مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۴-۲۴۵
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8

بررسی تاثیر نورهای LED بر القای ریشه موئین و میزان فلاونوئیدها در کالوس گیاه *Onosma pachypoda* توسط *Agrobacterium rhizogenes*

فریبا امینی، سیده بتول حسنی* و فرانسواز برنارد

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

گیاه زنگوله ای پاکوتاه (*Onosma pachypoda* Boiss.)، گیاهی دارویی و متعلق به تیره گاوزبان (*Boraginaceae*) می‌باشد. افزایش متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های نوین زیست فناوری نظیر کشت بافت و القای ریشه موئین توسط *Agrobacterium rhizogenes* می‌تواند کاربردی باشد. در پژوهش حاضر، القای ریشه موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز سویه A4 با روش خشک و غوطه‌ورسازی بر کالوس‌های گیاه *O. pachypoda* تحت تیمار نورهای رنگی LED مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین اثر نورهای LED بر میزان محتوای فلاوونوئید در کالوس‌های تلقیح شده بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد (۵۰ درصد) القای ریشه‌های موئین در نتیجه غوطه‌ور سازی کالوس‌ها در سوسپانسیون آگروباکتریوم ریزوژنز تحت شرایط تاریکی بدست آمد. بیشترین محتوای فلاونوئیدی در کالوس‌های تلقیح شده تحت تیمار نور آبی و تاریکی مشاهده شد. بنابراین، روش غوطه ور سازی روشی مناسب برای تلقیح کالوس‌ها به‌منظور القای ریشه‌های موئین در این گیاه می‌باشد. همچنین به‌نظر می‌رسد که بکارگیری نورهای مختلف LED بر محتوای فلاونوئید در کالوس گیاه *O. pachypoda* موثر می‌باشد.

واژه های کلیدی: زنگوله‌ای پا کوتاه، کالوس، ریشه موئین، فلاونوئید.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۹۹۰۵۹۳۵-۰۲۱ ، پست الکترونیکی:b_hassani@sbu.ac.ir

مقدمه

گیاه زنگوله‌ای پا کوتاه (*Onosma pachypoda* Boiss) از خانواده *Boraginacae* گیاهانی علفی، کم و بیش پایا و دو ساله، حاوی ترکیبات موسیلاژی و نیترات پتاسیم بوده،گل، ساقه، برگ و ریشه این گیاه اثر درمانی دارد. عصاره‌های تعدادی از گونه‌های *Onosma* به عنوان آنتی اکسیدان، ضد باکتری، ضد ویروس و ضد التهاب استفاده شده‌اند (۲۷). ریشه‌های آن‌ها برای درمان اختلالات مثل برونشیت ها، هموروئید، همچنین تسکین درد استفاده می‌شود. در ریشه گیاه به دلیل وجود میزان بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر فلاونوئیدها نقش مهمی در درمان سوختگی‌ها و زخم‌ها دارد (۲۲).

گیاهان دارویی دارای اهمیت جهانی و فراگیر بوده و در شمار میراث‌های بومی کشورها محسوب می‌شوند (۷). امروزه تاکید فراوانی بر استفاده از داروهایی با منشاء طبیعی در درمان و حفظ سلامتی شده‌است (۴). تقریبا یک چهارم داروهای تولید شده، حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده و یا اینکه براساس ترکیبات گیاهی مدلسازی شده‌است (۶). از این میان ترکیبات، فنولیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها بیشتر مورد توجه هستند (۱۹). فلاونوئیدها بزرگترین گروه فنل های گیاهی هستند و به عنوان گروه مهمی از ترکیبات آنتی اکسیدانی نقش مهمی در مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید و هیدروکسیل دارند (۱۴). همچنین فلاونوئیدها نظیر کامفرول و کوئرستین بر روی تنظیم رشد

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8

گیاه تاثیر می‌گذارند (۲۷). فلاونوئیدها بیشتر در میوه‌های جوان، برگ‌ها و ریشه‌ها تجمع می‌یابند (۲). تحقیقات اخیر در زمینه محتوای فلاوونوئید در گونه‌های مختلف جنس *Onosma* نشان داد که گونه *O. pachypoda* بیشترین محتوای فلاوونوئید را دارا می‌باشد (۸). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کم بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می‌رسد یکی از روش‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه ایجاد ریشه‌های موئین می‌باشد (۱). سیستم کشت ریشه موئین بر اساس تلقیح با *A. rhizogenes* به عنوان روشی برای تولید متابولیت‌های ثانویه که در گیاهان سنتز می‌شوند رایج شده‌است. از ویژگی‌های ریشه موئین به دست آمده از تلقیح *A. rhizogenes* می‌توان به رشد در شرایط عاری از هورمون، فقدان ژئوتروپیسم، انشعابات جانبی زیاد، پایداری ژنتیکی و قابلیت تطابق با طراحی بیوراکتور اشاره کرد. میزان تولید متابولیت ثانویه در ریشه‌های موئین به همان اندازه یا بیشتر از ریشه گیاه طبیعی است (۲۵). تغییرات میزان متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین القاشده توسط آگروباکتریوم ریزوژنز در گیاهان *Momordica dioica Roxb* (۲۹)، *Verbascum xanthophoeniceum* (۱۳) و *Calendula officinalis* (۵) گزارش شده است.

بررسی اثرات نورهای رنگی LED بر روی پارامترهای مختلف آناتومیکی و فیزیولوژیکی گیاهان از جمله موضوعات نوینی است که طی چند سال اخیر مورد توجه پژوهشگران علم بیولوژی و بیوتکنولوژی قرار گرفته‌است. مطالعات گوناگونی در مورد تاثیر نورهای رنگی LED بر افزایش محتوای فلاونوئیدها در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌است (۱۳ و ۲۴، ۱۵ و ۳۰)

با وجود پژوهش‌هایی که در زمینه افزایش متابولیت ثانویه در برخی از گونه‌های *Onosma* صورت گرفته‌است اما تاکنون در مورد افزایش متابولیت ثانویه از طریق القای ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز در گونه‌های گیاهی این جنس گزارش مستندی ارائه نشده‌است. بنابراین، هدف از این تحقیق تاثیر نورهای LED و القای ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز بر محتوای فلاونوئید در گیاه زنگوله‌ای پا کوتاه می‌باشد.

مواد و روشها

ضدعفونی کردن بذر و تولید دانه رست استریل: بذر گیاه زنگوله‌ای پا کوتاه مورد استفاده در این پژوهش از منطقه گلابدره (استان تهران) در سال ۱۳۹۷ جمع آوری گردید. بذرها در زیرهود لامینار با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و سه مرتبه با آب مقطر استریل شست وشو داده شدند. سپس بذرهای استریل در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیترجیبرلیک اسید در دمای ۴ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از ۳ ماه، جوانه زنی بذرها صورت گرفت و برای مراحل بعدی کشت القای کالوس از دانه رست‌های استریل استفاده شد.

القای کالوس در گیاه *Onosma pachypoda* : جهت کالوس زایی، قطعات جداکشت از دانه رست ها بر روی محیط کشت جامد B5 شامل سوکروز 3 درصد و آگار 7 درصد به همراه هورمون‌های BAP با غلظت ۰/۹۳ میلی گرم برلیتر و IAAبا غلظت ۰/۱۶ میلی گرم بر لیترکشت داده شدند. طبق تحقیقات گذشته از این محیط کشت و غلظت هورمونی برای تشکیل کالوس در جنس *Onosma* استفاده شده بود (۹). کشت‌ها در اتاق کشت در شرایط تاریکی با دمای 23±2 درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند. واکشت ریز نمونه‌ها هر دو هفته بر روی محیط کشت تازه انجام می‌شد. کالوس ها بعد از ۳ هفته بر روی قطعات دانه رست‌ها تشکیل شدند و سپس این کالوس‌ها برای تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۴-۲۴۵

تلقیح ریزنمونه ها برای القای ریشه موئین: به منظور القای ریشه های موئین از سویه A4 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز استفاده شد. سویه مذکور در محیط کشت LB مایع در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه کشت شد.OD سوسپانسیون باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۸- ۰/۵ تنظیم گردید. طبق تحقیقات گذشته غلظت مناسب برای انتقال ژن توسط *A. rhizogenes* در محدوده 0/8- 0/5 است (۳). برای تلقیح کالوس‌ها از دو روش غوطه ور سازی و روش خشک استفاده شد . در روش خشک با استفاده از اسکالپل از محیط کشت جامد باکتری برداشته شد و سپس بر روی کالوس‌ها کشیده شد. در روش غوطه ور سازی کالوس‌ها با سوسپانسیون باکتری به مدت زمان۱۰ دقیقه تلقیح شدند و سپس کالوس‌ها توسط کاغذ صافی به طور نسبی خشک شدند. سپس کالوس‌های تلقیح شده از هر دو روش خشک و غوطه ور سازی جهت هم‌کشتی در محیط کشت MS حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون (Acetosyringone) کشت داده شدند و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. نمونه‌های شاهد (کالوس‌های تلقیح نشده) نیز در شرایط مشابه نگهداری شدند. بعد از ۴۸ ساعت هم کشتی کالوس‌ها با باکتری، جهت حذف باکتری‌های اضافی کالوس ها با محلول آنتی بیوتیک ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و در نهایت کالوس‌ها در محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از ۱ هفته، کالوس‌های تلقیح شده تحت تیمارهای نوری LED آبی، قرمز، آبی / قرمز، سفید و تاریکی قرار گرفتند. هر محفظه حاوی یک سیستم نوری شامل 12 عدد لامپ LED power است که به فواصل مساوی در یک قاب آلومینیومی به طول 95 cm تعبیه شده است که نور هر لامپ به طور جداگانه بوسیله یک لنز بر سطح تحت تیمار متمرکز گردید. به طوری‌که تمام سطح کف محفظه با نورلامپ‌ها پوشش داده شد. به‌دلیل وجود لنز در سر راه هر لامپ و نوع طول موج لامپ LED شدت نوری که در کف محفظه بر ریز نمونه‌ها اعمال میگردد با فاصله از حالت عمودی کمتر می گردد به طوریکه در مرکز کف محفظه بیشترین شدت نوری و در لبه‌های کف محفظه کمترین شدت نوری وجود داشته است. بنابراین برای یکسان بودن شدت نوری اعمال شده بر تمام نمونه‌ها، در هر محفظه پلیت‌ها در دو ردیف و در فواصل مساوی از مرکز محفظه قرار گرفتند تا شرایط نوری یکسان بر نمونه‌ها اعمال می‌گردد. سیستم نوری LED آبی دارای طول موج 450 نانومتر بوده و شدت نوری تولید شده 135 لوکس می‌باشد. سیستم نوری LED آبی /قرمز از۶ لامپ LED قرمز و 6 لامپ LEDآبی تشکیل شده بود و شدت نوری تولید شده میانگین نور تولید شده توسط نیمی از هرکدام از نورها است و ۱۳۵ لوکس می باشد. سیستم نوری سفید با 6 لامپ LED سفید با شدت نوری تقریبا ۱۵۰۰ لوکس می باشد. ریز نمونه‌های واکشت داده شده که در پلیت‌های پلاستیکی قرار داده شده بودند به محفظه‌های نورهای رنگیLED منتقل گردیدند.

بررسی محتوای فلاونوئیدها

آماده سازی نمونه‌ها: ۱۵/۰ گرم از کالوس‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم و همچنین بذر گیاه داخل ازت مایع پودر شدند. پس از پودر شدن بافت‌ها برای عصاره‌گیری آن‌ها را با متانول 80 درصد ترکیب و به حجم ۲ میلی لیتر رسانده و سپس به مدت 2 ساعت بر روی شیکر در ۲۰۰ rpm قرار داده شدند. بعد از 2 ساعت عصاره‌ها به مدت 20 دقیقه در 10000 rpm سانتریفیوژ (SIGMA) شدند و فاز بالایی برای آنالیز نگه داشته شد.

اندازه گیری میزان کل فلاونوئید: سنجش میزان کل فلاونوئید براساس روش Quettier و همکاران (۲۶) انجام گرفت. بیست میکرولیتر ازعصاره بافت‌ها با 980 میکرولیتر از متانول 80 درصد و یک میلی لیتر از$AlCl_3$ 2 درصد ترکیب و هر کدام به حجم ۲ میلی لیتر رسیده و برای مدت 1 ساعت در دمای اتاق نگه داشته شدند. سپس جذب آن

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۴-۲۴۵

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(UV, Schimadzu) در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد.

همچنین محلول‌های استاندارد کوئرستین نیز با غلظت های ۰/۰۰۵- ۰/۰۳۵ میلی گرم برمیلی لیتر تهیه گردید و نمودار استاندارد مربوطه بر اساس میزان جذب آن‌ها رسم شد. غلظت فلاوونوئید هر نمونه با استفاده از فرمول بدست آمده از نمودار استاندارد (نمودار ۱) محاسبه شد. مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ها بر حسب میلی گرم کوئرستین درگرم بافت خشک گیاه تعیین گردید.

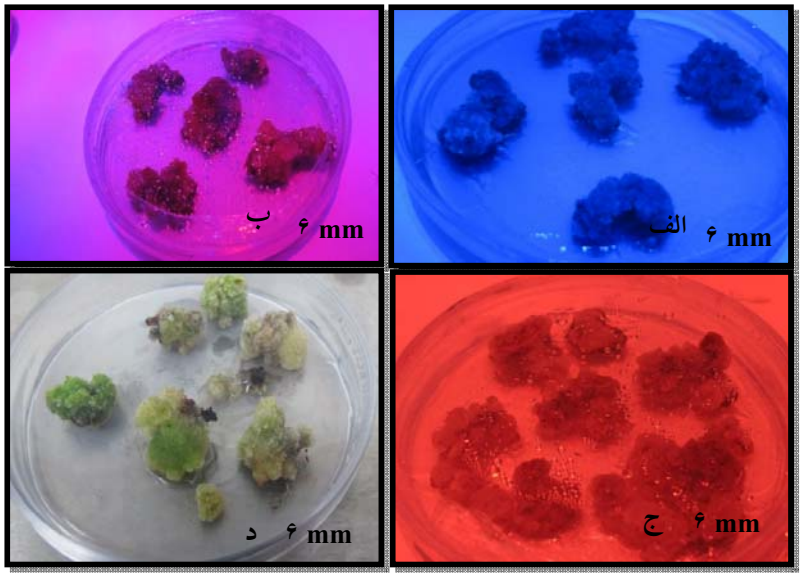
غلظت فلاونوئید کل بر حسب فرمول زیر محاسبه شد: (۱۰)

$$\text{غلظت فلاونوئیدکل(میلی گرم کوئرستین گرم وزن خشک)} = \frac{\text{(میلی لیتر) حجم محلول} \times \text{ضریب رقت} \times \text{غلظت فلاونوئید (میلی گرم/میلی لیتر)}}{\text{وزن آب از دست داده- وزن خشک (گرم)}}$$

محاسبات آماری: پژوهش حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS VER.20 و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس One way ANOVA برای مقایسه غلظت فلاونوئیدها در تیمارهای مختلف انجام گرفت . نتایج بدست آمده با آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq 0/05$ مقایسه شدند.

نتایج

تشکیل ریشه موئین در گیاه *O. pachypoda* : تلقیح کالوس ها با آگروباکتریوم ریزوژنز به دو روش خشک و غوطه ورسازی انجام شد و سپس کالوس‌های تلقیح شده در تیمارهای نوری قرار داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- کالوس های تحت تیمار نورهای رنگی LED، الف) ریز نمونه های تحت تیمار نورآبی، ب) ریز نمونه های تحت تیمار نور آبی + قرمز، ج) ریز نمونه های تحت تیمار نور قرمز، د) ریز نمونه های تحت تیمار نورفلورسنت.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8

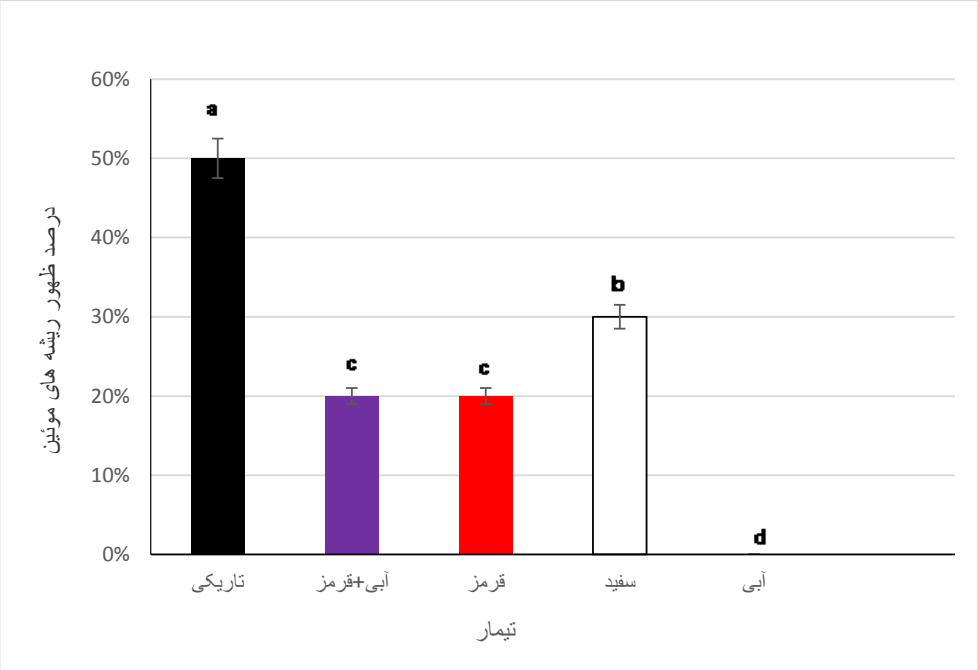
در کالوس‌های تلقیح شده توسط روش خشک هیچ گونه ریشه موئینی تشکیل نشد. درحالیکه در کالوس‌های تلقیح شده توسط روش غوطه ورسازی، اولین ریشه موئین دو هفته پس از قرار گرفتن کالوس‌ها تحت تیمار نورهای رنگی تشکیل شد (شکل ۲). بیشترین درصد ظهور ریشه‌های موئین (۵۰ درصد) در کالوس‌هایی که در تاریکی قرارگرفته بودند مشاهده شد و به طور معنی داری بیشتر از کالوس‌های تحت تیمار نورهای فلورسنت (۳۰ درصد)، نورهای قرمز (۲۰ درصد)، آبی /قرمز (۲۰ درصد) بود (شکل ۳). در کالوس‌های تحت تیمار نورهای آبی هیچ گونه ریشه موئینی تشکیل نشد.

نتایج حاصل ازآنالیز غلظت فلاونوئیدها درکالوس‌های تلقیح شده تحت تیمار نورهای رنگی LED و بذر گیاه

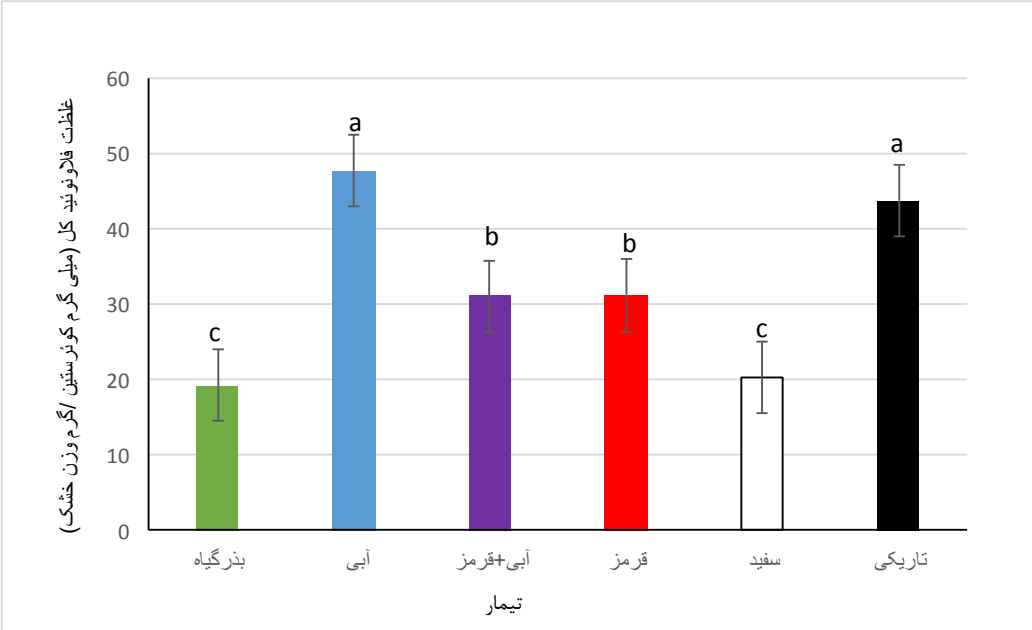
O. pachypoda : غلظت فلاونوئیدها در کالوس‌های تحت تیمار نورهای رنگی آبی و تاریکی تفاوت معنی داری را نسبت به نورهای آبی / قرمز، قرمز و سفید نشان دادند (شکل ۴). بیشترین غلظت فلاونوئیدها در کالوس‌های تحت تیمار تاریکی(۴۳درصد) و نور آبی(۴۷درصد) مشاهده شد و کمترین میزان غلظت فلاونوئید در نور سفید(۲۰درصد) مشاهده شد. مقایسه میزان فلاونوئید در بذر گیاه با کالوس‌های تحت تیمار نوری و تاریکی نشان داد که میزان فلاونوئید در بذر گیاه کمتر از میزان فلاونوئید در کالوس‌ها می‌باشد (شکل ۴).

شکل ۲- تشکیل ریشه های موئین در کالوس های تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز تحت تیمار نور قرمز (الف)، تاریکی (ب) و آبی / قرمز (ج).

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8



شکل۳- مقایسه میانگین درصد ظهور ریشه های موئین در کالوس‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز تحت تیمار نورهای رنگی LED. مقادیر میانگین حداقل ۵ تکرار ± خطای معیار می باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P\leq 0.05$ می‌باشد.



شکل۴- مقایسه میانگین غلظت فلاونوئیدها در کالوس‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز تحت تیمار نورهای رنگی LED و بذر گیاه *O. pachypoda* . مقادیر میانگین حداقل ۵ تکرار ± خطای معیار می باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P\leq 0.05$ می‌باشد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۴-۲۴۵

بحث

پژوهش حاضر اولین پژوهش صورت گرفته به‌منظور القای ریشه‌های موئین در گیاه زنگوله‌ای پاکوتاه (*O. pachypoda*) است که توسط آگروباکتریوم ریزوژنز سویه A4 انجام شد و موفقیت آمیز بود. در کالوس‌های تلقیح شده با روش خشک ریشه موئین تشکیل نشد. اولین ریشه‌های موئین دو هفته پس از آلودگی بر روی کالوس‌های تلقیح شده با روش غوطه ورسازی تشکیل شدند. القای ریشه موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز به فاکتورهای مختلفی مانند گونه گیاهی، سویه باکتری، غلظت باکتری و نور بستگی دارد (۱۷). در گیاه زنگوله‌ای پا کوتاه درنتیجه تلقیح کالوس با آگروباکتریوم ریزوژنز سویه A4 باOD_{600} =۰/۶ به مدت ۱۰ دقیقه القای ریشه‌های موئین صورت گرفت. در گیاه *Allium sativum* مشابه این نتایج نیز مشاهده شده است (20). درحالیکه در گیاه همیشک (*Danea racemosa*) روشهای تلقیح خشک و غوطه ورسازی منجر به القای ریشه موئین نشد. بنظر می رسد که غلظت بالای آگروباکتریوم در روش خشک در مقایسه با روش غوطه‌ور سازی مانع از انجام موفقیت آمیز القای ریشه موئین در کالوس ها شد.

در پژوهش حاضر بر روی زنگوله‌ای پا کوتاه، بیشترین درصد القای ریشه‌های موئین در کالوس‌های تلقیح شده تحت تیمار تاریکی به دست آمد. درحالیکه کالوس‌های تلقیح شده تحت تیمار نورهای رنگی آبی، آبی /قرمز، قرمز و سفید درصد کمتری از القای ریشه موئین را نشان دادند مشابه این نتایج نیز در تحقیقات خاوار و همکاران بر روی گیاه *Cicer Arietinum* L مشاهده شد. بطوریکه بیشترین و کمترین درصد تشکیل ریشه‌های موئین (تعداد ریشه‌های موئین) در ریز نمونه‌های قرار داده شده به ترتیب در تاریکی و روشنایی بود (۱۶). همچنین در گونه‌های دیگر از جمله *Typha latifolia* (21) و *Dianthus caryophyllus* L (۳۰) قرار گرفتن ریز نمونه‌ها در تاریکی باعث افزایش ترانسفورماسیون و تشکیل ریشه‌های موئین شد.

با توجه به اینکه تحقیقات گذشته بر روی گونه‌های جنس *Onosma* نشان دادند که بیشترین محتوای فلاونوئید در بخش‌های هوایی برگ و ساقه گیاه *O. pachypoda* به میزان تقریبا ۵ میلی گرم کوئرستین / گرم وزن خشک گزارش شده بود (۸). در پژوهش حاضر با استفاده از القای ریشه‌های موئین و یا تیمار نور آبی محتوای فلاوونوئید به میزان تقریبا ۴۰ میلی گرم کوئرستین / گرم وزن خشک بدست آمد، که نشان دهنده افزایش ۸ برابری محتوای فلاونویید می‌باشد. رشد گیاه و بیوسنتز فلاونوئیدها به وسیله‌ی چندین فاکتور کنترل می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها کیفیت نور می‌باشد (۱۱). پژوهش حاضر نشان داد که کیفیت نور بر روی محتوای فلاونوئیدها تاثیر گذار بود. در آنالیزی که بر روی کالوس‌های تلقیح شده تحت تیمار نورهای رنگی LED صورت گرفت کالوس‌های تحت تیمار نورهای رنگی آبی در مقایسه با نور سفید از میزان فلاونوئید بیشتری برخوردار بودند. بر اساس مطالعه ای که بر روی گونه‌های *Saussurea medusa* (۱۲)، *Hyptis marrubioides* (۲۴) و*Cyclocarya paliurus* (۱۸) صورت گرفته بود، نور آبی باعث افزایش غلظت فلاونوئیدها نسبت به سایر نورهای رنگی شد. همچنین پژوهش‌های جدید حاکی از اثر مثبت نور آبی در افزایش غلظت فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدان‌های موجود در گیاه است (15).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر در کالوس زنگوله‌ای پاکوتاه (*O. pachypoda*)، القای ریشه موئین توسط آگروباکتریوم ریزوژنز به روش غوطه ورسازی صورت گرفت و در روش خشک به دلیل غلظت بالای آگروباکتریوم تلقیح موفقیت آمیز نبود. بیشترین میزان القای ریشه‌های موئین در کالوس‌های تلقیح شده در تاریکی به‌دست آمد که غلظت بالایی از فلاوونوئید را نیز نشان دادند. نور LED آبی بیشترین تاثیر را در افزایش میزان فلاوونوئید در کالوس گیاه زنگوله‌ای پاکوتاه نشان داد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای دکتر احمدرضا محرابیان برای شناسایی گیاه و جناب آقای اکبر نعمتی برای جمع‌آوری بذر گیاه اعلام می‌دارند.

منابع

۱- اصغری ، غ .۱۳۸۵ . بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و تولید داروهای گیاهی . انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان

۲- بیگی، الف .۱۳۸۴ .تولید و فرآوری گیاهان دارویی .جلد اول . انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد. صفحه ۳۴۶.

۳- حسینی، م. ۱۳۹۲. القای ریشه های مویین و تولید رسوراترول در چند ژنوتیپ انگور با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان.

۴- دیانتی، ب، مومنی، ت، ۱۳۸۰ .عوارض جانبی گیاهان دارویی . انتشارات شهر آب ، تهران

۵- سهرابی نژاد، مرعشی، سیدحسن، مشتاقی. (۲۰۱۸). بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی همیشه بهار *(Calendula officinalis)* به منظور تولید ترکیب دارویی اولئانولیک اسید. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) (علمی)، ۳۱(۳)، ۶۴۰-۶۵۴.

۶- شیرازی، ز، پیری، خ، میرزایی اصل ، الف، حسنلو، ط، قیاسوند، ط، ۱۳۹۳، اثر محرکهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات برمیزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین در ریشه های مویین شیرین بیان(*Glycyrrhiza glabra* L.) مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) ، جلد۲۷، شماره ۳، صفحه ۴۴۱-۴۴۷.

۷- قاسمی ،ع . ۱۳۹۰ . گیاهان دارویی و معطر شناخت و بررسی اثرات آنها .انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

۸- کرمیان، آراوند، جهانیان نجف آبادی، حسین، پاکزاد، رامتین. (۲۰۱۸). ارزیابی محتوای ترکیبات فنلی، آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه گونه عسلک (تیره گاوزبان) از ایران. دوفصلنامه فنآوری تولیدات گیاهی، ۱۰(۲)، ۱۷-۲۹.

9-Bagherieh-Najjar, M. B., & Nezamdoost, T. 2016. Optimization of shikonin production in *Onosma dichroantha* callus using response surface methodology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *126*(3), 399-409.

10-Da Silva, L. A. L., Pezzini, B. R., & Soares, L. 2015. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L.(*Lamiaceae*) leaves. *Pharmacognosy magazine*, 11(41), 96-97.

11-Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, S. S., Akbar, F., & Kanwal, F. 2016. Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important Prunella vulgaris L. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 159, 1-7.

12-Guo, B., Liu, Y. G., Yan, Q., & Liu, C. Z. 2007. Spectral composition of irradiation regulates the cell growth and flavonoids biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim. *Plant growth regulation*, *52* (3), 259-263.

13-Georgiev, M. I., Ludwig-Müller, J., Alipieva, K., & Lippert, A. 2011. Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascu xanthophoeniceum Griseb*. for bioactive metabolite accumulation. *Plant cell reports*, *30*(5), 859-866.

14-Harborne, J. and Williams, C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55 (6): 481-504.

15-Johkan, M., Shoji, K., Goto, F., Hashida, S. N., & Yoshihara, T. 2010. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. *HortScience*, *45*(12), 1809-1814

16-Khawar, K. M. & Ozcan, S. 2004. Hairy root transformation in Turkish chickpea *(Cicer arietinum* L) cultivars. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *18*(3), 51-54.

17-Kokate, C.K. 2006. *Medicinal plant biotechnology*. CBS Publisher and Distributors. 506.

18-Liu, Y., Fang, S., Yang, W., Shang, X., & Fu, X. 2018. Light quality affects flavonoid production and related gene expression in *Cyclocarya paliurus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *179*, 66-73.

19-Mahadevaswamy, G. & Vijayalakshmi, G. 2018. Role of secondary metabolites in defense

mechanisms of plants. *Trends in Biosciences*, *11*(28), 3511-3518.

20-Moradi, F., M. Z. Mehrjerdi and K. Vahdati, 2017. Agrobacterium rhizogenes – mediated hairy root induction in garlic. Bulg. J. Agric. Sci., 23(4): 527-577

21-Nandakumar.r, Chen.l., Rogers.s., 2004. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 31–38.

22-Nadeem, M., Abbasi, B. H., Younas, M., Ahmad, W., Zahir, A., & Hano, C. 2019. LED-enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of Ocimum basilicum. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 190, 172-178.

23-Ozgen, U., Ikbal, M., Hacimuftuoglu, A., Houghton, P.J. Gocer, F., Dogan, H., Coskun, M .2006. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. in Journal of Ethnopharmacology 104(1-2).100-103.

24-Pedroso, R. C. N., Branquinho, N. A. A., Hara, A. C., Costa, A. C., Silva, F. G., Pimenta, L P., . & Januario, A. H. 2017. Impact of light quality on flavonoid production and growth of Hyptis marrubioides seedlings cultivated in vitro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *27*(4), 466-470.

25-Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A., and Pistelli, L. 2010. Hairy root cultures for secondary metabolites production. In: Bio-Farms for Nutraceuticals pp. 167-184. Springer.

26- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., …& Trotin, F. 2000 Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. Jornal of ethnopharmacology, 72(1-2), 35-42.

27 -Smith, D. A. and Banks, S. W. 1986. Formation and biologicalproperties of isoflavonoid phytoalexins, Formation and biologicalproperties of isoflavonoid phytoalexins, *Progress in clinical and biological research*, *213*, 113-124.

28- Tosun. a, Akkol. Ek, Bahadir. O, Yesilada. E .2008. Evaluation of anti- inflammatory and antinociceptive activities of *onosma* L. species growing in turkey. In Ethnopharmacol. 120(3)..378-831

29- Thiruvengadam, M., Rekha, K., & Chung, I. M. 2016. Induction of hairy roots by Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica Roxb*. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. *Scientia horticulturae*, *198*, 132-141.

30-Zuker, A., Ahroni, A., Tzfira, T., Ben-Meir, H., & Vainstein, A. 1999. Wounding by bombardment yields highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular Breeding*, *5*(4), 367-375.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۴-۲۴۵ DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.3.8

The effect of LED lights on hairy root induction and the amount of flavonoids in *Onosma pachypoda* callus by *Agrobacterium rhizogenes*

Amini F., Hassani S.B.* and Bernard F.

Dept. of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Onosma pachypoda Boiss. is a medicinal plant and belongs to Boraginaceae family. Enhancement of secondary metabolites using modern biotechnological methods such as tissue culture and hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* can be important. In the present study, hairy root induction by *A. rhizogenes* strain A4 on the callus of *O. pachypoda* was examined via dry and immersion methods under different spectral LED lights. The effect of LED lights was also investigated on the concentration of flavonoid content in inoculated callus. The results showed that the highest percentage (50%) of hairy root induction was obtained by immersing the callus in the suspension of *A. rhizogenes* under dark conditions. The highest flavonoid content was observed in inoculated callus under blue LED light and dark conditions. Therefore, the immersion method is a suitable method for inoculation of callus to induce hairy roots in the plant. It seems that using of different spectral LED lights also affects flavonoid content in the callus of *O. pachypoda*.

Keywords: *Onosma pachypoda*, callus, hairy root induction, flavonoid.