بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) به‌منظور تولید ترکیب دارویی اولئانولیک اسید

زهره سهرابی‌نژاد، حسن مرعشی و نسرین مشتاقی*

مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۶

چکیده

گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) گیاهی دارویی با خاصیت ضدمیکروب و ضدالتهاب می‌باشد. یکی از ترکیبات دارویی مهم یافت شده در این گیاه، اولئانولیک اسید است که دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدویروس و ضد تومور می‌باشد. از میان روش‌های مختلف کشت بافت گیاهی، تکنیک کشت ریشه‌های مویین برای تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه دارویی مورد توجه قرار گرفته است. در این آزمایش، ریزنمونه‌های برگ با پنج سویه اگروباکتریوم رایزوژنز (۱۵۸۳۴ و MSU و ۲۶۵۶ و R۱۰۰۰ و A۴) در دو محیط کشت $\frac{1}{2}$MS و $\frac{1}{2}$B5 برای القای ریشه مویین، تلقیح شدند. ریشه‌های مویین در ۴ نوع محیط کشت $\frac{1}{2}$B5، $\frac{1}{4}$B5، $\frac{1}{2}$MS و $\frac{1}{4}$MS به دو صورت مایع و جامد و همراه هورمون اکسین IAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کشت گردیدند. سپس میزان اولئانولیک اسید در ریشه طبیعی، برگ، گلبرگ و ریشه‌های مویین تحت تیمار غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار محرک متیل جاسمونات، با روش HPLC اندازه‌گیری گردید. بر اساس نتایج، بیشترین (۴/۴۳ درصد) و کمترین (۱۳/۶۹ درصد) میزان تولید ریشه‌های مویین به‌ترتیب در سویه‌های MSU و ۲۶۵۶ حاصل شد. میانگین تولید ریشه مویین در محیط کشت $\frac{1}{2}$B5، ۳۵/۸۴ درصد و در محیط کشت $\frac{1}{2}$MS، ۲۵/۶۷ درصد بود. ریشه‌های مویین در محیط کشت $\frac{1}{2}$ B5 و در سطح هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر از IAA بیشترین رشد را داشتند. بیشترین مقدار اولئانولیک اسید را ریشه طبیعی داشت (۱۶ میکروگرم در یک گرم وزن خشک). متیل جاسمونات در غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار، مقدار اولئانولیک اسید را در ریشه مویین افزایش داد اما در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، باعث کاهش این ترکیب شد.

واژه‌های کلیدی: همیشه‌بهار، ریشه مویین، اولئانولیک اسید، اگروباکتریوم، اکسین، متیل جاسمونات

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۸۸۰۵۷۲۴-۰۵۱ ، پست الکترونیکی: moshtaghi@um.ac.ir

مقدمه

همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* (متعلق به خانواده Asteraceae) در سراسر مناطق معتدل و آفتابی جهان کشت شده و به‌راحتی بومی می‌شود. این گونه گیاهی به‌عنوان یک ضدعفونی کننده، ضدالتهاب، ضد ویروس و نیز یک ضد باکتری به کار برده می‌شود. علاوه بر این، اثرات حفاظتی و سیتوتوکسیک هم برای این گیاه گزارش شده است (۱۳).

یکی از متابولیت‌های ثانویه مهم گیاه همیشه بهار، اولئانولیک اسید است که یک تری‌ترپنوئید آب‌گریز با اثرات مختلف حفاظت از کبد در برابر آسیب ناشی از مواد شیمیایی حاد، فیبروز کبدی، سیروز، آنتی‌تومور و آنتی اکسیدانت می‌باشد (۱۷و۲۴). اولئانولیک اسید در شرایط آزمایشگاهی با مهار فعالیت پروتئاز، همانندسازی HIV-1 را در سیستم‌های سلولی مهار می‌کند (۲۱).

تولید ریشه‌های مویین یکی از تکنیک‌های کشت بافت است که در تولید متابولیت‌های ثانویه کاربرد وسیعی دارد.

رشد سریع، زمان کمتر برای دو برابر شدن، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیفی از ترکیبات شیمیایی در ریشه‌های موئین ازجمله مزایایی است که آنها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل نموده است. گرچه نوع محیط کشت و غلظت اجزای محیط کشت نیز میزان رشد ریشه مویین را تحت تأثیر قرار می دهد (۳۴و۲۵). اما ریشه‌های مویین نسبت به کاربرد انواع هورمون ها به ویژه اکسین‌ها حساسیت نشان داده اند. استفاده از هورمون اکسین در محیط کشت ریشه‌های مویین منجر به افزایش چند برابری رشد و افزایش تولید متابولیت های ثانویه در آنها شده است (۵ و۳۲و ۳۳).

تولید ترکیب اولئانولیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه همیشه بهار در یک بازه ۲۵ روزه بررسی شده است و بیشترین مقدار این متابولیت (۷۳ میکروگرم در گرم وزن تر) پس از گذشت ۲۱ روز گزارش شد. همچنین گزارش شده که وجود نور بر میزان تولید اولئانولیک اسید بی تأثیر بوده است (۱۱). لگا و همکاران (۲۰۱۲) کشت کالوس گیاه همیشه بهار را از نظر میزان تولید ترکیبات کاروتنوئیدی مورد بررسی قرار دادند که طی آن ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت MS و در شرایط تاریکی بهترین عملکرد را در تولید کالوس داشتند. افزایش غلظت ساکارز در محیط کشت و همچنین حذف آمونیوم نیتروژن از محیط کشت MS، باعث افزایش میزان تولید ترکیبات کاروتنوئیدی شد (۱۴).

یکی از روش های مؤثر برای افزایش تولید ترکیبات دارویی در گیاهان استفاده از محرک‌هاست. محرک‌ها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث تحریک تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (۳۷). به عنوان مثال جاسمونات‌ها یکی از کارآمدترین محرک‌ها در گیاهان محسوب می‌شوند که بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه ازجمله ترپنوئیدها، اندول آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی را تحریک می‌کنند (۲۰).

با توجه به ویژگی‌های ارزشمند اولئانولیک اسید و اینکه در زمینه امکان افزایش این ترکیب دارویی در گیاه همیشه بهار تا کنون مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، در این پژوهش بهینه سازی شرایط تولید ریشه مویین در گیاه همیشه بهار و اثر عواملی مانند سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، شرایط نوری و انواع مختلف محیط کشت پایه بر تولید ریشه‌های مویین بررسی شد. علاوه بر این تولید اولئانولیک اسید در اندام‌های مختلف گیاه (برگ، گلبرگ و ریشه) و ریشه مویین و نیز اثر محرک متیل جاسمونات در میزان تولید این ترکیب دارویی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه گیاهچه استریل: بذرهای همیشه بهار از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. بذرها ابتدا چند ساعت درون آب خیسانده شدند و بعد پوسته بذرها جدا شد. سپس بذرها به مدت ۵ دقیقه در محلول بنومیل ۱۰۰ گرم در لیتر، ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، بذرها به محیط کشت حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیترآگار منتقل گردیدند. بذرها پس ۳-۴ روز جوانه زدند و پس از یک هفته به محیط کشت MS جامد (۲۳) حاوی ۲۵ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۸ انتقال یافتند و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا گیاهچه های یک ماهه تهیه شوند.

تهیه سوسپانسیون باکتری: سویه های 15834، 2656، MSU, A_4 و R1000 از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* از جهاد دانشگاهی دانشگاه فردوسی مشهد

تهیه شدند. برای اطمینان یافتن از صحت باکتری‌های مورد نظر و عدم آلودگی آنها از تأیید بخش T-DNAی باکتری با آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *rol*C استفاده شد.

سویه‌های مورد بررسی در محیط کشت LB مایع (۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم در لیتر کلرید سدیم) کشت داده شدند و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تا رسیدن به OD مناسب (۰/۸) قرار داده شدند. OD باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. به‌منظور آماده سازی سوسپانسیون باکتری، ۱۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و بعد رسوب باکتری در ده میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز حل گردید.

هم‌کشتی: برگ‌ها از گیاهچه جدا شده و در قسمت رگبرگ با نوک یک سرنگ دو میلی لیتری، با باکتری آلوده شد. سپس ریزنمونه های تلقیح شده در داخل پتری‌دیش‌های استریل حاوی دو نوع محیط کشت پایه MS $^1/_2$ و B5 $^1/_2$ (۱۰) قرار گرفتند و به اتاقک رشد با دمای ۲۴±۱ °C منتقل شدند. ریزنمونه‌ها تا زمان ظهور ریشه در محل زخم، در اتاق رشد در شرایط نوری متفاوت (روشنایی و تاریکی) نگهداری شدند. حدود دو تا سه روز بعد از تلقیح، باکتری در اطراف ریزنمونه ها شروع به رشد نمود. برای حذف باکتری در یک مرحله ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو گردیدند و دوباره به محیط‌های MS $^1/_2$ و B5 $^1/_2$ جامد جدید حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند.

یک تا دو هفته پس از تلقیح، اولین ریشه های مویین تراریخت در محل تلقیح ظاهر شدند. پس از ظهور ریشه‌های مویین، درصد تولید ریشه‌های مویین توسط سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های درصدی ابتدا به کمک روش Arcsin تبدیل گردیدند و بعد آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار JMP انجام شد. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام و آنالیز شد.

استقرار و نگهداری ریشه‌های مویین: زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود ۲ تا ۳ سانتیمتری رسید، ریشه ها جدا و به درون ارلن های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت مایع ½ B_5 با pH=۵/۵ منتقل شده و در تاریکی و دمای ۲۴±۱ °C بر روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شده و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. کلون های ریشه مویین تولید شده از گیاه همیشه بهار رشد بسیار آهسته ای داشتند. پس از گذشت سه ماه، کلونی که بیشترین میزان رشد را نشان داد (کلون A1 که حاصل تلقیح سویه A_4 بود) برای انجام سایر آزمایش‌ها انتخاب شد.

تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین: برای تأیید تراریختگی از آنالیز PCR برای ژن *rol*C استفاده شد. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی که برای تکثیر ژن *rol*C استفاده گردید شامل توالی‌های 5'-CTCCTGACATCAAACTCGTC-3' و 3'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-5' بودند. همچنین به‌منظور اثبات عدم آلودگی ریشه های مویین، از یک جفت آغازگر کاملا اختصاصی و مونومرف برای ژن *vir* استفاده شد که تکثیر قطعه ای به طول ۱۰۵۰ جفت باز را انجام می‌داد.

بررسی ثبات رشد و تأثیر هورمون IAA بر رشد ریشه‌های مویین: به‌منظور بررسی ثبات رشد، میزان رشد ریشه‌های مویین تا دو ماه متوالی هر بیست روز یکبار اندازه گیری شد. بدین منظور از کلون A1 انشعابات ۵ تا ۶ سانتی متری جدا سازی شده و در ۴ نوع محیط کشت $^1/_2$B5, $^1/_4$B5, $^1/_2$MS, $^1/_4$MS به دو صورت مایع و جامد

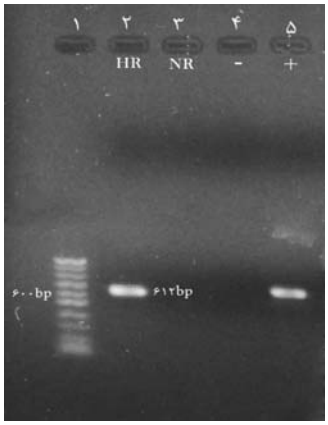
و به‌همراه هورمون IAA با سه غلظت ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کشت شدند. همزمان با ریشه‌های تراریخت، ریشه‌های غیرتراریخت از گیاهچه‌های استریل رشدیافته در شرایط این ویترو نیز جداسازی شده و به محیط‌های مشابه انتقال یافتند و تیمارهای مشابه با تیمارهای ریشه‌های مویین بر روی آنها اعمال شد. در نهایت بعد از گذشت ۶۰ روز وزن تر و خشک آنها اندازه‌گیری شد.

تیمار با متیل جاسمونات: ریشه‌های مویین به ارلن های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت B5 ½ مایع حاوی سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از محرک متیل جاسمونات انتقال یافتند و به اتاق رشد در تاریکی و دمای ۲۴±۱ °C و بر روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه منتقل شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، ریشه‌های مویین از محیط کشت خارج شده و به‌وسیله فریز درایر خشک شدند.

اندازه‌گیری مقدار اولئانولیک اسید: مقدار اولئانولیک اسید در ریشه‌های مویین و در اندام های مختلف گیاه همیشه بهار (ریشه، گلبرگ، برگ) رشد یافته در شرایط طبیعی، به روش HPLC تعیین شد. ابتدا ریشه‌های مویین تیمار شده با متیل جاسمونات، برگ های جوان ۲ ماهه، گلبرگ و ریشه‌های طبیعی گیاه همیشه بهار رشد یافته در گلخانه، جمع آوری شده و توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند. یک گرم از بافت‌های خشک شده گیاه به مدت ۴۰ دقیقه با ۴۰ میلی‌لیتر متانول تحت التراسونیک عصاره‌گیری شدند. سپس متانول در شرایط خلأ در دستگاه روتاری تبخیر گردید. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳۰ میلی‌لیتر اتیل استات به آن اضافه و در قیف جداکننده (دکانتور) جداسازی انجام شد. پس از حذف حلال، عصاره خشک در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل و با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتری تحت فشار فیلتر شده و در یخچال نگهداری گردید. برای تعیین محتوای اولئانولیک اسید از دستگاه HPLC ساخت شرکت Knauer آلمان، مجهز به اتوسمپلر ۳۹۰۰، پمپ ۱۰۰۰، آشکارساز PDA ۲۰۰۰۰ و ستون Eurospher 100-5 C18 با ابعاد ۴٫۶*۲۵۰ mm در طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده شد. فاز متحرک مخلوطی از ۷۸ میلی‌لیتر متانول، ۱۲/۹۵۰ میلی‌لیتر آب و ۵۰ میکرولیتر اسیدفسفریک بود. سرعت جریان فاز متحرک در این آزمایش ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه و غلظت استاندارد یک ppm بود. غلظت اولئانولیک اسید با توجه به منحنی استاندارد و در دو تکرار محاسبه شد.

نتایج

برای اطمینان از صحت آگروباکتریوم‌های مورد استفاده در عمل هم‌کشتی، باکتری‌های مورد نظر برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol*C مورد آزمون PCR قرار گرفتند. نتایج حاصل، حضور T-DNA را تأیید نموده و قطعه ۶۱۲ bp مربوط به *rol*C در چاهک‌های ژل الکتروفورز در سویه‌های مختلف باکتری مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج حاصل از **PCR** ژن ***rol*C**. چاهک‌ها به ترتیب ۱- نشانگر **bp** ۱۰۰+؛ ۲-قطعه تکثیر شده **bp** ۶۱۲ مربوط به ژن ***rol*C** در **DNA**ی استخراجی از ریشه‌های مویین؛ ۳-ریشه نرمال؛ ۴- کنترل منفی؛ ۵- محصول **PCR** ژن ***rol*C** برای پلاسمید باکتری

تقریباً ۱۰ تا ۱۵ روز پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ گیاه همیشه بهار با سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌های مویین شروع به ظاهر شدن کردند. اولین ریشه‌های مویین، ۱۰ روز پس از تلفیح ظاهر شده و مربوط به سویه MSU بودند. ریشه مویین حاصل از سویه ۲۶۵۶ نسبت به سایر

سویه‌ها دیرتر ظاهر شدند. ریشه‌های مویین هم در سطح برگ و هم در زیر برگ ها ایجاد شدند.

در تمامی محیط کشت‌ها ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های نرمال سرعت رشد بیشتری داشتند و دارای ظاهری منشعب و کرک مانند بودند. ریشه‌های طبیعی در محیط‌های بدون هورمون پس از گذشت دو ماه، تغییر رنگ دادند و رشد بسیار آهسته‌ای داشتند. در محیط‌های حاوی هورمون، ریشه‌های طبیعی رشد بیشتری از محیط فاقد هورمون داشتند اما بعد از گذشت ۶ ماه، آنها هم اثراتی از قهوه‌ای شدن را نشان می‌دادند (شکل ۲).

شکل ۲- ریشه‌های مویین (الف) و ریشه‌های نرمال (ب) کشت شده در محیط B5 ½ حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون IAA بعد از شش ماه

همانند ریشه‌های مویین، ریشه‌های طبیعی نیز در محیط های کشت حاوی هورمون IAA، کالوس تولید کردند. مشاهدات نشان داد که میزان تولید کالوس در محیط های جامد از محیط مایع بیشتر بود. در محیط کشت جامد کالوس در نواحی که ریشه‌های مویین با محیط کشت در تماس بود تولید می شد. همچنین میزان تولید کالوس در محیط کشت‌های B5 از MS بیشتر بود و رنگ ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط های MS تا حدودی تیره‌تر از محیط های B5 بود. در محیط های فاقد هورمون، ریشه‌های نرمال و ریشه‌های مویین هیچ کالوسی تولید نکردند.

در این پژوهش، میزان القای ریشه‌های مویین در سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* متفاوت بود. سویه MSU و ۱۵۸۳۴، به‌ترتیب با ۴۳/۴ و ۳۹/۴ درصد بالاترین و سویه ۲۶۵۶ با ۱۳/۶۹ درصد کمترین میزان تولید ریشه مویین را داشتند (شکل۳).

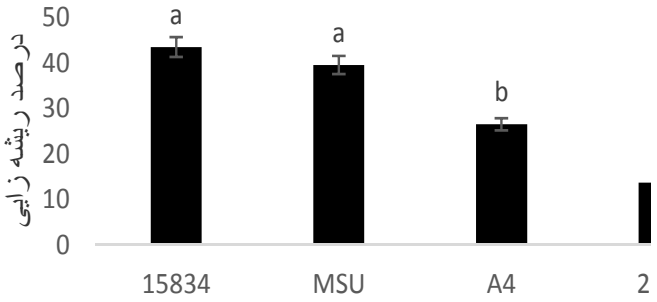
سویه R1000 توانایی تولید ریشه‌های مویین را در گیاه همیشه بهار نداشت و تنها در تعدادی از ریزنمونه‌ها کالوس‌هایی با رشد اندک ایجاد شد. ریزنمونه‌های برگ همیشه بهار با سرنگ حاوی آب مقطر نیز خراش داده شدند و این ریزنمونه‌ها هیچ ریشه مویین تولید نکردند.

برای اثبات قطعی تراریخته بودن ریشه‌های مویین از آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن *vir* استفاده شد. تکثیر این آغازگر اختصاصی ، حضور ژن *vir* را که خارج از T-DNAی پلاسمید است اثبات می کند. با مشاهده باند بر روی ژل آگارز در هر یک از نمونه‌های حاصل از PCR می‌توان به حضور این ژن در DNAی استخراج شده و آلودگی باکتریایی در نمونه پی برد. عدم رؤیت باند در چاهک مربوط به ریشه‌های مویین و طبیعی نشان دهنده عدم آلودگی این ریشه‌ها به باکتری می‌باشد (شکل ۴).

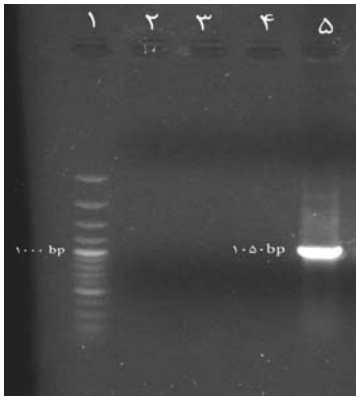
دو محیط کشت $^1/_2$B5 و $^1/_2$MS از نظر درصد تولید ریشه مویین، اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند. محیط کشت $^1/_2$B5 با ۳۵/۸۴ درصد، نسبت به محیط کشت $^1/_2$MS با ۲۵/۶۷ درصد، برای بالا بردن میزان تولید ریشه مویین محیط مناسب‌تری بوده‌است (شکل ۵).

میزان تولید ریشه‌های مویین در شرایط نور و تاریکی به‌ترتیب ۲۹/۰۷ درصد و ۳۲/۴۴ درصد بود و اختلاف معنی‌داری بین این دو مشاهده نشد. نمودار اثر متقابل سویه باکتری و شرایط نوری نشان می‌دهد که بیشترین درصد تولید ریشه مربوط به سویه ۱۵۸۳۴ و در شرایط تاریکی می‌باشد. کمترین درصد نیز مربوط به سویه ۲۶۵۹ و در شرایط تاریکی است. سویه‌های مختلف اگروباکتریوم در

دو شرایط نور و تاریکی اختلاف معنی داری نشان ندادند (شکل ۶).

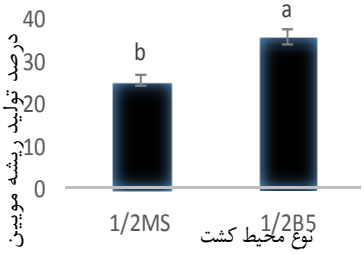


شکل ۳- اثر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم بر تولید ریشه مویین گیاه همیشه بهار

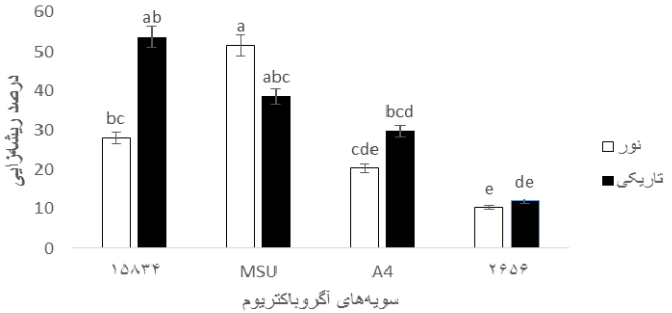


شکل ۴- حضور قطعه ۱۰۵۰ جفت بازی ژن *vir* در باکتری و نبود آن در کلون ریشه‌ی مویین .

چاهک‌ها به ترتیب: ۱- سایز مارکر ۲- کلون ریشه مویین ۳-ریشه نرمال ۴-کنترل منفی ۵- محصول PCR ژن *vir* برای پلاسمید باکتری



شکل۵- اثر محیط کشت بر درصد تولید ریشه مویین در گیاه همیشه بهار

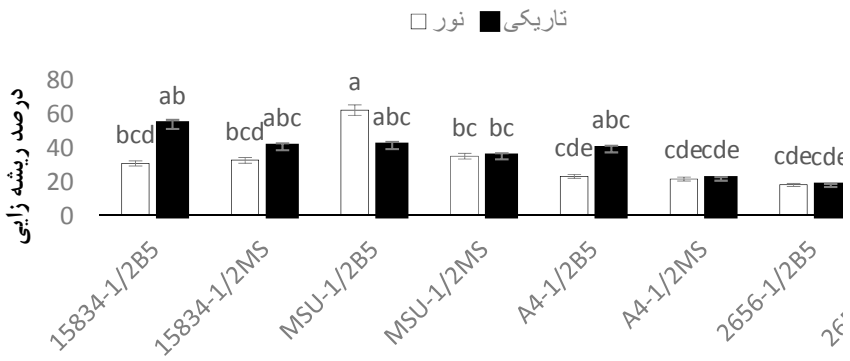


شکل ۶- اثر متقابل سویه باکتری و شرایط نوری بر تولید ریشه مویین گیاه همیشه بهار

همان طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، فقط درصد ریشه‌زایی توسط سویه MSU و در شرایط نوری بین محیط کشت MS ½ و B5 ½ اختلاف معنی داری داشت. البته بین سایر سویه‌ها از نظر ریشه‌زایی در دو محیط کشت مختلف B5 ½ و MS ½ در شرایط نور و تاریکی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

میزان رشد هر دو ریشه تراریخت و طبیعی در محیط کشت‌های B5 ½ و B5 ¼ بیشتر از MS ½ و MS ¼ بود. رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت‌های B5 ½ و B5 ¼ تقریبا دو برابر محیط کشت‌های MS ½ و MS ¼ رشد داشتند.

در این بررسی، انواع مختلف محیط کشت پایه بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین تأثیر یکسانی داشته اند، با این تفاوت که وزن خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت B5 ½ به طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت B5 ¼ بود (جدول ۱).



شکل ۷- اثر برهمکنش سویه باکتری، محیط کشت و شرایط نوری بر تولید ریشه مویین گیاه همیشه بهار

جدول ۱- مقایسه اثرات سه‌گانه محیط کشت، نوع محیط و غلظت‌های مختلف هورمون IAA بر میزان رشد ریشه‌های مویین و ریشه‌های طبیعی

نوع محیط	هورمون IAA / ترکیب محیط	وزن خشک ریشه مویین (گرم)			وزن تر ریشه مویین (گرم)			وزن تر ریشه نرمال (گرم)		
		۰ mg/l	۰/۵ mg/l	۱ mg/l	۰ mg/l	۰/۵ mg/l	۱ mg/l	۰ mg/l	۰/۵ mg/l	۱ mg/l
محیط مایع	½ B5	0.271^{bcd}	0.3169^{bc}	0.3968^{a}	7.2591^{cd}	8.4983^{abc}	10.6562^{a}	3.1526^{e}	4.0225^{c}	4.557^{b}
	¼ B5	0.2268^{def}	0.2269^{def}	0.2495^{cde}	6.0897^{def}	6.7815^{cde}	7.4590^{cd}	1.9795^{g}	5.0208^{a}	2.5431^{f}
	½ MS	0.1391^{gh}	0.1067^{gh}	0.1284^{gh}	3.6966^{gh}	2.8227^{gh}	3.4081^{gh}	0.1645^{mn}	0.8443^{jk}	0.9089^{ijk}
	¼ MS	0.1276^{gh}	0.1312^{gh}	0.1624^{fgh}	3.3998^{gh}	3.4989^{gh}	4.3436^{fgh}	0.8223^{jkl}	0.9689^{ij}	0.7835^{jkl}
محیط جامد	½ B5	0.2237^{def}	0.2283^{def}	0.2683^{bcd}	5.9823^{def}	6.8505^{cde}	8.0529^{bcd}	1.4322^{h}	2.4717^{f}	3.5136^{de}
	¼ B5	0.1752^{efg}	0.2493^{cde}	0.333^{ab}	4.6720^{efgh}	7.4796^{cd}	10.0192^{ab}	1.8973^{g}	4.6693^{ab}	3.5754^{d}
	½ MS	0.1526^{fgh}	0.1444^{gh}	0.1753^{efg}	4.0620^{fgh}	4.0880^{fgh}	4.9660^{efg}	0.0792^{n}	1.2990^{hi}	0.4163^{lmn}
	¼ MS	0.1128^{gh}	0.0966^{h}	0.1128^{gh}	2.9852^{gh}	2.7237^{h}	3.1862^{gh}	0.0490^{n}	0.4970^{klm}	0.3064^{mn}

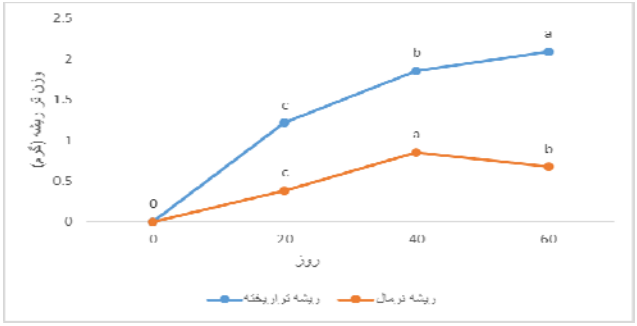
داده ها میانگین سه تکرار هستنند. در هر ستون، گروه های واجد حروف یکسان، تفاوت معنی دار ندارند.

بر اساس نتایج حاصل، میزان رشد ریشه مویین *C. officinalis* در محیط کشت B5 ½ مایع از B5 ½ جامد و سایر محیط کشت‌ها بیشتر بوده و اختلاف معنی داری با آنها نشان داده است. رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت‌های مایع و جامد MS ½, B5 ¼ و MS ¼ اختلاف معنی داری نشان نداد.

استفاده از هورمون IAA با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت توانست میزان وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین را به صورت معنی داری افزایش دهد اما غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون اثری بر رشد ریشه نداشت (جدول ۱). تأثیر هورمون بر رشد ریشه‌های نرمال با ریشه‌های مویین متفاوت بود. در کشت ریشه‌های طبیعی، استفاده از هورمون IAA در هر دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر با محیط کشت فاقد هورمون اختلاف معنی داری داشت.

رشد ریشه‌های مویین در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون IAA در دو محیط کشت B5 ½ و B5 ¼ اختلاف معنی داری با هم نداشت (جدول یک). در محیط کشت B5 ½ و در غلظت هورمون یک میلی‌گرم بر لیتر رشد ریشه‌های مویین بیشتر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و محیط فاقد هورمون بود. اما در محیط کشت B5 ¼ بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون اختلاف معنی داری دیده نشد. میزان رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت‌های MS ½ و MS ¼ در هیچیک از غلظت های هورمونی اختلاف معنی داری نشان نداد. ریشه‌های مویین در محیط B5 ½ و حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA بیشترین رشد را داشتند.

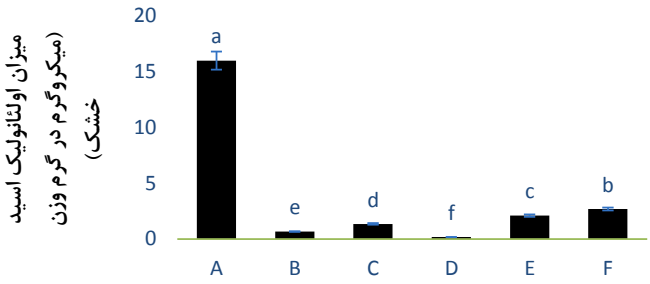
وزن ریشه‌های مویین لاین A_1 و ریشه‌های نرمال، در محیط کشت B5 ½ مایع فاقد هورمون، در سه فاصله زمانی ۲۰ روزه اندازه‌گیری شد. ریشه‌های طبیعی و ترایخته در دوره‌های زمانی مختلف میزان رشد متفاوتی داشتند. ریشه‌های مویین در ۲۰ روز اول رشد آهسته‌ای داشتند و بین روزهای ۶۰-۴۰ بالاترین میزان رشد را داشتند. رشد ریشه‌های طبیعی هم در ۲۰ روز اول آهسته‌تر بود، در بین روزهای ۲۰ تا ۴۰ افزایش پیدا کرد اما در بازه زمانی سوم روند کاهشی داشت (شکل ۸). رشد ریشه‌های مویین در ۲۰ روز دوم به میزان ۰/۶۴ گرم نسبت به ۲۰ روز اول رشد بیشتری داشته است. ریشه‌های مویین در ۲۰ روز سوم حدود ۰/۲۴ گرم از ۲۰ روز دوم بیشتر رشد کرده‌اند.



شکل ۸- منحنی رشد ریشه‌های مویین و ریشه‌های طبیعی گیاه همیشه بهار طی ۶۰ روز

بر اساس نتایج آنالیز HPLC، مقدار اولئانولیک اسید در ریشه طبیعی و ریشه مویین گیاه همیشه بهار به‌ترتیب ۱۶ و ۰/۶۶۵ میکروگرم در یک گرم وزن خشک بود. به‌عبارت دیگر، مقدار اولئانولیک اسید در ریشه طبیعی ۲۴ برابر بیشتر از ریشه مویین بود. میزان اولئانولیک اسید در ریشه گیاه ۱۶ میکروگرم، در برگ‌های همیشه بهار ۲/۱ میکروگرم و در گلبرگ گیاه همیشه بهار۲/۷ میکروگرم در گرم وزن خشک بود (شکل۹). در ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار متیل جاسمونات، غلظت اولئانولیک اسید به‌ترتیب ۱/۳۵ و ۰/۱۷۶ میکروگرم

در گرم از وزن خشک بود. بنابراین کاربرد این محرک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در کشت ریشه‌های مویین گیاه همیشه بهار می‌تواند باعث افزایش تولید اولئانولیک اسید شود. کاربرد متیل جاسمونات با این غلظت در کشت ریشه‌های مویین همیشه بهار باعث کاهش مقدار اولئانولیک اسید در ریشه‌های مویین می‌شود. میزان اولئانولیک اسید در محیط کشت ریشه‌های مویین اولئانولیک اسید وجود نداشت. این نتیجه نشان می‌دهد که اولئانولیک اسید از ریشه‌های مویین به محیط انتشار پیدا نکرده‌است.



شکل ۹ – میزان اولئانولیک اسید در ریشه‌های مویین و اندام‌های مختلف گیاه همیشه بهار. A: ریشه طبیعی، B: ریشه مویین، C: ریشه مویین با غلظت ۵۰ میکرومولار بر لیتر متیل جاسمونات، D: ریشه مویین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر لیتر متیل جاسمونات، E: برگ، F: گلبرگ

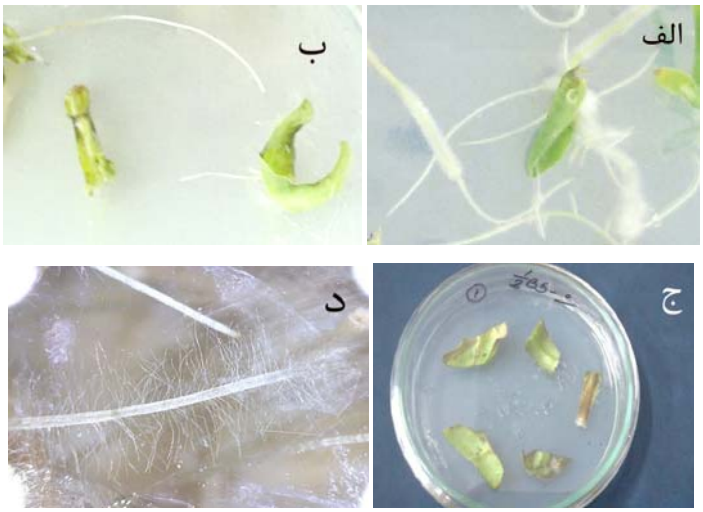
بحث

طبق مشاهدات، محل رویش ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ گیاه همیشه بهار، محل تلقیح نمونه با باکتری و نیز قسمت پایینی نمونه نزدیک رگبرگ بود. دلیل این امر احتمالا فراوانی آوندهای حاوی آب و مواد غذایی در رگبرگ اصلی است که باعث می‌شود مواد غذایی لازم برای تولید و رشد ریشه‌ها فراهم شود. البته پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های برگی به تلقیح با آگروباکتریوم می‌تواند در نتیجه شرایط فیزیکی مختلف و خصوصیات فیزیولوژیکی بافت در پاسخ به شرایط کشت باشد (۱۹). ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، مورفولوژی متفاوتی داشتند. سویه MSU ریشه‌های مویینی را القا کرد که در بیشتر موارد ظاهری کرک دار و منشعب داشتند اما ریشه‌های القا شده توسط سویه 15834 فاقد کرک بودند و انشعابات بسیار کمی داشتند (شکل ۱۰). بین نژادهای مختلف باکتری از نظر میزان القای ریشه و رشد، تفاوت بارزی وجود دارد و ریشه های مویین بوجود آمده از نظر فنوتیپی (میزان انشعاب و تراکم پرزهای ریشه‌ای) با هم متفاوت هستند (۳۷).

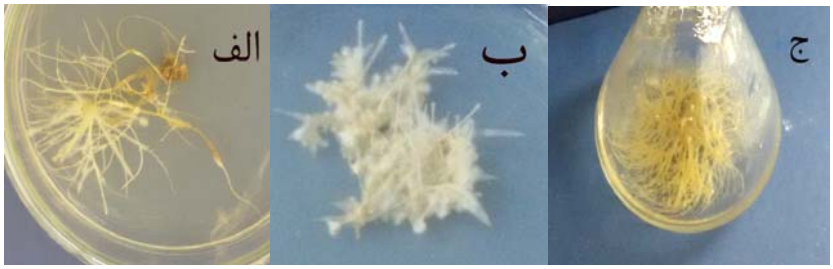
کاربرد هورمون IAA در محیط کشت باعث تغییر ریخت شناسی و کالوس زایی ریشه‌های مویین شد و موجب شد ریشه‌های مویین ظاهری کرک دارتر داشته باشند (شکل۱۱). در تحقیقی که سائوروین و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی ریشه‌های مویین گیاه *Hyoscyamus albus* تراریخته شده توسط سویه A_4 انجام دادند نتایج مشابهی دیده شد. به طوری که استفاده از هورمون IAA در غلظت‌های ۰/۴ تا ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر باعث تغییر ریخت شناسی ریشه‌های مویین و ایجاد ساختارهای کالوس‌مانند شد.

هم ریشه‌های مویین و هم ریشه‌های طبیعی، در محیط‌های کشت حاوی هورمون IAA، کالوس تولید کردند. فنوتیپ ریشه مویین تراریخت توسط دو دسته ژن که بر روی پلاسمید Ri باکتری قرار دارند تولید می‌شوند. این ژن‌ها شامل ژنهای *aux* در منطقه TR از T-DNA و ژنهای *rol* (root loci) در ناحیه Tl از T-DNA می‌باشند (۱۲). اپین نیز توسط ژنهای *ags* که در ناحیه TR قرارگرفته‌اند سنتز

می‌شود و آگروباکتریوم از این ترکیب به‌عنوان منبع کربن و هیدروژن استفاده می‌کند. ژن *aux* فقط در ۲۵ تا ۶۰ درصد کشتهای ریشه که فرم تیپیک دارند تظاهر می‌یابد در حالیکه این ژن در تمامی ریشه‌هایی که قدرت تولید کالوس دارند، بروز پیدا می‌کند. بنابراین ارتباط معنی‌داری بین ژنهای *aux* و مورفولوژی ریشه‌های تراریخت وجود دارد و حذف ژن *aux* در پلاسمید سبب شده که ریشه های مویین تراریخت با فنوتیپ کالوس مانند تولید نشوند (۲۲).



شکل ۱۰- ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه‌های MSU (الف) ؛ ۱۵۸۳۴ (ب) ؛ R1000 (ج) بعد از ۱۵روز؛ نمونه‌ای از ریشه‌های مویین گیاه همیشه بهار (د)



شکل ۱۱- ریشه‌های مویین رشدیافته در محیط کشت جامد B5 ½ فاقد هورمون (الف)؛ محیط کشت جامد B5 ½ حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون IAA (ب)؛ محیط کشت مایع B5 ½ حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون IAA(ج)

کاربرد هورمون‌های گیاهی در محیط کشت، می‌تواند میزان رشد و نیز مورفولوژی ریشه‌های مویین را تحت تأثیر قرار دهد. در این تحقیق استفاده از هورمون IAA در محیط کشت جامد، مورفولوژی ریشه‌های مویین را تغییر داد و باعث شد ریشه‌های مویین رشد کالوسی پیدا کنند. ریشه‌های مویین انتقال یافته به محیط کشت جامد حاوی هورمون، ابتدا شروع به کالوس زایی کرده و بعد رشد عادی پیدا کردند، در حالی که در محیط کشت مایع، تشکیل کالوس به وضوح کمتر از محیط جامد بود. افزودن هورمون IAA به محیط کشت ریشه‌های مویین گیاه *H. albus* نیز باعث افزایش رشد و نیز تغییر مورفولوژی ریشه‌های مویین شد (۲۹). کای و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که استفاده از هورمون 2,4-D در محیط کشت باعث تغییر مورفولوژی ریشه‌های مویین و کالوس زایی *H. albus* شده‌است (۸).

در این پژوهش، میزان القای ریشه‌های مویین در سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* متفاوت بود. سویه MSU و ۱۵۸۳۴ به‌ترتیب با ۴۳/۴ و ۳۹/۴ درصد بالاترین و سویه ۲۶۵۶ با ۱۳/۶۹ درصد کمترین میزان تولید ریشه مویین را داشتند (شکل۳). نتیجه مشابهی توسط نادریان (۱۳۹۳) در القای ریشه مویین توسط سویه ۲۶۵۶ در گیاه داتوره گزارش شده است (۴). حمیدی (۱۳۹۲) برای سویه‌های MSU و ۱۵۸۳۴ در گیاه پروانش نیز درصدهای مشابهی به دست آورد، در حالیکه سالاری (۱۳۹۰) میزان تولید ریشه مویین را با سویه ۱۵۸۳۴ در ریزنمونه‌های برگ گیاه پروانش دو درصد گزارش کرد. سویه ۲۶۵۶ که در این پژوهش کمترین درصد تولید ریشه مویین را داشته در تحقیق حمیدی (۱۳۹۲) هیچ ریشه مویینی را القا نکرده است (۱و۲). میزان القای ریشه مویین توسط سویه A4, در این پژوهش ۲۶/۴ درصد بود. مشتاقی (۱۳۸۲) و نادریان (۱۳۹۳) میزان تولید ریشه مویین را برای سویه A4 در گیاه داتوره، به‌ترتیب ۸۰ و ۸۴ درصد گزارش کرده‌اند (۳و۴).

سویه ۱۵۸۳۴ در ۴۰ درصد ریزنمونه‌های گیاه هم خانواده همیشه بهار *Artemisia annua* توانسته ریشه مویین را القا کند اما سویه LBA4902 هیچ ریشه مویینی را در این گیاه القا نکرده است (۷). در این تحقیق، سویه R1000 هیچ ریشه مویینی تولید نکرد اما در تحقیق پارک و فاچینی (۲۰۰۰)، که اثر ۵ سویه مختلف اگروباکتریوم را روی گیاهان *Papavera somniferum* و *Scholzia californica* بررسی کردند سویه R1000 القای ریشه مویین بیشتری داشت و همچنین بالاترین سرعت رشد ریشه را نیز نشان داد (۲۶). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قدرت تشکیل ریشه مویین تراریخت توسط نژادهای مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز متفاوت است و بستگی به قدرت بیماری‌زایی آنها دارد. از این‌رو ممکن است یک گونه گیاهی به یک سویه باکتری حساس نباشد و به سویه دیگر واکنش نشان دهد.

سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز بر اساس نوع اپین به انواع مختلف تقسیم بندی می شوند. طبق مشاهدات به دست آمده به نظر می‌رسد باکتری‌های دسته اگروپین (برای مثال سویه‌های TR105, A4, A2-83, R1000, HR1, 15834, LBA9402) در ایجاد بیماری‌زایی از قدرت بیشتری نسبت به باکتری‌های دسته مانوپین (TR101, TR7 8196) و اکتوپین برخوردار هستند. این امر احتمالا به دلیل حضور دو یا چند ناحیه T-DNAی مجزا در پلاسمید Ri این باکتری‌ها می باشد که باعث افزایش شانس انتقال T-DNA به ژنوم گیاه میزبان و در نتیجه افزایش قدرت بیماری زایی این سویه‌ها می‌شود (۲۶).

محیط کشت ½B5، نسبت به محیط کشت ½MS برای بالا بردن میزان تولید ریشه مویین، محیط مناسب‌تری بوده‌است (شکل ۵). بنابراین به نظر می‌رسد غلظت کمتر نمک در محیط کشت ½ B5 نسبت به محیط کشت ½ MS محیط مطلوب تری را برای تولید ریشه‌های مویین فراهم می‌کند. تیواری و همکاران (۲۰۰۸) نیز رشد ریشه‌های مویین گیاه *Scutellaria baicalensis* را در محیط کشت ½ B5، بیشتر از ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط کشت ½ MS گزارش کرده‌اند (۳۱). در بررسی اثر محیط کشت‌های B5 و MS با غلظت‌های کامل و نصف روی میزان رشد ریشه‌های مویین در گیاه *Valeriana officinalis*، مشخص شد که میزان رشد ریشه‌ها در محیط کشت‌های ½ B5 و B5 تفاوتی نداشت اما میزان رشد ریشه در محیط کشت ½ MS بیشتر از محیط کشت MS بود. گرچه ریشه‌ها در محیط کشت B5 رشد بهتری نسبت به محیط کشت MS داشتند (۲۵). غلظت محیط کشت یکی از عواملی است که می‌تواند رشد ریشه‌های مویین را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰). پوتالون و همکاران (۲۰۰۹) وزن خشک ریشه‌های مویین گیاه *Stephania suberosa* را در غلظت‌های مختلف محیط کشت MS بررسی کردند. آنان گزارش کردند که وزن خشک ریشه مویین در غلظت ¼ بیشتر از ½ بوده است

اما وزن خشک ریشه مویین در محیط کشت MS ۱/۸ کاهش پیدا کرده‌است (۲۷). بر اساس گزارش نادریان (۱۳۹۳) رشد ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح گیاه داتوره با سویه A4، در محیط کشت MS ½ بیشتر از MS ¼ بود، گرچه رشد این ریشه‌ها در محیط کشت B5 ½ از B5 ¼ کمتر بوده است (۴).

گاهی وجود نور می‌تواند مقدار تولید ریشه‌های مویین را تحت تأثیر قرار دهد. در تحقیق حمیدی (۱۳۹۲) میزان تولید ریشه مویین برای گیاه پروانش در شرایط روشنایی بیشتر از تاریکی بود. طبق پژوهش نادریان (۱۳۹۳) ریزنمونه‌های گیاه داتوره نیز در شرایط تاریکی ریشه مویین بیشتری تولید کردند (۱و۴) اما در این تحقیق به جز سویه MSU، سایر سویه ها از نظر مقدار تولید ریشه‌های مویین در شرایط نور و تاریکی، تفاوت معنی داری ایجاد نکردند.

تأثیر هورمون بر رشد ریشه‌های نرمال با ریشه‌های مویین متفاوت بود. در کشت ریشه‌های طبیعی، استفاده از هورمون IAA در هر دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر با محیط کشت فاقد هورمون اختلاف معنی داری داشت. ازجمله ژنهایی که در تولید ترکیبات اکسین دخالت دارند ژنهای *rol*A ، *rol*B و *rol*C می باشند که در بخش TL-DNA از T-DNA پلاسمید آگروباکتریوم رایزوجنز حضور دارند و ترکیبات مشابه اکسین تولید می نمایند. علاوه بر این ژنها، در بخش TR-DNA پلاسمید آگروباکتریوم، ژنهای *tms*-1 و *tms*-2 نیز حضور دارند که مسیر بیوسنتزی دیگری برای اکسین فراهم می‌کنند (۲۲).

افزایش و بهبود رشد ریشه های مویین با استفاده از اکسین ها ازجمله IAA در گونه های مختلف گیاهی مانند *Linum flavum*، *Lobelia inflate* و *Nepeta cataria* گزارش شده است (۱۶،۶،۳۵). ژن های *rol* واقع در T-DNAی باکتری *Agrobacterium rhizogenes* که در القای ریشه مویین نقش دارند، باعث افزایش حساسیت سلول‌ها به هورمون اکسین می‌شوند. افزایش هورمون اکسین در ریشه‌های تراریخته می‌تواند باعث افزایش رشد آنها شود (۱۵).

میزان رشد ریشه‌های مویین همیشه بهار در بازه‌های زمانی مختلف متفاوت بوده است (شکل ۸). در گیاه هم خانواده همیشه‌بهار یعنی کاسنی، ریشه‌های مویین تا روز ۳۰ افزایش رشد نشان دادند اما از روز ۳۰ تا ۳۵ میزان رشد کمتری داشته اند (۱۸). در تحقیق مشتاقی (۱۳۸۲) نیز ریشه‌های مویین گیاه داتوره در ماه اول نسبت به ماه‌های دوم و سوم رشد بیشتری داشته اما در ماه سوم رشد ریشه‌های مویین کاهش یافته است.

محرک متیل جاسمونات، تنها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار اولئانولیک اسید را افزایش داد. ذاکر و همکاران (۲۰۱۵) اثر ۳ غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از محرک متیل جاسمونات را بر میزان ترکیب کریپتوتانشینون در کشت ریشه گیاه *Perovskia abrotanoides* بررسی کردند. تنها غلظت ۱۰ میلی‌مولار از این محرک توانسته بود میزان این ترکیب را در مقایسه با نمونه شاهد افزایش دهد. البته دو غلظت دیگر میزان این ترکیب را نسبت به نمونه شاهد کاهش داده بودند (۳۶).

ریشه گیاه همیشه بهار علاوه بر تولید اولئانولیک اسید، منبع ذخیره این ترکیب نیز هستند و اولئانولیک اسید تولید شده در برگ‌های جوان همیشه بهار نیز در ریشه گیاه ذخیره می‌شود (۲۸). در این تحقیق میزان اولئانولیک اسید در ریشه گیاه (۱۶ میکروگرم) حدود هشت برابر برگ‌های همیشه بهار (۲/۱ میکروگرم) است که این نتایج با مطلب فوق مطابقت دارد.

کاربرد هورمون‌های گیاهی در گیاه همیشه‌بهار، ترکیبات شیمیایی مانند کلروفیل‌ها، محتوای کاروتنوئید و اولئانولیک اسید را تغییر می‌دهد. همچنین منطقه کشت گیاه، محیط رشد و تراکم کشت گیاه همه از مواردی هستند که می‌توانند غلظت ترکیبات فیتوشیمیایی را در گیاه همیشه

بهار تحت تأثیر قرار دهند (۱۳). محققان مقادیر متفاوتی از اولئانولیک اسید را در گیاه همیشه بهار گزارش کرده‌اند. دلاگاس و همکاران (۲۰۱۳) میزان اولئانولیک اسید گلیگوزید را در ریشه‌های طبیعی گیاه همیشه بهار رشد یافته در محیط کشت MS ۸/۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اعلام کردند اما مقدار این ترکیب در ریشه همیشه بهار رشد یافته در شرایط گلخانه‌ای در تحقیق رازوسکی و همکاران (۲۰۰۳) ۳۰ میکروگرم در یک گرم وزن تر اعلام شد (۹و۲۸). بنابراین به نظر می‌رسد شرایط کشت همیشه بهار و نیز تفاوت‌های ژنوتیپی در ارقام مختلف همیشه بهار روی میزان تولید اولئانولیک اسید در این گیاه بسیار مؤثر است. دلاگوس و همکاران (۲۰۱۳) میزان اولئانولیک اسید گلیکوزید را در کلون‌های مختلف ریشه‌های مویین گیاه همیشه بهار اندازه‌گیری کردند و مقادیر مختلفی از کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر یک گرم وزن خشک تا ۱۶/۷ میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک را گزارش کردند (۹). در این تحقیق میزان اولئانولیک اسید در یک گرم از وزن خشک ریشه مویین گیاه همیشه بهار ۰/۶۶۵ میکروگرم بود. انتقال T-DNAی آگروباکتریوم به ریشه‌های مویین همیشه بهار ممکن است در مسیر سنتز ترکیبات فیتوشیمیایی در این ریشه‌ها اختلال ایجاد کند و ممکن است میزان تولید این ترکیبات را تحت تأثیر قرار دهد. از این‌رو شاید انتخاب کلون دیگری بتواند به افزایش تولید این ترکیب در ریشه مویین کمک نماید.

منابع

۱- حمیدی، ا. ۱۳۹۲. بهینه‌سازی شرایط تولید ریشه مویین در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) و تأثیر کاربرد محرک متیل‌جاسمونات در تولید آلکالوئیدهای مهم دارویی آن. پایانامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- سالاری ثانی، ا. ۱۳۹۰. بررسی تولید ریشه‌های مویین در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus* roseus) به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانویه با ارزش دارویی. پایانامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- مشتاقی، ن. ۱۳۸۲. تولید ریشه مویین با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* در گیاه *Datura stramonium* و مقایسه میزان و ثبات رشد با ریشه‌های نرمال. پایانامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- نادریان، پ. ۱۳۹۳. مقایسه میزان تولید آلکالوئید هیوسیامین در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید داتوره (*Datura stramonium*) و ریشه مویین حاصل از گیاهان دیپلوئید. پایانامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه فردوسی مشهد.

5- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P. and Vivanco, J.M. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 983-995.

6- Balvanyos, I., Kursinszki, L., Szoke, E. 2001. The effect of plant growth regulators on biomass formation and lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Plant Growth Regulation* 34:339-345

7- Bandeh-Ali1, E., Kyhanfar1, M., Asghari, G. 2012. Investigating the effect of different induction methods on preparation of hairy roots in *Artemisia annua*, using *Agrobacterium rhizogenes*. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 7(5): 454-461.

8- Cai, Z.Z., Kastell, A., Knorr, D., Smetanska, I. 2012. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*. 31:461-477.

9- Dlugosz, M., Wiktorowska, W., Wisniewska, A. and Paczkowski, C. 2013. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis*. *Acta biochimica Polonica* 60(3):467-73.

10- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:151-158.

11- Grzelak, A. and Janiszowska, W. 2002. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 29-40.

12- Jung, G., Tepfer, D. 1987. Use of genetic transformation by the RiT-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass

and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro. *Plant science*. 50:141-151.

13- Khalid, K., Teixeira dasilva, J. 2012. Biologu of *Calendula officinalis* Linn: Focus On Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 6(1): 12-27.

14- Legha, M. R. Prasad, K. V. Singh, S. K. Kaur, C. Arora A. and Kumar S. 2012. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula offlcinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48: 99-106.

15- Lemcke, K., Prinsen, E., Onckelen, H. and Schmulling, T. 2000. The ORF8 gene product of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA has tryptophan 2-monooxygenase activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 13: 787-790.

16- Lin, H., Kwok, K. H., and Doran, P.M. 2003. Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin. *Biotechnology Letters*. 521, 521–525

17- Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 49:57-68.

18-Malarz, J., Stojakowska, A., Kisiel, W. 2002. Sesquiterpene lactones in a hairy root culture of *Cichorium intybus*. *Z Naturforsch C*. 57(12): 994-997.

19- Mano, Y., Ohkawa, H., Yamada, Y.1989.Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science*. 59: 191-201.

20- Matkowski, A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants A review. *Biotechnology Advances*. 26: 548–560.

21- Mengoni, F., Lichtner, M., Battinelli, L., Marzi, M., Mastroianni, CM., Vullo, V., Mazzanti, G. 2002. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. *Planta Medica* 68: 111-114

22- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfil, M., Morales, C., Pifiol, M.T. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in solanaceae plants. *Phytochemistry*. 52:1287-1299.

23- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. 15: 473-497.

24- Ovesna, Z,. Vachalkova, K., Horvathova,D., Tothova. 2004. Pentacyclic triterpenoic acids:new chemoprotective compounds. *Minireview*. *Neoplasma*. 51:327-333.

25- Pakdin Parizi, A., Farsi, M., Nematzadeh, G., Mirshamsi, A. 2013. Impact of different culture media on hairy roots growth of Valeriana officinalis L. *Acta Agriculturae Slovenica* 299-305

26- 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* 51: 1005-1016

27- Putalun, W., Yusakul, G., Patanasethanont, D. 2009. Dicentrine Production from a hairy roots culture of *Stephania suberosa*. *Journal of Biosciences* 64: 692-696

28- Ruszkowski, D. Szakiel, A. and Janiszowska, W. 2003. Metabolism of [3-3H] oleanolic acid in Calendula officinalis L. roots. *Acta Physiologiae Plantarum*. 25: 311-317

29- Sauerwein, M., Wink, M., and Shimomura, K. 1992. Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of Hyoscymus albus. *Journal of Plant Physiology*. 140:147–152

30- Suzuki, S., Yoshiki, T., Yamasaki, N., Yoshizaki, M. 1992. Rapid propagation of *Stephania cephalantha* Hayata by tissue culture. *Japanese Journal of Breeding*. 42: 769 – 777

31-Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang, Z., Guo, G. and Zheng, G. 2008. Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of Scutellaria baicalensis and production of flavonoids in hairy roots. *Biologia Plantarum* 52: 26-35.

32-Washida, D., Koichiro,S., Takido, M. and Kitanaka, S. 2004. Auxins affected ginsenoside production and growth of hairy roots in *Panax* hybrid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27: 657-660.

33-Weathers, P.J., Bunk, G. and Mccoy, M.C. 2005. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cell. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:47–53.

34-Xo, H., Park, J., Kim, Y., Park, N., Lee, S., Park, S. 2009. Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. *Journal of Medicinal Plants Research* 3: 978-981

35-Yang, Y., Lee, S., Park, W., Park, N. and Park, S. 2010. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. *Plant Omics Journal*. 3: 190-193.

36-Zaker, A. Sykora, C. Gössnitzer, F. Abrishamchi, P. Asili, J. Mousavi, S. H. Wawrosch, C. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitiousroot cultures of *Perovskia abrotanoides* KarelArehzoo. *Industrial Crops and Products* 67: 97-102

37-Zhang, Y., Mian, M.R., Bouton, J. H. 2006. Recent molecular and genomic studies on stress tolerance of forage and turf grasses. *Crop Science*. 46:497–511.

38-Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23(4): 283–333.

Optimization of hairy root production in *Calendula officinalis* for production of oleanolic acid

Sohrabinejad Z., Marashi H. and Moshtaghi N.

Biotechnology and Plant Breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Calendula officinalis is a medicinal plant and widely used for its anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and etc properties. Oleanolic acid is an important bioactive compounds which found in *C.officinalis*. Hairy root cultures are characterized by high growth rate and ability to synthesize secondary metabolites. Some factors are effective on the production of hairy roots. So this experiment was performed to select the best strain of *Agrobacterium rhizogenes*, culture medium and light condition for production of hairy roots. Highest (43/4%) and the lowest (13/69%) of hairy root production were obtained by MSU and 2656 strains respectively. The Average production of hairy roots in ½B5 culture medium, 35/84% and in ½ MS culture medium was 25/67%. So it seems that the ½ B5 medium is better culture medium. There was no significant difference between light and dark condition for production of hairy roots. The branches (6-7cm) from A1 clone of hairy roots were cultured in ½ B5, ¼ B5, ½ MS and ¼ MS culture media, in both liquid and solid media, and the branches were treated by three concentrations of auxin (IAA) (0, 5.0 and 1 mg/l). After two months, Hairy roots have highest growth in the ½ B5 culture medium with 1mg/l of IAA. The effect of three levels of methyl jasmonate elicitor (0, 500 and 100mM) on amount of oleanolic acid was investigated in normal roots and hairy roots and determined by HPLC. Methyl jasmonate at 500mM, increased oleanolic acid production but at 100mM concentration, this compound was reduced.

Key words: Calendula officinalis, Hairy roots, HPLC , Oleanolic acid, strains of bacteria