زیست‌توده و متابولیت متفاوتی نشان دادند و لاین C بیشترین افزایش زیست‌توده (۰/۳۶ گرم) و لاین K بیشترین میزان فنول (۴/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان گفت که سیستم کشت ریشه‌های مویین، به‌واقع رهیافت مفید و کارآمد برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی گیاهان در سطح وسیع و استفاده از آن‌ها در صنایع داروسازی و سلامت می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری گروه علوم باغبانی دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی کمال تشکر را دارند.

منابع

فتحی رقیه؛ محب الدینی مهدی؛ چمنی اسماعیل (۱۳۹۷) بهینه سازی القای ریشه‌های مویین در کاسنی (Cichorium intybus L.) و تأثیر اکسین و منبع کربن بر رشد آن ها. علوم باغبانی ایران (۹۴)۳، ۶۶۷-۶۵۷.

کبیرنتاج سارا؛ ذوالعلی جعفر؛ نعمت زاده قربانعلی؛ شکری احسان (۱۳۹۱) بهینه سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موئین گیاه کاسنی (cichorium intybus) حاصل از تلقیح اگروباکتریوم رایزوژنز. مجله‌ی بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۲، ۶۱-۷۵.

مرادی فاطمه؛ زارع مهرجردی محبوبه؛ وحدتی کوروش؛ حسنلو طاهره (۱۳۹۷) تأثیر عوامل مختلف بر القای ریشه‌های مویین در سیر ایرانی. تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) (۱۴)۱، ۵۴- ۴۳.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Abdoli M, Moieni A, Naghdi Badi H (2013) Influence of KNO3, CaCl2 and MgSO4 concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (Echinacea purpurea L.). J Med Plant Res 12, 75-84.

Ajungla L, Patil P, Barmukh R, Nikam T, (2009) Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of Datura metel L. Indian J Biotechnol 8, 317-322.

Al-Turki S, Shahba MA, Stushnoff C (2010) Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (Phoenix dactylifera L.) fruits as affected by cultivar and location. J Food Agric Environ 8, 253-260.

Aycan M, Beyaz R, Bahadir A, Yildiz M (2019) The effect of magnetic field strength on shoot regeneration and Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in flax (Linum usitatissimum L.). Czech J Genet Plant Breed. 55, 20-27.

Azadi P, Chin DP, Kuroda K et al. (2010) Macro elements in inoculation and co-culture medium strongly affect the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation in Lilium. J Plant Cell Tissue Organ Cult 101, 201-209.

Azarmehr B, Karimi F, Taghizadeh M et al. (2013) Secondary Metabolite Contents and Antioxidant Enzyme Activities of Cichorium intybus Hairy Roots in Response to Zinc. J medicinal plants by- products 2, 131-138.

Balvanyos I, Szoke E, Kursinszki L (2003) Effect of macroelements on the growth and lobeline production of Lobelia inflata L. hairy root cultures. Acta Hortic 597, 245-251

Bathoju G, Rao K, Giri A (2017) Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of Chlorophytum borivilianum (Safed musli). Plant Cell Tissue Organ Cult 131, 369-376.

Chen L, Liu QQ, Gai JY et al. (2011) Effects of nitrogen forms on the growth and polyamine contents in developing seeds of vegetable soybeanJ Plant Nutr 34, 504-521.

Conforti F, Sosa S, Marrelli M et al. (2009) The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. Food Chem 112, 587–594.

www.SID.ir

Danhorn T, Hentzer M, Givskov M et al. (2004) Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen Agrobacterium tumefaciens through the PhoR–PhoB regulatory system. J. Bacteriol 186, 4492-4501.

Degl innoocenti E, Pardossi A, Tattini M Guidi L (2008) Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. J Food Biochem 32, 642–653.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11-15.

Dupre P, Lacoux Y, Neutelings G et al. (2000) Genetic transformation of Ginkgo biloba by Agrobacterium tumefaciens. Physiol Plant 108, 413–419.

Elkin YN, Kulesh NI, Stepanova AY et al. (2018) Methylated flavones of the hairy root culture Scutellaria baicalensis. J plant physiol 231, 277-280.

Fan Y, Wang Y, Tan R, Zhang Z (1998) Seasonal and sexual variety of Ginkgo flavonol glycosides in the leaves of Ginkgo biloba L. J Tradit. Chin. Med 23, 267-269.

Fathi R, Mohebodini M, Chamani E (2019) High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation in Cichorium intybus L. via removing macronutrients. Ind Crops Prod 128, 572-580.

Fathi R, Mohebodini M, Chamani E (2019) High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation in Cichorium intybus L. via removing macronutrients. Ind Crops Prod 128, 572-580.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50, 151-158

Gangopadhyaya M, Dewanjeeb S, Chakrabortyc D, Bhattacharyaa S (2011) Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in Plumbago indica hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. Ind Crops Prod 33, 445-450.

Hank H, Laszlo I, Balvanyos I, et al. (2003) Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. Acta Hortic 597, 271-274.

Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A (2009) Polyphenol content and antiradical activity of Cichorium intybus L. from biodynamic and conventional farming. Food Chem 114, 765–770.

www.SID.ir

Archive of SID

Henzelyova J, Cellarova E (2018) Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived Hypericum tomentosum regenerants. Acta Physiol Plant 40, 82.

Kahrizi D, Ghari S, Ghaheri M et al. (2017) Effect of KH_2PO_4 on gene expression, morphological and biochemical characteristics of Stevia rebaudiana Bertoni under in vitro conditions. Mol Cell Biol 63, 107-111.

Kumar V, Sharma A, Narasimha Prasad BC et al. (2006) Agrobacterium rhizogenes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electron J Biotechnol 9, 349-357.

Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18, 100-127.

Montoro P, Teinseree N, Rattana W et al. (2000) Effect of exogenous calcium on Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in Hevea brasiliensis (rubber tree) friable calli. Plant Cell Rep 19, 851–855.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473-476.

Nigutova K, Kusari S, Sezgin S et al. (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, 46-57.

Palmer AG, Gao R, Maresh J et al. (2004) Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. J. Annu Rev Phytopathol 42, 439-464.

Pereira MMA, Martins AD, Morais LC et al. (2019) The Potential of Agro-homeopathy Applied to Medicinal Plants-A Review. J Agric Sci 11, 215-227.

Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of Brugmansia candida. Enzyme Microb Technol 26, 252-258.

Saeed M, Abdel-Hack ME, Alagawany M et al. (2017) Chicory (cichorium intybus) herb: Chemical composition, pharmacology, nutritional and healthical applications. Int J Pharmacol 13, 351-360.

www.SID.ir

Shanjani PS (2003) Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of Juniperus excelsa. Int J Agric Biol 5, 419-422.

Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, Sharafi AA (2014) Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant Dracocephalum kotschyi. Physiol Mol Biol Plants 20, 257-262.

Shehata, WF, Aldaej MI, Alturki SM, Ghazzawy HS (2014) Effect of ammonium nitrate on antioxidants production of date palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro. Biotechnol 13, 116-125.

Shirin F, Parihar NS, Shah SN (2015) Effect of nutrient media and KNO_3 on in vitro plant regeneration in Saraca asoca (Roxb.) Willd. American J Plant Sci 6, 3282.

Siddiqui ZH, Mujib A (2012) Accumulation of vincristine in calcium chloride elicitated Catharanthus roseus cultures. J Nat Prod 2, 307-315.

Singh RS, Chattopadhyay T, Thakur D et al. (2018) Hairy Root Culture for In Vitro Production of Secondary Metabolites: A Promising Biotechnological Approach. In Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants 110, 235-250.

Sonald SF, Laima SK (2019) Phenolics and cold tolerance of Brassica napus. Plant Agric 2001; 1:1-5.

Tabone T, Felker P, Bingham R et al. (1986) Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree Prosopis alba clone B2V50.For Ecol Manag 16, 191-200.

Tripathi MK, Mishra N, Tiwari S et al. (2019) Plant Tissue Culture Technology: Sustainable Option for Mining High Value Pharmaceutical Compounds. International Int J Curr Microbiol Appl Sci 8, 1002-1010.

Young-Am C, Yu HS, Song JS et al (2000) Indigo production in hairy root cultures of Polygonum tinctorium Lour. Biotechnol Lett 22, 1527-1530.

Zhong JJ, Wang SJ (1998) Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of Panax quinquefolium. Process Biochem 33, 671-675.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir