

Effect of iron oxide nanoparticles on hairy root induction and antioxidant activity in Purslane (*Portulaca oleracea*)

Mehdi Mohebodini 

*Corresponding author. Professor, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: mohebodini@uma.ac.ir

Roghayeh Fathi 

PhD Candidate, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: fathi.r@uma.ac.ir

Abstract

Objective

Many secondary metabolites produced by plants are used in manufacturing drugs and new treatments, but are too difficult, expensive or impossible to prepared by chemical synthesis. Biotechnology progresses have provided a huge source of new chemical compounds of plant origin to various applications. Purslane (*Portulaca oleracea* L.) is one of the valuable medicinal plants that World Health Organization (WHO) called it Global Panacea. Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* is an effective method for production of secondary metabolites.

Materials and methods

In this study, hairy roots of Purslane were produced using *Agrobacterium rhizogenes* strains A4 and ATCC15834. The presence of the *rolB* gene in the hairy roots was confirmed by PCR using *rolB* gene specific primers. The effect of the type of strain (A4 and ATCC15834), explant (cotyledon, hypocotyl and seedling) and also different concentrations of Iron oxide nanoparticles (0, 20, 40 and 6 mg l⁻¹) were examined as abiotic elicitors on the hairy root induction, growth and increase of secondary metabolites of hairy roots.

Results

The results showed that the highest hairy root induction (80 percent) was observed in the A4 strain, seedling explants and 40 mg l⁻¹ the iron oxide nanoparticles. The greatest hairy root length was obtained by 60 mg l⁻¹ the iron oxide nanoparticles (4.17 cm) and also ATCC15834 strain, seedling explants and 40 mg l⁻¹ the iron oxide nanoparticles were superior for highest phenolic and flavonoid content (4.92 and 0.48 mg g DW) and also 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (52.59%) and ferric reducing antioxidant power (60.37(Mol g⁻¹ DW)). Hairy root lines showed significant differences in growth rate and biomass production and the largest biomass production was exhibited by G line.

Conclusions

Overall, the strain and explant types and iron oxide nanoparticles had considerable effects on the hairy roots induction secondary metabolites production. The results indicated significant increases in hairy root induction and medicinal compounds by A4 and ATCC15834 strains, seedling explant and 40 mg l⁻¹ the iron oxide nanoparticles.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, Phenolic, RolB gene, Seedling.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohebodini M, Fathi R, (2021) Effect of iron oxide nanoparticles on hairy root induction and antioxidant activity in Purslane (*Portulaca oleracea*). *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 69-90.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (3), 69-90.

DOI: 10.22103/jab.2021.17438.1311

Received: July 21, 2021.


Accepted: August 22, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors

تأثیر نانو ذرات اکسید آهن بر القای ریشه‌های موئین و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

مه‌دی محب‌الدینی 

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

رقیه فتحی 

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰

چکیده

هدف: بیشتر متابولیت‌های ثانویه توسط گیاهان تولید می‌شوند و در تولید داروها و درمان‌های نوین کاربرد دارند. اما سنتز شیمیایی بسیاری از این متابولیت‌ها مشکل، پرهزینه و یا غیر ممکن است. با استفاده از پیشرفت‌های بیوتکنولوژی، تولیدات طبیعی گیاهان می‌تواند منبعی غنی از ترکیبات جدید با منشا گیاهی را برای کاربردهای گوناگون فراهم سازد. گیاه خرفه از جمله گیاهان دارویی مهم بوده و سازمان بهداشت جهانی به آن لقب اکسیرجهانی داده است. القای ریشه‌های موئین با استفاده از *rhizogenes Agrobacterium* یکی از روش‌های کاربردی برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ریشه‌های موئین خرفه با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A4 و ATCC15834 تولید شد و به منظور تأیید تراریختی ریشه‌ها، حضور ژن *rolB* توسط PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بررسی شد. تأثیر سویه‌ی باکتری (A4 و ATCC15834)، ریزنمونه‌ی گیاهی (کوتیلدون، هیپوکوتیل و گیاهچه کامل) و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان محرک غیرزیستی بر میزان القا و رشد ریشه‌های موئین و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه بررسی شد.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد بیشترین درصد القای ریشه‌های موین (۸۰ درصد) توسط سویه A4، بر روی ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل و با استفاده از ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن به‌دست آمد. بیشترین طول ریشه در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن تولید شد و همچنین سویه ATCC15834، ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن بیشترین تأثیر را در افزایش محتوای فنول و فلاونوئید (۴/۹۲ و ۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریشه) و همچنین میزان مهار رادیکال آزاد (۵۲/۵۹ درصد) و قدرت آنتی‌اکسیدانی احیا آهن فریک (۶۰/۳۷ مول بر گرم وزن خشک ریشه) داشتند. لاین‌های ریشه‌های موین تفاوت معنی‌داری را از نظر میزان رشد و تولید زیست‌توده نشان دادند و همچنین لاین G بیشترین میزان زیست‌توده را داشت.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نوع سویه، ریزنمونه و مقدار نانوذرات اکسید آهن نقش مهمی در القای ریشه‌های موین گیاه خرفه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. نتایج به‌دست آمده نشان داد سویه A4 و ATCC15834، ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن افزایش معنی‌داری در تولید ریشه‌های موین و ترکیبات دارویی گیاه خرفه سبب شدند. همچنین لاین‌های ریشه‌های موین تفاوت معنی‌داری از نظر رشد و تولید زیست‌توده نشان دادند و بیشترین زیست‌توده توسط لاین G تولید شد.

کلیدواژه‌ها: ژن *rolB*، فنول، گیاهچه کامل، نانوذرات اکسید آهن.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محب‌الدینی مهدی، فتحی رقیه (۱۴۰۰) تأثیر نانو ذرات اکسید آهن بر القای ریشه‌های موین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۶۹-۹۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گیاهان دارویی برای محافظت از خود در مقابل عوامل بیماری‌زا، شکارچیان و همچنین به منظور جذب حشرات گرده‌افشان، گروه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند (Ramachandra and Ravishancar 2002). از جمله چالش‌های پیش روی تولید ترکیبات دارویی از عصاره گیاهان وحشی یا کشت‌شده در مزرعه می‌توان به دشواری کشت برخی از این گیاهان، خطر انقراض آن‌ها در اثر بهره‌برداری بیش از حد، مشکلات جغرافیایی و تغییرات آب و هوایی اشاره کرد (Verporte et al. 2002). کشت درون‌شیشه‌ای/روشن مناسبی برای بهبود تولید این متابولیت‌ها و غلبه بر چالش‌های ذکر شده است. پیشرفت کشت‌بافت گیاهی

و ریشه‌های مویین تراریخته از طریق *Agrobacterium rhizogene* قدمی مهم در بکارگیری کشت درون شیشه‌ای برای تولید متابولیت ثانویه به حساب می‌آید (Kim et al. 2002). سرعت رشد زیاد، بازدهی و پایداری ژنتیکی بالا، زمان کوتاه مورد نیاز برای تولید ترکیبات دارویی، و عدم نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، چند نمونه از مهم‌ترین ویژگی‌هایی هستند که سیستم کشت ریشه‌های مویین را به روشی ارزشمند و کارآمد برای تولید ترکیبات دارویی بدل کرده‌اند. باکتری خاکزی *A. rhizogenes* هنگام ورود به سلول گیاهی با درج بخشی از ژنوم خود، موسوم به ناحیه‌ی T-DNA در ژنوم گیاهی موجب تراریختگی گیاه می‌گردد. ناحیه‌ی T-DNA ژن‌هایی را در بر می‌گیرد که آنزیم‌های سنتز هورمون‌های اکسین و سایتوکینین را رمزگذاری می‌کنند (Baskaran and Jayabalan 2009).

خرفه گیاه دارویی از تیره‌ی *Portulacaceae* است که برگ‌های دایره‌ای شکل و ضخیم و همچنین ساقه‌ی گوشتی با رنگ قرمز ارغوانی و بذره‌های سیاه کوچک دارد. معمولاً ارتفاع خرفه به ۴۰ سانتی‌متر می‌رسد و گل‌های زرد رنگی دارد که در بخش انتهایی ساقه‌اش می‌رویند. گیاه خرفه در زبان انگلیسی با نام‌های Hogweed، Pigweed و Purslane نیز شناخته می‌شود (Aamirul-Alam et al. 2015). این گیاه دارای ترکیب‌های شیمیایی مهمی نظیر پتاسیم، مس، کلسیم، آهن، فسفر، منگنز، سلنیوم، کربوهیدرات، ساختارهای پروتئینی، ترکیبات آنتی‌اکسیدان، اسیدهای چرب غیراشباع و قندهایی نظیر پکتین است. این گیاه منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه‌ی سودمندی نظیر دوپامین، امگا-۳ و انتقال‌دهنده‌های عصبی از جمله نورآدرنالین به حساب می‌آید (Pirian and Piri 2012). بر اساس نتایج آزمایش‌های فیتوشیمیایی انجام شده روی عصاره‌ی خرفه، این گیاه ویتامین‌های A و B، گروهی از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید سینامیک، اسید کافئیک، اسید اگزالیک، اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید آلفا لینولئیک و ترکیبات دیگری مانند آلکالوئید کوئرستین، گلیکوزیدهای قلبی آنتراکینونی، فلاوونوئیدها و کومارین را دارا می‌باشد (Ahmadi-Moghadam et al. 2013). همچنین خرفه می‌تواند در کاهش سردردهای میگرنی، تسکین دردهای گوارشی خصوصاً ناراحتی معده، کاهش احساس درد و سوزش در مجاری ادراری، پایین آوردن تب بالا و از بین بردن بیوست موثر باشد (Mahipal et al. 2015). نوراپینفرین، دوپامین و امگا-۳ موجود در کرک‌های ریشه‌ی گیاه خرفه برای تعدیل سیستم ایمنی کاربرد دارند (Ghorbani et al. 2015).

گیاهان در میان تمامی ریزمغذی‌ها بالاترین نیاز را به آهن (Fe) دارند. این عنصر در عین ضروری بودن، در گیاه بسیار کم مصرف می‌شود و تحرک اندکی دارد. آهن قسمتی از گروه کاتالیزوری اغلب آنزیم‌های اکسیداسیون و احیا به حساب می‌آید که در سنتز کلروفیل نقش دارد. عناصر ریزمغذی به علت تأثیری که در افزایش عملکرد محصولات گیاهی دارند نقشی مهمی در رشد گیاهان ایفا می‌کنند (Dewal and Pareek 2004). متابولیسم گیاه در اثر کمبود آهن به میزان قابل توجهی تغییر کرده و در نتیجه گیاه زرد می‌شود (Kabata-Pendies and Pehdias 1999) مطالعات زیادی وجود دارد که نقش آهن را در تثبیت ازت و فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز را به خوبی تایید شده است (Balakrishnani 2000).

اندازه‌ی نانو ذرات اکسید آهن، ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است و در دو شکل اصلی مگنتیت (Feso4) و ماگمیت (Feso3) وجود دارد که به دلیل داشتن ویژگی فوق پارامغناطیسی، کاربردهای بسیار زیادی در صنایع دارند. نانو ذرات اکسید آهن در میان نانو ذرات فلزی مورد استفاده در صنعت، بیشترین کارایی را دارند و در زمینه‌هایی نظیر پزشکی، فیزیولوژی، فیزیک، اپتیک، گیاه‌پزشکی، صنایع غذایی و بهداشتی استفاده می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که سمیت نانو ذرات اکسید آهن بسیار کم بوده و پژوهشگران آن را در دسته‌ی مواد زیست تخریب پذیر به حساب می‌آورند (Dewal and Pareek 2004). با توجه به اینکه ترکیبات محیط کشت در بهینه‌سازی کشت ریشه‌های موپین تأثیر بسزایی دارد، پژوهش‌های وسیعی در مورد این موضوع صورت گرفته است، لیکن تأثیر غلظت نانو ذرات اکسید آهن بر القای ریشه‌های موپین در گیاه خرفه تا به حال بررسی نشده است. بر اساس نتایج پژوهشی که برای بررسی اثر سویه‌ی ATCC15834 بر القای ریشه‌های موپین، روی قطعه‌های سه میلی‌متری ساقه و کوتیلدون گیاه خرفه صورت گرفت، بالاترین مقدار ریشه‌دهی در قطعه‌های کوتیلدون مشاهده شد و محتوای دوپامین ریشه‌های حاصل از ریز نمونه‌ی کوتیلدون بالاترین مقدار بود (Ahmadi-Moghadam et al. 2013). بر اساس نتایج مطالعه‌ای دیگر که اثر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید را برای دستیابی به بالاترین میزان دوپامین در ریشه‌های موپین خرفه را مورد بررسی قرار داده بود، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل‌جاسمونات و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید بالاترین تأثیر را در افزایش متابولیت‌های ثانویه نشان دادند (Pirian and Piri 2012). پژوهشی دیگر اثر غلظت‌های متفاوت محرک‌های نانو ذرات اکسید آهن و روی (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) را بر بهبود تولید هایپرسیسین و هایپرفورین در کشت‌های سلولی گل راعی (*Hypericurr.perfora tuta L.*) بررسی کردند و در نهایت پس از ۷۲ ساعت تیمار، در کشت‌های تحریک شده با نانو ذرات اکسید روی، میزان تولید هایپرسیسین و هایپرفورین، افزایش ۳ و ۱۳ برابری و در کشت‌های تحریک شده با نانو ذرات اکسید آهن، میزان هایپرسیسین و هایپرفورین افزایش ۵ و ۱۲ برابری نسبت به گروه شاهد داشتند (Sharafi et al. 2013). از این رو استفاده از نانو ذرات راهکاری مناسب برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد و برای تولید گیاهچه، بذرها در شرایط استریل، به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از چندین مرحله آبکشی با آب مقطر، به مدت ۹۰ ثانیه با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شدند و پس از شستشوی دوباره با آب مقطر، نهایتاً در محیط کشت MS دارای ۳ درصد ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شدند. دمای اتاقک رشد ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شد و برای تأمین نور مورد نیاز نیز منبع نوری با روشنایی ۳۰۰۰ لوکس استفاده شد. ریز نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش، کوتیلدون، هیپوکوتیل و گیاهچه کامل بود (Fathi et al. 2019). به منظور القای ریشه‌های موپین، از سویه‌های A4 و ATCC15834 برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای

تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری، یک کلونی از باکتری در محیط کشت LB (Luria-Bertani) مایع دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین کشت گردید. کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۲۰ قرار داده شد. پس از ایجاد زخم سطحی توسط اسکالپل روی ریزنمونه‌ها، سوسپانسیون باکتری به داخل پتری‌دیش‌هایی که ریزنمونه‌ها در آن قرار داشتند ریخته شد و ریزنمونه‌ها در شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه درون سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شده و تکان داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، روی کاغذ صافی تا حدودی خشک شدند تا باکتری‌های اضافی آن‌ها حذف شود و سپس به محیط کشت MS جامد منتقل شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند که به این مرحله، هم‌کشتی گفته می‌شود. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به عنوان شاهد در شرایطی مشابه کشت شدند. ریزنمونه‌ها پس از سپری شدن مدت هم‌کشتی، در آب استریل که ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به آن اضافه شده بود شسته شده و پس از خشک شدن نسبی روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد شامل نانوذرات اکسید آهن در چهار غلظت (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت شدند.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین: در این مطالعه، برای تشخیص ریشه‌های مویین، علاوه بر استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی ریشه‌ها از جمله زمان القا، محل خروج ریشه از ریزنمونه، میزان رشد آن‌ها، از روش تایید مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rolB* نیز استفاده شد. برای استخراج DNA از ریشه‌های مویین و ریشه‌های شاهد از روش CTAB (Khan et al. 2007) با اندکی تغییر استفاده گردید. از ترموسایکلر (Qantarus) برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، و آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* با توالی 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر غیرمستقیم) برای تکثیر ژن *rolB* استفاده شد. برنامه‌ی RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه که شامل واسرشتگی در دمای 94°C درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای 55°C درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای 72°C درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای 72°C درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد از هم جدا شدند و در دستگاه ژل داگ (ATP SN: G089301) بررسی شد.

تهیه‌ی عصاره اتانولی و ارزیابی میزان فنول و فلاونوئید: برای اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل ریشه‌ها از روش (Sonalid and Laima (2001) و Heimler et al. (2009) به ترتیب استفاده شد. برای تهیه‌ی عصاره‌ی پلی‌فنول، ۲ گرم از بافت خشک ریشه‌های مویین در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و فرمیک اسید به نسبت ۹۹ اسید و ۱ فرمیک اسید ساییده شد. برای بررسی میزان فنول، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره پلی‌فنلی، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ برابر رقیق شده و ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم با هم مخلوط شدند. سپس ۳ میلی‌لیتر آب استریل به محلول افزوده شد و به مدت

۹۰ دقیقه در شرایط تاریک نگهداری شد. در نهایت با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید مقدار دقیق فنول در ریشه‌ها به دست آمد. به منظور بررسی میزان فلاونوئید کل، ۷۵ میکرولیتر سدیم نترات ۵ درصد، ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره پلی فنلی، ۷۵ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر سدیم هیدروکساید ۱ مولار با هم مخلوط شدند. سپس آب دو بار تقطیر شده به محلول حاصل افزوده شد تا حجم نهایی محلول به ۲/۵ میلی لیتر برسد. میزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد و میزان دقیق فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد.

تهیه‌ی عصاره متانولی ارزیابی میزان عملکرد مهار رادیکال آزاد DPPH : مقدار ۱۰۰ میلی گرم از ریشه‌های

مویین خشک با ۳ میلی لیتر محلول متانول ۸۰٪ در هاون ساییده شد و سپس ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۴۵۰۰ قرار داده شد. در نهایت مایع شفاف رویی به عنوان عصاره‌ی متانولی برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی استفاده شد. در این پژوهش سنجش عملکرد مهار DPPH (Argolo et al. 2004) به وسیله ترکیبات موجود در عصاره‌ی ریشه‌ها بررسی شد. برای این منظور ابتدا ماده DPPH به مقدار $4 \mu\text{M}$ در حلال متانول حل شد و سپس از این محلول $2000 \mu\text{l}$ به ۵ میکرولیتر از عصاره افزوده شد. به مدت ۳۰ دقیقه این محلول در دمای اتاق و شرایط تاریکی انکوبه گردید. همچنین از محلول DPPH بدون افزودن عصاره به عنوان نمونه‌ی بلانک استفاده شد. مولکول DPPH رادیکال چربی دوستی با بیشینه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. در شرایطی که DPPH در معرض ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره قرار می‌گیرد با احیا شدن به وسیله گروه هیدوکسیل آنتی‌اکسیدان‌ها و سپس بلوکه شدن، از رنگ بنفش به رنگ زرد روشن تغییر می‌یابد. به همین دلیل در این پژوهش برای به دست آوردن مقدار DPPH باقی‌مانده در واکنش از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر کمک گرفته شد و در نهایت درصد مهار DPPH از طریق رابطه‌ی زیر به دست آمد.

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن فریک یا FRAP: برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از

روش FRAP استفاده شد. محلول کار FRAP از طریق مخلوط نمودن بافر استات سدیم^۱ ($300 \mu\text{M}$ ، $\text{pH} \sim 3/6$)، محلول TPTZ^2 ($10 \mu\text{M}$ در $40 \mu\text{M}$ از HCL) و آهن فریک ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $20 \mu\text{M}$) به نسبت ۱۰ (استات): ۱ (TPTZ): ۱ (آهن فریک) بدست آمد. ابتدا ۳ میلی لیتر از محلول FRAP به $25 \mu\text{l}$ میکرولیتر از عصاره افزوده شد و بعد از ورتکس و قرار دادن در بن‌ماری با دمای 37°C به مدت ۳۰ دقیقه، میزان جذب واکنش در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. در طی این آزمایش، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره، کاتیون فریک^۳ موجود در واکنش را به کاتیون فروس^۴ احیاء کرده و در نتیجه کمپلکس بی‌رنگ

1 . Sodium acetate, CH_3COONa

2 . 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine

3 . Fe^{3+}

4 . Fe^{2+}

فریک-TPTZ به کمپلکس آبی‌رنگ فروس-TPTZ تبدیل شده که امکان خوانده شدن در طول موج ۵۹۳ نانومتر را دارد. در میزان FRAP با کمک منحنی استاندارد ($y = 0.0058x + 0.328$; $r^2 = 0.988$) بر حسب میلی‌مول سولفات آهن^۵ در هر گرم از وزن خشک نمونه محاسبه شد (Benzie & Strain 1996).

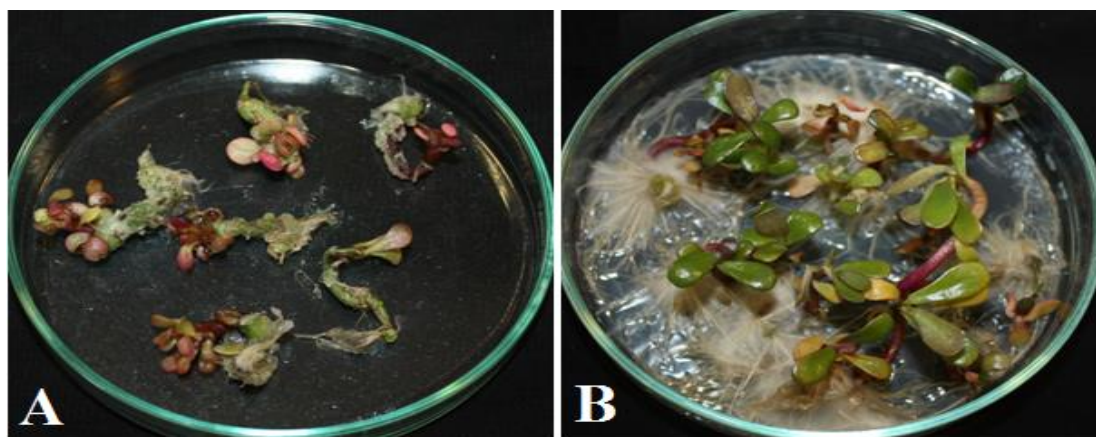
بررسی توان رشدی لاین‌های ریشه موبین: در این آزمایش هر تک ریشه‌ی نمایان شده از محل زخم ریزنمونه‌ها به عنوان یک لاین مستقل در نظر گرفته شد. بعد از ظهور ریشه‌های موبین در محل‌های زخم که بسته به نوع ریزنمونه و سویه‌ی باکتری مورد استفاده، در فاصله‌های زمانی متفاوت رخ داد، میزان ۲ سانتی‌متر از ۱۳ لاین پر رشد (A تا M) (همراه با نوک ریشه) برش داده شد و در محیط کشت مایع MS محتوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت شد و ثبت مشاهدات مربوط به مورفولوژی رشدی ریشه‌های موبین آغاز گردید. بازکشت لاین‌های ریشه موبین به محیط کشت جدید با محتوای سفوتاکسیم کمتر، در فواصل ۲ هفته‌ای انجام گرفت. پس از چهار هفته وزن تر و میزان فنول در لاین‌های ریشه موبین اندازه‌گیری شد (Fathi et al. 2019).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش تأثیر نوع سویه، ریزنمونه و نانوذرات آهن به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آزمایش مربوط به بررسی توان رشدی لاین‌های ریشه موبین نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. قبل از آنالیزهای آماری، نرمال بودن داده‌ها بررسی شد و مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

ریزنمونه‌های تراریخته یک هفته پس از هم‌کشتی با *A. rhizogenes* اولین ریشه‌های موبین را تولید کردند و میزان رشد و انشعابات بسیار زیادی را نسبت به ریشه‌شاهد ایجاد کردند (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع سویه‌ی باکتری (A4 و ATCC15834)، نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن بر درصد تولید ریشه‌های موبین و همچنین میانگین تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده اما بر روی طول ریشه تأثیر معنی‌دار نداشت. اما اثرات اصلی نوع سویه و ریزنمونه و همچنین اثرات اصلی نانوذرات اکسید آهن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل نوع سویه، نوع ریزنمونه و نانوذرات اکسید آهن بر میزان فنول و فلاونوئید موجود در ریشه‌های موبین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد ریزنمونه‌های گیاهچه کامل که با سویه‌ی A4 تلقیح یافته و در روی محیط کشت دارای ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن کشت شده بودند، بیشترین درصد القای ریشه‌های موبین (۸۰ درصد) را نشان داد (شکل ۲). بالاترین میانگین تعداد ریشه (۹/۱۶ عدد) در اثر ترکیب تیماری ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل، سویه‌ی ATCC15834 و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن به‌دست آمد (شکل ۳). همچنین بالاترین میانگین طول ریشه

(به ترتیب ۴/۱۷ و ۵/۷ سانتی متر) در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن (شکل ۴) و سویه ی ATCC15834 حاصل شد (شکل ۵). نتایج بررسی تأثیر ترکیبات تیماری مختلف بر میزان فنول و فلاونوئید کل (۴/۹۲ و ۰/۴۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در ریشه های مویین حاصل از ترکیب تیماری ریزنمونه ی گیاهچه کامل، سویه ی ATCC15834 و ۴۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات اکسید آهن مشاهده شد (شکل ۶ و ۷).



شکل ۱. القای ریشه های مویین در گیاه خرفه. A: القای ریشه های نابجای در ریزنمونه های غیر تراریخت به عنوان شاهد، B: القای ریشه های مویین در ریزنمونه های تراریخته.

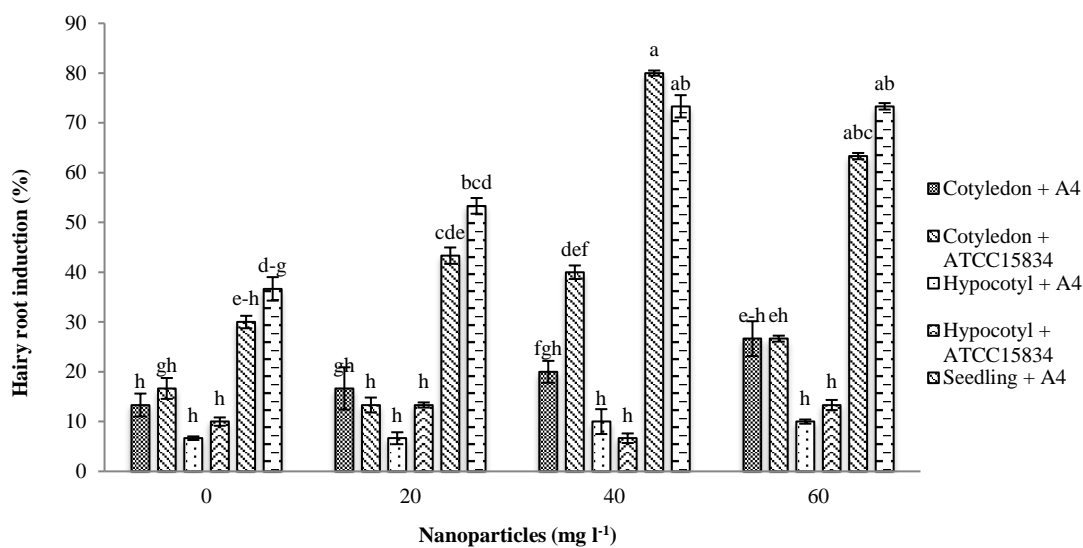
Figure 1. Hairy roots induction by A4 strain, A: Adventitious root induction in Non-transformed explants as control, B: Hairy root induction in Transformed explants.

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی ویژگی های ریشه های مویین

Table 1. Analysis of variance of the effects of strain, explant and nanoparticles on hairy roots characteristics.

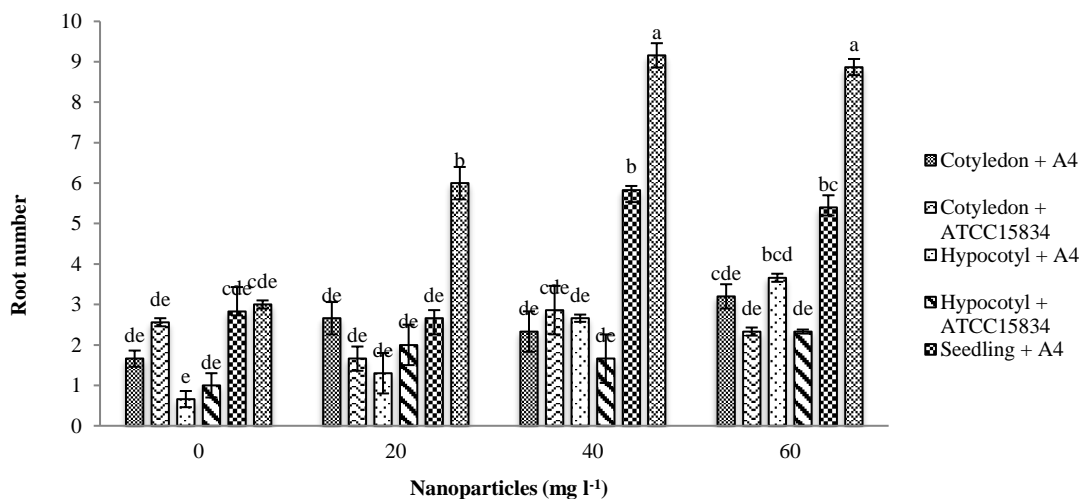
منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square				
		درصد القای ریشه Percentage of hairy root induction	تعداد ریشه Roots number	طول ریشه Root length	فنول Phenol	فلاونوئید Flavonoid
نانوذرات nanoparticles	3	1516.2**	22.56**	8.85**	1.86**	0.01*
سویه و ریزنمونه Strain and explant	5	5808.05*	43.68**	23.9**	13.58**	0.08**
سویه و ریزنمونه × نانوذرات nanoparticles × Strain and explant	15	289.53*	3.86*	1.93 ^{ns}	0.57**	0.005*
Error	48	140.27	1.94	2.58	0.16	0.002

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد



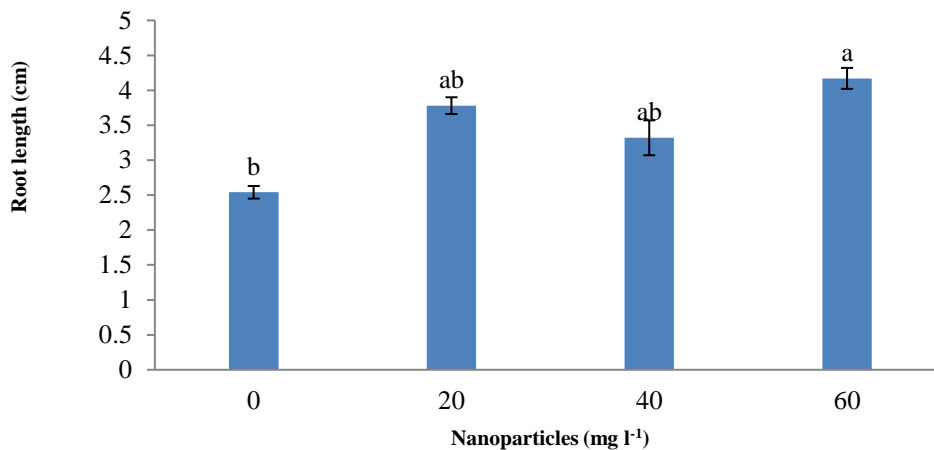
شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی درصد القای ریشه‌های موپین

Figure 2. Mean comparisons of the effects of strain, explant and nanoparticles on hairy roots induction.



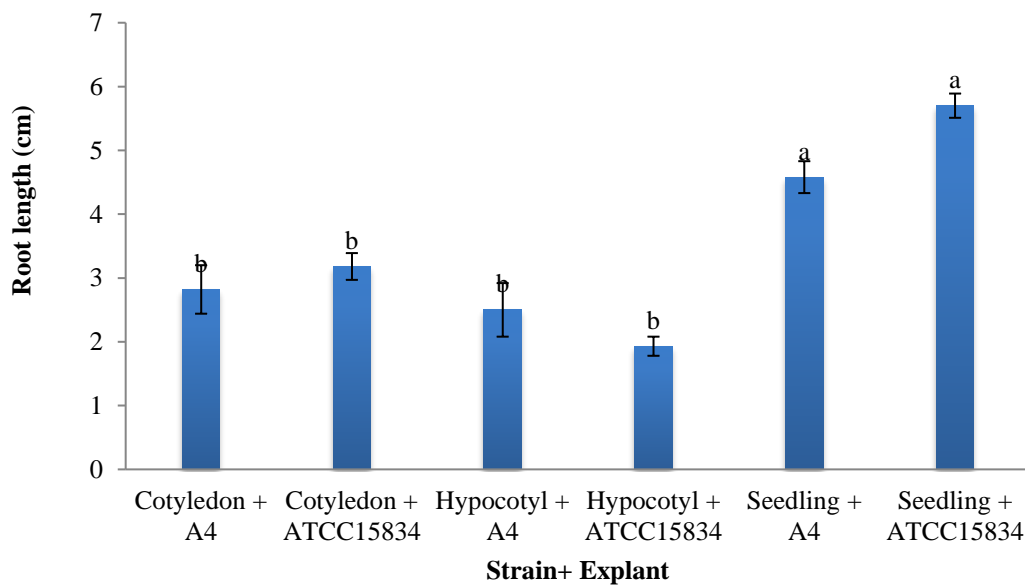
شکل ۳. مقایسه میانگین تأثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی میانگین تعداد ریشه‌های موپین

Figure 3. Mean comparisons of the effects of strain, explant and nanoparticles on hairy roots number.



شکل ۴. مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات بر روی میانگین طول ریشه‌های موئین

Figure 4. Mean comparisons of the effects of different concentration of nanoparticles on hairy roots length.

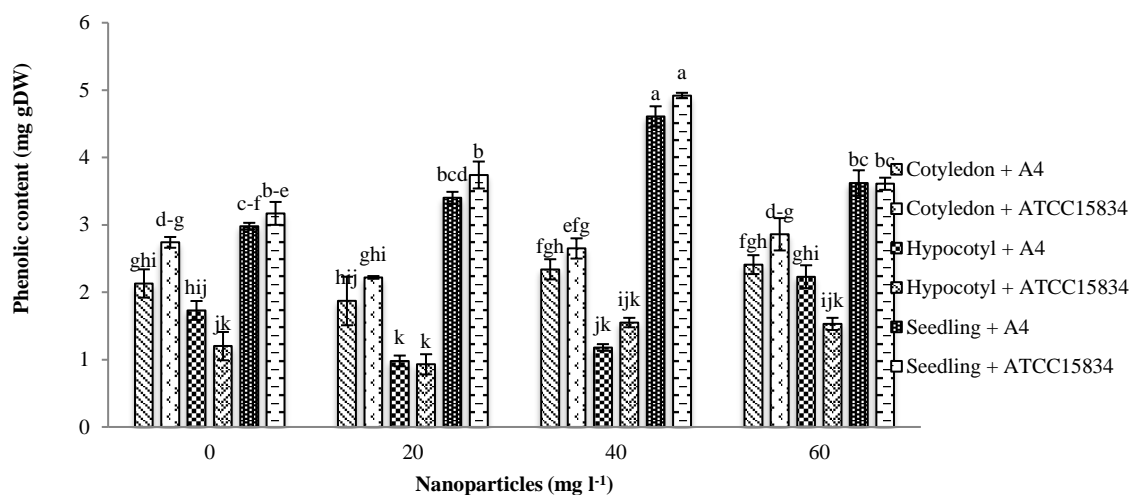


شکل ۵. مقایسه میانگین تأثیر نوع سویه و ریزنمونه بر روی میانگین طول ریشه‌های موئین

Figure 5. Mean comparisons of the effects of strain and explant on hairy roots length.

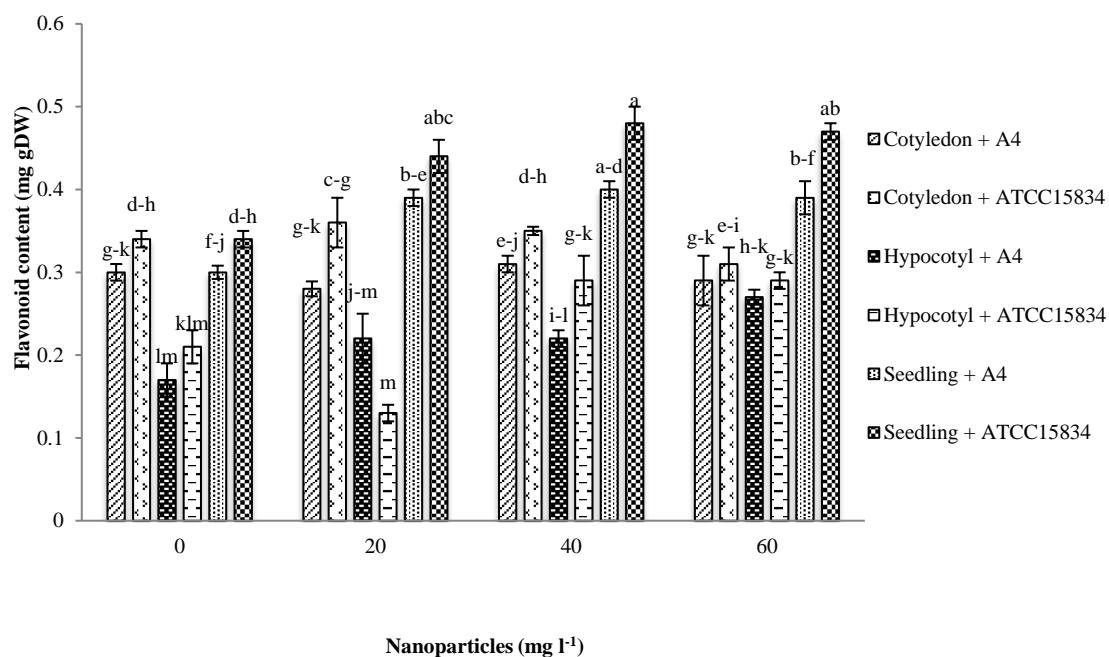
انتقال و بیان ژن‌های انتقال یافته توسط *A. rhizogenes* در بافت گیاهی تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله سازگاری سویه با گیاه و همچنین سن و نوع ریزنمونه‌ی مورد استفاده است. در پژوهش‌های پیشین تأثیر مثبت سویه‌ی ATCC15834 نسبت به سایر سویه‌ها برای القای ریشه‌های موئین و رشد آن در محیط مایع در گیاه خرفه گزارش شده است (Pirian & Piri 2012). در پژوهش حاضر ریزنمونه‌های گیاهچه کامل که با سویه‌های A4 و ATCC15834 تلقیح یافته و در روی محیط کشت حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن کشت شدند، بیشترین میزان القای ریشه‌های موئین را نشان دادند. در پژوهش‌های پیشین تأثیر نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های موئین تأیید شد است. به‌عنوان مثال در ریزنمونه‌های برگ گیاه خرفه (Pirian and Piri, 2012) و گیاه *Coleus forskohlii* Briq (Reddy et al. 2012). همچنین تأثیر بسزای نوع ریزنمونه‌های مختلف در القای ریشه‌های موئین در گیاه *Pueraria phaseoloides* گزارش شده است (Shi and Kintzios 2003). همچنین در پژوهشی بررسی اثر متقابل ترکیبات محیط کشت و سویه‌ی باکتری بر درصد القای ریشه موئین نشان داد که بالاترین فراوانی القای ریشه مربوط به محیط MS دارای ۶ درصد ساکارز و سویه A4 می‌باشد (Moradi et al. 2019).

گیاهان برای رشد بهینه به اکسید آهن نیاز دارند. جذب آن از طریق سلول‌های ریشه گیاه است و بر فرآیندهای مختلف مربوط به رشد گیاه تأثیر می‌گذارد (Shanjani 2003). در این پژوهش وجود نانوذرات اکسید آهن در محیط کشت باعث افزایش القای ریشه‌های موئین گردید که با نتایج پژوهش Shirin et al. (2015) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش نمودند که بیشترین میانگین تعداد شاخساره در گیاه آکاسیا (*Saraca asoca*) در تیمار نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. همچنین Fathi et al (2019) گزارش کردند که ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید آهن و سویه‌ی ATCC15834 برای القا و رشد ریشه‌های موئین در گیاه کاسنی عملکرد مطلوب‌تری داشتند و در محیط‌های فاقد نانو ذرات آهن، سویه‌ی A4 بهترین عملکرد تاریخته سازی گیاه را نشان داد. این تفاوت در عملکرد را می‌توان به تفاوت‌های ساختاری و عملکردی هر یک از سویه‌ها نسبت داد. در پژوهش حاضر ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن تأثیر بیشتری در افزایش القای ریشه‌های موئین و تولید متابولیت نسبت به تیمار ۶۰ میلی‌گرم نانوذرات اکسید آهن داشت و می‌توان دلیل آن را اثر سمیت در غلظت‌های بالاتر دانست (Castiglione et al. 2011). همچنین Moharrami et al. (2017) نیز غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات آهن را در رشد ریشه‌های موئین بذربالنج و تولید متابولیت موثرتر از غلظت بالاتر دانستند. استفاده از غلظت‌های بیش از حد معمول محرک‌ها نه تنها موجب افزایش متابولیت‌ها نمی‌شود بلکه باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های بیوستیزی شده و تولید متابولیت را کاهش می‌دهد (Yin et al. 2011). نانوذرات آهن نقش بسزایی در فرآیند انتقال پیام ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی تولید جاسمونات در ریزنمونه‌های گیاهی دارد (Sharafi et al. 2014). جاسمونات در اثر پاسخ دفاعی گیاه در مقابل تنش‌ها تولید می‌شود که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شود (Menek et al. 2009). افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین توسط جاسمونیک اسید قبلاً گزارش شده است (Kondo et al. 2001).



شکل ۶. مقایسه میانگین تاثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی میزان فنول در ریشه‌های مویین

Figure 6. Mean comparisons of the effects of strain, explant and nanoparticles on phenolic content in hairy roots.



شکل ۷. مقایسه میانگین تاثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی میزان فلاونوئید در ریشه‌های مویین

Figure 7. Mean comparisons of the effects of strain, explant and nanoparticles on flavonoid content in hairy roots.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین: اثر متقابل نوع سویه‌ی باکتری (A4 و ATCC15834)، نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن بر میزان DPPH و FRAP در ریشه‌های مویین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد ریشه‌های مویینی که از ریزنمونه‌های گیاهچه کامل که با سویه‌ی ATCC15834 تلقیح یافته و تحت تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن قرار گرفته بودند حاصل شده‌اند بیشترین میزان DPPH و FRAP (۵۲/۵۹ و ۶۰/۷۳ میلی‌گرم در لیتر) را داشتند (جدول ۳). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً متناسب با فنول و فلاونوئید موجود در ریشه‌های مویین بوده است. گیاهانی که ترکیبات فنولی بیشتری دارند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نیز نشان می‌دهند (Arumugam et al. 2010). نقش مهم ترکیبات فنولی که حذف‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد هستند در چندین پژوهش گزارش شده است (Katalinic et al. 2006). در واقع ترکیبات فنولی به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده و بنابراین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان فعالیت می‌کنند (Golluce et al. 2007). در این پژوهش ترکیب‌های فنلی و آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در بررسی‌های انجام شده بر روی ریشه‌های مویین کاسنی حاصل از سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* میزان ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی تفاوت معنی‌داری را نشان داد (Kabirnataj et al. 2013). همچنین نتایج به‌دست آمده نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی متناسب با فنول کل موجود در نمونه‌های مورد بررسی بوده است. نتایج این بررسی همانند سایر مطالعات نشان داده است که گیاهانی که ترکیبات فنلی بالاتری دارند، فعالیت ضدرادیکال‌های آزاد بالاتری را نیز نشان می‌دهند (Damien Dorman et al. 2003).

جدول ۲. تجزیه واریانس تاثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین

Table 2. Analysis of variance of the effects of strain, explant and nanoparticles on antioxidant characteristics of hairy roots.

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square	
		DPPH	FRAP
نانوذرات nanoparticles	3	279.47**	1126.04**
سویه و ریزنمونه Strain and explant	5	534.99**	998.34**
سویه و ریزنمونه × نانو ذرات nanoparticles × Strain and explant	15	226.64**	137.1**
خطا Error	48	39.34	44.99

ns, *, **: به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

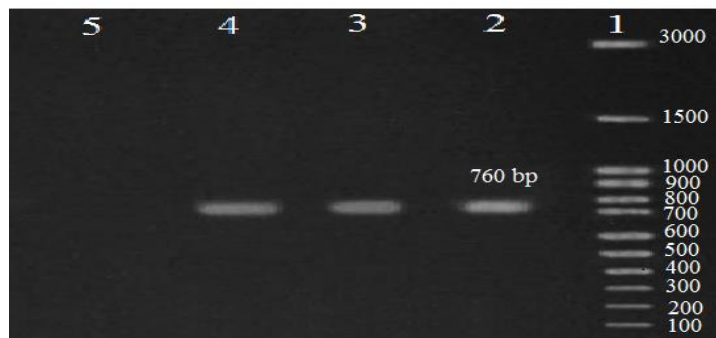
جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین تأثیر سویه، ریزنمونه و نانوذرات بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین

Table 3. Mean comparisons of the effects, strain, explant and nanoparticles on antioxidant characteristics of hairy roots.

نانوذرات (میلی‌گرم در لیتر) Nanoparticle (mg l ⁻¹)	سویه+ریزنمونه Explant+Strain	FRAP	PPH
0	Cotyledon + A4	18.88 ^{jk}	22.36 ^{hij}
	Cotyledon + ATCC15834	22.25 ^{h-k}	24.74 ^{g-j}
	Hypocotyl + A4	13.84 ^k	31.91 ^{d-h}
	Hypocotyl + ATCC15834	20.56 ^{ijk}	26.27 ^{f-j}
	Seedling + A4	23.55 ^{h-k}	22.07 ^{hij}
	Seedling + ATCC15834	37.5 ^{c-g}	35.74 ^{c-g}
20	Cotyledon + A4	33.49 ^{d-i}	39.92 ^{b-e}
	Cotyledon + ATCC15834	30.7 ^{d-i}	28.28 ^{e-i}
	Hypocotyl + A4	23.68 ^{h-k}	19.98 ^{hij}
	Hypocotyl + ATCC15834	28.7 ^{e-j}	20.34 ^{hij}
	Seedling + A4	40.71 ^{b-e}	38.89 ^{c-g}
	Seedling + ATCC15834	39.12 ^{c-f}	35.89 ^{c-g}
40	Cotyledon + A4	28.53 ^{e-j}	25.68 ^{g-j}
	Cotyledon + ATCC15834	42.94 ^{bcd}	29.86 ^{e-j}
	Hypocotyl + A4	25.42 ^{de}	14.74 ^j
	Hypocotyl + ATCC15834	23.63 ^{h-k}	18.91 ^{ij}
	Seedling + A4	49.85 ^{abc}	45.7 ^{abc}
	Seedling + ATCC15834	60.73 ^a	52.59 ^a
60	Cotyledon + A4	26.61 ^{f-k}	26.2 ^{f-j}
	Cotyledon + ATCC15834	30.26 ^{d-i}	32.15 ^{d-h}
	Hypocotyl + A4	42.24 ^{bcd}	43.25 ^{a-d}
	Hypocotyl + ATCC15834	35.1 ^{d-h}	30.87 ^{de}
	Seedling + A4	54.91 ^a	45.9 ^{ab}
	Seedling + ATCC15834	52.86 ^{ab}	38.35 ^{b-f}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن ($p < 0.05$) نمی‌باشند

ژن‌های *rolB* نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های مویین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن ریشه‌ی مویین تولید نخواهد شد (El-Esawi et al. 2017). در این تحقیق بررسی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده از ردیابی ژن *rolB* انجام شد. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار ۷۶۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rolB* را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود اما برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نشده نوار تکثیر نشد (شکل ۸).

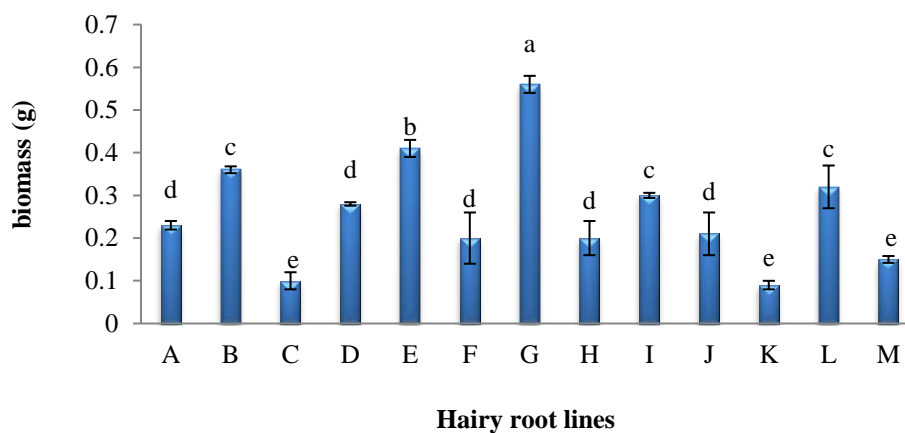


شکل ۸. تکثیر قطعه‌ی ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA ریشه‌های مویین: ۱: نشانگر اندازه‌ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، ۲: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* به‌عنوان شاهد مثبت، ۳ و ۴: ریشه‌های مویین، ۵: ریشه‌های شاهد حاصل از ریزنمونه‌های غیر ترا ریخت به‌عنوان شاهد منفی

Figure 8. PCR amplified 760 bp fragments using specific primers for *rolB* gene of *A. rhizogenes* on chicory hairy root DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2: *A. rhizogenes* plasmid as positive control 3 and 4: hairy roots, 5: Adventitious root raised from non-transformed explant as negative control.

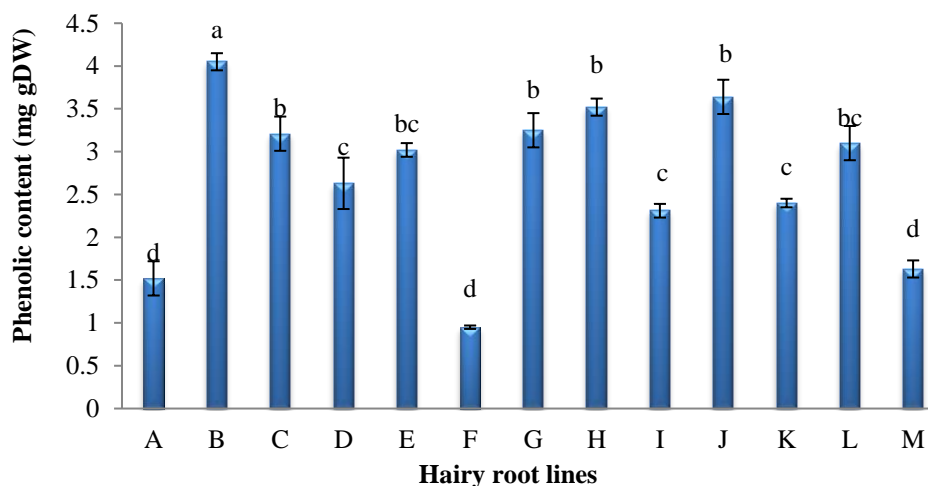
ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین: برای این آزمایش ۱۳ لاین ریشه‌های مویین به‌طور جداگانه در محیط کشت مایع کشت گردید. لاین‌های مورد نظر تفاوت معنی‌داری را در میزان رشد و افزایش زیست‌توده نسبت به یکدیگر نشان دادند. این تفاوت می‌تواند به‌علت درج تصادفی DNA باکتری و میزان بیان متفاوت ژن باکتریایی در ریزنمونه‌های مختلف باشد. بیش‌ترین میزان زیست‌توده در لاین G (۰/۵۶ گرم) و کمترین میزان زیست‌توده در لاین K ریشه‌های مویین (۰/۰۹ گرم) مشاهده گردید (شکل ۹). همچنین بیش‌ترین محتوای فنول کل (۴/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در لاین B مشاهده گردید (شکل ۱۰). تنوع زیاد میزان رشد در بین لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین مشاهده شده در این پژوهش احتمالاً به دلیل تنوع بالا در تعداد نسخه‌های T-DNA درج شده در ژنوم گیاه و همچنین میزان بیان ژن انتقال یافته می‌باشد (Bathoju et al. 2017). با اینکه لاین G از نظر میزان رشد و تولید زیست‌توده بهترین بود و بیشترین میزان فنول کل نیز در لاین b مشاهده شد اما با توجه اینکه میزان رشد لاین G تقریباً دوبرابر لاین b است می‌توان نتیجه گرفت میزان فنول آن نیز در مجموع بیشتر از لاین b است. در پژوهشی که با هدف بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه در ۸ لاین مختلف ریشه‌های مویین گیاه گل راعی انجام شد، گزارش دادند که میزان فلاونوئید در بین لاین‌ها از ۱/۴ میلی‌گرم بر گرم در لاین D تا ۴/۷ میلی‌گرم بر گرم در لاین E متغیر است (Nigutova et al. 2016). همچنین تفاوت در تعداد نسخه‌های ژن *rolC* در لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین گیاه *Hypericum tomentosum* قبلاً گزارش شده است. و تعداد نسخه‌ها در ریشه‌های مویین از ۱/۰۱ نسخه در لاین اول تا ۷/۱۸ نسخه در لاین هفتم تفاوت بود

(Hezelyov et al. 2018). این تفاوت با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت و احتمالاً ناشی از درج تصادفی و متفاوت T-DNA باکتری در ژنوم گیاهان است.



شکل ۹. مقایسه‌ی زیست‌توده در لاین‌های ریشه‌های موئین

Figure 9. Comparison of biomass in hairy root lines



شکل ۱۰. مقایسه‌ی میزان فنول در لاین‌های ریشه‌های موئین

Figure 10. Comparison of phenolic content in hairy root lines

نتیجه‌گیری: از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که بیش‌ترین درصد القای ریشه‌های موئین در تیمار سویه‌ی A4، ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد (۸۰ درصد). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که القای ریشه‌های موئین و تولید متابولیت‌های ثانویه در خرفه تحت تأثیر سویه‌ی باکتری، نوع ریزنمونه‌ی گیاهی و ترکیبات محیط کشت و به‌خصوص غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن قرار دارد. همچنین بیش‌ترین میزان فنول، فلاونوئید، DPPH و FRAP در ریشه‌های موئین حاصل از ترکیب تیماری ریزنمونه‌ی گیاهچه کامل، سویه‌ی ATCC15834 و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات

اکسید آهن مشاهده شد. تاکنون پژوهشی در زمینه‌ی بررسی تاثیر نانوذرات آهن بر روی القا و رشد ریشه‌های مویین گیاه خرفه انجام نشده و این پژوهش اولین گزارش در این مورد می‌باشد. همچنین از بین ۱۳ لاین پررشد ریشه‌های مویین که در محیط کشت مایع رشد کردند میزان تجمع زیست‌توده و متابولیت در لاین‌های مختلف متفاوت بود و بیش‌ترین افزایش زیست‌توده در لاین G و کمترین میزان زیست‌توده در لاین K ریشه‌های مویین مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان نمود که سیستم کشت ریشه‌های مویین یک رهیافت مفید و کارآمد برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی گیاهان در سطح وسیع می‌باشد و استفاده از آن‌ها در صنایع داروسازی و سلامت باید مورد توجه بیش‌تری قرار گیرد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی و همکاری در اجرای پژوهش

حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

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

References

- Aamirul-Alam M, Juridimi A, Rafii A (2014) Genetic improvement of porslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects. *Mol Biol Rep* 41, 7395- 7411.
- Ahmadi-Moghadam Y, Piri K, Bahramnejad B, Habibi P (2013) Methyl jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (Purslan). *BEPLS* 2, 89-94.
- Argolo A, Sant'Ana A, Pletsch M, Coelho L (2004). Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresour Technol* 95(2), 229-233.
- Arumugam P, Ramamurthy P, Ramesh A (2010) Antioxidant and Cytotoxic Activities of Lipophilic and Hydrophilic Fractions of (*Mentha Spicata* L.) (Lamiaceae). *Inter. J Food Properties* 13(1), 23-31.
- Balakrishnan K (2000) Peroxidase activity as an indicator of the iron deficiency banana. *Indian J Plant Physiol* 5, 389-391.
- Baskaran P, Jayabalan N (2009). Psoraleh production in hairy roots and adventitious roots culture of *Psoralea coryfolia*. *Biotechnol Lett* 31, 1037-1077.
- Bathoju G, Rao K, Giri A (2017) Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum borivilianum* (Safed musli). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131(3), 369-376.
- Benzie I F, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1), 70-76.

- Castiglione M R, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R (2011). The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J Nanoparticle Res* 13(6), 2443-2449.
- Damien Dorman H J, Koşar M, Kahlos K et al. (2003) Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *J Agric Food Chem* 51 (16), 4563-9.
- Dewal GS, Pareek RG (2004) Effect of phosphorus, sulphur and zinc on growth, yield and nutrient uptake of wheat (*Triticum aestivum*). *Indian J Agron* 49, 160-162.
- El-Esawi M A, Elkelish A, Elansary H O et al. (2017) Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxid Med Cell Longev* 56, 1-8.
- Fathi R, Mohebodini M, Chamani E (2019) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. *Ind Crop Prod* 128, 572-580.
- Ghorbani M, Ghorbani M, Omidi S, Hashemi M (2015). Response surface modelling of noradrenaline production in hairy root culture of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Turkish JASFT* 3(6), 349-443.
- Golluce M, Sahin F, Sokmen M et al. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from (*Mentha longifolia* L.) ssp. longifolia. *Food Chem* 103, 1449-1456.
- Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A (2009) Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chem* 114, 765–770.
- Henzelyova J, Cellarova E (2018) Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived *Hypericum tomentosum* regenerants. *Acta Physiol Plant* 40(5), 82.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1999) Biogeochemistry of trace elements. PWN, Warsaw, Poland 12, 398.
- Kabirnataj S, Zolala J, Nematzadeh GA, Shokri E (2013) Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crop Biotechnol* 4, 61-75.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M (2006) Scerning of 70 medical plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94, 550-577.

- Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ (2007) Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *Afr J Biotechnol* 6, 175-178.
- Kim Y, Wysolouzil B, Weathers PJ (2002) Secondary metabolism of hairy root cultures bioreactore. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38, 1-10.
- Kondo S, Tsukada N, Niimi Y, Seto H (2001). Interactions between jasmonates and abscisic acid in apple fruit, and stimulative effect of jasmonates on anthocyanin accumulation. *J JPN Soc Hortic Sci* 70(5), 546-552.
- Mahipal SSH, kanan N, manokari M (2015) Propagation of *portulacae oleracea* L. in liquid medium: implications of plant growth regulators in culture. *J microbiol biotechnol food sci* 4(4), 332 -335.
- Menek, S (2009) İç mekanlar için geleneksel form ve desenlerle tasarlanmış aydınlatma elemanları (Doctoral dissertation, DEÜ Güzel Sanatlar Enstitüsü).
- Moharrami F, Hosseini B, Sharafi A, Farjaminezhad M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 53(2), 104-111.
- Nigutova K, Kusari S, Sezgin S (2019). Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured *Hypericum* species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. *J Pharm Pharmacol* 71(1), 46-57.
- Pirian LK, Piri K (2012) Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots. *Portulaca oleracea*, *International Research J Appl Bas Sci* 3(1), 213-218.
- Ramachandra RS, Ravishancar GA (2002) Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20, 101-153.
- Reddy CS, Praveena CH, Veeresham C (2012) Strategies to improve the production of Forskolin from hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq. *Pharm Sci Nanotechnol* 5, 1720-1726.
- Shanjani PS (2003) Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. *Int J Agric Biol* 5, 419-422.
- Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, Sharafi AA (2014) Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physi Mol Biol Plants* 20(2), 257-262.
- Sharafi E, Khayam Nekoei SM, Fotokian MH et al. (2013) Improvement of Hypericin and Hyperforin Production Using Zinc and Iron Nano-oxides as Elicitors in Cell Suspension Culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *JMPB* 2,177-184.

- Shi HP, Kintzios S (2003) Genetic transformation of *pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep* 21, 1103-1107.
- Shirin F, Parihar NS, Shah SN (2015) Effect of nutrient media and KNO_3 on in vitro plant regeneration in *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. *Am J Plant Sci* 6, 3282.
- Sonald SF, Laima SK (2001) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*, *Plant Agric* 1, 1-5.
- Verpoorte R, Memelin J (2002) Engineering secondary metabolite production in plants, *Curr Opin Biotechnol* 13, 181–187.
- Yin, Robert K (2001) Applications of case study research. Sage.