نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.124473.2455
جلد ۳۶، شماره ۱، صفحه ۳۹-۲۲ (۱۳۹۹) | شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.36.22.99.1.1576.41

بهینه‌سازی القاء سریع و کارایی ریشه موئین در دو گونه بذرالبنج (*Hyoscyamus reticulatus* L. و *Hyoscyamus pusillus* L.)

راحله قدسی[۱]، بهمن حسینی[۲*] و احد هدایتی[۳]

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

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷ | تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۸ | تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

بذرالبنج ازجمله *Hyoscyamus reticulatus* L. و *H. pusillus* L.، منبع غنی از تروپان آلکالوئیدها به‌ویژه هیوسیامین و آسکوپولامین (هیوسین) هستند که به‌دلیل ویژگی‌های گشادکننده مردمک چشم، ضد اسپاسم، آنتی‌کولینرژیک، ضد درد و آرام‌بخشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، در آزمایش اول تأثیر چهار نوع سویه باکتری آگروباکتریوم (A4، A7، A13 و ATCC 15834) و سه نوع ریزنمونه (برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون) بر میزان القای ریشه موئین در این دو گونه بذرالبنج بررسی گردید. در آزمایش دوم، تأثیر محیط کشت‌های پایه مختلف (MS، 1/2 MS، 1/4 MS و B5) بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی ریشه‌های موئین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گونه *H. reticulatus* L.، بیشترین میزان القای ریشه موئین (۷۸٪) در ریزنمونه کوتیلدون تلقیح شده با سویه A7 و حداکثر وزن تر (۶/۲۵ گرم) و خشک (۰/۵ گرم) در محیط کشت پایه MS بدست آمد. با توجه به نتایج، حداکثر فنول کل (۳/۸۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده تر) و فلاونوئید کل (۷ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده تر) در محیط کشت پایه MS مشاهده شد. تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین در محیط کشت‌های مختلف مشاهده نشد. در مورد گونه *H. pusillus* L.، ریزنمونه برگ تلقیح یافته با سویه A13 آگروباکتریوم بیشترین میزان القای ریشه موئین (۹۰٪) را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن تر (۵/۲۵ گرم) و خشک (۰/۴۳ گرم) در محیط کشت MS و بیشترین میزان فنول کل (۲/۲۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده تر) و فلاونوئید کل (۹/۲۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده تر) در محیط کشت پایه B5 مشاهده گردید. این مطالعه نشان داد که ترکیب‌های محیط کشت و نوع گونه گیاهی تأثیر قابل توجهی بر زیست‌توده و ویژگی‌های فیتوشیمیایی ریشه‌های موئین در این گونه‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، محیط کشت پایه، فنول و فلاونوئید کل، ریشه موئین.

مقدمه

جنس بذرالبنج یا بنگ دانه (*Hyoscyamus*) متعلق به تیره Solanaceae می‌باشد که ۹ گونه آن منحصراً در ایران و ۱۸ گونه در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارد. گونه *H. reticulates* L. گیاهی علفی و یک‌ساله یا دوساله است. این گیاه بومی مناطق خشک و نیمه‌خشک مصر، جنوب‌غرب آسیا، ایران و ترکیه است (Davis, 1987). تمام بخش‌های این گیاه حاوی متابولیت ثانوی آلکالوئید بوده که کمّیت و کیفیت آن در اندام‌های مختلف متفاوت است. مقدار آلکالوئید در اندام‌های مختلف گونه *H. reticulates* شامل ریشه از ۰/۰۸ تا ۰/۱۵ درصد، برگ‌ها از ۰/۰۶ تا ۰/۱۷ درصد، ساقه ۰/۰۲ و بذرها ۰/۰۶ تا ۰/۱ درصد متغیر می‌باشد. مهمترین آلکالوئیدهای این گیاه را هیوسیامین و آسکوپولامین (هیوسین) تشکیل می‌دهند. گونه *H. pusillus* L. یکی دیگر از گونه‌های این جنس و گیاهی یک‌ساله و خاص تپه‌های شنی، مزارع و مناطق بایر است (Mozaffarian, 1996). یکی از تفاوت‌های آشکار این گونه با سایر گونه‌ها، بالا بودن میزان آسکوپولامین نسبت به هیوسیامین در سه اندام ریشه، ساقه و برگ می‌باشد. میزان آسکوپولامین به‌عنوان آلکالوئید اصلی این گیاه در اندام‌های مختلف متفاوت بوده و در ریشه ۰/۰۸۷٪، ساقه ۰/۰۵۷٪ و برگ ۰/۰۹۰٪ گزارش شده است (Bahmanzadegan *et al*., 2009). با توجه به اینکه تقاضای تجاری برای آسکوپولامین نسبت به هیوسیامین به‌دلیل ارزش دارویی ۱۰ برابر بیشتر است (Madani *et al*., 2015)، این گونه می‌تواند منبع مناسبی برای آسکوپولامین باشد. با توجه به اینکه سنتز شیمیایی این ترکیب‌ها پیچیده و میزان تولید آنها به‌صورت طبیعی کم بوده و استخراج آنها هزینه‌های زیادی دربردارد، توانایی باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) در القاء ریشه موئین در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های موئین به‌عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی شده است (Flores *et al*., 2006). کارایی تراریختی توسط باکتری آگروباکتریوم تحت تأثیر نوع ژنوتیپ، نوع و سن ریزنمونه، سویه باکتری و سیگنال‌های مولکولی می‌باشد. سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز توانایی‌های متفاوتی در میزان تراریختی دارند (Tao & Li, 2006). در تحقیقی Noori و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر میزان فنول ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) را بررسی کرده و نتایج نشان داد که ریشه‌های حاصل از تلقیح با سویه A4 بیشترین میزان فنول را داشتند. همچنین در استفاده از *A. rhizogenes* به‌منظور انتقال ژن به گیاهان، باید عوامل مختلفی ازجمله شرایط کشت بهینه‌سازی شوند (Kabirnetaj *et al*., 2012). بهینه‌سازی ترکیب‌های محیط کشت ریشه‌های موئین برای افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی ضروریست (Sharafi *et al*., 2013). به نظر می‌رسد تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت پایه، تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد ریشه‌های موئین دارد و غلظت و نوع مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت در میزان رشد یک لاین ریشه موئین تأثیر قابل توجهی دارد. بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت به‌منظور رشد مطلوب و افزایش تجمع متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین بسیار حائز اهمیت است (Shinde *et al*., 2009؛ Condori *et al*., 2010). افزایش غلظت آمونیوم در محیط کشت ریشه‌های موئین شابیزک (*Atropa belladonn*) باعث کاهش رشد گردید، در حالی‌که افزایش غلظت نیترات منجر به افزایش بیوسنتز آلکالوئید و تجمع آن شده و بیشترین مقدار زیست‌توده و عملکرد آلکالوئیدها با کاهش هر دو سطح منبع نیتراتی بدست آمد (Bensaddek *et al*., 2001). براساس نتایج بدست آمده در ریشه‌های موئین جینسینگ (Ginseng) مشخص گردید که عناصر معدنی، عامل تنظیم‌کننده مهمی بر میزان زیست‌توده می‌باشد. در *Withania somnifera* بیشترین میزان رشد ریشه‌ها در محیط 1/2MS گزارش شده‌است (Saravanakumar *et al*., 2012). ترکیب‌های محیط کشت گاهی اوقات می‌تواند علاوه‌بر تغییر میزان رشد ریشه‌های موئین، تولید متابولیت‌های ثانوی و آنتی‌اکسیدان‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Singh, 2007). غلظت بالای یکی از اجزای محیط کشت می‌تواند شرایط تنشی ایجاد کرده و باعث تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر گردد، در نتیجه

سلول برای مقابله با این موضوع تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را افزایش می‌دهد (Wu, 2007). با توجه به اهمیت دو جنس *H. pusillus* و *H. reticulatus* به‌دلیل داشتن آلکالوئیدهای با ارزش، یافتن راهی برای تولید ارزان و سریع آنها از طریق ریشه‌های موئین ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور، در این تحقیق اثر سویه‌های مختلف باکتری و ریزنمونه‌های مختلف بر درصد القای ریشه موئین و همچنین تأثیر بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین از طریق انتخاب بهترین نوع محیط کشت پایه (از نظر تولید زیست‌توده و ویژگی‌های فیتوشیمیایی ازجمله میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) در دو گونه از گیاه بذرالبنج به‌عنوان اولین گام مؤثر در کشت ریشه‌های موئین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

کشت بذرها و تهیه ریزنمونه‌ها

بذر مورد نیاز دو گونه بذرالبنج از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و در زیر هود لامینار توسط الکل اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردیده و پس از آن ۳ بار با آب‌مقطر به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه شستشو داده شد. بذرها برای جوانه‌زنی و تهیه ریزنمونه در محیط کشت‌های MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

بررسی تأثیر نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر القای ریشه موئین

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در هر دو گونه انجام شد که فاکتور اول نوع سویه باکتری در چهار سطح (سویه‌های A4، A7، A13 و ATCC 15834) و فاکتور دوم نوع ریزنمونه در سه سطح (کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ) در سه تکرار بود. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش دو هفته‌ای بودند. تمام سویه‌ها از بانک میکروبی مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (تهران–ایران) تهیه گردید. تک کلون هر سویه در محیط کشت LB مایع (Bertani, 1951) به مدت ۴۸ ساعت و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. غلظت بهینه باکتری (OD_{600}) برای تلقیح به میزان ۰/۵ تا ۰/۶ تعیین گردید. تمامی ریزنمونه‌ها به روش غوطه‌وری توسط سویه باکتری تیمار شدند. بدین‌منظور ریزنمونه‌ها پس از ایجاد زخم سطحی توسط اسکالپل استریل در محل دمبرگ و پشت برگ، به مدت ۱۰ دقیقه توسط سوسپانسیون باکتری تلقیح و برای هم‌کشتی در محیط کشت پایه MS فاقد هورمون به مدت ۴۸ ساعت و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت هم‌کشتی، ریزنمونه برای حذف باکتری به محیط کشت پایه MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شد (Nourozi *et al*., 2019). پس از ظهور ریشه‌های موئین، درصد ریشه‌زایی ثبت و بهترین سویه و نوع ریزنمونه برای هر گونه مشخص گردید.

تأثیر محیط کشت‌های پایه مختلف بر رشد ریشه‌های موئین

پس از تعیین بهترین نوع سویه و ریزنمونه، برای بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه‌های موئین، اثر ۴ نوع محیط کشت مایع مختلف (MS، 1/2MS، 1/4 MS و B5) بر تولید زیست‌توده ریشه‌های موئین و ویژگی‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. به این دلیل یک گرم از ریشه‌های تازه به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از هر یک از محیط‌های کشت منتقل و کشت‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای رشد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت، ریشه‌های موئین برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک و آنالیزهای فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره‌گیری متانولی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل

۰/۱ گرم از ریشه‌های موئین فریز شده، در هاون و توسط ازت مایع آسیاب شده و به داخل لوله آزمایش منتقل گردید. ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به هر لوله اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اولتراسونیک (مدل E120H ساخت کشور آلمان) گردید و در نهایت عصاره حاصل شده از کاغذ صافی عبور داده شده و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Fattahi, 2012).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها، ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (۶×۱۰^{-۵} mol/lit) اضافه و میزان جذب پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید. برای تهیه شاهد (بلنک) آنتی‌اکسیدان نیز به روش بالا عمل و فقط به جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰٪ اضافه شد (Chiou *et al*., 2007).

$$(AC-AS/AC)\times100$$

AC: میزان جذب بلنک؛ AS: میزان جذب نمونه

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

مقدار مشخصی از هر عصاره با ۳ میلی‌لیتر از معرف تازه FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/۶، فریک- تری پریدیل- اس-تریازین ۲ و فریک کلرید) با هم مخلوط شدند. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها براساس mmol Fe^{+2}/g FW بیان شد (Žugić *et al*., 2014).

اندازه‌گیری فنول کل

به‌منظور اندازه‌گیری فنول کل ابتدا به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰٪ اضافه و پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰٪ افزوده شد و در نهایت ۱/۵ تا ۲ ساعت در شرایط تاریکی نگهداری گردید تا رنگ نمونه‌ها به بنفش تغییر کند و بعد میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. در نهایت مقدار جذب (Y) در رابطه حاصل از کالیبراسیون جایگذاری شده و مقدار فنول کل (X) بر حسب (mg Gal/g FW) بدست آمد. از گالیک اسید (Gallic acid) به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (Slinkard & Singleton, 1977).

$$Y=0.0007X+0.0145$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ اضافه و پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار نیز اضافه گردیده و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت شد. مقدار جذب (Y) در رابطه زیر جاگذاری شده تا مقدار فلاونوئید کل (X) بر حسب (mg Que/g DW) بدست آید. از کوئرسیتین (Quercetin) به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (Shin *et al*., 2007).

$$Y= 0.0094\ X+0.8712$$

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین فریز شده هر یک از گونه‌ها توزین شده و به‌میزان ۵ برابر وزن آن بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ بر حسب میلی‌لیتر اضافه و بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه خرد شد تا یک عصاره کاملاً همگن بدست آمد. عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل VS-15000CFNH ساخت کشور کره جنوبی) سانتریفیوژ شد. محلول رویی از رسوب با دقت جدا شده و به ویال‌های تمیز منتقل و با سرعت ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در پایان، ویال‌ها به آرامی از دستگاه سانتریفیوژ خارج شده و محلول رویی در چند ویال کوچک توزیع گردید. عصاره حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar *et al*., 2001).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهیه شد. سپس به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از آن بافر و ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳٪ برای هر نمونه برداشته شد. این مواد با هم مخلوط شده و بعد ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۱ دقیقه بررسی شد. محتوای فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای گرم وزن تر (U g^{-1} FW) محاسبه گردید (Aebi, 1974).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به‌عنوان سوبسترا و براساس روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲/۷۷ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴٪ بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر ($\Delta OD\ min^{-1}g^{-1}$ FW) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

پس از آماده‌سازی عصاره‌های آنزیمی، برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳٪، ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حمام یخ با یکدیگر مخلوط گردید. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوای فعالیت آنزیم برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر (U g^{-1} FW) محاسبه گردید (Nakano & Asada, 1981).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به‌منظور تأیید حضور ژن *rol*B، DNA ژنومی نمونه‌های ریشه‌های موئین به روش CTAB (Cetyl Trrimethyl Ammonium Bromide) استخراج گردید (Kamalizadeh *et al*., 2014). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور تأیید حضور ژن *rol* B آگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* B انجام شد (آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار

oligo طراحی شد). شرایط دمایی مورد استفاده برای ژن *rol*B شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه به مدت ۸۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

F: 5′-TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA-3′

R: 5′-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3′

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های حاصل از آزمایش‌ها در نرم‌افزار SAS 9.2 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 رسم گردید.

شکل ۱- مراحل مختلف رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی *H. reticulatus* (A) و *H. pusillus* (B)

الف) ظهور ریشه‌های موئین از ریزنمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم، ب) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد و ج) کشت ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع

نتایج

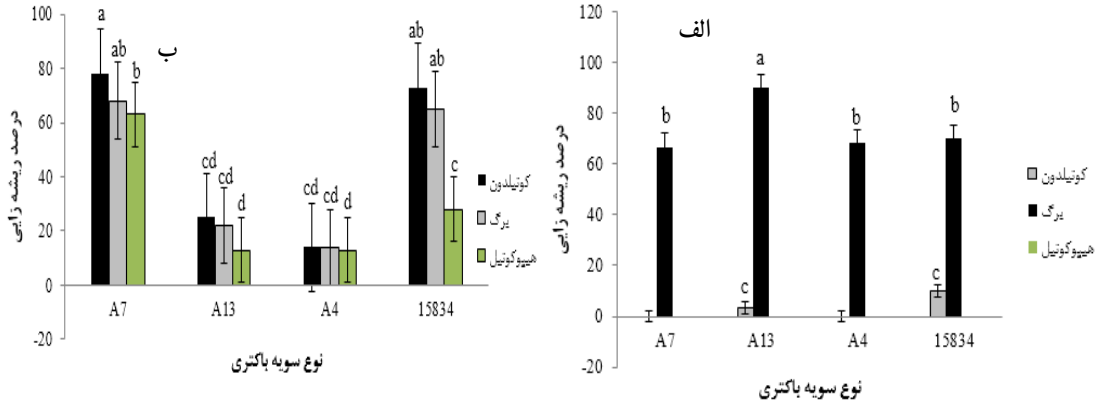
تأثیر نوع سویه و ریزنمونه بر درصد القای ریشه موئین

در گونه *H. reticulates*، ۱۵ روز و در گونه *H. pusillus*، ۱۰ روز بعد از تلقیح ریشه‌های موئین از محل زخم بر روی ریزنمونه‌ها ظاهر شدند (شکل ۱). نتایج آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر درصد القاء ریشه‌های موئین در هر دو گونه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرهای نوع سویه و نوع ریزنمونه بر درصد ریشه‌زایی گونه *H. pusillus* نشان داد که بالاترین درصد ریشه‌زایی (۹۰٪) در سویه A13 و ریزنمونه برگ حاصل گردید. در ریزنمونه کوتیلدونی تلقیح شده با سویه A7 و A4 هیچگونه القاء ریشه‌ای مشاهده نگردید و تنها سویه‌های A13 و 15834 درصد پایینی را از القای ریشه موئین (به‌ترتیب ۳/۳۳٪ و ۱۰٪) تولید کردند. در ریزنمونه هیپوکوتیل هیچ‌یک از سویه‌های باکتری قادر به ایجاد ریشه موئین نشدند، در حالی‌که ریزنمونه برگ با تولید درصد بالایی از ریشه موئین توسط همه سویه‌ها بهترین ریزنمونه تعیین گردید (شکل۲– الف). در گونه *H. reticulates* سویه A7 و ریزنمونه کوتیلدونی بیشترین و سویه A13 در ریزنمونه هیپوکوتیل کمترین درصد ریشه‌زایی را نشان داد (شکل۲– ب).

جدول ۱– جدول تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه بر درصد القاء ریشه‌های موئین در دو گونه بذرالبنج (*H. reticulatus* و *H. pusillus*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد ریشه‌زایی	
		H. pusillus	*H. reticulatus*
ریزنمونه (a)	۲	۲۱۰۶۴**	۹۷۷/۵۲**
سویه باکتری (b)	۳	۱۴۸/۷۴**	۶۳۷۱/۰۶۵**
اثر متقابل (a×b)	۶	۱۱۸/۵۱**	۳۱۰/۳۴**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۶/۸۸	۵۳/۵۰
ضریب تغییرات (CV%)		۱۰/۳۳	۱۸/۰۴

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.



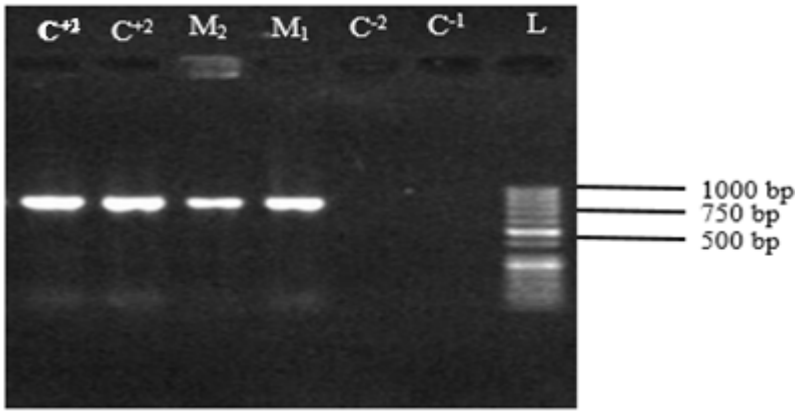
شکل ۲– تأثیر اثرهای متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر درصد القای ریشه موئین در گیاه بذرالبنج

الف: گونه *H. pusillus* و ب: گونه *H. reticulatus*

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است.

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه 780 bp مربوط به ژن *rol* B را در ریشه‌های حاصل در ریزنمونه‌های مختلف توسط سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد (شکل ۳). اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (آگروباکتریوم مورد استفاده در تلقیح) مشابه باندهای تکثیری در ریشه‌های تراریخت بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (به‌عنوان کنترل منفی) هیچ باندی مشاهده نگردید. اگرچه مورفولوژی رشد پلاژیوتروپیک سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت فاقد هورمون، معرف ریشه‌های موئین مورد مطالعه بود، با این حال بررسی ماهیت تراریخته آنها توسط تکنیک PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol* B با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی به شکل جداگانه انجام شد. ظهور ریشه‌های موئین ناشی از آگروباکتریوم رایزوژنز، حاصل انتقال بخشی از ژن‌های موجود بر روی T-DNA پلاسمید Ri این باکتری به سلول گیاهی می‌باشد. بنابراین بررسی ماهیت تراریخته ریشه‌های موئین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر روی T-DNA این باکتری که مهمترین آنها ژن *rol* C، *rol* A و *rol* B است، انجام داد (Królicka *et al*., 2001).



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تأیید حضور ژن *rol* B در ریشه‌های تراریخت

L: DNA مارکر 1kb (Fermentase)، C^{+1}: باکتری اگروباکتریوم سویه A7 به‌عنوان کنترل مثبت برای گونه *H. reticulates* ، C^{+2}: باکتری اگروباکتریوم سویه A13: به‌عنوان کنترل مثبت برای گونه H. pusillus ، C^{-1}: ریشه‌های غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی اول، C^{-2}: واکنش PCR بدون الگوی DNA به‌عنوان کنترل منفی دوم، M_1: ریشه‌های موئین القاء شده در ریزنمونه‌های کوتیلدونی گونه *H. reticulates* و M_2: ریشه‌های موئین القاء شده در ریزنمونه‌های برگی گونه *H. pusillus*

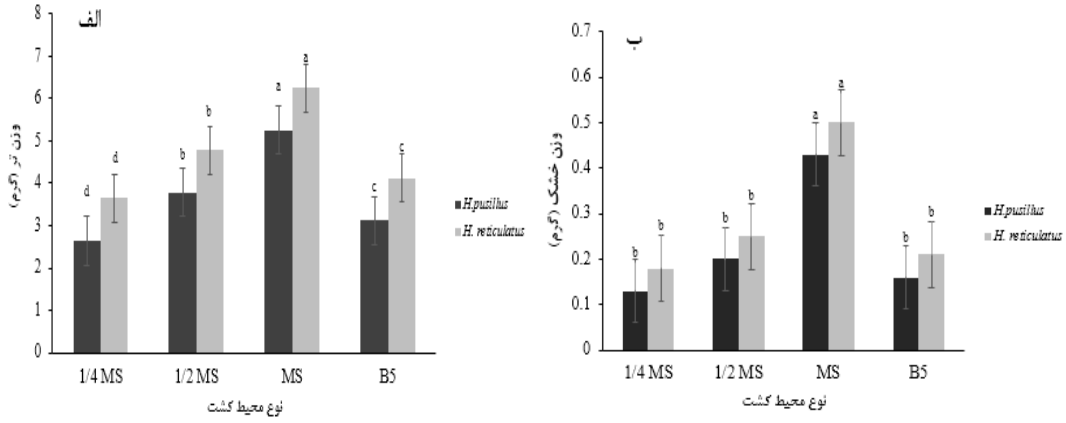
تأثیر نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت‌های پایه مختلف بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین گیاه *H. pusillus* و *H. reticulates* (جدول ۲) نشان داد که وزن تر و خشک ریشه‌های موئین در هر دو گونه به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر نوع محیط کشت پایه می‌باشد ($P<0.05$). در گونه *H. pusillus* بیشترین میزان وزن تر (۵/۲۵ گرم) و خشک (۰/۴۳ گرم) در محیط کشت پایه MS و کمترین میزان وزن تر (۲/۶۴ گرم) و خشک (۰/۱۳ گرم) در محیط کشت پایه 1/4MS ثبت گردید. در گونه *H. reticulates* نیز به‌ترتیب محیط کشت پایه MS باعث تولید بیشترین وزن تر (۶/۲۵ گرم) و خشک (۰/۵ گرم) و محیط کشت 1/4 MS باعث تولید کمترین وزن تر (۳/۶۴ گرم) و خشک (۰/۱۸ گرم) شد (شکل ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر میزان وزن تر و وزن خشک ریشه‌های موئین در دو گونه ***H. reticulatus*** و ***H. pusillus***

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک
		H. pusillus		*H. reticulatus*	
نوع محیط کشت	۳	۳/۸۷**	۰/۰۵۷**	۳/۸۶**	۰/۰۶۴**
اشتباه آزمایشی	۸	۰/۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۱۷	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات (CV%)		۴/۸۹	۱۹/۸۹	۲/۷۹	۱۹/۹۲

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.



شکل ۴- تأثیر نوع محیط کشت بر میزان وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) در دو گونه ***H. pusillus*** و ***H. reticulates***

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است.

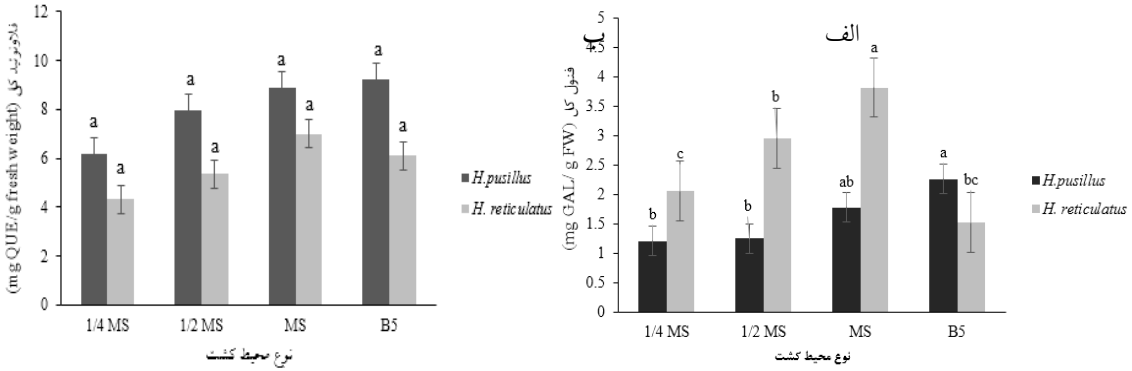
تأثیر نوع محیط کشت بر میزان فنول و فلاونوئید کل ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر میزان فنول و فلاونوئید کل نشان داد که در گونه *H. pusillus* نوع محیط کشت پایه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر میزان فنول کل ریشه‌های موئین داشت، در حالی‌که نوع محیط کشت در گونه *H. reticulates* در سطح ۱٪ بر میزان فنول تأثیر معنی‌داری نشان داد (جدول ۳). در گونه *H. pusillus* بیشترین فنول کل به میزان ۲/۲۶ mg GAE g^{-1} FW مربوط به محیط کشت پایه B5 و کمترین آن به میزان ۱/۲۱ mg GAE g^{-1} FW مربوط به محیط کشت پایه 1/4 MS بود. این مقدار در گونه *H. reticulates*، به‌ترتیب ۱/۶۹ و ۱/۵۲ برابر نسبت به گونه *H. pusillus* افزایش نشان داد. بیشترین میزان فنول کل در ریشه‌های موئین گونه *H. reticulates* در محیط کشت پایه MS و کمترین میزان آن در محیط کشت پایه B5 مشاهده گردید. در مقابل، اثر نوع محیط کشت پایه بر میزان فلاونوئید کل در هر دو گونه معنی‌دار نبود. حداکثر فلاونوئید کل (mg QE g^{-1} ۹/۲۲FW) در گونه *H. pusillus* در ریشه‌های موئین کشت شده در محیط B5 مشاهده گردید و حداقل فلاونوئید کل (mg FW^{-1} ۶/۱۶QE g^{-1}) در محیط کشت پایه 1/4 MS ثبت شد. در گونه *H. reticulates*، بالاترین سطح فلاونوئید کل (mg QE FW^{-1} ۷g) در محیط کشت پایه MS و کمترین سطح فلاونوئید کل (۴/۳۲mg QE g^{-1} FW) در محیط کشت پایه 1/4 MS بدست آمد، هرچند که مقایسات میانگین اختلاف آماری معنی‌داری را بین محیط کشت‌های مختلف در هر دو گونه نشان نداد (شکل ۵). تفاوت در فنول و فلاونوئید کل در گونه‌های مختلف احتمالاً ناشی از تفاوت در مکان جایگیری T-DNA در ژنوم سلول تراریخت منشأ هریک از گونه‌ها می‌باشد.

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP ریشه‌های موئین در دو گونه *H. reticulatus* و *H. pusillus*

		میانگین مربعات						
		H. pusillus			*H. reticulatus*			
منابع تغییرات	درجه آزادی	فنول	فلاونوئید	آنتی‌اکسیدانت (DPPH)	آنتی‌اکسیدانت (FRAP)	فنول	فلاونوئید	آنتی‌اکسیدانت (DPPH)	آنتی‌اکسیدانت (FRAP)
نوع محیط کشت	۳	۰/۷۴*	۵/۶۴ns	۳۰/۵۹**	۶/۷۸**	۳/۰۷**	۳/۸۸ns	۸/۶۷ns	۱۴/۲۵**
اشتباه آزمایشی	۸	۰/۱۷	۳/۷۲	۱/۹۰	۰/۵۷	۰/۱۱	۳/۷۳	۲/۱۷	۱/۰۴
ضریب تغییرات (CV%)		۲۵/۷۳	۲۳/۹۶	۸/۹۵	۱۷/۰۲	۱۳/۱۲	۳۳/۹۵	۱۴/۴۵	۱۳/۰۴

**، * و ns: به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد.

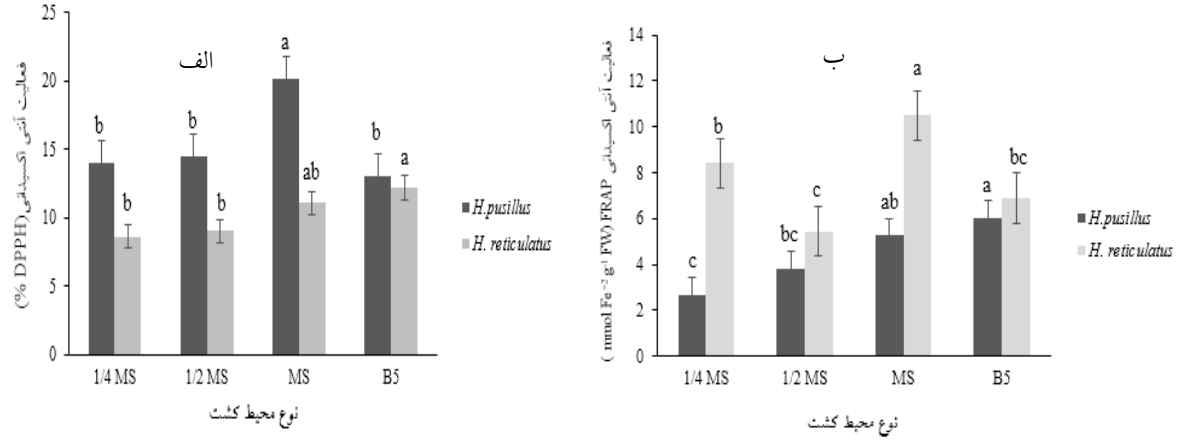


شکل ۵- تأثیر نوع محیط کشت پایه بر میزان فنول کل (الف) و فلاونوئید کل (ب) در ریشه‌های موئین حاصل از دو گونه *H. reticulatus* و *H. pusillus*

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است.

تأثیر نوع محیط کشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و FRAP) ریشه‌های موئین

در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله دو روش مختلف DPPH و FRAP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس هر دو روش نشان داد که اثر نوع محیط کشت پایه در *H. pusillus* در هر دو روش مورد مطالعه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید، در حالی‌که در *H. reticulates* فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH معنی‌دار نبود و در روش FRAP در سطح احتمال ۱٪ اثرهای معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳). در نتایج حاصل از مقایسات میانگین مشخص گردید که فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد در ریشه‌های موئین وابسته به نوع محیط کشت می‌باشد. به‌طوری که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۲۰/۱۲٪) در *H. pusillus* به روش DPPH در محیط کشت پایه MS و به‌روش FRAP در محیط کشت پایه B5 (۶/۰۵ mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) حاصل گردید. در حالی‌که در *H. reticulates* بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۲/۱۸٪) به روش DPPH در محیط کشت B5 و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۰/۵ mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) به روش FRAP در محیط کشت پایه MS مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- تأثیر نوع محیط کشت پایه بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (الف) و FRAP (ب) در ریشه‌های موئین حاصل از دو گونه بذرالبنج (*H. pusillus* و *H. reticulates*)

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است.

تأثیر نوع محیط کشت پایه بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین

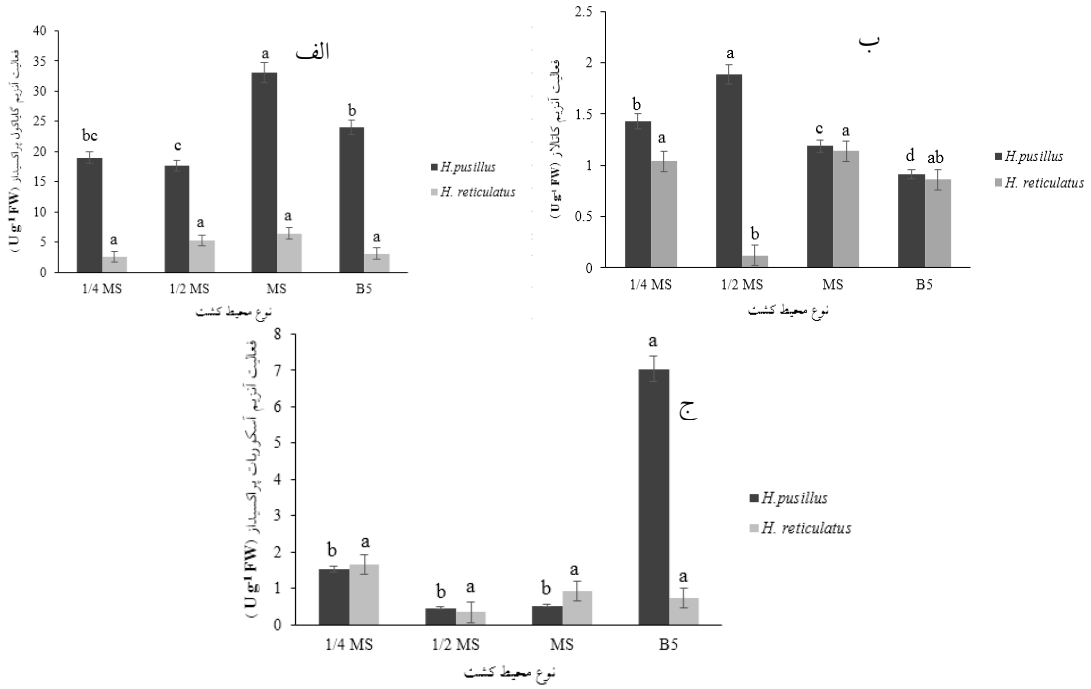
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در گونه *H. pusillus* نوع محیط کشت پایه، در سطح احتمال ۵٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز داشت و در مقابل اثر نوع محیط کشت پایه بر میزان فعالیت هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. reticulates* معنی‌دار نگردید (جدول ۴). مطابق نتایج حاصل از مقایسه میانگین در گونه *H. pusillus*، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۱/۸۹U g^{-1} FW)، گایاکول پراکسیداز (۳۳/۱۳ΔOD g^{-1} FW min^{-1}) و آسکوربات پراکسیداز (۷/۰۴ U g^{-1} FW) به‌ترتیب در محیط کشت پایه 1/2 MS، MS و B5 بدست آمد. در حالی‌که در گونه *H. reticulates*، حداکثر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (۱/۱۴U g^{-1} FW) و گایاکول پراکسیداز (۶/۴۳ΔOD g^{-1} FW min^{-1}) در محیط کشت MS مشاهده گردید و بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱/۶۵ U g^{-1} FW) در محیط کشت

پایه 1/4 MS مشاهده گردید، هرچند که در مورد آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در این گونه تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۷).

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین در دو گونه *H. reticulates* و *H. pusillus*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		H. pusillus			*H. reticulatus*		
		کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
نوع محیط کشت	۳	۰/۵۱**	۵/۶۴**	۳۰/۳۱**	۰/۶۳ns	۹/۸۳ns	۰/۹۰ns
اشتباه آزمایشی	۸	۰/۰۰۰۲	۳/۷۲	۰/۱۶	۰/۱۹	۵/۴۸	۰/۵۰
ضریب تغییرات (CV%)		۱۰/۰۹	۲۳/۹۶	۱۱/۸۵	۳۳/۹۵	۳۰/۴۵	۳۴/۰۴

**، * و ns: به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۷- تأثیر نوع محیط کشت پایه بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل: کاتالاز (الف)، گایاکول پراکسیداز (ب) و آسکوربات پراکسیداز (پ) در ریشه‌های موئین حاصل از دو گونه *H. pusillus* و *H. reticulates*

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است.

بحث

گیاهان به‌عنوان منبع ارزشمند ترکیب‌های طبیعی برای درمان انواع بیماری‌های انسانی و حیوانی شناخته شده‌اند و کاربرد این داروهای طبیعی در حال گسترش می‌باشد. از سوی دیگر به‌دلیل مسائل مربوط به انقراض گیاهان در طبیعت، استفاده از کشت بافت گیاهی برای تولید ترکیب‌های باارزش دارویی اهمیت زیادی در صنایع داروسازی پیدا کرده است. یکی از مهمترین کاربردهای زیست‌فناوری در حوزه گیاهی، استفاده از روش‌هایی مانند مهندسی متابولیک مسیرهای بیوشیمیایی، القای ریشه موئین، تغذیه با پیش‌سازه و موارد متعدد دیگر به‌منظور افزایش تولید ترکیب‌های ثانویه دارویی می‌باشد. به همین منظور باید سیستم‌های مناسب القاء و تولید ریشه موئین بهینه‌سازی شود. فاکتورهای متعددی در موفقیت القاء و رشد ریشه‌های موئین مؤثر می‌باشند که ازجمله آنها می‌توان به نوع و سن ریزنمونه مورد استفاده، سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، شرایط تراریختی و اجزای محیط کشت اشاره کرد (Bensaddek *et al.*, 2001).

رشد سلول گیاهی و تولید متابولیت‌های ثانوی در سلول‌های کشت شده وابسته به غلظت و تعامل مواد غذایی موجود در محیط کشت می‌باشد. اجزاء محیط کشت، گاهی اوقات می‌تواند میزان رشد ریشه‌های موئین و عملکرد متابولیت‌های تجمع یافته را تغییر دهد. استنباط شده است که تفاوت در میزان یون‌های محیط کشت، اولین فاکتور مؤثر بر میزان رشد ریشه‌های موئین می‌باشد (Wu, 2007). محیط‌های کشت پایه MS و B5 دارای مقادیر یکسان فسفر و کلسیم هستند ولی مقدار نیتروژن آنها متفاوت است. محیط B5 و MS نیتروژن زیاد و در حدود ۲۶/۸ میلی‌مولار (در محیط MS) و ۲۲/۵ میلی‌مولار (در محیط B5) دارند، در حالی‌که مقدار نیتروژن در محیط 1/2 MS و 1/4 MS کمتر می‌باشد. بنابراین مقدار نیتروژن می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور رشدی، رشد ریشه‌های موئین را تحت تأثیر قرار دهد (Wu, 2007). همچنین براساس نتایج، محیط کشت‌های مختلف به‌دلیل داشتن غلظت‌های متفاوتی از عناصر معدنی و ویتامین‌ها، تأثیر قابل توجهی بر رشد و ویژگی‌های فیتوشیمیایی ریشه‌های موئین گیاه دارویی بذرالبنج داشتند. حداکثر وزن تر و وزن خشک نیز در هر دو گونه *H. pusillus* و *H. reticulates* در محیط کشت MS مشاهده گردید.

منشأ بسیاری از مواد دارویی و درمانی به‌دلیل متابولیسم ثانوی در گیاهان است که پلی‌فنول‌ها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مهمترین گروه از این متابولیت‌ها را شامل می‌شوند (Maganha *et al.*, 2010). افزایش محتوای فلاونوئید و فنول کل که در یک مسیر آبشاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شود که می‌تواند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد (Yousefi & Riahi Madvar, 2016؛ Saboura *et al.*, 2014؛ Kamalizadeh *et al.*, 2014). غلظت بالای عناصر محیط کشت به منزله اعمال تنش، موجب وادارکردن گیاه به تولید مواد دفاعی (متابولیت‌های ثانوی) و در نتیجه افزایش تولید آنها می‌شود (Khoshbakhat *et al.*, 2012). هرچند گیاهان واکنش‌های دفاعی متفاوتی دارند، ازاین‌رو با توجه به نوع گونه گیاهی، نوع واکنش دفاعی نیز متفاوت می‌باشد (Jin *et al.*, 1999؛ Chang *et al.*, 1998). تفاوت بسیار بارزی بین محیط کشت B5 و MS از لحاظ نوع و غلظت عناصر و مقدار ویتامین‌ها وجود دارد که می‌تواند در تولید مواد فنولیکی مؤثر باشد. غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم نقش مؤثری در افزایش زیست‌توده و غلظت ترکیب‌های فنولی دارد. به این ترتیب که در مسیر سنتز ترکیب‌های فنولی، اولین واکنش در مسیر فنیل پروپانوئید به‌وسیله فنیل آلانیل آمونیالیاز (PAL: Phenylalanine Ammonia Lyase) کاتالیز می‌شود که L– فنیل آلانیل را به ترنس سینالیک اسید تبدیل می‌کند. آمونیوم سولفات نقش بسیار مؤثری در تنظیم بیان ژن PAL در بیوسنتز سلول‌های گیاهی دارد. همچنین تفاوت بارزی از لحاظ مقدار بالای ویتامین‌ها در محیط B5 نسبت به MS وجود دارد که می‌تواند در تولید ترکیب‌های فنولی مؤثر باشد. تیامین نقش کلیدی به‌عنوان کوفاکتور در مسیرهای متابولیکی اصلی گیاه

دارد، بنابراین ممکن است به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم به تولید ترکیب‌های ثانوی کمک کند (Vahdatpour *et al*., 2009). به‌طور کلی، با افزایش غلظت ترکیب‌های فنولی، میزان توانایی عصاره حاصل از ریشه‌های موئین در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر ترکیب‌های فنولی، به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Zhang *et al*., 2009). فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به ساختارهای شیمیایی ترکیب‌ها است که به آنها اجازه می‌دهد به‌عنوان عوامل احیاءکننده عمل کنند (Nour *et al*., 2014). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که در حضور ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان DPPH می‌تواند یک الکترون و یا یک اتم هیدروژن بپذیرد تا به یک مولکول بسیار پایدار DPPH تبدیل گردد (Nour *et al*., 2014). در روش FRAP فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق پتانسل کاهش اکسیداسیون مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این روش ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی با Ferric tri-pyridyl-triazine complex (Fe (III)-TPTZ) واکنش می‌دهند و موجب ایجاد رنگ آبی می‌شوند (Gülçin, 2012). تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف به‌دلیل تفاوت در محتوای فنول و فلاونوئید کل می‌باشد (Singh, 2007). مطالعات متعددی نشان داده است که آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش اکسیداتیو ناپایدار می‌باشد (Chagas *et al*., 2008) و احتمالاً این می‌تواند دلیل فعالیت پایین این آنزیم در هر دو گونه باشد. کاتالاز در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن نقش دارد، بنابراین افزایش فعالیت کاتالاز در هر دو گونه نشان‌دهنده مهار کارآمد نسبت به پراکسید هیدروژن می‌باشد (Candan & Tarhan, 2012). تفاوت در میزان فعالیت آنزیم‌ها در گونه‌های مختلف نشان‌دهنده وجود روش‌های دفاعی متفاوت در برابر گونه‌های فعال اکسیژن در گونه‌های مقاوم نسبت به گونه‌های حساس می‌باشد (Mirzaei, 2000). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش نیز احتمالاً به علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن می‌باشد که با نتایج تحقیقات در گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) مطابقت دارد (Ghorbanpour *et al*., 2014). سطح بالای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد موجود در گیاهان، بیانگر افزایش تحمل آنها به تنش‌های محیطی است (Hojati *et al*., 2011). فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور کلی به ترکیب‌های فنولی در عصاره‌های گیاهی وابسته است (Babbar *et al*., 2011). البته در این مطالعه نیز میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با توجه به شرایط محیط کشت و غلظت نمک‌ها تغییر یافت.

سویه باکتری آگروباکتریوم نیز در موفقیت القای ریشه موئین و همچنین رشد آن تأثیر زیادی دارد. تمامی سویه‌های آگروباکتریوم برای انتقال ژن به سلول گیاهی قابلیت بیماری‌زایی ندارند و تمامی گیاهان آماده پذیرش ژن بیگانه نیستند (Hong *et al*., 2006). ساختار T-DNA در سویه‌های مختلف اگروباکتریوم متفاوت می‌باشد، به صورتی که برخی از سویه‌ها دارای تمام ژن‌های *rol* بوده ولی برخی از سویه‌ها فقط یک یا چند تا از این ژن‌ها را دارند، ازاین‌رو همین امر بر قدرت ریشه‌زایی سویه‌های مختلف تأثیر می‌گذارد. یک واریته گیاهی و نوع ریزنمونه پاسخ متفاوتی به سویه‌های متنوع یک گونه بیماری‌زا می‌دهند. بنابراین بهبود بیماری‌زایی باکتری و آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش به‌سزایی دارد. از فاکتورهای دیگر مؤثر در موفقیت القای ریشه موئین، نوع ریزنمونه می‌باشد. در اغلب مطالعات نشان داده شده است که رابطه متقابلی بین نوع سویه و نوع ریزنمونه گیاهی وجود دارد. در این مطالعه هم با توجه به گونه بذرالبنج، نتایج متفاوتی مشاهده گردید. به صورتی که در گونه *H. reticulates*، ریزنمونه کوتیلدون و سویه A7 و در گونه *H. pusillus*، ریزنمونه برگ و سویه A13 بیشترین درصد القای ریشه موئین را نشان دادند. تفاوت در القاء ریشه‌های موئین می‌تواند به تفاوت در قدرت بیماری‌زایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم وابسته باشد (Porter &

Flores, 1999). البته انتخاب سویه مؤثر آگروباکتریوم برای تولید ریشه‌های تراریخت وابسته به گونه گیاهیست (Lee *et al*., 2010). سویه آگروباکتریوم نقش مهمی در مراحل تراریختی و انتقال ژن بازی می‌کند (Dogan *et al*., 2011). به‌طوری‌که منشأ لاین‌های ریشه موئین و تفاوت در اندازه کروموزوم ممکن است فرصت خوبی برای بدست آوردن ریشه‌های موئین با توانایی بالای تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم نمایند (Akbarian *et al*., 2011).

منابع مورد استفاده

- Aebi, H.I., 1974. Catalase: 673-677. In: Bergmeyer, H., (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis (Vol. 2). Academic Press, New York, 682p.
- Akbarian, R., Hasanloo, T. and Khosroshahli, M., 2011. Evaluation of trigonelline in production *Trigonella foenum-greacum* hairy root cultures of two Iranian masses. Plant Omics Journal, 4(7): 408-412.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S. and Patil, R.T., 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Research International, 44: 391-396.
- Bahmanzadegan, A., Sefidkon, F. and Sonboli, A., 2009. Determination of hyoscyamine and scopolamine in four *Hyoscyamus* species from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8(1): 65-70.
- Bensaddek, L., Gillet, F., Nava-Saucedo, J.E. and Fliniaux, M.A., 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology, 85: 35-40.
- Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62: 293-300.
- Candan, N. and Tarhan, L., 2012. Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. Environmental and Experimental Botany, 75: 83-88.
- Chagas, R., Silveira, J., Ribeiro, R., Vitorello, V. and Carrer, H., 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquatinduced oxidative stress. Pesticide Biochemistry and Physiology, 90: 181-188.
- Chang, J.H., Shin, J.H., Chung, I.S. and Lee, H.J., 1998. Improved menthol production from chitosanelicited suspension culture of *Mentha piperita*. Biotechnology letters, 20(12): 1097-1099.
- Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K., 2007. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry, 102: 516-522.
- Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M.C., Sobolev, V.S. and Medina-Bolivar, F., 2010. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. Plant Physiology and Biochemistry, 48(5): 310-318.
- Davis, P., 1987. Flora of Turkey. University Press, Edinburg, 7724p.
- Dogan, D., Khawar, K.M. and Özcan, S., 2011. *Agrobacterium* mediated tumor and hairy root formation from different explants of lentils derived from young seedlings. International Journal of Agriculture and Biology, 7(6): 1019-1025.
- Fattahi, M., 2012. Assessment of morphological diversity, phytochemical and production of capillary roots in daenensis lemon balm. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Tehran University, Iran.
- Flores, H.E., Vivanco, J.M. and Loyola-Vorgas, M., 2006. Radicle biochemistry: the biology of root specific metabolism. Trends in plant science, 4: 220-226.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M. and Hatam, M., 2014. Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. Acta agriculturae Slovenica, 105 (1): 23-32.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Karimi, M. and Ghanati, F., 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta Physiologiae Plantarum, 33(1): 105-112.
- Hong, S.B., Peebles, C.A., Shanks, J.V., San, K.Y. and Gibson, S.I., 2006. Terpenoid indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring rol ABC genes. Biotechnology and Bioengineering, 93: 386-390.
- Jin, J.H., Shin, J.H., Kim, J.H., Chung, I.S. and Lee, H.J., 1999. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane Nakai*) cell culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 4(4): 300-304.
- Kabirnetaj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G.A. and Shokri, E., 2012. Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus*)

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 33(1): 90-102.
- Nour, V., Trandafir, I. and Cosmulescu, S., 2014. Influence of preparing method on antioxidant activity and polyphenols content of green Walnuts comfiture. South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, 5: 83-94.
- Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R. and Abdollahi Mandoulakani, B., 2019. Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschyi* hairy roots elicited by SiO_2 nanoparticles. Industrial Crops and Products, 133: 435-446.
- Porter, J.R. and Flores, H., 1999. Host range and implications of plant infections by *Agrobacterium rhizogenes.* Critical Reviews in Plant Sciences, 10: 387-421.
- Saboura, A., Ahmadi, A., Zeynali, A. and Parsa, M., 2014. comparison between the contents of phenolic and flavonoid compounds and aerial part antioxidant activity in *Scutellaria pinnatifida* in two North Iranian populations. Journal of Rafsanjan University Medical Science, 13(3): 249-266.
- Saravanakumar, A., Aslam, A. and Shajahan, A., 2012. Development and optimization of hairy root culture systems in *Withania somnifera* (L.) Dunal for withaferin-A production. African Journal of Biotechnolog, 11(98): 16412-16420.
- Sharafi, A., Hashemi Sohi, H., Mousavi, A., Azadi, P., Dehsara, B. and Hosseini Khalifani, B., 2013. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of Salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(11): 2125-2131.
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D. and Watkins, C.B., 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45: 349-357.
- Shinde, A.N., Malpathak, N. and Fulzele, D.P., 2009. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 288-294.
- Singh, B.D., 2007. Plant tissue culture. Biotechnology fundamentals and application. New Dehli, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 14: 332-425.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1): 49-55.

through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian Journal of Biotechnology, 4: 61-75.
- Kamalizadeh, M., Bihamta, M.R. and Peyghambari, S.A., 2014. Expression of genes involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway in dragonhead affected by nanoparticles. Genetics in the Third Millennium, 12: 3428-3437.
- Khoshbakhat, T., Bahadori, F., Khalighi, A. and Ardalan, M.M., 2012. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on the macro elements and performance *aloe vera* plant in a greenhouse. Journal of Crop Physiology, 2: 45-59.
- Królicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J. and Kojkowska, E., 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science, 160: 259-264.
- Lee, K.W., Choi, G.J., Kim, K.Y., Yoon, S.H., Ji, H.C., Park, H.S., Lim, Y.C. and Lee, S.H., 2010. Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass. Electronic Journal of Biotechnology, 13(3): 1-10.
- Mac-Adam, J.W., Nelson, C.J. and Sharp, R.E., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. Plant Physiology, 99(3): 872-878.
- Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei-Chiyaneh, E., 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Physiologiae Plantarum, 37(3): 55-68.
- Maganha, E.G., Halmenschlager, R.C., Rosa, R.M., Henriques, J.A., Ramos, A.L. and Saffi, J., 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. Food Chemistry, 118(1): 1-10.
- Mirzaei, M., 2000. The study of drought stress on germination and seedling growth in some of canola cultivars. Master's thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University.
- Mozaffarian, V., 1996. A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian. Farhange moaser, 963p.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with *tobacco* tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22(5): 867-880.
- Noori, M., Gharanjik, Sh., Safipour Afshar, A. and Saeid Nematpur, F., 2017. The influence of different strains of *Agrobacterium* on hairy root induction and the content of total phenolics and polysaccharides in medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) moench.

- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.
- Tao, J. and Li, L., 2006. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. South African Journal of Botany, 72(2): 211-216.
- Vahdatpour, F., Mashayekhi, K. and Piri Zirkuhi, M., 2009. Investigation of antioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of *Ulmus parvifolia* Jacq. callus. Journal of Plant Production, 16(2): 1-14.
- Wu, X., 2007. Establishment and chemical analysis of hairy root of *Eucommia ulmoides*. Ph.D. thesis, China, 65p.
- Yousefi, K. and Riahi Madvar, A.A.B., 2016. Effect of flavone synthase gene expression and elicitor silver and copper on some biochemical parameters in seedlings of native Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). Journal of Plant (Iranian Journal of Biology). 28: 210-223.
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T. and Wang, Z., 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chemistry, 113(1): 160-165.
- Žugić, A., Đorđević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S. and Tadić, V., 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Industrial Crops and Products, 52: 519-527.

Optimization of rapid and efficient hairy root induction in two *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Hyoscyamus pusillus* L.

R. Ghodsi[1], B. Hosseini[2*] and A. Hedayati[3]

1- M.Sc. studendt, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Ph.D. studendt, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: December 2018 Revised: Julu 2019 Accepted: November 2019

Abstract

Hyoscyamus species such as *H. reticulatus* L. and *H. pusillus* L. are rich sources of tropane alkaloids, mainly hyoscyamine and scopolamine, which are used for their mydriatic, antispasmodic, anticholinergic, analgesic and sedative properties. In this study, in the first experiment, the effects of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834, A4, A7 and A13) and three explants (leaf, hypocotyls, and cotyledon) on hairy root induction were investigated in both *H. reticulatus* and *H. pusillus* species. In the second experiment, the effects of various culture media (MS, 1/2 MS, 1/4 MS, and B5) were evaluated on some morphological and phytochemical traits of hairy roots. The results showed that in *H. reticulatus*, maximum hairy root induction (78%) was obtained in the cotyledon explant inoculated with A7 strain and maximum hairy roots fresh weight (6.25 g) and dry weight (0.5 g) were recorded in MS medium. In this species, the highest total phenol (3.82 mg GAE g^{-1} FW) and total flavonoid (7 mg QUE g^{-1} FW) content were observed in MS medium; however, no significant changes were observed in the activity of antioxidant enzymes of hairy roots cultured in different media. In *H. pusillus*, the leaf explant inoculated with A13 strain showed maximum hairy root induction (90%), and the highest hairy root fresh weight (5.25 g) and dry weight (0.43 g) were observed in MS medium and the highest total phenol (2.26 mg GAE g^{-1} FW) and flavonoid (9.22 mg QUE g^{-1} FW) content were obtained in B5 medium. This study showed that basal culture medium type and plant species had a significant impact on the biomass and phytochemical characteristics of hairy roots.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*is, basal media culture, total phenol and flavonoid, hairy root.