Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Optimization of hairy root induction conditions in radish (*Raphanus sativus* L.) and evaluation of biosynthesis ability of secondary metabolites in hairy root cultures

Zahra Gholami

MSc Student, Department of plant breeding and biotechnology, Faculty of crop sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: Gholami.zahra88@gmail.com

Nadali Babaeian Jelodar

Professor,Department of plant breeding and biotechnology, Faculty of crop sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: n.babaeiyan@umz.ac.ir

Ali Pakdin Parizi

*Assistant Professor,Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: a.pakdin@sanru.ac.ir

Mehdi Dadmehr

Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University,Tehran, iran Email: **mdadmehr@ut.ac.ir**

Abstract

Objective

Agrobacterium rhizogenes results in the formation of hairy root phenotype in plants. The hairy roots have high growth rate and genetic stability and able to produce plant metabolites. In this study, the optimum parameters for induction and growth conditions of radish hairy roots has been investigated.

Materials and methods

The effect of explant type (leaves, stems and cultures), co-culture medium (MS, ½MS, B5 and ½B5) and *A. rhizogenes* strains (A4, ATCC15834 and LBA9402) were evaluated based

on factorial experiments in a CRD design with three replications. Transformation percentage was calculated based on the number of appearing hairy roots and was considered as an index for determining the optimum conditions. Transgenic nature of hairy roots was confirmed by PCR and specific primers for *rol*B and *vir*D genes. The dry and fresh biomass and the amount of phenolic and flavonoid compounds of hairy roots were measured.

Results

ATCC15834 had the highest ability to induce hairy roots in radish under different conditions. The ½B5 medium was the most suitable co-culture medium and the cotyledon explant was the best plant material for induction of radish hair roots. The growth rate among hairy root clones was significantly different based on dry and fresh biomass and the highest amount of phenolic and flavonoid compounds in hairy root cultures was 2.9 and 3.6 times more than normal plant, respectively.

Conclusions

The optimum conditions for induction of hairy roots must be determined in each plant and the hairy root cultures of radish have a high capability to produce secondary metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, flavonoid compounds, hairy root, phenolic compounds, radish

Citation: Gholami Z, Babaeian Jelodar N, Pakdin Parizi A, Dadmehr M (2019). Optimization of hairy root induction conditions in radish (*Raphanus sativus* L.) and evaluation of biosynthesis ability of secondary metabolites in hairy root cultures. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 99-118.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 99-118.
DOI: 10.22103/jab.2019.13579.1118
Received: February 10, 2019; Accepted: April 28, 2019
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بهینه‌سازی شرایط القای ریشه‌موئین در تربچه (*Raphanus sativus* L.) و بررسی توانایی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های ریشه موئین

زهرا غلامی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. ایمیل: Gholami.zahra88@gmail.com

نادعلی بابائیان جلودار

استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. ایمیل: n.babaeiyan@umz.ac.ir

علی پاکدین پاریزی

* نویسنده مسئول: استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،مازندران. ایمیل: a.pakdin@sanru.ac.ir

مهدی دادمهر

استادیار نانوبیوتکنولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. ایمیل: mdadmehr@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: 1397/11/21، تاریخ پذیرش: 1398/02/08

چکیده

هدف: آگروباکتریوم رایزوژنز سبب ایجاد فنوتیپ ریشه موئین در گیاهان می‌شود. ریشه‌های موئین قابلیت رشد و ثبات ژنتیکی بالایی داشته و قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. در این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی شرایط القا و رشد ریشه‌های موئین گیاه تربچه، تأثیر عوامل مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: اثر نوع ریز نمونه (برگ، ساقه و کوتیلدون)، محیط همکشتی (MS, ½ MS, B5 و ½ B5) و سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (A4, ATCC15834 و LBA9402) بر القای ریشه موئین بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. درصد تراریختی بر اساس تعداد ریشه‌های موئین ظاهر شده در تیمارهای مختلف محاسبه

و به‌عنوان شاخص برای تعیین شرایط بهینه القای ریشه‌های موئین در نظر گرفته شد. تائید ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*B و *vir*D انجام شد. زیست‌توده تر و خشک و مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در ریشه‌های موئین اندازه‌گیری شد.

نتایج: سویه ATCC15834 بیشترین توانایی القای ریشه موئین در گیاه تربچه را داشت. محیط کشت B5 ½ مناسب‌ترین محیط همکشتی و ریز نمونه کوتیلدون بهترین نمونه گیاهی برای القای ریشه‌های موئین تربچه بود. میزان رشد ریشه‌های موئین بر اساس زیست‌توده تر و خشک با هم تفاوت معنی‌داری نشان داد و بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت‌های ریشه موئین به ترتیب 2/9 و 3/6 برابر بیشتر از گیاه طبیعی بود.

نتیجه‌گیری: شرایط بهینه برای القای ریشه موئین در هر گیاه باید تعیین شود و کشت‌های ریشه موئین گیاه تربچه از توانایی بالایی برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، تربچه، ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات فنولی، ریشه موئین

مقدمه

تربچه (*Raphanus sativus* L.) گیاهی غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها، گلوکوزینولیدها، ایزوتیوسیانات‌ها، فیبرهای محلول رژیمی و ویتامین‌های B و C می‌باشد (Gutierrez & Perez 2004; Hara et al. 2009; Gururaj et al. 2006). این ترکیبات دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد از جمله خواص ضد جهشی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و همچنین تحریک‌کنندگی هضم و برطرف‌کننده اختلالات معده می‌باشند (Esaki & Onozaki 1982; Hecht et al. 2000; Hashem Saleh 1999; Kapoor 2000). با استفاده از روش‌های مختلف زیست‌فناوری مانند کشت‌های سلول، بافت و ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی امکان‌پذیر است. در کشت سلول و بافت، به ویژه در مراحل قبل از تمایز بافت‌ها و اندام‌ها، ممکن است میزان تولید برخی از متابولیت‌ها با گیاه کامل تفاوت داشته و آنزیم‌هایی که مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها را در گیاه کنترل می‌کنند، در این کشت‌ها در مقایسه با گیاه فعالیت یکسانی نداشته باشند (Dechaux et al. 2005). برای غلبه بر این محدودیت‌ها و فراهم نمودن امکان تولید پیوسته متابولیت‌های ثانویه از کشت ریشه‌های موئین به دلیل توانایی رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه و سهولت نگهداری استفاده می‌شود (Giri et al. 2000). میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های ریشه موئین می‌تواند با گیاه مادری برابر و در برخی موارد بیشتر نیز باشد (Mulabagal et al. 2004). ریشه‌های موئین تربچه برای نخستین بار توسط Hanhong Bae et al. (2012) تولید شده و میزان تولید ترکیبات آنتوسیانینی در یکی از کلون‌های ریشه موئین 26 برابر بیش از گیاه مادری گزارش شد. در تحقیقی دیگر Beyzaei et al. (2015) نشان دادند که میزان ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین گیاه تربچه به طور معنی‌داری نسبت به ریشه‌های

عادی افزایش می‌یابد. فرایند تراریزش بافت‌های گیاهی با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و القای ریشه موئین تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند گونه، سن و نوع بافت گیاهی، نوع سویه و غلظت سوسپانسیون باکتریایی و همچنین حضور ترکیبات فنولی محرک باکتری در محیط القا می‌باشد (Bulgakov et al. 2012). در تحقیق حاضر تأثیر محیط کشت‌های مختلف، نوع ریز نمونه و نوع سویه باکتریایی بر القا و رشد ریشه‌های موئین گیاه تربچه و میزان تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاه تربچه و ریشه‌های موئین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه: بذور تربچه رقم چری بل از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. بذرها به مدت یک دقیقه در الکل 70 درصد (حجمی/ حجمی) غوطه‌ور و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد (حجمی/ حجمی) به مدت 10 دقیقه ضدعفونی شده و در نهایت بطور کامل با آب مقطر استریل آبشویی شدند. بذور ضدعفونی شده در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog 1962) حاوی 3 درصد ساکارز و 0/8 درصد آگار با pH برابر با 5/8 کشت شده و در دمای 2±25 درجه سلسیوس با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی برای تولید گیاهچه‌های استریل نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته از گیاهچه‌های استریل حاصل ریزنمونه‌های کوتیلیدون، برگ و ساقه با اندازه یک سانتی‌متر برای تلقیح با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و القای ریشه موئین استفاده شد.

آماده‌سازی باکتری: از سویه‌های A4، ATCC15834 و LBA9402 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز برای القای ریشه موئین در ریزنمونه‌های گیاه تربچه استفاده شد. سویه‌های باکتری در محیط کشت MYB مایع حاوی 40 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و در دمای 28 درجه سلسیوس و 160 دور در دقیقه کشت داده شدند. سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری برابر با 0/6 در طول موج 600 نانومتر، در دمای 4 درجه سلسیوس و 5000 دور در دقیقه رسوب داده شد. پس از حذف مایع رویی، رسوب باکتری در محیط کشت مایع ½MS حاوی 3 درصد ساکارز و 100 میکرومولار استوسیرینگون حل شد. از این سوسپانسیون برای تلقیح ریز نمونه‌های گیاه تربچه استفاده شد.

القای ریشه‌های موئین: ریزنمونه‌های مختلف در سوسپانسیون باکتری به مدت 15 دقیقه غوطه‌ور شدند. ریز نمونه‌های تلقیح شده پس از حذف باکتری اضافی به چهار محیط همکشتی MS، ½MS، B5 و ½ B5 فاقد هورمون منتقل شدند. محیط‌های همکشتی برای 72 ساعت در دمای 25 درجه سلسیوس و در تاریکی قرار گرفتند. واکشت ریز نمونه‌ها در همان محیط کشت حاوی 500 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به‌منظور حذف باکتری انجام شد. در واکشت‌های بعدی غلظت آنتی‌بیوتیک تا حذف کامل آن به تدریج کاهش یافت. ظهور ریشه‌های موئین در ریز نمونه‌های تلقیح شده به صورت روزانه بررسی و یادداشت برداری

شد. ریشه‌های موئین ظاهر شده به محیط کشت ½MS مایع فاقد هورمون منتقل و در دمای 25 درجه سلسیوس و 120 دور در دقیقه نگهداری شدند.

تائید ماهیت تراریختگی ریشه‌های موئین: برای تائید تراریخته بودن ریشه‌های موئین و عدم آلودگی باکتریایی آن‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های *rol*B و *vir*D استفاده شد. استخراج DNA ژنومی گیاهی براساس روش Porebski et al. (1997) انجام شد. آغازگرهای با توالی ´5-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3´ و ´5- GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3´ برای تکثیر ژن *rol*B و ´5- ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA-3´ و ´5-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3´ برای تکثیر ژن *vir*D استفاده شد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر دو واکنش تکثیر شامل94 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و 35 چرخه با برنامه دمایی 94 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه برای واسرشت‌سازی، 55 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه برای اتصال، 72 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه برای بسط و در نهایت 72 درجه سلسیوس به مدت 7 دقیقه برای بسط نهایی بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

ارزیابی توده زیستی کلون‌های ریشه موئین: بر اساس فنوتیپ و سرعت رشد کلون‌های ریشه مویین تایید شده، شش کلون انتخاب و میزان تولید توده زیستی در آنها بررسی شد. برای این‌منظور 100 میلی‌گرم از کلون‌های مختلف ریشه مویین با سه تکرار به ارلن های 250 میلی‌لیتری حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت ½MS مایع منتقل شد. پس از گذشت یک ماه ریشه‌ها با آب مقطر شستشه شد و پس از آبگیری وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های ریشه موئین در دمای 40 درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شدند و پس از آن نمونه‌ها توزین شدند.

استخراج عصاره: یک گرم از نمونه‌های خشک شده ریشه‌های موئین حاصل از کشت یک ماهه به خوبی پودر شده و با 10 میلی‌لیتر متانول 80 درصد مخلوط و به مدت 24 ساعت در تاریکی تکان داده شد. سپس عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده و از آن برای انجام آزمایشات بعدی استفاده شد.

سنجش ترکیبات فنلی: میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteau و بر حسب اسید گالیک اندازه‌گیری شد (Folin & Ciocalteu 1927). بطور خلاصه، 20 میکرولیتر از محلول عصاره ریشه موئین گیاه تربچه درون لوله آزمایش با 1160 میکرولیتر آب مقطر و 100 میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس 300 میکرولیتر محلول کربنات سدیم (20% وزنی/حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار گرفته و پس از گذشت 30 دقیقه میزان جذب در طول

موج 760 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. نتایج به‌صورت معادل اسید گالیک با واحد میلی‌گرم در گرم وزن خشک گزارش شد.

سنجش ترکیبات فلاونوئیدی: میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی به روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد (Chang et al. 2002). در این روش 0/5 میلی‌لیتر از محلول عصاره با 1/5 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد، 0/1 میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم 10 درصد، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه، جذب مخلوط در 415 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک بیان شد.

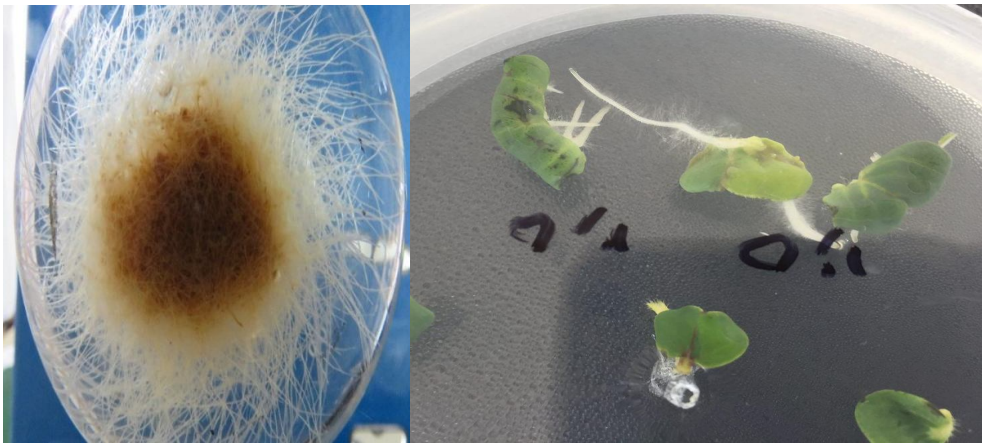
تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایشات بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار شامل 20 ریز نمونه در هر تکرار بود. فراوانی تراریختی به‌صورت درصد بر اساس فرمول ((تعداد ریزنمونه‌های آلوده شده/ تعداد ریشه‌های موئین ظاهر شده) ×100) محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه مقادیر میانگین‌ها از نرم‌افزارSAS 9.4 استفاده شد. از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها استفاده شد.

نتایج

اثر سویه باکتری و نوع ریز نمونه بر القای ریشه موئین: اولین ریشه‌های مویین بعد از گذشت 8 روز از القا در ریزنمونه‌های کوتیلدون تلقیح شده با سویه A4 مشاهده شد (شکل 1). نوع سویه باکتری در تعداد ریشه‌های موئین القاشده در ریز نمونه‌های مختلف تأثیر معنی‌داری داشت (شکل 2). بیشترین تعداد ریشه موئین در ریزنمونه‌های کوتیلدون تلقیح شده با باکتری ATCC15834 و با فراوانی کمتر در نمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های A4 و LBA9402 مشاهده شد ($p<0.05$). درصد تراریختی در ریزنمونه‌های ساقه و برگ نسبت به ریزنمونه‌های کوتیلدونی کمتر بود. کمترین تعداد ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های ساقه و برگ تلقیح شده با سویه‌های ATCC15834 و LBA9402 مشاهده شد، هرچند تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت. بهترین ریزنمونه برای تولید ریشه‌های موئین در تربچه، ریزنمونه‌های کوتیلدونی بود، اگرچه پاسخ این ریزنمونه‌ها به سویه‌های مختلف آگروباکتریوم متفاوت بوده و اختلاف معنی داری در تعداد ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح ریزنمونه‌ها با سویه ATCC15834 و سایر سویه‌ها مشاهده شد (جدول 1).

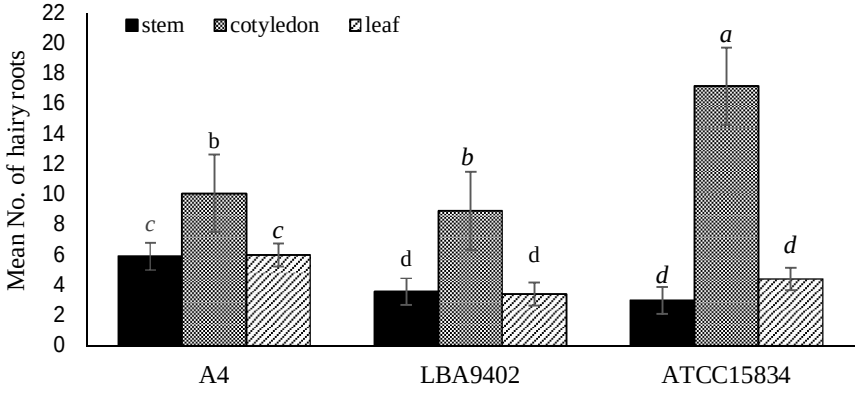
اثر سویه باکتری و نوع محیط کشت بر القای ریشه موئین: همان‌گونه که در شکل (3) مشاهده می‌شود، نوع سویه باکتری در تعداد ریشه‌های موئین القا شده بر روی محیط کشت‌های مختلف تأثیر معنی‌داری داشت. تفاوت معنی‌دار بین میانگین تعداد ریشه‌های موئین ظاهر شده در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری ATCC15834 در محیط کشت ½B5 (9/56) و میانگین تعداد ریشه‌های موئین در ریز نمونه‌های تلقیح شده با باکتری LBA9402 در محیط کشت MS (3/3) مشاهده شد

($p<0.05$). بر اساس نتایج آزمون مقایسه میانگین، محیط کشت ½B5 و سویه ATCC15834 به‌عنوان بهترین محیط کشت و سویه تعیین شد (جدول 1).



شکل 1. ظهور ریشه‌های موئین تربچه در ریزنمونه‌های کوتیلدونی تلقیح شده با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 (سمت چپ) و رشد ریشه های موئین در محیط کشت مایع (سمت راست)

Figure 1. Emergence of *Raphanus sativus* hairy roots in cotyledon explants inoculated with *A. rhizogenes* strain A4 (left) and hairy root growth in liquid medium (right)



شکل 2. تأثیر ریز نمونه (برگ، ساقه و کوتیلدون) و سویه باکتری (A4، LBA9402 و ATCC15834) بر میانگین تعداد ریشه‌های موئین گیاه تربچه. هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند.

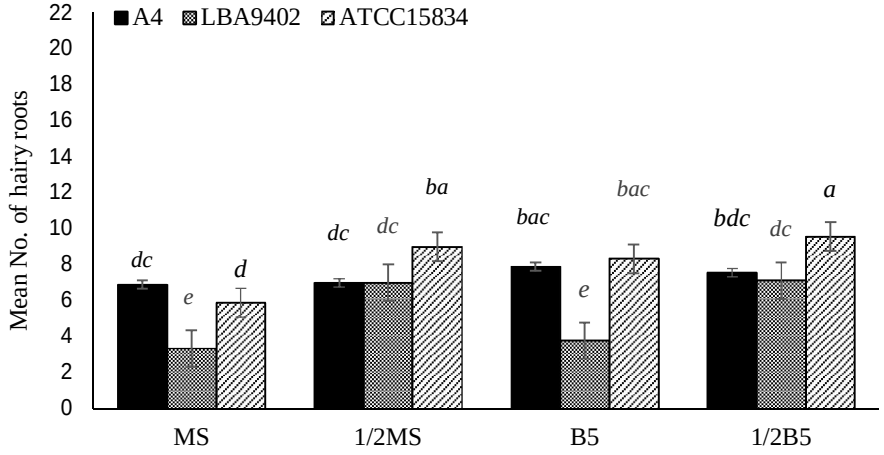
Figure 2. The effect of explant (leaf, stem and cotyledon) and bacterium strain (A4, LBA9402 and ATCC15834) on the mean number of hairy roots in *Raphanus sativus*. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments.

جدول1. تجزیه واریانس اثر متقابل سویه باکتری، محیط کشت و ریز نمونه بر ظهور ریشه مویین در گیاه تربچه

Table 1. Analysis of variance of the interaction among bacterial strain, culture media and explant on the appearance of radish hairy roots

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
Mean square	df	S.O.V.
**79.19	2	سویه باکتریایی Bacterial strain
**707.11	2	ریزنمونه گیاهی explant
**39.17	3	محیط کشت گیاهی culture media
**104.47	4	اثر متقابل سویه و ریز نمونه bacterial strain× explant interaction
**11.70	6	اثر متقابل سویه و محیط کشت bacterial strain× culture media interaction
**23.54	6	اثر متقابل محیط کشت و ریز نمونه explant × culture media interaction
**85.62	12	اثر متقابل سویه باکتری، محیط کشت و ریزنمونه bacterial strain× culture media interaction and explant
2.73	72	خطا error
23.79		ضریب تغییرات Coefficient of variation

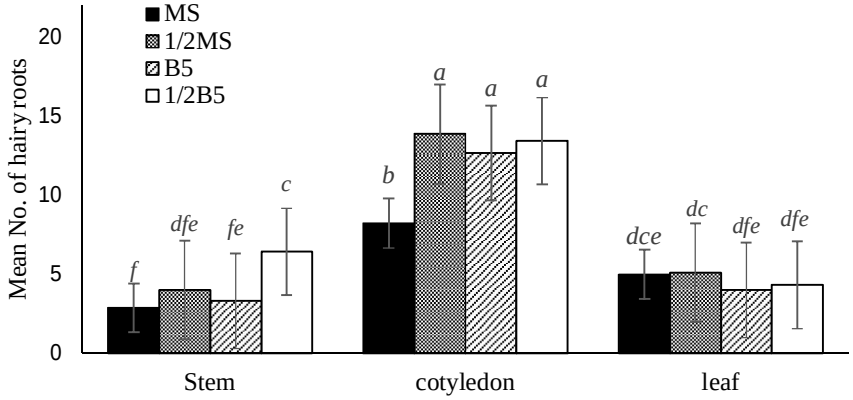
** معنی داری در سطح احتمال 1 درصد



شکل 3. تأثیر محیط همکشتی (MS، ½MS، B5 و ½B5) و سویه باکتری (A4، LBA9402 و ATCC15834) بر میانگین تعداد ریشه‌های موئین ظاهر شده در ریز نمونه‌های مختلف گیاه تربچه. هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 3. The effect of co-culture medium (MS ،½MS ،B5 and ½B5) and bacterium strain (A4, LBA9402 and ATCC15834) on the mean number of hairy roots appeared on different *Raphanus sativus* explants. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments

اثر نوع محیط کشت و نوع ریز نمونه بر القای ریشه موئین: نوع محیط کشت بر تعداد ریشه‌های موئین القا شده در ریزنمونه‌های مختلف تأثیر معنی‌داری داشت (شکل 4). در ریزنمونه‌های کوتیلدون تلقیح شده روی محیط کشت ½B5 بیشترین تعداد ریشه موئین و در ریز نمونه ساقه در محیط کشت MS کمترین تعداد ریشه موئین مشاهده شد ($p<0.05$). بر اساس نتایج آزمون مقایسه میانگین، ریز نمونه کوتلیدون به همراه محیط کشت ½B5 به‌عنوان بهترین ریزنمونه و محیط کشت تعیین شد (جدول 1).

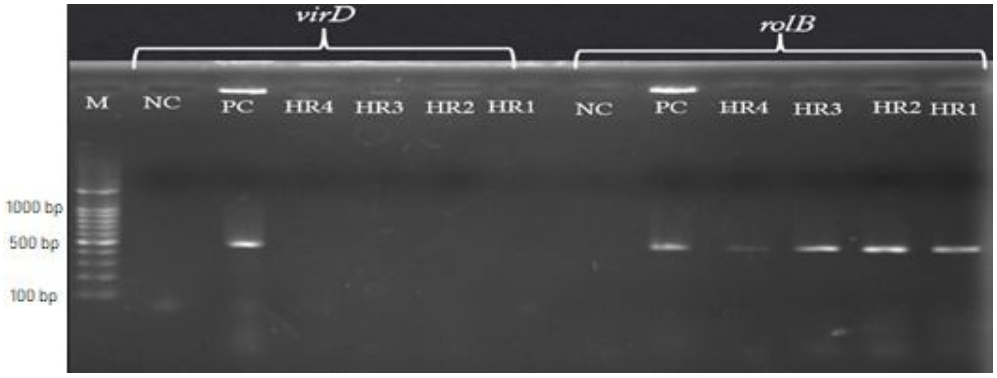


شکل 4. تأثیر نوع محیط کشت (MS، MS ½، B5 و ½B5) و ریز نمونه (برگ، ساقه و کوتلیدون) بر میانگین تعداد ریشه‌های موئین در گیاه تربچه. هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 4. The effect of culture media (MS, ½MS, B5 and ½B5) and explant type (leaf, stem and cotyledon) on the mean number of hairy roots in *Raphanus sativus*. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments

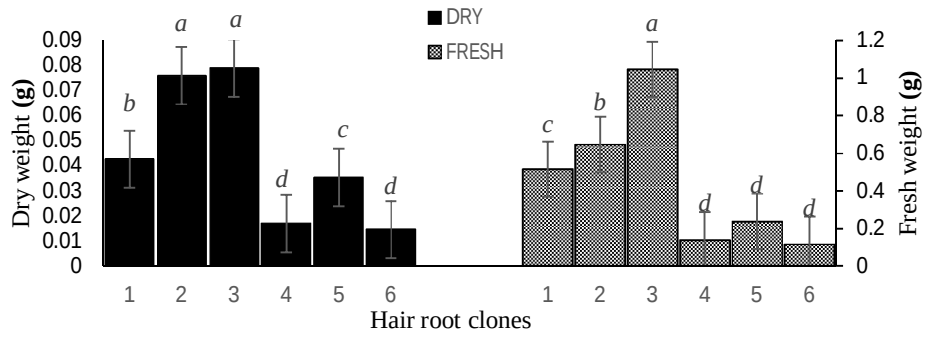
تائید ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین: ماهیت تراریختی کلون‌های مختلف ریشه موئین با استفاده از واکنش PCR با بررسی حضور ژن *rol*B انجام شد. ریشه گیاه به‌عنوان کنترل منفی و باکتری به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. حضور محصولات PCR با اندازه 423 جفت باز نشان دهنده انتقال موفقیت آمیز ژن *rol*B به ژنوم گیاه می‌باشد. هم چنین عدم حضور ژن *vir*D (با اندازه 438 جفت باز) در ریشه‌های موئین عدم وجود آلودگی باکتریایی در ریشه‌های موئین را تایید می‌کند (شکل 5).

بررسی میزان رشد کلون‌های مختلف ریشه موئین: نتایج حاصل از اندازه گیری وزن تر و خشک نشان داد که تفاوت معنی داری از نظر میزان زیست توده بین کلون‌های مختلف ریشه مویین وجود دارد (شکل 6). در بین کلون‌های بررسی شده، کلون‌های شماره 2 و 3 بیشترین میزان وزن خشک را نسبت به سایر کلون‌ها پس از گذشت 40 روز تولید کردند. هرچند وزن تر زیست توده کلون شماره 3 بیش از کلون دیگر بود و با آن اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$).



شکل 5. تائید ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین گیاه تربچه با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B و بررسی عدم آلودگی باکتریایی ریشه‌های موئین با تکثیر ژن *vir*D (M: سایز مارکر؛ NC : کنترل منفی، DNA استخراج شده از ریشه گیاه تربچه؛ PC: کنترل مثبت، DNA استخراج شده از باکتری؛ HR : DNAاستخراج شده از کلون‌های مختلف ریشه موئین گیاه تربچه)

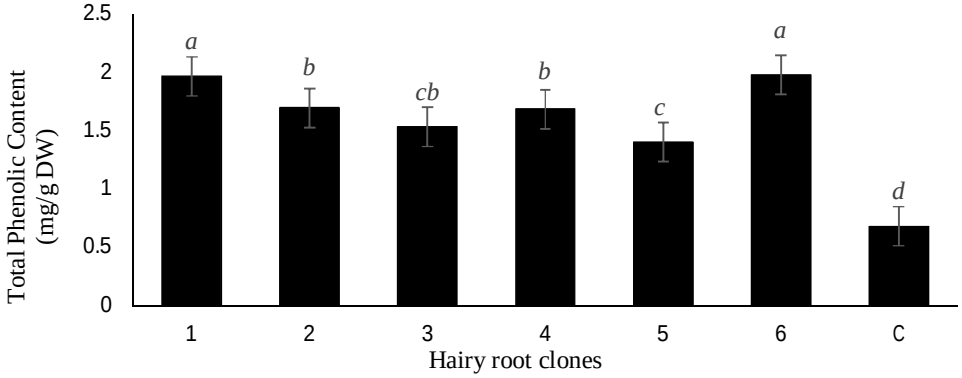
Figure 5. confirmation of transgenic status of the *Raphanus sativus* (L.) hairy roots by *rol*B gene specific primers and evaluation of hairy roots bacterial contamination by *Vir*D gene specific primers. (M: DNA size Marker; NC: negative control, DNA extracted from Radish plant; PC: positive control, DNA extracted from bacteria; HR: DNA extracted from different hairy root clones)



شکل 6. مقایسه وزن تر و خشک زیست توده کلون‌های مختلف ریشه مویین گیاه تربچه. هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 6. Comparison of dry and fresh weight of biomass of different hairy root clones of radish. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments.

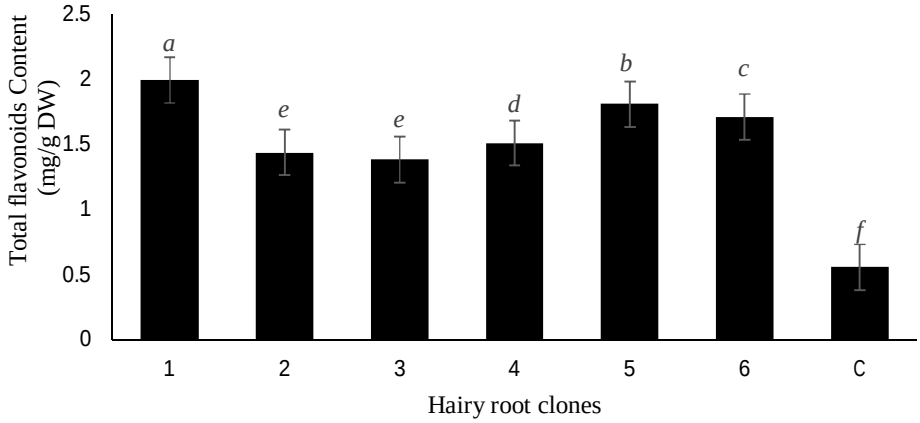
ترکیبات فنلی: نتایج مقایسه میانگین حاصل از اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی در شش کلون مختلف ریشه موئین که براساس مورفولوژی و سرعت رشد انتخاب شده بودند، تفاوت معنی‌داری مقدار این ترکیبات در کلون‌های مختلف ریشه موئین و ریشه گیاه تربچه را نشان داد. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در کلون‌های 1 و 6 به ترتیب با 1/96 و 1/98 میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک و تقریباً سه برابر مقدار ترکیبات فنولی ریشه گیاه تربچه اندازه‌گیری شد. علاوه بر این تفاوت معنی داری بین مقدار این ترکیبات در کلون‌های مختلف ریشه موئین مشاهده شد (شکل 7).



شکل 7. مقایسه مقدار ترکیبات فنولی در ریشه‌های موئین تربچه با گیاه تربچه (C). هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 7. Phenolic compounds content in hairy root clones of *Raphanus sativus* (L.) and normal plant. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments

ترکیبات فلاونوئیدی: مقایسه میانگین نتایج اندازه‌گیری میزان ترکیبات فلاونوئیدی در کلون‌های منتخب ریشه موئین تربچه، تفاوت معنی‌داری مقدار این ترکیبات در کلون‌های مختلف ریشه موئین و ریشه گیاه تربچه را نشان داد. بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در کلون شماره 1 به مقدار 1/99 میلی‌گرم در گرم وزن خشک و تقریباً سه برابر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی ریشه گیاه تربچه اندازه‌گیری شد. مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در کلون‌های مختلف ریشه موئین نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل 8).



شکل 8. مقایسه مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در ریشه‌های موئین تربچه با گیاه تربچه (C). هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح 5% با هم تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 8. Flavonoid compounds content in hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) and normal plant. Each column represents the average of three repeats ± standard error (SE). Different letters above columns indicate significant differences (P < 0.05) among treatments

بحث

یکی از راهکارهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، تراریزش گیاهان با استفاده از ناقل طبیعی آگروباکتریوم رایزوژنز و تولید سیستم کشت ریشه‌های موئین می‌باشد (Guillon et al. 2006). در تحقیق حاضر تأثیر محیط کشت‌های مختلف، نوع ریز نمونه و نوع سویه باکتریایی بر القا و رشد ریشه‌های موئین در گیاه تربچه و میزان تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاه تربچه و ریشه‌های موئین آن مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، سویه باکتری ATCC15834 ، ریز نمونه کوتیلدن و محیط کشت ½B5 بهترین شرایط برای القای ریشه موئین و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه تربچه بودند. انتقال T – DNA از طریق آگروباکتریوم به عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ و نوع ریز نمونه گیاهی، سویه باکتری و عوامل فیزیکی و شیمیایی مانند دما و مدت زمان هم کشتی بستگی دارد (Bulgakov et al. 2012). به دلیل اثر متقابل و برهمکنش گیاه و باکتری، نوع سویه باکتریایی یکی از عوامل تعیین کننده موفقیت تراریزش گیاه می‌باشد. در تحقیق حاضر از سه سویه مختلف ATCC15834، A4 و LBA9402 استفاده شد که سویه ATCC15834، به عنوان بهترین سویه معرفی گردید. در بررسی اثر چهار نوع سویه باکتریایی AR15834، A4، K599 و MSU440 بر القاء ریشه موئین در گیاه سرخارگل، سویه AR15834 به عنوان بهترین سویه معرفی شده است (Khalili et al. 2014). در مطالعه دیگر در زمینه بررسی توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر القای ریشه موئین در گیاه سنبل‌الطیب، سویه A4 بیشترین توانایی را نشان داده است (Pakdin et al. 2013). از

میان سویه‌های A4، R1000، SA79، MTCC532 و MTCC2364 سویه SA79 حداکثر فراوانی ترنسفورماسیون را در *Bacopa monnieri* نشان داده است (Bansal et al. 2014). تفاوت در توانایی آلوده‌سازی و القا ریشه های موئین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز ممکن است به دلیل تفاوت در میزان بیماری‌زایی سویه‌های مختلف باکتری و یا اختصاصیت میزبان باشد (Zehra et al. 1999; Porter & Flores 1991). محیط کشت‌های مختلف (MS، ½MS، B5 و ½B5) از نظر نوع و مقدار ترکیبات تشکیل دهنده با هم متفاوت هستند و بر این اساس می‌توانند بر القای ریشه‌های موئین و همچنین میزان رشد آن‌ها تأثیر داشته باشند. در این مطالعه، محیط ½B5 بهترین ترکیب محیط کشت برای القای ریشه موئین در تربچه بود. تعداد ریشه‌های موئین در محیط کشت MS در مقایسه با سایر محیط های کشت کاهش معنی داری نشان داد. همین روند در محیط کشت B5 نیز مشاهده شد، هر چند تفاوت بین دو محیط MS و B5 نیز از نظر آماری معنی دار بود. تأثیر زیاد نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه توسط Wink et al.(1999) نشان داده شده است. نقش تعیین کننده ترکیبات نیتروژنه در افزایش متابولیت‌ها به حضور نیتروژن به عنوان مولکول اصلی در ترکیب اسیدهای آمینه و بعضی از متابولیت‌های حاصل از آنها نسبت داده شده است (Facchini 2001). مطابق با نتایج تحقیق حاضر، PARIZI et al. (2014) در مطالعه‌ای طی مقایسه اثر سه نوع محیط کشت MS، B5 و N6 بر میزان رشد ریشه‌های موئین در گیاه سنبل‌الطیب، محیط کشت ½B5 را به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت معرفی کردند، آن‌ها همچنین بیان داشتند که ترکیب مختلف محیط کشت و همچنین نسبت منابع نیتروژن تأثیر قابل توجهی در رشد ریشه‌های موئین دارد. Kabirnetaj et al. (2012) طی گزارشی در زمینه‌ی تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر القای ریشه موئین در گیاه کاسنی، محیط کشتMS را مناسب‌ترین محیط کشت معرفی کردند. Bivadi, et al. (2014) در آزمایشی دیگر طی مقایسه اثر چهار نوع محیط کشتMS، ½MS، 1/4MS و B5 بر میزان رشد ریشه‌های موئین در گیاه گل راعی، محیط کشتB5 و ½MS را به‌عنوان مناسب‌ترین محیط کشت معرفی کردند. تفاوت در ژنوتیپ، نیازهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاه و همچنین نوع سویه باکتری مورد استفاده در تعیین محیط کشت بهینه برای القای ریشه موئین اهمیت دارند (Shakti et al. 2008). مطالعات نشان می‌دهد که نوع و سن ریز نمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه موئین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین کننده‌ی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است. در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی و تعیین مناسب‌ترین نوع ریز نمونه‌های گیاهی سه نوع ریز نمونه‌ی مختلف گیاهی (ساقه، کوتلیدون و برگ) مورد بررسی قرار گرفت به طوری که القای ریشه موئین در کوتیلدون ها فراوانی بیشتری نسبت به برگ و ساقه نشان دادند. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه ای Kabirnetaj et al. (2012) نشان دادند که بهترین نوع ریز نمونه در القای ریشه موئین گیاه کاسنی ریز نمونه کوتلیدون است، آن‌ها همچنین بیان داشتند با افزایش سن ریز نمونه‌های گیاهی، توانایی سلول‌ها برای پذیرش ژن بیگانه کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری توده زیستی کلون‌های ریشه موئین، تفاوت قابل توجهی بین کلون‌های مختلف از نظر میزان رشد و وزن تر و خشک زیست توده مشاهده شد. Cho et al. (1998) بیان داشتند که تنوع در سرعت رشد بین کلون‌های مختلف ریشه مویین می‌تواند به تعداد نسخه‌های درجی T-DNA، میزان بیان ژنهای *rol* و دیگر ژنهای موجود روی T-DNA و اثرات جانبی تلفیق T-DNA

در ژنوم گیاه نسبت داده شود. تنوع قابل ملاحظه‌ای در سرعت رشد، تجمع متابولیت‌های ثانویه و بازدهی 45 کلون ریشه مویین گیاه *Duboisia leichhardtii* گزارش گزارش شده است (Mano et al. 1989). در تحقیقی دیگر کلون‌های ریشه مویین گیاه درمنه خزری بر اساس ویژگی‌های رشدی به گروه‌هایی با انشعابات فراوان، سرعت رشد خوب و غیر کالوس‌زا و کلون‌های تولید کننده کالوس با سرعت رشد متفاوت تقسیم‌بندی شدند (Soleimani et al. 2012). در سال‌های اخیر کشت ریشه‌های موئین به‌منظور تولید متابولیت های ثانویه در برخی از گونه‌های گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است (Srivastava et al. 2007). میزان تولید ترکیبات ثانویه در ریشه‌های موئین بالاتر از ریشه‌های طبیعی یا سایر بافت‌ها است. بنابراین ریشه‌های موئین یک ابزار قدرتمند جهت انجام تحقیقات به‌منظور بالا بردن میزان تولید متابولیتهای ثانویه و حتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شوند (Bulgakov et al. 2012). نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوت معنی‌دار میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در ریشه‌های موئین نسبت به گیاه طبیعی را نشان داد. در تحقیق دیگر که در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های ریشه موئین تربچه انجام شده است نیز افزایش معنی‌دار میزان ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین نسبت به ریشه‌های عادی نشان داده شده است (Beizaee et al. 2015). در تحقیق دیگر، Habibi et al. (2015) افزایش تولید برخی از اسیدهای فنلی در ریشه‌های موئین در مقایسه باریشه‌های شاهد در گیاه گون را نشان داده‌اند. Victor et al. (2005) بیان داشتند که تراریختی توسط آگروباکتریوم رایزوژنز سبب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعال شدن سیستم‌های دفاعی می‌شود.

نتیجه‌گیری

ریشه‌های موئین مسیرهای بیوسنتزی و فعال موجود در ریشه‌های طبیعی و حتی سایر اندام‌های گیاهی را دارا می‌باشند. این ریشه‌ها به دلیل ثبات ژنتیکی و بالا بودن سرعت رشد و دارا بودن مسیرهای بیوسنتزی برای تولید متابولیت‌های ثانویه به خصوص متابولیت‌های با خاصیت دارویی سودمند هستند. در برخی موارد میزان تولید این متابولیت‌ها در ریشه‌های موئین بالاتر از ریشه‌های طبیعی یا سایر بافت‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تولید ریشه‌های موئین در گیاه تربچه به‌میزان زیادی تحت تاثیر شرایط القا بوده، بنحویکه از میان عوامل مورد بررسی محیط کشت ½B5 سویه ATCC15834 و ریز نمونه کوتلیدون شرایط بهینه برای تولید کشت‌های ریشه موئین در این گیاه می‌باشند.

منابع

بیضایی سعید، صفی پور افشار اکبر، نعمت پور فاطمه (1394) تولید ترکیبات فنلی درکشت ریشه‌های مویین گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.). مجله زیست شناسی ایران. دوره 28. 3، 335-327.

References

Bae H, Kim YB, Park NI et al. (2012) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of radish (*Raphanus sativus* L. cv. Valentine) for accumulation of anthocyanin. Plant Omics 5, 381-385.

Bansal M, Kumar A, Reddy MS (2014) Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and 'bacoside A' production from *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Acta Physicochim URSS 36, 2793-2801.

Beizaee S, Safipour A, Nematpour F (2015) Production of phenolic compounds in hairy roots culture of Radish (*Raphanus sativus* L.). Iran J Biol 28, 327–335.

Bivadi V, Zakaria R, Zare N et al. (2014) Effects of different tissue culture conditions in Hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L. Intl J Agri Crop Sci 7, 646-653.

Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Veremeichik, GN et al. (2012) The *rol*B gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. Plant Physiol 158, 1371-1381.

Chang CC, Yang MH, Wen HM et al. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal 10, 178-182.

Cho HJ, Widholm JM, Tanaka N et al. (1998) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus Sinicus* (Chinese milk). Plant Sci 138, 53-65.

Dechaux C, Boitel-Conti M (2005) A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. Acta Biol Cracov Bot 47, 101-107.

Esaki H, Onozaki H (1982) Antimicrobial action of pungent principles in radish root (*Raphanus sativus*). Eiyo to shokuryo= J JPN Soc Food Nutr. 35, 207-211.

Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52, 29–66.

Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J Biol Chem 73, 627–650.

Giri A, Narasu ML (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotech Adv 18, 1-22.

Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK et al. (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. Curr Opin Pharmacol 9, 341-346.

Gururaj HB, Kumar V, Prasad BCN et al. (2006) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electron J Biotech 9, 349-357.

Gutiérrez RMP, Perez RL (2004) *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. Sci World J 4, 811-837.

Habibi S, niknam V, Ebrahimzadeh H et al. (2015) Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation in *Astragalus compactus*. Iran J Plant Res 27, 804–810.

Hara M, Ito F, Asai T et al. (2009) Variation in amylase activities in radish (*Raphanus sativus*) cultivars. Plant Eng 64, 188-192.

Hashem FA, Saleh MM (1999) Antimicrobial components of some cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). Phytother Res 13, 329-332.

Hecht SS, Kenney, PM, Wang M et al. (2000) Effects of phenethyl isothiocyanate and benzyl isothiocyanate, individually and in combination, on lung tumorigenesis induced in A/J mice by benzo [a] pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. Cancer J Sci Am 150, 49-56.

Kabirnetaj S, Zolala J, Nematzadeh GA et al. (2012) Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. J Agri Biotech 4, 61–75.

Kapoor LD (2000) Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC Press Boca Raton; Florida 1–424.

Khalili S, Moieni A, Abdoli M (2014) Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, culture medium, age and type of explant on hairy root induction in *Echinacea angustifolia*. Iran J Genet Plant Breed 3, 56-49.

Mano Y, Ohkawa H, Yamada Y (1989) Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci 59, 191–201.

Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures- an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Intel J Appl Sci Eng 2, 29-48.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol plant 15, 473-497.

Parizi AP, Farsi M, Nematzadeh GA et al. (2015) Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L. Acta Agric Slov 103, 299-305.

Pakdin A, Farsi M, Nematzadeh GA et al. (2013) Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Valeriana officinalis* L. Continental J Biol Sci 6, 9-15.

Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Biol Rep 15, 8-15.

Porter JR, Flores H (1991) Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Critic Rev Plant Sci 10, 387-421.

Shakti M, Arun KK, Suman P et al. (2008) Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electron J Biotech 11, 1–7.

Soleimani T, Keyhanfar M, Piri K et al. (2012) Morphological evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L. and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. Int J Agric Res Rev 2, 1005-1013.

Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critic Rev Biotech 27, 29-43.

Wink M. (1999) Biochemistry of Plant Secondary Product Metabolism. CRC Press, USA. 1-16.

Zehra M, Banerjee S, Sharma S et al. (1999) Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus*. Planta Med 65, 060-063.

Zhuravlev V (2005) Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rol*C gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures, Planta Med 221, 471–478.