

بررسی عامل‌های مؤثر در القای ریشه موئین و افزایش میزان رزمارینیک اسید زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss)

بهمن حسینی^{۱*}، نسرين ايوبی^۲ و محمد فتاحی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۲)

چکیده

زرین گیاه یا همان بادرنجویه دناهی با نام علمی *Dracocephalum kotschy* متعلق به تیره نعناعیان و جنس بادرشبو (*Dracocephalum*) است که به علت پراکنش گسترده آن در ایران با نام‌های چندی از آن یاد می‌شود. ترکیب‌های فلاونوئید موجود در زرین گیاه، خاصیت ضدسرطانی دارد و استفاده از روش‌های مختلف مانند تولید ریشه‌های موئین می‌تواند به تولید ترکیب‌هایی با ارزش دارویی بالا کمک کند. در این بررسی تأثیر چهار نوع ریزنمونه (لپه یا کوتیلدون، محور ریزلپه یا هیپوکوتیل، برگ و میانگره) و سن ریزنمونه (برگ یک‌هفته‌ای، دو هفته‌ای و چهار هفته‌ای) بر میزان القای ریشه موئین گیاه زرین گیاه بررسی شد. تأیید تراریختی با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rolB* به روش PCR انجام شد. به منظور شناسایی محیط کشت مناسب برای رشد و افزونش ریشه‌های موئین، تأثیر چهار نوع محیط کشت پایه مایع MS، 1/2MS، 1/4 MS و B5 و محرک UV-B در سه سطح: ۳ دقیقه، ۶ دقیقه و ۹ دقیقه بر تغییر ویژگی‌های بیوشیمیایی و رزمارینیک اسید ریشه‌های موئین بررسی شد. بیشترین درصد القاء ریشه در ریزنمونه برگ یک‌هفته‌ای (۵۶/۶۶ درصد) و لپه (۳۶/۶۶ درصد) مشاهده شد. بیشترین وزن تر (۴/۳۴ گرم) و وزن خشک (۰/۳۱ گرم) در محیط کشت 1/4MS و کمترین وزن تر (۱/۰۴ گرم) و وزن خشک (۰/۱۰ گرم) در محیط کشت B5 ثبت شد. بیشترین فعالیت پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) در تیمار شش دقیقه (۹۲/۳۳ درصد) و کمترین میزان فعالیت پاداکسندگی در ریشه‌های غیرتراریخت (۶۳ درصد) به دست آمد. نتایج تجزیه HPLC نشان داد که تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با UV-B با زمان شش دقیقه، ۲/۵ برابر بیشتر از ریشه‌های غیر تراریخت (۳۴/۹ g/mg DW در مقایسه با ۱۳/۸ μg/mg DW) است.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، زرین گیاه، فعالیت پاداکسند، فلونوئید کل، کاتالاز.

Study of factors affecting hairy roots induction and Rosmarinic Acid production in *Dracocephalum kotschy* Boiss

Bahman Hosseini^{1*}, Nasrin Ayyobi² and Mohamad Fattahi³

1, 2, 3. Associate Professor, Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

(Received: Oct. 5, 2016 - Accepted: Sep. 13, 2017)

ABSTRACT

Abstract: The flavonoid compounds in the *Dracocephalum kotschy* has anti-cancer properties and using various methods such as hairy roots production can used to produce valuable secondary metabolites. In this study, the effect of explant type (cotyledon, hypocotyl, leaf and internode) and explants age (1 week leaf, 2 weeks leaf and 4 weeks old leaf) on hairy roots induction percent were surveyed. The transgenic status of hairy roots was confirmed by PCR using *rolB* genes-specific primers. In order to find optimum culture media for hairy roots growth and proliferation, four types of liquid basal media including MS, 1/2MS, 1/4 MS and B5 and UV-B elicitor effects in three levels (3 min, 6 min and 9 min) on biochemical characteristics and Rosmarinic acid (RA) contents were investigated. The maximum hairy roots induction was obtained in 1 week leaves old (56.66 %); cotyledon explants (36.66 %), respectively. The highest fresh (4.34 gr) and dry weight (0.31 gr) and lowest fresh (1.04 gr) and dry weight (0.10 gr) was recorded in 1/4 MS and B5 media, respectively. The maximum and minimum antioxidant activities (92.33% and 63 %) were obtained in UV-B exposure time to 6 min radiation and non-transformed hairy roots. High performance liquid chromatography analysis revealed that the production of RA in UV-B (6 min) elicited hairy roots of *D. kotschy* was almost 2.5-fold higher than that of the non-transformed roots (34.9 μg/mg DW compared to 13.8 μg/mg DW).

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*; antioxidant activity, catalase, total flavonoid, Zarrin-giah.

* Corresponding author E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

جنس *Dracocephalum* از جمله مهم‌ترین جنس‌های خانواده نعنائیان بوده و در ایران زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy* Boiss در قسمت‌هایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است، ترکیب‌های موجود در زرین گیاه از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک‌اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن است (Fatahi, 2012). رزمارینیک‌اسید فعالیت‌های زیستی قابل توجهی از جمله: ضد ویروسی، ضد باکتری، ضد فسادپذیری و پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) دارد (Xiao et al., 2009). سامانه آگروباکتریوم، نخستین سامانه تراریختی موفق در گیاهان است که کاربرد آن در سال ۱۹۸۳ میلادی، نشانه‌ای از برطرف شدن بازدارنده‌ها در مهندسی ژنتیک گیاهی است (Chawla, 2000; Hoekema et al., 1983). موفقیت در القاء ریشه موئین به فراسنجه (پارامتر)های مختلفی وابسته است مانند: گونه گیاهی، سن و بافت گیاهی. به‌طور عمده نمونه‌های جوان به باکتری‌ها حساس‌تر هستند (Sevon & Oksman-Caldentey, 2002). سوپه باکتری و تراکم آن نیز بر میزان القاء ریشه موئین مؤثر است (Park & Facchini, 2000). ریزنمونه‌هایی که به‌طور عمده استفاده می‌شوند شامل بافت‌های جوان، محور ریزلیه (هیپوکوتیل)، لپه (کوتیلدون)، دمبرگ و برگ‌های جوان است. نحوه برش بافت‌ها، سطح برگ و انتخاب اندام در افزایش سطح تماس بین بافت‌های گیاهی و باکتری، اثر می‌گذارد (Komaraiah et al., 2003). در گونه‌های مختلف گیاهی مانند *Withania somnifera* (Saravanakumar et al., 2012)، *Glycyrrhiza glabra* (Shirazi et al., 2012) و *Portulaca oleraceo* (Piran et al., 2012) ریزنمونه در موفقیت القای ریشه‌های موئین بررسی و نتایج مختلف بسته به نژادگان (ژنوتیپ) گیاهی گزارش شده است. در درمنه (*Artemisia annua* L.)، ریزنمونه‌های برگی دوهفته‌ای و دوماهه انتخاب و با آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) سوپه AR15834 تراریخت شده و نتایج نشان داد، ریزنمونه دوهفته‌ای بیشترین میزان تراریختی (۶۰/۷۵)

درصد) را داشتند (Solemani et al., 2012). در تحقیقی تأثیر دو روش تلقیح تزریقی و غوطه‌وری در ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) بررسی شد. نتایج بررسی محققان نشان داد، روش غوطه‌وری برتری نسبت به روش تزریق دارد (Rahnama et al., 2008). به‌طورمعمول ترکیب‌های محیط کشت با توجه به غلظت و نسبت کربن به نیتروژن، روی و فسفات بر رشد ریشه‌های موئین مؤثر هستند. بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت نیز می‌تواند باعث افزایش سرعت رشد و یا تجمع متابولیت‌ها شود. افزایش غلظت آمونیوم در محیط کشت ریشه‌های موئین (*Atropa belladonna*) باعث کاهش رشد شد درحالی‌که افزایش غلظت نیترات منجر به افزایش زیست‌ساخت (بیوسنتز) آلکالوئید و تجمع آن شده و بیشترین میزان زیست‌توده (بیوماس) و عملکرد آلکالوئیدها با کاهش هر دو سطح منبع نیتراتی به دست آمد (Bensaddek et al., 2001). بنابر نتایج به‌دست‌آمده در ریشه‌های موئین جینسینگ^۱، پیشنهاد شد که عنصرهای کانی، عامل تنظیم‌کننده مهمی بر رشد و زیست‌توده است. در *Withania somnifera* بیشترین میزان رشد ریشه‌ها در محیط 1/2MS گزارش شده است (Saravanakumar et al., 2012).

افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، از طریق محرک‌ها در کشت یاخته‌ای گیاه، فضای بررسی‌های جدیدی باز کرده است که می‌تواند منافع اقتصادی مهم برای صنایع زیستی داشته باشد. در اصل، اصطلاح محرک‌ها مربوط به مولکول‌هایی است که قادر به تحریک فیتوآلکسین‌ها هستند، اما اکنون به‌طورمعمول برای مولکول‌هایی که هر نوع پاسخ دفاعی گیاه را برمی‌انگیزد به کار می‌رود. گیاهان در مقابل تابش اشعه UV سازوکارهای دفاعی از خود نشان می‌دهند که شامل تجمع رنگیزه‌های جذب‌کننده طیف نوری در ناحیه فرابنفش مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و دیگر ترکیب‌های جذب‌کننده UV است (Allen et al., 1998). همچنین گزارش شده است، فلاونوئیدها نقش پاداکسندگی

میلی‌گرم در لیتر ریغامپیسین کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. پس از رسیدن OD₆₀₀ باکتری به ۰/۵-۰/۴، دروایه (سوسپانسیون) باکتری با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. پس از تشکیل رسوب باکتری، محیط LB مایع حذف و به رسوب باکتری ۷ میلی‌لیتر محیط تلقیح آگروباکتریوم^۲ (حاوی ۵۰ گرم در لیتر ساکاروز و pH: ۵/۵، میزان عنصرهای پرمصرف، کم‌مصرف، ویتامین‌ها و آگار در این محیط همسان محیط کشت MS است) اضافه شد. سپس فاکلون‌ها به مدت ۵ ساعت در دستگاه لرزای اتافک رشد (شیکر انکوباتور) با دمای ۲۸ درجه و دور ۱۸۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

القای ریشه موئین

ریزنمونه‌های تهیه‌شده با سویه 15834 آگروباکتریوم رایزوتنز به مدت ۱ دقیقه به روش غوطه‌وری تلقیح و آنگاه به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی انتقال داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی برای القای ریشه موئین نگهداری شدند و پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها سه بار با آب مقطر سترون شستشو و به روی کاغذ صافی سترون‌شده برای جذب آب اضافی انتقال یافتند سپس نمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی پادزی (آنتی‌بیوتیک) سفوتاکسیم منتقل شده و برای ظهور ریشه‌های موئین در شرایط تاریکی و در زیر فویل آلومینیومی نگهداری شدند.

بررسی تأثیر نوع و سن ریزنمونه بر درصد القای ریشه موئین

تأثیر چهار نوع ریزنمونه شامل لپه، محورریزلیپه، برگ با دم‌برگ و میانگره یک‌هفته‌ای تهیه‌شده از گیاهچه‌های سترون‌شده در محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد بررسی شد. همچنین به‌منظور بررسی تأثیر سن ریزنمونه، گیاهچه‌های سترون‌شده

داشته و باعث سمیت‌زدائی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. گزارش شده که فلاونوئیدها در پاسخ به تابش اشعه ماوراءبنفش (UV-C و UV-B) به‌سرعت افزایش‌یافته و به میزان زیاد در لایه روپوستی (اپیدرمی) تجمع می‌یابد (Gitz et al., 2004). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد، بررسی جامعی در ارتباط با بررسی عامل‌های مؤثر در القای ریشه موئین در زرین گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق تحریک^۱ گزارش نشده است. لذا در این بررسی برای نخستین بار، تأثیر عامل‌های مختلف بر تولید و رشد ریشه‌های موئین و همچنین تغییرپذیری‌های بیوشیمیایی تحت تأثیر اشعه UV-B بررسی و گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

این بررسی در سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۳ در گروه علوم باغبانی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد. بذره‌های زرین‌گیاه، از شرکت پاکان بذر (اصفهان-ایران) خریداری شد. به‌منظور برطرف کردن خواب بذر، از اسیدسولفوریک غلیظ (به مدت ده دقیقه) و برای ضدعفونی از اتانول ۷۰ درصد (به مدت یک دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت ده دقیقه) و آب مقطر سترون (استریل) استفاده شد لازم به یادآوری است که همه این مراحل در زیر هود لامینار انجام شد. بذره‌های سترون‌شده در محیط کشت پایه MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت و در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. از گیاهچه‌های سترون‌شده برای تهیه ریزنمونه‌های مختلف (یک‌هفته‌ای، دو هفته‌ای و چهار هفته‌ای) استفاده شد.

آماده‌سازی باکتری برای تلقیح

تک همسانه (کلون) سویه 15834 باکتری در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع و حاوی ۵۰

بشر ۱۰ میلی‌لیتر منتقل شد. دوباره میزان ۵ میلی‌لیتر از اتر را درون لوله ریخته و پس از گذشت ۵ ساعت با تبخیر شدن اتر، به ماده جامد باقی‌مانده میزان ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه و سپس دیواره ظرف را کامل تمیز کرده تا به محلول اضافه بشود و در نهایت عصاره به‌دست‌آمده از صافی عبور داده شده و در یخچال ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Fattahi *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری فعالیت پاداکسندگی

برای اندازه‌گیری فعالیت پاداکسندگی به ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها، ۹۵۰ میکرولیتر DPPH^۱ (۶×۱۰^{-۵} mol/lit) اضافه و پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با استفاده از طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده و در رابطه زیر گذاشته شد. برای تهیه شاهد (بلنک) پاداکسندگی نیز به روش بالا عمل و تنها به‌جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد (Chiou *et al.*, 2007).

$$\frac{AC-AS}{AC} \times 100$$

AC: میزان جذب بلنک، AS: میزان جذب نمونه.

اندازه‌گیری فنل کل

به‌منظور اندازه‌گیری فنل کل در آغاز به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد اضافه و پس از ۵ الی ۱۰ دقیقه، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد افزوده شد و در نهایت ۱/۵ الی ۲ ساعت در شرایط تاریک نگهداری شد تا رنگ نمونه‌ها به بنفش تغییر کند و سپس با دستگاه طیف‌سنج نوری و طول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی واسنجی (کالیبراسیون) از تهیه ۴ غلظت از فلاونوئید کوئرستین استفاده شد و در نهایت میزان جذب (Y) را در معادله به‌دست‌آمده از واسنجی جایگذاری کرده تا میزان فنل کل (X) برحسب (μg/g Qu. DW) به دست آید (Slinkard & Singleton, 1977).

$$Y=0.0007X+0.0145$$

در سن‌های مختلف (یک‌هفته‌ای، دو هفته‌ای و چهار هفته‌ای) برای تهیه ریزنمونه‌های برگ با دم‌برگ استفاده شد (شکل A-1). این آزمایش در شش تکرار و هر تکرار شامل ده ریزنمونه بود. درصد القای ریشه موئین در هر تیمار محاسبه شد.

بررسی تأثیر نوع محیط کشت بر میزان رشد ریشه‌های موئین

پس از القای ریشه موئین در ریزنمونه برگ یک‌هفته‌ای، رگه (لاین) ۲۱ به‌عنوان رگه تندرشد انتخاب و برای بررسی تأثیر نوع محیط کشت پایه استفاده شد. برای این منظور از چهار نوع محیط کشت مایع MS، 1/2MS، 1/4 MS و B5 (pH:۵/۷) و در سه تکرار استفاده شد. بدین منظور میزان ۰/۱ گرم ریشه موئین وزن شده و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع کشت و روی دستگاه لرزای اتافک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۲۰ نگهداری شد. پس از ۳ هفته وزن تر و خشک ریشه‌ها توسط ترازوی دیجیتال ثبت شد.

بررسی تأثیر UV-B بر تغییرپذیری متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین زین گیاه

بنابر نتایج آزمایش اولیه، محیط کشت مایع 1/4MS به‌عنوان بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های موئین زین گیاه انتخاب شد و پس از یک هفته کشت ریشه‌های موئین در محیط جدید، تیمار UV-B (توسط یک لامپ ۲۰ وات، HITAGH 1) در سه سطح ۳: دقیقه، ۶ دقیقه و ۹ دقیقه به‌صورت یک روز در میان به مدت یک هفته و با سه تکرار انجام شد.

عصاره‌گیری متانولی برای اندازه‌گیری پاداکسندگی، فنل کل و فلاونوئید

میزان ۰/۱ گرم از ریشه‌های خشک‌شده در آون، در هاون آسیاب شده و به درون لوله آزمایش منتقل شد. در زیر هود میزان ۱۰ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر درون لوله اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شد. پس از چند بار تکان دادن لوله‌ها، عصاره اتری به‌دست‌آمده را در زیر هود درون

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شده و پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار اضافه و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس با دستگاه طیف‌سنج نوری و طول‌موج ۳۸۰ نانومتر تنها شد. میزان جذب (Y) را در معادله زیر جاگذاری کرده تا میزان فلاونوئید کل (X) برحسب ($\mu\text{g Qu/g DW}$) به دست آید. از کوئرسیتین^۱ به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی واسنجی استفاده شد (Shin *et al.*, 2007).

$$Y = 0.002X + 0.011$$

مستقیم ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه فام‌نگاری (کروماتوگرافی) مایع با کارایی بالا (دل ۱۱۰۰ اجیلنت^۲) زمان بازداری و سطح زیر نقطه اوج (پیک) آن‌ها مشخص شد. حدود ۰/۱ گرم از ریشه توزین و به لوله آزمایش منتقل شد. نمونه‌های ریشه در هاون پودر و یکنواخت شد. ۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد به عصاره اضافه و خوب هم زده شد و در ادامه به درون دستگاه فراصوت (اولتراسونیک) منتقل شد تا تحت فرافوق صوت قرار گیرد. سپس نمونه سانتریفوژ شده و از لایه (فاز) بالایی و شفاف پس از گذراندن از صافی ۰/۴۵ میکرومتر نیتروسولوزی به دستگاه فام‌گاری مایع با کارایی بالا تزریق شد و غلظت رزمارینیک اسید در نمونه‌های ریشه محاسبه شد.

$$Y = 76.091X - 31.191$$
 معادله رگرسیون:

تجزیه PCR ریشه‌های موئین

به‌منظور تأیید حضور ژن *rolB* DNA ژنگانی (ژنومی) نمونه‌های ریشه‌های موئین به روش CTAB^۳ استخراج شد (Khan *et al.*, 2007). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به‌منظور تأیید حضور ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوزنز در ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد. توالی آغازگرهای زیر بر پایه توالی ژن در بانک‌های اطلاعاتی طراحی و به‌منظور افزونش قطعه‌های 780 bp ژن *rolB* استفاده شدند. محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

F:

5'-TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA-3'

R:

5'-TTAGGCTTCTTTCTCAGGTTTACTGCAGC-3'

اندازه‌گیری میزان رزمارینیک اسید در نمونه‌های

ریشه موئین زربین‌گیاه

برای سنجش میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین، در آغاز محلول اصلی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از رزمارینیک اسید در حلال استونیتریل تهیه شد. پنج غلظت متفاوت ۱، ۶، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر از رقیق‌سازی محلول پایه تهیه شد و با تزریق

تجزیه آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها در نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین داده‌ها بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 رسم شد.

نتایج و بحث

تأثیر سن ریزنمونه در القاء ریشه موئین

ده روز پس از آلودگی ریزنمونه‌ها با باکتری، ظهور ریشه‌های موئین آغاز و تا ۴ هفته در ریزنمونه‌ها ریشه‌های موئین تشکیل شد. در ریزنمونه‌های تلقیح نشده هیچ‌گونه ریشه موئین مشاهده نشد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اختلاف معنی‌دار از نظر درصد القاء ریشه موئین در بین تیمارهای مورد بررسی وجود دارد ($P < 0.01$) (جدول ۱). بیشترین درصد القاء ریشه، در ریزنمونه برگ یک‌هفته‌ای (۵۶/۶۶ درصد) و کمترین درصد القاء ریشه، در ریزنمونه برگی چهارهفته‌ای (۱۵ درصد) ثبت شد (شکل B-۱) (شکل A-۲). آغاز تشکیل ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های

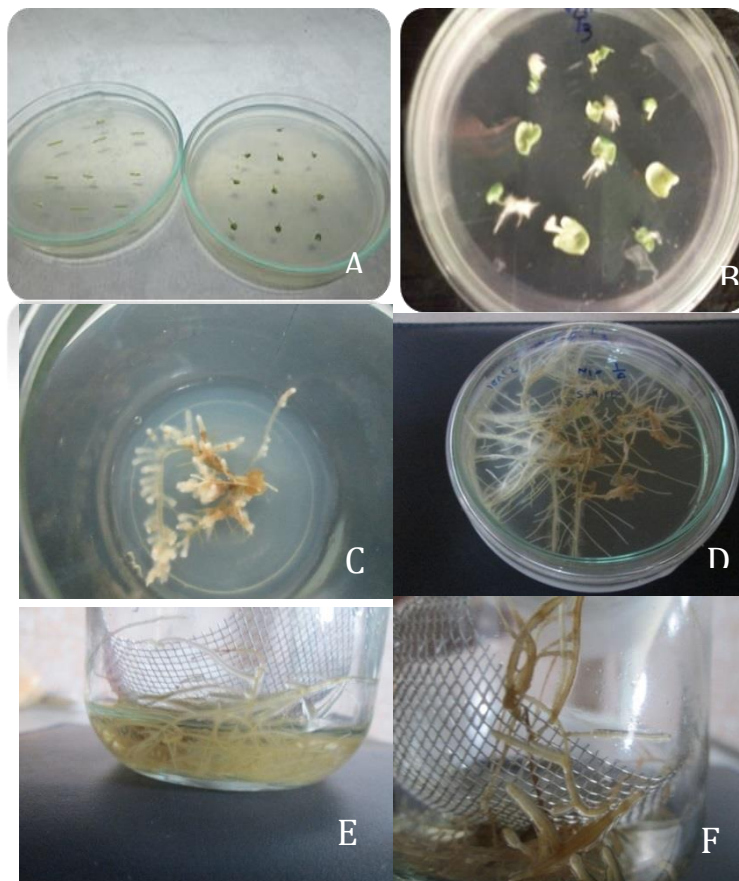
1. Quercetin

2. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

3. Agilent

وضعیت مرستمی دارند (Ghahreman, 2000)، بنابراین بافت‌های جوان‌تر توانایی بیشتری در دریافت ژن خارجی دارند. یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیقات Khezri (2013) در کلپوره (*Teucrium polium* L. Dhakulkar & Bargava, 2004) در *Gemalina arborea* و Sarvankumar *et al.* (2012) در *Withania somnifera* همخوانی دارد.

جوان‌تر زودتر از ریزنمونه‌های مسن بود (شکل C-۱). سن ریزنمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه موئین دارد، زیرا سن یاخته گیاهی تعیین‌کننده ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است (Kabirnetaj *et al.*, 2012). به نظر می‌رسد به دلیل اینکه بخش اصلی ساختار گیاهان جوان بافت‌های پارانشیمی است و یاخته‌ها در این بافت، کم‌وبیش



شکل ۱. القای ریشه موئین در ریزنمونه‌های مختلف زیرین گیاه در شرایط درون شیشه

A: ریزنمونه‌های برگ و میانگره یک هفته‌ای. B) ظهور ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای. C) ریشه‌های موئین القاء شده در برگ چهار هفته‌ای. D) ریشه‌های موئین القاء شده در برگ یک هفته‌ای. E) ریشه‌های موئین رشد یافته در محیط کشت MS ۱/۲. F) ریشه‌های قهوه‌ای‌رنگ رشد یافته در محیط کشت MS مایع

Figure 1. Hairy root induction in various explants of *D. kotschy* under *In vitro* conditions.

A) One week old leaf and internode explants. (B) Appearance of hairy roots in one week old leaf explants. (C) Induced hairy roots in 4 weeks old leaf. (D) Induced hairy roots in one weeks old leaf. (E), Hairy roots growth in 1/2 MS media. (F) Brown hairy roots growth in MS media.

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر سن ریزنمونه در القای ریشه موئین در زیرین گیاه

Table 1. Effect of explant age on hairy roots induction in Zarrin-Giah

Variation Sources	Degree of Freedom	Mean of Squares
Explant Age	2	2772.22**
Standard Error	15	82.22
Coefficient of Variation		23.31

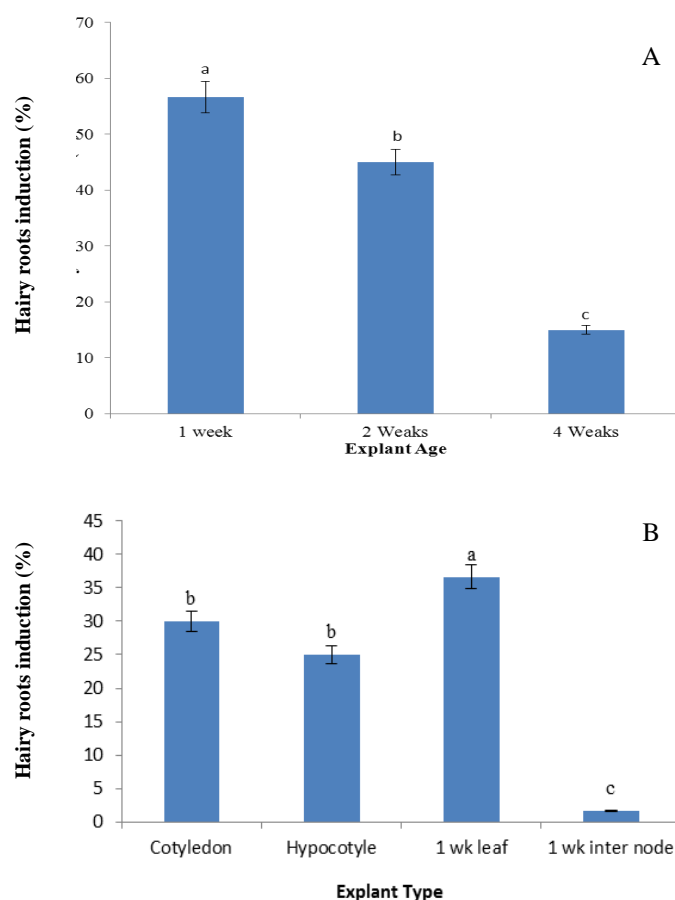
** : Significantly differenc at 1% probability level.

** نشان دهنده معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

کوچک و محدودیت در شمار یاخته‌های فعال، کمترین میزان تراریختی را نشان دادند (شکل D-۱). یافته‌های این پژوهش با نتایج Karmarkar & Keshavachndran (2001) که تأثیر پنج نوع ریزنمونه (محورریزلیپه، جوانه شاخه، برگ، میانگره) در گیاه *Holostemma annulare* را بررسی و نتایج آنان نشان داد، در محورریزلیپه بیشترین میزان القاء ریشه به دست آمد، همخوانی ندارد. دلایل چندی در ارتباط با پاسخ ریزنمونه به تیمارهای مورد استفاده وجود دارد که از این موارد می‌توان به نوع نژادگان، نوع، سن و شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه و تأثیر اجزای محیط کشت و شرایط کشت اشاره کرد. یکی از دلایل این نبود همخوانی، می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی گیاهان مورد بررسی یا سن ریزنمونه مورد استفاده در بررسی‌های مختلف باشد.

تأثیر نوع ریزنمونه بر القای ریشه مؤین

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) از نظر درصد القاء ریشه مؤین در بین ریزنمونه‌های لپه، محورریزلیپه، برگ یک‌هفته‌ای و میانگره یک‌هفته‌ای وجود دارد (جدول ۲). بیشترین و کمترین درصد القاء ریشه در بین ریزنمونه‌های مختلف به ترتیب مربوط به ریزنمونه برگ یک‌هفته‌ای (۳۶/۶۶ درصد) و میانگره یک‌هفته‌ای (۱/۶۶ درصد) بود (شکل B-۲). همچنین بین ریزنمونه‌های لپه و محورریزلیپه از نظر درصد القاء ریشه‌های مؤین اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ولی مشاهده‌های تجربی نشان داد، محورریزلیپه ولپه به دلیل کوچک بودن و سن بسیار پایین نسبت به گیاهان یک‌هفته‌ای، توانایی رویارویی با باکتری را نداشته و به‌طور عمده بافت مرده (نکروزه) می‌شوند و میانگره به دلیل سطح



شکل ۲. تأثیر (A) سن ریزنمونه (۱، ۲ و ۴ هفته) و (B) نوع ریزنمونه بر درصد القاء ریشه‌های مؤین تراریخته زربین گیاه. حرف‌های همسان نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

Figure 2. Effect of (A) explant age and (B) explant type on percentage of hairy roots induction in *D. kotschy*. Different letters above each column indicate significant differences ($p < 0.01$) according to Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه بر القاء ریشه موئین زرین گیاه
Table 2. Effect of explant type on hairy root induction in Zarrin-Giah

Variation Sources	Degree of Freedom	Mean of Squares
Explant Type	3	1388.888**
Error	20	18.333
Coefficient of Variation		18.35

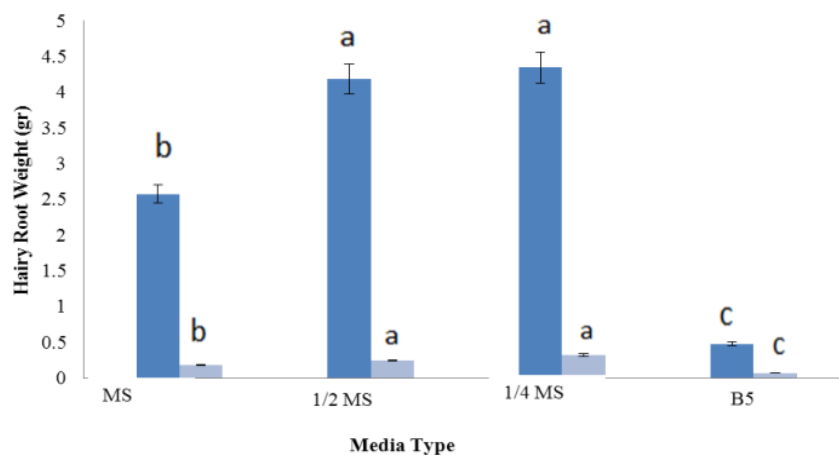
** : Significantly difference at 1% probability level.

** نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

فعال و بهینه و همچنین افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موئین، اهمیت و ارزش بالایی دارد (Shinde *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد که ریشه‌های موئین این گیاه به غلظت‌های بالای نمک حساس باشد، زیرا مشاهده‌های تجربی نشان داد، در محیط کشت MS، ریشه‌ها قهوه‌ای رنگ شده و دچار بافت‌مردگی می‌شدند ولی با کاهش غلظت نمک‌ها، ریشه‌ها رشد بیشتری داشتند (شکل ۱-E, F). در گیاه *Scrophularia buergeriana* Miquel از چهار نوع محیط کشت مورد بررسی (1/2MS, MS, SH, 1/2SH)، محیط 1/2MS محیط بهینه برای کشت ریشه‌های موئین گزارش شد (Park *et al.*, 2000). بسته به گونه گیاهی مورد بررسی، نوع محیط کشت پایه بهینه برای رشد ریشه‌های موئین می‌تواند متفاوت باشد. یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیقات Noruzi (2013) بر رشد ریشه‌های موئین گل مکزیکی (*Agastache foeniculum*) و Kabirnotaj *et al.* (2012) در *Cichorium intybus* L. همخوانی ندارد که این می‌تواند ناشی از تفاوت در نژادگان‌های مورد بررسی باشد.

تأثیر نوع محیط کشت بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد، نوع محیط کشت پایه مورد استفاده، تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین دارد. بنا بر نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین وزن تر (۴/۳۴ گرم) و وزن خشک (۰/۳۱ گرم) در محیط کشت 1/4MS و کمترین میزان وزن تر ریشه‌های موئین (۱/۰۴ گرم) و وزن خشک (۰/۱۰ گرم) در محیط کشت B5 مشاهده شد (شکل ۳). با توجه به نتایج این بخش، در بین محیط کشت‌های 1/2MS و 1/4MS از نظر میزان وزن تر و خشک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد تغییرپذیری‌های غلظت و نوع عنصرهای غذایی در محیط کشت پایه، باعث ایجاد تغییر معنی‌دار در رشد ریشه‌های موئین باشد و افزایش یا کاهش غلظت عنصرهای تشکیل‌دهنده محیط کشت، در میزان رشد ریشه موئین در کشت درون شیشه تأثیر قابل توجهی داشته باشد. به همین دلیل، شناسایی ترکیب بهینه محیط کشت به منظور ایجاد شرایط رشد



شکل ۳. تأثیر محیط کشت بر وزن تر و وزن خشک ریشه‌های موئین زرین گیاه. حرف‌های همسان نشان‌دهنده نبود اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن است.

Figure 3. Effect of media type on fresh and dry weight of hairy roots in *D. kotschy*. Different letters above each column indicate significant differences ($p < 0.01$) according Duncan's Multiple Range Test.

Furness et al. و *Mesembryanthemum crystallium* (1999) در گیاه *Cynoglossum officinalis* همخوانی دارد. به نظر می‌رسد یکی از رایج‌ترین اثرگذاری‌های استفاده از محرک‌ها، کاهش تولید زیست‌توده باشد. زیرا هم سوخت‌وساز (متابولیسم) گیاه بیشتر به سمت تولید متابولیت‌های ثانویه تمایل دارد و هم در نتیجهٔ تکانهٔ (شوک) ناشی از محرک، رشد رویشی محدودتر می‌شود.

تأثیر UV-B بر میزان فنل و فعالیت پاداکسندگی

تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از اثر UV-B بر میزان فعالیت پاداکسندگی نشان داد، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) وجود دارد. بنا بر شکل (A-5) بیشترین افزایش در میزان فعالیت پاداکسندگی مربوط به زمان ۶ دقیقه با ۹۲/۳۳ درصد است. کمترین میزان فعالیت پاداکسندگی نیز در ریشه‌های غیر ترا ریخت (۶۳ درصد) مشاهده شد.

جدول تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر UV-B بر میزان فنل کل نشان داد، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) قابل مشاهده است. افزایش تیمار با UV-B تا ۶ دقیقه با افزایش تولید فنل کل ($1599/04 \mu\text{g/g DW}$) همراه بود. ولی افزایش زمان به ۹ دقیقه منجر به کاهش تولید میزان فنل کل ($1423/71 \mu\text{g/g DW}$) شد. باین‌حال اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های ۹ دقیقه و ۳ دقیقه مشاهده نشد و کمترین میزان فنل کل در ریشه‌های غیر ترا ریخت $144/52 \mu\text{g/g DW}$ مشاهده شد (شکل B-5). از راهکارهای مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی، استفاده از انواع محرک‌های زیستی و غیرزیستی است که می‌تواند مسیرهای بیوشیمیایی ساخت (سنتر) متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آن‌ها را تغییر دهند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که با وجود تأثیر منفی اشعهٔ UV-B بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین به دلیل اختلال در فرایند تقسیم یاخته‌ای، تولید متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر اشعه افزایش داشته است. این تغییرپذیری به دلیل تأثیر تحریکی اشعه بر پاسخ گیاه به شرایط تیمار خارجی بوده است.

تأثیر UV-B بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد، در بین سطوح مختلف UV-B بر وزن تر ریشه‌های موئین اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.01$) (جدول ۳). با افزایش زمان تیمار با اشعه، وزن تر ریشه‌های موئین کاهش یافت به طوری که در زمان ۹ دقیقه کمترین وزن تر ریشه‌ها ($1/3$ گرم) و بیشترین وزن تر ریشه‌ها نیز در نمونهٔ شاهد (بدون تیمار) ($2/57$ گرم) به دست آمد (شکل ۴). علت اصلی کاهش وزن تر این است که اشعهٔ UV-B از تقسیم یاخته‌ای جلوگیری می‌کند. کاهش در تقسیم یاخته‌ای به دلیل اکسایش (اکسیداسیون) توپولین‌ها تحت تأثیر اشعهٔ UV است که باعث تأخیر در تشکیل ریزلوله (میکروتوبول)‌ها و کاهش میزان تقسیم می‌شود و همچنین اشعهٔ UV بازدارندهٔ رونویسی پروتئین‌های هیستون می‌شود و بدین طریق بازدارندهٔ تقسیم یاخته‌ای نیز می‌شود (Hopkins et al., 2002). تیمار UV-B تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه‌ها نداشت. UV-B باعث کاهش رشد و وزن تر ریشه‌های موئین شد ولی نتایج مقایسهٔ میانگین تأثیر UV-B بر مواد مؤثره نشان داد که، با افزایش زمان تا سطح ۶ دقیقه، میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی افزایش یافته است. در واقع افزایش این رنگیزه‌ها، تأثیر UV-B بر کاهش رشد ریشه‌های موئین را خنثی کرده و در نتیجه تأثیر UV-B بر وزن خشک ریشه‌ها معنی‌دار نبوده است. تیمار ۹ دقیقه منجر به بافت‌مردگی شدید در ریشه‌ها شد. رادیکال‌های تولیدشده، بسیار فعال بوده و می‌تواند با درشت‌مولکول‌های حیاتی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و دیگر ترکیب‌های یاخته‌ای واکنش داده و اعمال طبیعی یاخته را مختل کند (Bischof et al., 2002; Agrawal, 1992; Dai et al., 1997). UV-B باعث کاهش رشد گیاهان، تولید برگ‌های کوچک، ساقه‌هایی با انشعاب‌های کم و تغییرپذیری بیوشیمیایی در رنگیزه‌های حفاظتی می‌شود (Qing et al., 2004). مشخص شده که UV-B به‌طور معمول تأثیر منفی روی رشد ریشه دارد (Fattahi & Fattahi, 2011). یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیقات Mapelli et al. (2006) در

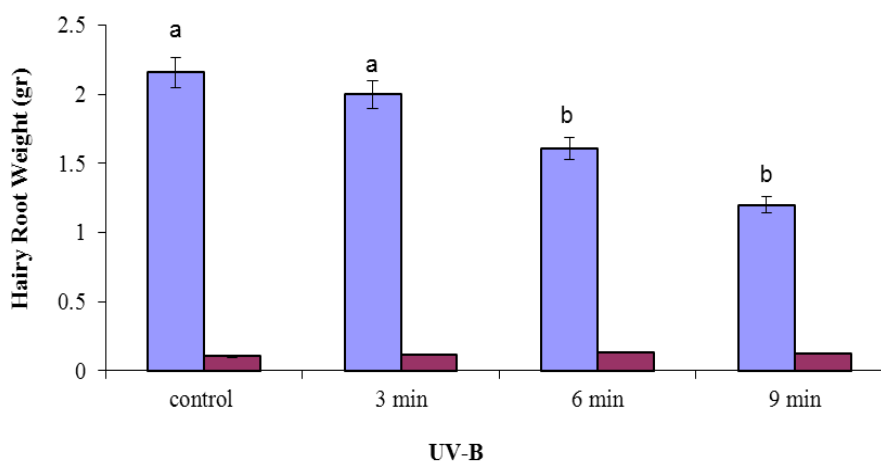
جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک، فعالیت پاداکسندگی، فنل کل و فلاونوئید ریشه‌های موئین زرین گیاه

Table 3. Effect of culture media on hairy root fresh and dry weight, antioxidant activity, total phenol and total flavonoid of Zarrin-Giah

Variation Sources	Degree of Freedom		Mean of Squares				
	Fresh and dry weight	Active constituents	Fresh weight (gr)	Dry Weight (gr)	Antioxidant activity	Total phenol	Total flavonoid
UV-B	3	4	0.547**	0.0004 ^{ns}	403.100**	987545.792**	1170.97**
Standard Error	8	10	0.077	0.0003	11.733	4059.413	49.733
Coefficient of Variation (%)			16.010	15.40	4.30	5.66	9.53

ns, *, **: non-significant and significantly differences at 5 and 1% probability levels, respectively.

ns, *, **: non-significant and significantly differences at 5 and 1% probability levels, respectively.



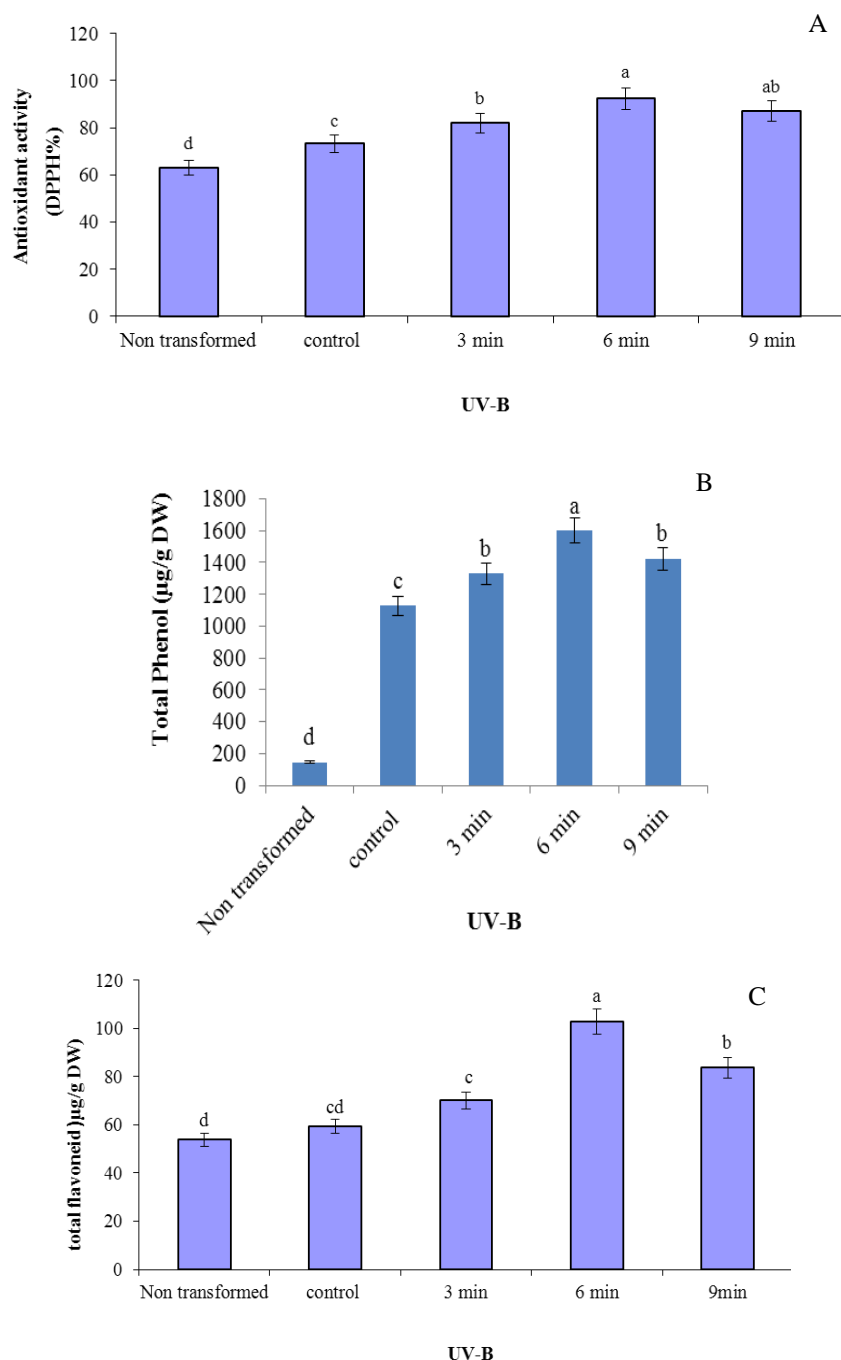
شکل ۴. تأثیر اشعه UV-B بر وزن تر و وزن خشک ریشه‌های موئین زرین گیاه. حرف‌های همسان نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن است.

Figure 4. Effect of UV-B on fresh and dry weight of hairy roots in *D. kotschy*. different letters above each column indicate significant differences ($p < 0.01$) according Duncan's Multiple Range Test.

تأثیر UV-B بر میزان فلاونوئید کل

که به روشنی احتمال بالا را توجیه می‌کند (Gitz *et al.*, 2004). در یک بررسی تأثیر نور UV-B بر میزان ایندول آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین گیاه پروانش بررسی شد و نتایج نشان داد، میزان این ترکیب‌ها افزایش قابل توجهی داشته است (Bernard *et al.*, 2009). تابش UV-B باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز شده و در نتیجه باعث ساخت سینامیک اسید و فعال شدن مسیر زیست‌ساخت فلاونوئیدها می‌شود که از این راه به احتمال بر میزان فلاونوئیدها افزوده شده و تنش به دست آمده را کاهش می‌دهد (Inze & Montagu, 2002). یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیق Wellman (1971) در تجمع فلاونوئیدها در کشت یاخته و بافت گیاه جعفری و سویا تحت تأثیر UV-B و Gould *et al.* (2000) همخوانی دارد.

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از تأثیر UV-B بر میزان فلاونوئید کل نشان داد، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) قابل مشاهده است. بیشترین افزایش در میزان فلاونوئید کل مربوط به زمان ۶ دقیقه با میانگین $102/83 \mu\text{g/g DW}$ بود (شکل C-۵). کمترین میزان فلاونوئید کل نیز مربوط به ریشه‌های غیرتراریخت ($53/83 \mu\text{g/g DW}$) است. اشعه فرابنفش UV-B پاسخ‌های حفاظتی را درون گیاهان فعال می‌کند (Giordano *et al.*, 2003). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد، ترکیب‌های فنلی جذب‌کننده UV و فلاونوئیدها در پاسخ به اشعه فرابنفش در بیشتر گیاهان به میزان زیاد افزایش می‌یابد (Hofmann *et al.*, 2000). کاربرد بازدارنده‌های ساخت فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز در عدسک آبی، باعث افزایش حساسیت آن نسبت به تابش UV-B شده است



شکل ۵. تأثیر اشعه UV-B بر (A) فعالیت پاداکسندگی (B) فنل کل و (C) فلاونوئید کل ریشه‌های موئین زرين گیاه. حرف‌های همسان نشان‌دهنده نبود اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن است.

Figure 5. Effect of UV-B on (A) antioxidant activity, (B) total phenol, (C) total flavonoid of hairy roots in *D. kotschy*. different letters above each column indicate significant differences ($p < 0.01$) according Duncan's Multiple Range Test.

زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* انجام شد. نتایج تجزیه PCR برای ریشه‌های تراریختی احتمالی، حضور نواری حدود به طول 780 bp مربوط به ژن *rol B* برای ریشه‌های به دست آمده از تلقیح با باکتری *A. rhizogenes* را نشان داد، هم‌اندازه

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین

امکان شناسایی ریشه‌های موئین بر پایه ویژگی‌های ظاهری مانند رشد سریع و انشعاب‌های جانبی فراوان وجود دارد با این حال به منظور تأیید انتقال ژن *rol* در بافت ریشه‌های موئین تولیدی، تجزیه واکنش

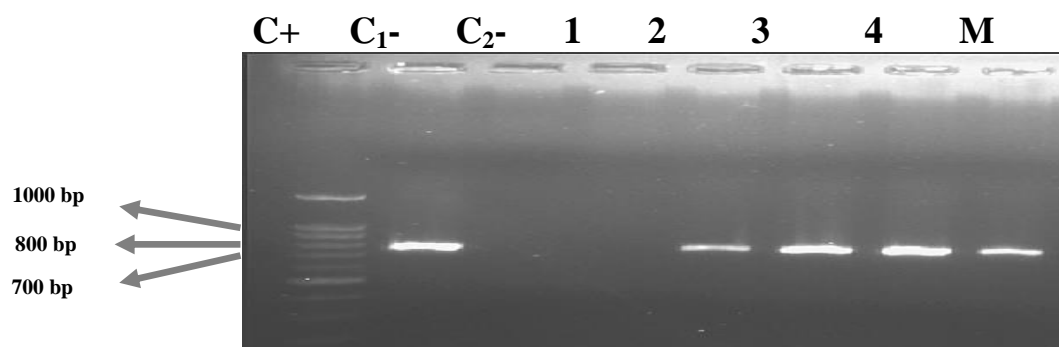
قطعه‌های افزونش شده در نمونه کنترل مثبت (باکتری *A. rhizogenes*) بود، در صورتی که در ریشه‌های شاهد به علت نبود تلقیح با *A. rhizogenes* هیچ نواری مشاهده نشد (شکل ۶).

تغییرپذیری میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین زرين گیاه تیمار شده با اشعه UV-B

میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های غیرتراریخت و ریشه‌های موئین تحت تأثیر UV-B به وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد (شکل ۷). کمترین میزان رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت، $13/8 \mu\text{g} / \text{mg DW}$ و بیشترین میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با UV-B با زمان ۶ دقیقه به میزان $34/9 \mu\text{g} / \text{mg DW}$ است (شکل ۶). در این تحقیق تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین احتمال دارد به دلیل برخی تغییرپذیری‌های بیوشیمیایی در سوخت‌وساز گیاه- آگروباکتریوم رایزوتنز باشد (Gandi and Giri., 2012). زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما مواد غذایی و شرایط محیطی نیز بر آن مؤثر است (Sevon & Oksman-Caldentey, 1992). به کارگیری محرک‌ها یکی از موفق‌ترین راهبرد (استراتژی)ها در افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله رزمارینیک اسید هستند. محرک‌ها به عنوان محرک‌های دفاعی و القاءکننده تنش در گیاه تعریف می‌شوند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با زیست‌ساخت ترکیب‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌شوند و میزان تأثیر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه به طور معمول به غلظت و زمان وابسته است (Wen Wan & Yong Wu, 2010). زیست‌ساخت رزمارینیک اسید از هر دو مسیر فنیل پروپانوئید و تریوزین انجام می‌گیرد. این مسیر توسط شش آنزیم اصلی و یک آنزیم جانبی کنترل می‌شود (Petersen et al., 1993; Petersen, 1997). Yang et al. (2006) تجمع رزمارینیک اسید و فعالیت آنزیم‌های تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) را در *Salvia miltiorrhiza* تحت تیمار عصاره مخمر و Ag^+ بررسی کردند. نتایج نشان داد، هر دو محرک منجر به تجمع رزمارینیک اسید شد همچنین با افزایش تجمع رزمارینیک اسید فعالیت آنزیم TAT افزایش و آنزیم PAL کاهش یافت.

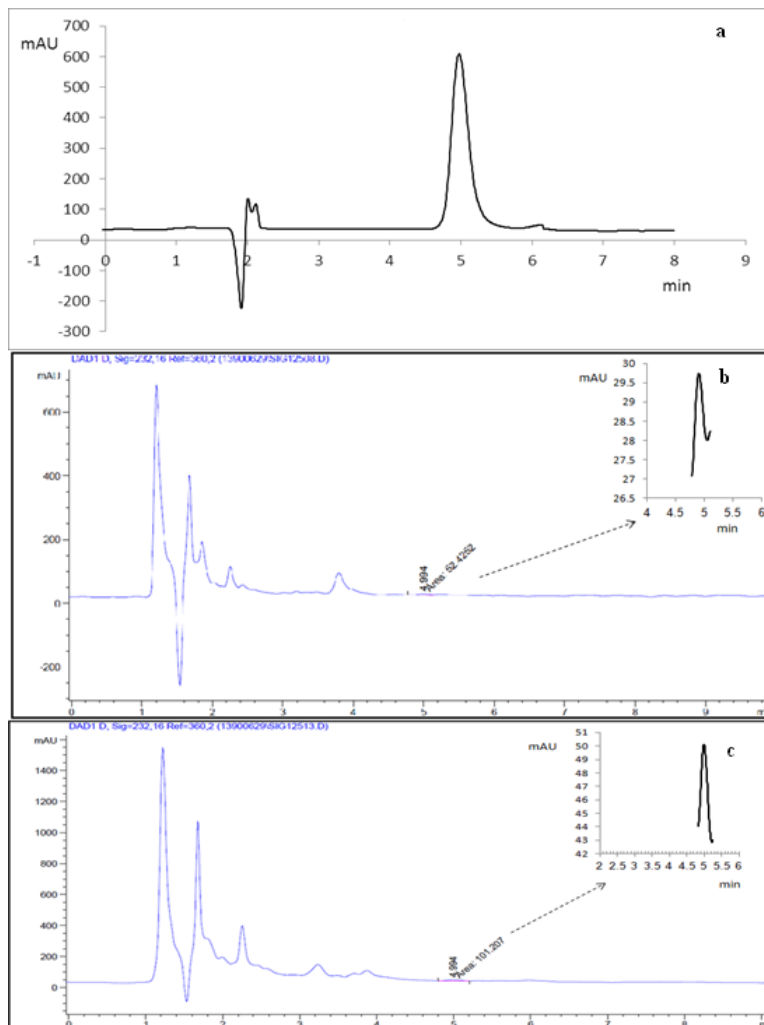
تغییرپذیری میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین زرين گیاه تیمار شده با اشعه UV-B

میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های غیرتراریخت و ریشه‌های موئین تحت تأثیر UV-B به وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد (شکل ۷). کمترین میزان رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت، $13/8 \mu\text{g} / \text{mg DW}$ و بیشترین میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با UV-B با زمان ۶ دقیقه به میزان $34/9 \mu\text{g} / \text{mg DW}$ است (شکل ۶). در این تحقیق تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین احتمال دارد به دلیل برخی تغییرپذیری‌های بیوشیمیایی در سوخت‌وساز گیاه- آگروباکتریوم رایزوتنز باشد (Gandi and Giri., 2012). زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما مواد غذایی و شرایط محیطی نیز بر آن مؤثر است (Sevon & Oksman-Caldentey, 1992). به کارگیری محرک‌ها یکی از موفق‌ترین راهبرد (استراتژی)ها در افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله رزمارینیک اسید هستند. محرک‌ها به عنوان محرک‌های دفاعی و القاءکننده تنش در گیاه تعریف می‌شوند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با زیست‌ساخت ترکیب‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌شوند و میزان تأثیر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه به طور معمول به غلظت و زمان وابسته است (Wen Wan & Yong Wu, 2010). زیست‌ساخت رزمارینیک اسید از هر دو مسیر فنیل پروپانوئید و تریوزین انجام می‌گیرد. این مسیر توسط شش آنزیم اصلی و یک آنزیم جانبی کنترل می‌شود (Petersen et al., 1993; Petersen, 1997). Yang et al. (2006) تجمع رزمارینیک اسید و فعالیت آنزیم‌های تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) را در *Salvia miltiorrhiza* تحت تیمار عصاره مخمر و Ag^+ بررسی کردند. نتایج نشان داد، هر دو محرک منجر به تجمع رزمارینیک اسید شد همچنین با افزایش تجمع رزمارینیک اسید فعالیت آنزیم TAT افزایش و آنزیم PAL کاهش یافت.



شکل ۶. تجزیه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت زرين گیاه. M: DNA مارکر 1kb (Fermentase); lane C⁺: باکتری آگروباکتریوم سویه 15834 به عنوان کنترل مثبت. C₁⁻: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی اول. C₂⁻: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی دوم. رگه ۱-۴: ریشه‌های موئین القاء شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای توسط سویه 15834 آگروباکتریوم رایزوتنز.

Figure 6. PCR amplification of *rolB* gene in hairy roots of *D. kotschy*. Lane M – Molecular size marker (1 kb ladder Fermentase); lane C⁺; *A. rhizogenes* 15834 strain as a positive control. C₁⁻ – PCR amplification without DNA template, C₂⁻ Non transformed roots as negative control; lanes 1–4 – Transgenic hairy roots induced on 1 week leaf explants infected by *A. rhizogenes* 15834 strains; lane.



شکل ۷. محتوی رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین زربین گیاه تیمار شده با اشعه UV (۶ دقیقه). (A) استاندارد، (B) ریشه غیر ترا ریخت، (C) ریشه ترا ریخت

Figure 7. Rosmarinic acid content of UV-B treated (6 min) hairy roots. (A) standard, (B) non-transformed roots, and (C) transformed hairy roots of *D. kotsch* grown on 1/2 MS medium.

فعالیت پاداکسنده مربوط به زمان ۶ دقیقه با ۹۲/۳۳ درصد و کمترین میزان فعالیت پاداکسنده نیز در ریشه‌های غیر ترا ریخت (۶۳ درصد) دیده شد. میزان تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های ترا ریخت تیمار شده با اشعه UV-B بیش از ۲/۵ برابر ریشه‌های غیر ترا ریخت ثبت شد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه و آزمایشگاه شیمی آلی جهاد دانشگاهی ارومیه برای ایجاد شرایط مناسب انجام PCR و HPLC، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بهینه‌سازی روش‌های مختلف القای ریشه موئین نشان داد، تولید ریشه موئین در گیاه زربین گیاه تحت تأثیر نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و محیط کشت است. بیشترین درصد القاء ریشه در ریزنمونه برگ یک‌هفته‌ای (۵۶/۶۶ درصد) و کمترین درصد القاء ریشه در ریزنمونه برگی چهار هفته‌ای (۱۵ درصد) ثبت شد. رشد ریزنمونه‌ها نیز در محیط کشت پایه مختلف متغیر بوده و بیشترین زیست‌توده در محیط کشت ۱/۴ موراشیگ و اسکوک به دست آمد. تأثیر UV-B بر میزان وزن تر، وزن خشک، فعالیت پاداکسنده، فنل کل، فلاونوئید و رزمارینیک معنی‌دار بوده و بیشترین

REFERENCES

1. Agrawal, S. B. (1992). Effects of supplemental UV-B radiation on photosynthetic pigment, protein and glutathione contents in green algae. *Environmental and Experimental Botany*, 32 (2), 137-143.
2. Allen, D. J., Nogues, S. & Baker, R. N. (1998). Ozonedepletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 328, 1775-1788.
3. Bensaddek, L., Gillet, F., Nava-Saucedo, J. E. & 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.
4. Bischof, K., Peralta, G., Krabs, G., Van de Poll, W. H., PerezLlorens, J. L. & Anneke, M. (2002). Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva* communities from southern Spain. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2411-2421.
5. Chawla, H. S. (2000). *Introduction to plant biotechnology*. (3rd ed.). CRC Press Book.
6. Chiou, A., Karathanos, V. T., Mylona, A., Salta, F. N., Preventi, F. & Andrikopoulos, N. K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 102, 516-522.
7. Dhakulkar, S. & Bhargava, S. (2004). Induction of hairy roots in *Gemelina arborea*, using *Agrobacterium rhizogens*. *Plant Cell Reports*, 49, 105-107.
8. Dai, Q., Yan, B., Huang, S., Liu, X. & Peng, S. (1997). Response of oxidative stress defense system in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UVB radiation. *Physiologia Plantarum*, 101, 301-308.
9. 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. (in Farsi)
10. Fattahi, M. & Fattahi, B. (2011). *Medicinal plant*. Jahad Daneshgahi, Tehran. Iran.
11. Furness, N., Upadhyaya, M. K. & Ormrod, D. P. (1999). Seedling growth and leaf surface morphological responses of three rangeland weeds to ultraviolet-B radiation. *Weed Science*, 47, 427-434.
12. Ghahreman, A. (2000). *Botanical basic anatomy and morphology of vegetative organs and operates the world's largest plant them in groups*. (5th ed.). Tehran University Press.
13. Gandi, S. & Giri, A. (2012). Genetic transformation of *Centella asiatica* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Pharmacognosy*, 3(2), 82-84.
14. Gould, K. S., Markham, K. R., Smith, R. H. & Goris, J. J. (2000). Functional role of anthocyanine in the leaves of *Quintinia serrate*. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1107-1115.
15. Gitz, D. C., Gitz, L. L., McClure, J. W. & Huerta, A. J. (2004). Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia*. *Journal of Experimental Botany*, 55, 919-927.
16. Giordano, C. V., Mori, T., Sala, O. E., Scope, A. L., Caldwell, M. M. & Ballare, C. L. (2003). Functional acclimation to solar UV-B radiation in *Gunnera magellanica*, a native plant species of *Southernmost Patagonia*. *Plant, Cell and Environment*, 26, 2027-2036.
17. Hoekema, A., Hirsch, P. R. & Hooykaas, P. J. J. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
18. Hopkins, L., Bond, M. A. & Tobin, A. K. (2002). Ultraviolet-B radiation reduces the rates of cell division and elongation in the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant, Cell and Environment*, 25, 617-625.
19. Hofmann, W., Swinny, E. E., Bloor, S. J., Markham, K. R., Ryan, K. G., Campbell, B. D., Jordan, B. R. & Fountain, D. W. (2000). Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Annals of Botany*, 86:527-573.
20. Hoque, E. & Remus, G. (1999). Natural UV screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* L. karts) needles. *Photochemistry and Photobiology*, 69, 177-192.
21. Inze, D. & Montagu, M. V. (2002). *Oxidative stress in plants*. (1st ed.) Taylor and Francis press.
22. Kabirnotaj, S., Zolali, J., Nematzade, G. H. & Shokri, A. (2012). Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(2), 75-61. (in Farsi)
23. Karmarkar, S. H. & Keshavachandran, R. (2001). Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma ada-kodien* K. Shum-A vulnerable medicinal plant. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 1263-1267.
24. Khan, S., Irfan, Q. M., Kamaluddin, A. T. & Abdin, M. Z. (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology*, 6, 175-178.
25. Khezri, M. (2013). The impact of some chemical triggers production of hairy root induction of β Caryophyllene *Teucrium* (*Teucrium polium* L). M.Sc. thesis. Agriculture faculty of Orumiyeh University, Iran. (in Farsi)

26. Liu, C. Z., Guo, C., Wang, Y. C. & Ouyang, F. (2002). Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*, 38(4), 581-585.
27. Mapelli, S., Shorina, M., Brambilla, I. & kuznetsov, V. (2006). Biochemical and physiological events following exposure to UV-B radiation in ice plants. *Plant Physiology*, 6, 33-44.
28. Mashayekhi, K. (2007). *Somatic embryogenesis Plant*. Makhtomgholi Fraghi (Sarli) press.
29. Nourozi, A. (2013). *Effect of different strains of Agrobacterium Rayzvzhnz to induce hairy root in the Mexican goal (Agastache foeniculum)*. Msc. Thesis. Agriculture faculty of Orumiyeh University, Iran. (in Farsi)
30. Park, S. U. & Facchini, P. J. (2000). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L. and *California poppy*, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 347, 1005-1016.
31. Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B. & Meinhard, J. (1993). Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta*, 189, 10-14.
32. Petersen, M. (1997). Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry*, 45, 1165-1172.
33. Pirian, K., Piri, K. & Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline, sproduction. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(3), 642-649.
34. Qing, L., Callaghan, T. V. & Yuanyuan, Z. (2004). Effects of Elevated Solar UV-B Radiation from Ozone Depletion on Terrestrial Ecosystems. *Journal of Mountain Science*, 1(3), 276-288.
35. Rahnama, H., Hasanloo, T., Shams, M. K. & Sepehrifar, R. (2008). Silymarrin production in hairy root culture of *Silybum marianum* Gearth. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6, 113-118. (in Farsi)
36. Saravankumar, A., Aslam, A. & Shajahan, A. (2012). Developmant and optimaization of hairy root cultur systems in *Withania somnifera* (L.) Dunal for withaferin-A production. *African Journal of Biotechnology*, 11(89), 16412-16420.
37. Sevon, N. & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68, 859-868.
38. Shin, Y., Liu, R. H., Nock, J. F., Holliday, D. & 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.
39. Shirazi, Z., Piri, K., Mirzaie, A. & Hasanloo, T. (2012). Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4640-4646. (in Farsi)
40. Sidhu, Y. (2010). In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 432-449.
41. Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
42. Solemani, T., Keyanfar, M., Piri, H. & Hasanloo, T. (2012). Morphological Evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annu* L and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2, 1005-1013. (in Farsi)
43. Wellman, E. (1971). Phytochrome-mediated flavon glycoside synthesis in cell suspension culture of *Petroselinum hortense* after pre irradiation with ultraviolet light. *Planta*, 101, 283-286.
44. Wen Wang, J. & Yong Wu, J. (2010). Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Application Microbiology Biotechnology*, 88, 437-449.
45. Xiao, Y., Di, P., Chen, J., Liu, Y., Chen, W. & Zhang, L. (2009). Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (Smhppd) from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Molecular Biology Reports*, 36, 2019-2029.
46. Yang, S. H., Liu, X. F., Guo, D. A. & Zhen, J. H. (2006). Induction of hairy roots and anthraquinone production in *Rheum palmatum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 18, 1496-1499.