ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحه ۵۷ - ۴۹

# بررسی میزان تولید هایپرسین و هایپرفورین در لاین ریشه نابجا تولید شده از ژنوتیپ توپاز گل راعی (*Hypericum perforatum* L. *var. Topaz*) تحت تأثیر طیف‌های نوری و غلظت‌های مختلف IBA

# Evaluation of hypercin and hyperforin production in adventitious root line produced from *Haypericum perforatum L. var. Topaz* genotype under the influence of light spectra and different concentrations of IBA

مژده شفائی[۱]، مرتضی ابراهیمی*[۲]، محمود خسروشاهلی[۱]، اسلام مجیدی هروان[۱]، رضا عزیزی نژاد[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استاد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده متابولیت‌های ثانویه گیاهی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

**Shafaei M[1], Ebrahimi M[*2], Khosroshahli M[1], Majidi Heravan E[1], Azizinezhad R[1]**

1- PhD Student, Professor, Professor, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Isfahan Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Isfahan Branch, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.ebrahimi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶)

## چکیده

**سالیان متمادی است که گونه‌های مختلف جنس *Hypericum spp.* برای درمان اختلالات عصبی و افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثرپذیری و نوسان بسیار زیاد تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه تحت تاثیر شرایط مزرعه‌ای محرک اصلی تحقیقات مرتبط با کشت در شرایط کنترل شده است. کشت ریشه مویین (تراریخته)، به‌عنوان جایگزین تولید زراعی گیاهان داروئی برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در بسیاری از گونه‌ها به‌کار رفته، ولی تولید این ریشه‌ها همیشه با چالش‌هایی مواجه بوده است که یکی از آن‌ها سختی القا ریشه مویین می‌باشد. از این رو تحقیق حاضر با هدف معرفی دستورالعمل کاربردی برای القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ گل راعی (*Hypericum perforatum*) تحت تیمار غلظت‌های مختلف (صفر، ۱ ، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) اسید ایندول-۳-بوتیریک (IBA) و منابع نوری مختلف شامل قرمز، قرمز دور، نور کامل، آبی، و نیز تاریکی مطلق انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA تحت تیمار تاریکی بهترین تأثیر القایی بر تولید ریشه نابجا (۲۶/۳۳ درصد) از ریزنمونه‌های برگ گل راعی داشت. در بررسی تأثیر منبع نور بر فراوانی القأ ریشه نابجا، بیشترین درصد ریشه‌زایی در تاریکی (۲۶/۳۳ درصد) در ثبت شد. بیشترین میزان هایپرسین در نور قرمز و به دنبال آن نور قرمز دور و آبی (به‌ترتیب ۰/۳۱، ۰/۳ و ۰/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد، اما منابع مختلف نور تأثیر معنی‌دار بر محتوای هایپرفورین نشان ندادند. بنابراین بر طبق نتایج به‌دست آمده بهترین تیمار اکسین جهت القأ ریشه‌نابجا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و بهترین نور جهت افزایش میزان هایپرسین نور قرمز است.**

**واژه‌های کلیدی**

**تاریکی**
**ریشه نابجا**
**طیف نوری‌های نوری آبی**
**گل راعی (*Hypericum perforatum*)**
**IBA**

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

## مقدمه

گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) با قدمتی بیش از ۲۰۰۰ سال تحت عنوان یک گیاه دارویی مطرح بوده است. عصاره گل راعی حاوی ترکیبات پیچیده‌ای از متابولیت‌های فعال است که عموماً شامل نفتودیانترون‌ها (هایپریسین و سودوهایپریسین)، فلوروگلوسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) و فلاونوئیدها با طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیکی می‌باشد (Butterweck 2003; Kirakosyan et al. 2004; Silva et al. 2005; Zhai et al. 2015).

از بین انبوهی از متابولیت‌های ثانویه گل راعی، هایپریسین و هایپرفورین دارای خواص مهمی مانند خاصیت ضد افسردگی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی می‌باشند و در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارند (Bertoli et al. 2008; Tatsis et al. 2007). روش‌های کشت سنتی اغلب به ماه‌ها و سال‌ها زمان برای دستیابی به گیاهان دارویی نیاز دارد. همچنین کشت زراعی گیاهان دارویی معایب مختلفی از جمله عملکرد پائین و نوسان در غلظت‌های متابولیت‌های ثانویه به علت عوامل جغرافیایی، فصلی، محیطی و نیز آلودگی با سموم و حمله پاتوژن‌ها دارد (Aliakbari et al. 2015; McCoy and Camper 2002). کشت سلول، بافت و اندام گیاهی یک سیستم جایگزین و مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه جهت کاربردهای دارویی است (Gao et al. 2005; Paek et al. 2005; Zobayed et al. 2007). در بسیاری از موارد کشت ریشه به‌دلیل تمایز بالاتر، پایداری بیشتر و نیز عملکرد مناسب، نسبت به کشت سلولی ترجیح داده می‌شود. کشت ریشه مویین گل راعی بعد از تلقیح با آگروباکتریوم به‌دست می‌آید (Bertoli et al. 2008; Koperdáková et al. 2008; Pavlík et al. 2007; Vinterhalter et al. 2006). کشت ریشه‌های تراریخت یک روش جایگزین امیدبخش برای کشت سلول است، اما معمولاً ریشه‌های مویین نوعی مواد شبه اوپین تولید می‌کنند که می‌تواند منجر به مرگ پستانداران شود (Yoshikawa and Furuya 1987). همچنین، موجودات زنده دست‌ورزی شده ژنتیکی در بسیاری از کشورها مورد پذیرش قرار نگرفتند، در مقابل ریشه‌های نابجا مشکلات مرتبط با ریشه تراریخته را ندارند. ایجاد سیستم کشت سوسپانسیون ریشه نابجا می‌تواند تکثیر در مقیاس وسیع، بهبود نژاد و حفاظت از گونه را تسریع بخشد (Holobiuc et al. 2009).

از سوی دیگر، ریشه‌های نابجای القا شده با روش‌های آزمایشگاهی، نرخ بالایی از تکثیر و متابولیسم فعال را نشان می‌دهند (Kim et al. 2004; Zhai et al. 2015). اما بهینه‌سازی و تولید در مقیاس وسیع نیازمند افزایش زیست توده و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه است (Choi et al. 2000; Gao et al. 2005; Lee et al. 2017; Paek et al. 2005; Zhai et al. 2015). تشکیل ریشه نابجا به‌دلیل عوامل درون‌زای متعدد، تنظیم کننده‌های رشد گیاه و عوامل محیطی مثل نور فرآیند پیچیده‌ای است (Sorin et al. 2005). نقش اصلی اکسین در تشکیل ریشه نابجا و برهمکنش آن با سایر عوامل درون‌زا و همچنین محرک‌های محیطی مانند نور است (Blakesley 1994). در مطالعه دیگری نیز اثر متضاد اکسین و نور را بر رشد ریشه‌های نابجا در اکالیپتوس گزارش کردند (Fett-Neto et al. 2001). بنابراین، القای ریشه فرعی عاری از کالوس که بتواند بهره‌وری پایدار را حفظ کند، بسیار مهم است. چندین محرک (الیسیتور) فیزیکی و شیمیایی وجود دارد که اثرات آن‌ها روی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی بررسی شده است. نور یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های تأثیرگذار بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تولید متابولیت ثانویه است (Batista et al. 2018). سطح اسانس در بومادران، *Lippia alba* و *Hyptis suaveolens* نیز تحت تأثیر کیفیت نور قرار گرفت (Alvarenga et al. 2015; Andrade et al. 2017; Batista et al. 2016; Batista et al. 2018). کیفیت نور همچنین اثر محرکی بر روی بیوسنتز فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتالین‌ها و جین سنوزیدها دارد (Yu et al. 2005). جینسینگ تحت تأثیر نور فلورسنت جینسنوزیدهای Rg1 و Rg2 بیشتری تولید می‌کند (Nhut et al. 2015). چندین مطالعه نشان داد که نور آبی و قرمز به‌طور مؤثر ترکیبات فنلی را تقویت می‌کنند (Jung et al. 2013). نور آبی همچنین منجر به افزایش سطح فنل کل، آلفاتوکوفرول و بتا آمیرین در جینسینگ می‌شود (Park et al. 2019).

منبع نور مصنوعی یک جزء مهم در سیستم‌های گیاهی است. پدیده‌هایی مانند رشد، مورفوژنز و تمایز گیاهان با کیفیت، شدت و مدت زمان نور کنترل می‌شود. کیفیت نور بر عملکرد فتوسنتز و گلدهی و همچنین بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر قابل توجهی دارد (Batista et al. 2018).



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

طول موج‌های قرمز و آبی معمولاً تأثیر به‌سزایی در توسعه گیاه و ظرفیت فتوسنتزی آن دارند و این پاسخ‌ها با توجه به گونه‌های گیاهی متفاوت است. ویژگی‌هایی مانند افزایش طول ساقه، عملکرد فتوسنتز، گسترش برگ و محتوای کلروفیل تحت تأثیر نور قرمز قرار می‌گیرد در حالی‌که نور آبی بر رشد و باز شدن روزنه، گسترش و آناتومی برگ و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تاثیرگذار است.

علی‌رغم اهمیت کیفیت نور بر روی متابولیت‌های ثانویه، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اثرات کیفیت نور بر روی القأ ریشه نابجا و تولید متابولیت ثانویه کشت ریشه نابجای *H. perforatum* گزارش نشده است. بنابراین، این مطالعه به‌منظور بررسی اثر نوع نور بر القأی تولید ریشه نابجا و متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه نابجا *H. perforatum* انجام شد.

## مواد و روش‌ها

بذر گل راعی ژنوتیپ توپاز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور استریل کردن، بذور ابتدا با آب‌مقطر آبشویی و سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه شسته شدند. بعد از این مرحله مجدداً آبشویی با آب‌مقطر استریل انجام شد. بذور به مدت ۵–۷ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و ۲–۱ قطره توئین ۲۰ تیمار شدند. بعد از این مرحله و در زیر لامینارفلو، ۳–۲ بار آبشویی با آب‌مقطر استریل انجام گرفت. به‌منظور حذف رطوبت باقی‌مانده، بذور بر روی کاغذ صافی استریل در زیر لامینارفلو خشک شده سپس بذور در ظروف کشت حاوی ۳۰–۲۵ سی‌سی محیط کشت با فرمولاسیون موراشیگ و اسکوگ (MS) ۳ درصد (وزنی/حجمی) ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار کشت شدند. در تمام مراحل آزمایش، محیط‌ها و وسایل مورد نیاز در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک بار به مدت ۲۰دقیقه در دستگاه اتوکلاو (شرکت Tomy مدل SX-700) استریل شدند. کشت‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی بذور گیاهچه‌ها به محیط با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به‌منظور القا ریشه نابجا، تعداد ۵ ریزنمونه برگی در سه تکرار حاصل از گیاهچه‌های چهار هفته‌ای به محیط یک دوم MS حاوی غلظت‌های (صفر، ۱، ۲ و ۳) میلی‌گرم بر لیتر ایندول ۳–بوتیریک اسید (IBA)، ۳ درصد (وزنی/حجمی) ساکارز و ویتامین‌های B5 (Gamborg et al. 1968) کشت شد. محیط کشت یک دوم MS بدون IBA به‌عنوان کنترل استفاده شد. به‌منظور بررسی تاثیر نور بر القاء ریشه نابجا، ۵ برگ بدون دمبرگ در ۳ تکرار در محیط کشت ذکر شده کشت شده و به رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت ۵۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه برای فلورسنت، قرمز، آبی، نور کامل و ۴/۵ میکرومول در مترمربع برای قرمز دور منتقل شدند. توزیع طیفی انرژی نسبی نورهای آبی، قرمز و قرمز دور با استفاده از یک کنترل‌کننده LPR (Kuei-Shan Shiang ،UF-80B23 ،Fulltech ،Taiwan) تعیین شد. پس از ۲ هفته کشت و ظهور اولین نشانه‌های القأ ریشه نابجا از ریزنمونه، تأثیر تیمارهای IBA و نور بر پارامترهای مختلف رشد شامل تعداد ریشه به ازای هر ریز نمونه، وزن تر و خشک ریشه‌های القأ و میزان هایپرسین و هایپرفورین در ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ریشه‌های تولید شده به‌صورت انفرادی از ریزنمونه برگ جدا شد و با ثبت کد مشخص اجازه رشد داده شد تا به بیومس قابل قبول برسند. سپس جهت ارزیابی‌های بعدی از آن‌ها استفاده شد. جهت تعیین وزن تازه و وزن خشک، ریشه‌ها را از محیط کشت جدا کرده و بعد از آبکشی ریشه‌ها با آب‌مقطر استریل و حذف آب سطحی، وزن تازه آن محاسبه شد. سپس ریشه‌ها در آون با دمای۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و وزن خشک ریشه‌ها ثبت شد. در انتهای آزمایش دو لاین ریشه نابجا از نظر پارامترهای فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی انتخاب شدند.

به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری میزان هایپرسین و هایپرفورین از روش (Cui et al. 2010) استفاده شد. بدین منظور، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم مواد گیاهی پودر شده در ویال‌های دو میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر متانول به آن اضافه شد. سپس ویال‌ها در حمام اولتراسونیک (Bandelin Sonorex آلمان) به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و در این مدت دمای آب داخل اولتراسونیک با استفاده از قطعات یخ در زیر۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. بعد از این مرحله ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر ( Germany Eppendorf) با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

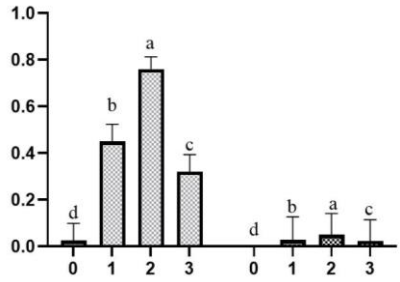
به مدت ۱۰دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ ( Beckman Coulter آمریکا) شدند. مایع رویی به ویال‌های جدید منتقل و به رسوبات باقی‌مانده مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر متانول اضافه و به همان روش فوق تکرار شد. برای قرائت هایپریسین و هایپرفورین، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC مدل Sykam ساخت کشور آلمان شامل پمپ S5300 و فلورسنس مدل ۳۲۱۰) استفاده شد. فاز متحرک شامل اتیل استات (۳۹ میلی‌لیتر) بافر سدیم دی-هیدروژن فسفات (۴۱ میلی‌لیتر) متانول (۱۶۰ میلی‌لیتر) بود. برای تهیه بافر مقدار ۶/۱۵ گرم سدیم دی-هیدروژن فسفات وزن و در یک لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. سپس pH آن با استفاده از اسیدفسفریک یک نرمال بر روی ۲ تنظیم شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر نمونه به دستگاه تزریق شد و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه با استفاده از ستون C18 با قطر ذرات ۵ میکرون و ابعاد ۲۰۰ × ۶/۴ میلی‌متر عبور داده شدند. قرائت هایپریسین در زمان ۶ دقیقه و در طول موج ۵۹۰ نانومتر و قرائت هایپرفورین در طول موج ۲۷۰ نانومتر و زمان ۱۷ دقیقه انجام شد. استاندارد هایپریسین (شماره شناسایی ۵۴۸-۰۴-۹) و هایپرفورین (شماره شناسایی ۱۱۰۷۹-۵۳-۱) از شرکت سیگما (Sigma, Aldrich) تهیه شد. بررسی میزان هایپریسین و هایپرفورین با تهیه منحنی استاندارد انجام شد.

کلیه آزمایشات به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم‌افزار ( Version 8.16) RStudio (easyanova package) و انجام شد.

## نتایج

در این آزمایش، القأ ریشه نابجا از برگ *H. perforatum* تحت تأثیر کیفیت نور قرار گرفت. با توجه به اینکه انتظار می‌رفت که در القأ ریشه نابجا تنها در تاریکی رخ دهد ولی پس از تاریکی که به‌عنوان کنترل مورد مطالعه قرار گرفت نور قرمز بالاترین میزان القأ ریشه‌نابجا (۰/۹۸ درصد) را نشان داد (شکل-۲). ریشه‌های القأ شده (پس از ۲ هفته) در کشت‌های رشد یافته تحت تابش فلورسنت و آبی به‌طور قابل توجهی ($p \geq ۰,۰۵$) کمتر (۰/۳۳ درصد) از کشت تحت تاریکی (۲۶/۳۳ درصد) و نورقرمز دور (۹ درصد) بود.

تجزیه واریانس اثر انواع نور و سطوح مختلف اکسین IBA بر فاکتورهای مورد ارزیابی نشان داد که تمامی فاکتورها و اثر متقابل آن‌ها بر پارامترهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ داشتند. در این رابطه تنها اثر سطوح مختلف IBA بر درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل IBA و انواع نور نشان داد که تاریکی و غلظت ۲ mg/l IBA بالاترین میزان (۰/۷۶ و ۰/۰۵ گرم) در فاکتورهای وزن تر و خشک را نشان داده است (شکل-۱).




شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین‌ها اثر سطوح مختلف IBA بر وزن تر و وزن خشک

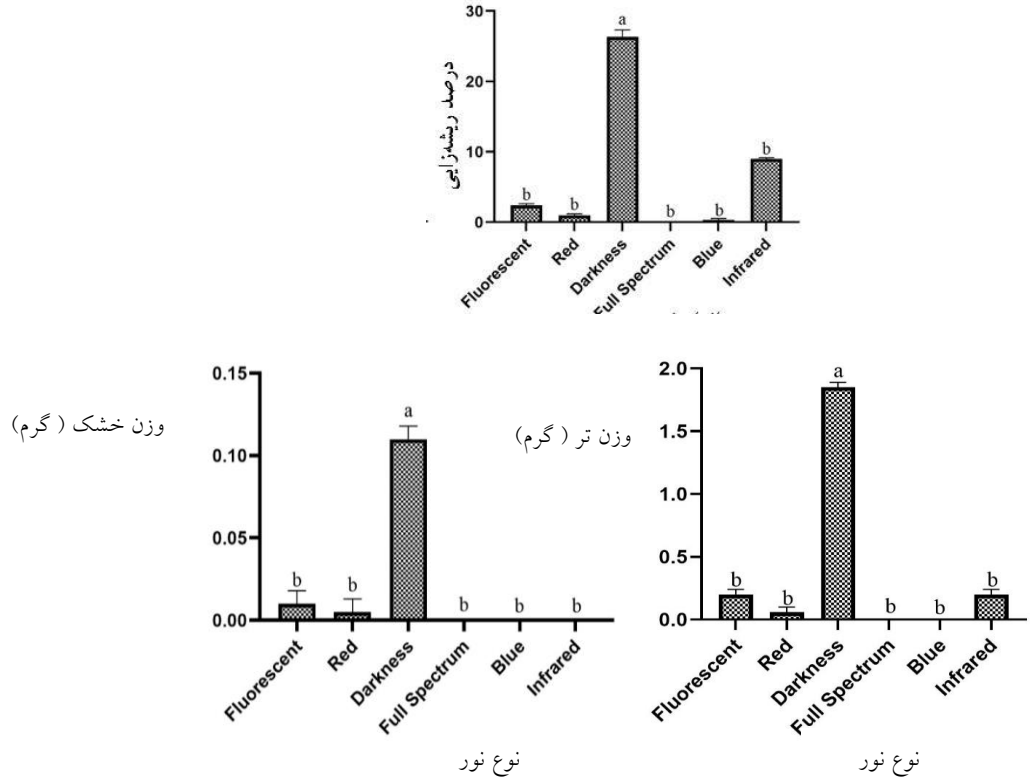
جدول۱- تجزیه واریانس اثر تیمار نوری و IBA بر پارامترهای مورد بررسی در لاین ریشه نابجای تولید شده از ریزنمونه برگ

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ٪ ریشه‌زایی | وزن تر | وزن خشک | هایپرسین (mg/gDW) | هایپرفورین (mg/gDW) |
| IBA | ۳ | ۳۸۶/۰۱۷$^{ns}$ | ۱/۶۳$^{*}$ | ۰/۰۰۷$^{*}$ | ۰/۰۵۲$^{*}$ | ۰$^{*}$ |
| نور | ۵ | ۱۲۵۹/۴۹$^{*}$ | ۶/۲۸$^{*}$ | ۰/۰۲$^{*}$ | ۰/۱۵$^{*}$ | ۰/۰۳۸$^{*}$ |
| ایندول بوتریک اسید× نور | ۸ | ۶۴۵/۱۱$^{**}$ | ۲/۷۷$^{*}$ | ۰/۰۱۲$^{*}$ | ۰/۰۰۴$^{*}$ | ۰$^{*}$ |
| خطا | ۳۰ | ۲۲۰/۱۰ | ۰/۳۹۶ | ۰/۰۰۳ | ۰ | ۰ |
| ضریب تغییرات | | ۱/۷۶ | ۰/۰۷ | ۰/۰۰۵ | ۰/۳۷ | ۰/۲۸ |

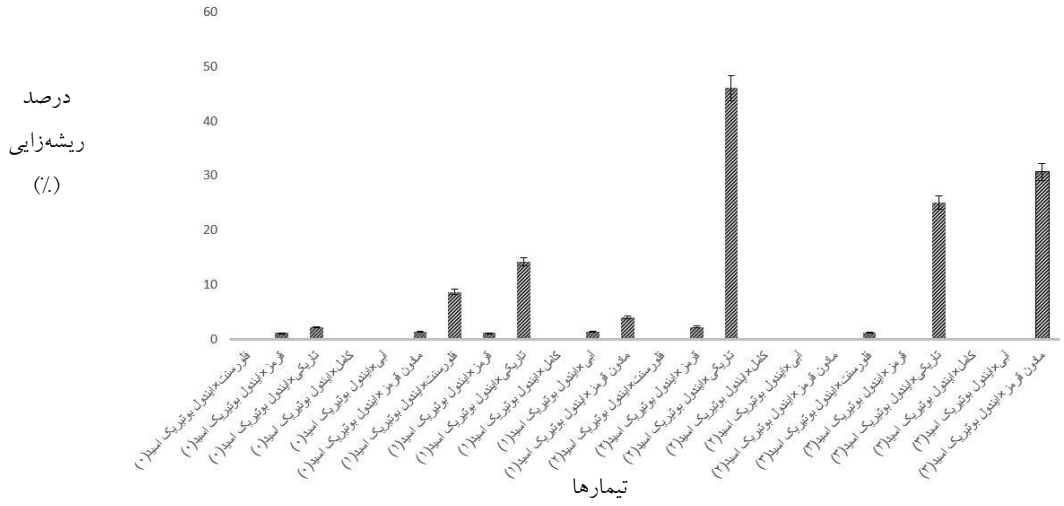


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد تیمار تاریکی و IBA ۲ mg/l بالاترین وزن تر و خشک را دارد (شکل -۲ و شکل -۳). مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی در خصوص صفت هایپریسین نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA دارای بیشترین مقدار هایپریسین (۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود (شکل۴). تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA کمترین مقدار هایپریسین را نسبت به سایر تیمارهای مورد استفاده داشت. در خصوص مقدار هایپرفورین، هیچ مقداری از هایپرفورین مشاهده نشد (شکل-۴).




شکل ۲- مقایسه میانگین‌ها اثر تیمار مختلف نوری بر پارامترهای درصد ریشه‌زایی، وزن تر، وزن خشک



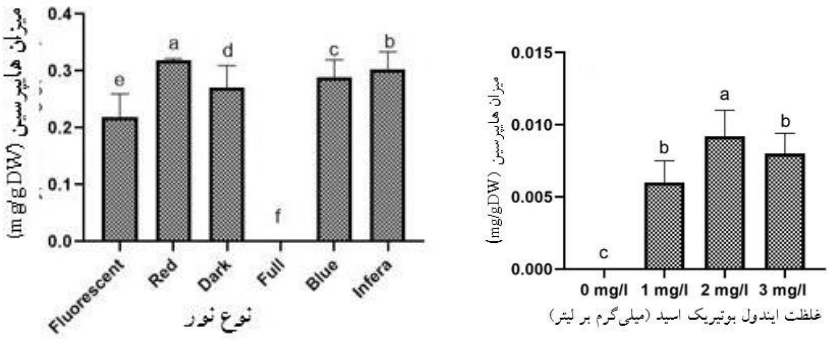

شکل ۳- مقایسه میانگین‌ها اثر متقابل تیمار نوری × IBA بر درصد ریشه‌زایی

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

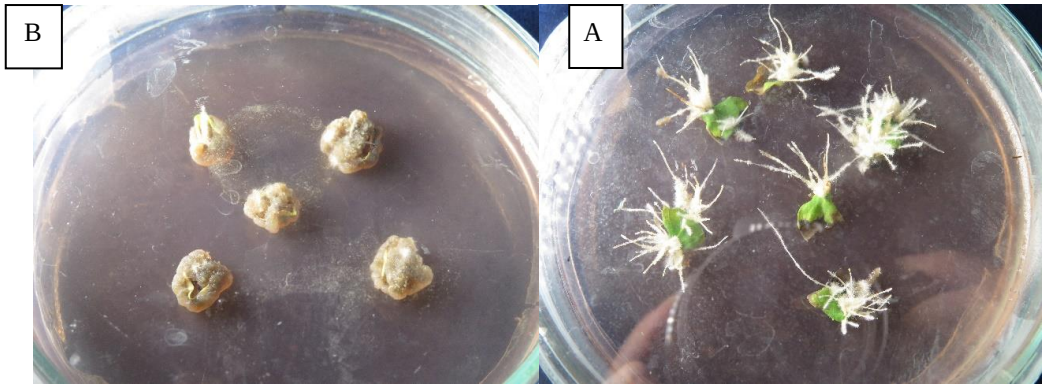
غلظت‌های مختلف IBA اثرات متفاوتی بر القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. prtforatum* نشان دادند (شکل۴). تحت شرایط نور، ریشه‌های متعدد با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA القا شدند. در مقابل، با افزایش غلظت IBA، تعداد کمتری از ریشه‌های نابجا به‌دلیل تشکیل کالوس ایجاد شد (شکل- ۵- B). در محیط بدون تنظیم‌کننده رشد چه با اعمال نور و چه تحت شرایط تاریکی ریشه‌های نابجا مشاهده نشد. جدول ۲ نشان می‌دهد که وزن تر و خشک با افزایش غلظت IBA تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافته است، هم‌چنین حداکثر وزن تر و خشک در شرایط تاریکی در مقایسه با شرایط نوری ثبت شده است. تولید بیومس بالاتر با تعداد ریشه نابجا در شرایط تاریکی به‌جای شرایط نوری به‌دست آمد.

## بحث

مطالعه ما بر انتخاب یک لاین ریشه نابجای سالم بدون کالوس متمرکز شده است که بتواند پایداری خود را برای تولید زیست توده و ترکیبات زیست فعال حفظ کند. با در نظر گرفتن این موضوع، ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین منبع اکسین را برای القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. perforatum* ژنوتیپ توپاز در این مطالعه ثابت شد. تحقیقات متعددی دخالت اکسین را در القأ ریشه‌های نابجا گزارش می‌دهند و سرآغازه‌های اولیه ریشه به اکسین اندوژن یا درون‌زا وابسته است. طبق مطالعات مختلف نشان داده شده است که IBA و NAA مؤثرتر از IAA طبیعی هستند. در کشت‌های تاریکی، ریزنمونه‌های برگ برآمدگی‌های آشکاری را از انتهای بریده شده پس از ۳ هفته در مقایسه با انتهای بریده شده در نور ایجاد کردند (شکل- ۵- A). این برآمدگی‌ها پس از ۲ هفته به‌طور مستقیم بدون القای کالوس به ریشه‌های نابجا تبدیل شدند.




شکل ۴- مقایسه میانگین‌ها سطوح IBA و انواع نور بر میزان هایپرسین




شکل ۵- A) ریشه‌های نابجا ایجاد شده از ریزنمونه برگی در تاریکی و محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA، B) نمونه برگی روی محیط با ترکیب مشابه در محیط فلورسنت



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

فرآیند شروع تمایز و مسیرهای القایی به تنظیم کننده‌های گیاهی خاص و گونه‌های گیاهی بستگی دارد. به‌عنوان مثال در پژوهشی گزارش شد که در گیاه *Panax notoginseng* حضور دی کلرو فنوکسی استیک اسید مسئول القأ کالوس و IBA مسئول القأ ریشه نابجا بوده است (Gao et al. 2005). با این حال، در آزمایش حاضر، ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای تحریک القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ در *H. perforatum* بدون فاز القای کالوس مناسب‌تر بود.

کیفیت نور اثرات قابل توجهی بر القای ریشه نابجا نشان داد. بالاترین تعداد ریشه نابجا در تاریکی به‌دست آمد. در نور قرمز دور، ریشه‌های نابجای متعددی القأ شد. نور فلورسنت از نظر پارامتر تعداد ریشه نابجا در رتبه سوم قرار گرفت. کمترین تعداد ریشه نابجا تحت نور کامل القا شده است. نور آبی باعث ایجاد فرآیند تشکیل کالوس شد که منجر به کاهش ریشه‌های نابجا شد. با این حال، در زیر قرمز، هیچ کالوسی دیده نشد، ولی القأ ضعیف ریشه‌های قهوه‌ای مشاهده شد. نتایج نشان داد که نور قرمز دور به‌عنوان یک منبع نور ضعیف برای القای ریشه‌های نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. perfortum* ژنوتیپ توپاز عمل می‌کند. تشکیل کالوس همراه با ریشه نابجا تحت نور فلورسنت اتفاق افتاد. شایان ذکر است که جداسازی ریشه نابه‌جا حاصل از کالوس‌ها در محیط تکثیر دشوار است، اما ریشه‌های سالم بدون کالوس می‌تواند بدون هیچ مانعی تکثیر شود و الگوهای رشد پایدار را حفظ کند. اگر چه زیست توده بالاتر تحت تاریکی القأ شد و به دنبال آن در زیر نور قرمز دور به‌دست آمد، نتایج تأثیر متقابل غلظت IBA و نور بر درصد ریشه‌زایی و میزان هایپرسین نشان داد که تاریکی به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. perforatum* ژنوتیپ توپاز مناسب است (شکل۳). اندام زایی (ریشه‌زایی)، به‌طور قابل توجهی به منبع نور یا تنظیم کننده‌های رشد گیاه بستگی دارد. به‌طور مثال، تولید کالوس برگ‌های به (*Cydonia oblonga*) با افزایش غلظت 2,4-D افزایش یافت، در حالی‌که نور آبی + قرمز دور میزان کالوس‌زایی را در بین منابع مختلف نور کاهش داد (Koperdáková et al. 2008). این نشان‌دهنده دخالت سیستم گیرنده نوری جذب کننده آبی در فرآیند تشکیل کالوس و برای القأ ریشه است. به‌نظر می‌رسد که فیتوکروم تنها گیرنده نوری درگیر باشد. در مورد هویج وحشی، تولید کالوس با کاهش تولید جنین در نوری غیر از نور قرمز و سبز افزایش یافت (Michler and Lineberger 1987). در تحقیق حاضر مشاهده شد که IBA و محیط تاریک تأثیر قابل توجهی بر القأی ریشه نابجا دارند. در مقابل، القای کالوس به‌طور معنی‌داری تحت نور قرمز دور و به دنبال آن نور فلورسنت اتفاق افتاد، در حالی‌که نور قرمز یا آبی به تنهایی فرآیند ریشه‌زایی نابجا را کاهش داد.

پاسخ افتراقی القای ریشه نابجا در رابطه با مکانیسم تنظیمی پاسخ متابولیت ثانویه ناشی از نور و تنظیم کننده‌های رشد در مطالعه حاضر مشاهده شد. محتوای هایپرسین در منابع مختلف نور متفاوت بود. بالاترین میزان هایپرسین تحت تاریکی و به دنبال آن نور قرمزدور بالاترین میزان بود. در هیچ یک از انواع نور هایپرفورین مشاهده نشد. تغییرات در محتوای متابولیتی تا حد زیادی تحت تاثیر منبع نور و مرحله رشد ریشه قرار دارد.

نور عامل مهمی است که بر رشد، اندام زایی و تشکیل محصولات گیاهی از جمله متابولیت‌های اولیه و ثانویه تأثیر می‌گذارد. اعتقاد کلی بر این است که سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخ دفاعی گیاهان به تنش است. اکسیداسیون با تنش گیاهان مرتبط است (Paek et al. 2005). نور یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های مؤثر بر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه خصوصاً متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Batista et al. 2018). نشان داده شده است که میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان *Achillea millefolium L* (Alvarenga et al. 2018)، *Lippia alba* (Batista et al. 2016) و *Hyptis suaveolens* تحت تأثیر کیفیت نور قرار گرفته است (Andrade et al. 2017).

بهبود رشد گیاه به‌دلیل راندمان برتر نور قرمز تک رنگ می‌تواند مربوط به‌طول موج نور قرمز باشد که با حداکثر جذب کلروفیل‌ها و فیتوکروم‌ها مطابقت دارد. بنابراین، نور قرمز می‌تواند بیشتر از سایر طیف‌ها توسط گیاهان جذب شود (Nishimura et al. 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که نور قرمز تقسیم و طویل شدن سلولی را افزایش می‌دهد. این رویدادها می‌تواند باعث افزایش سطح برگ و افزایش طول ریشه شود که در نهایت می‌تواند منجر



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

به بهبود عملکرد گیاه شود، در حالی‌که نور آبی از تقسیم و بسط سلولی جلوگیری می‌کند

هم‌چنین در پژوهشی دیگر گزارش شد که گیاهان گل راعی در زیر لامپ‌های فلورسنت قرمز رشد بیشتری نسبت به گیاهان تحت لامپ‌های فلورسنت آبی داشتند گزارش شده است که گونه‌های مختلف علاوه بر رشد و نمو، عکس‌العمل‌های گلدهی متفاوتی نسبت به کیفیت نور نشان می‌دهند. گلدهی توسط گیرنده‌های نوری تنظیم می‌شود، به‌طوری که گیرنده‌های نوری کیفیت نور را درک کرده و زمان شروع گلدهی را تعیین می‌کنند تحریک به‌عنوان یک راهبرد مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های گیاهی مانند گل‌راعی ذکر شده است، زیرا کاربرد ابزارهای مهندسی متابولیک یا زیست‌شناسی سنتزی به‌علت نبود روش‌های موفق تراریختی و اطلاعات ژنتیکی درباره مسیرهای بیوسنتزی، کار دشواری است (Hou et al. 2016).

## نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌توان بیان داشت که IBA به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اکسین‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی است، می‌تواند نقش مثبتی در تولید ترکیبات زیستی فعال و نیز متابولیت‌های ثانویه داشته باشد. غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA تأثیر را بر القأ ریشه نابجا در برگ ژنوتیپ توپاز گل راعی داشت. از طرفی نور توانست مقادیر هایپرسین و هایپرفورین را افزایش دهد. از آنجایی‌که پتانسیل تحریک متابولیت ثانویه در میان انواع کشت‌ها، الیسیتورها، شرایط اعمال و دیگر پارامترها متفاوت است، تحقیقات بیشتری برای درک مسیرهای متابولیکی که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه خاص و تنظیم آن‌ها می‌شوند با بهینه‌سازی دستورالعمل‌های مؤثر و کارآمدتر ضروری می‌باشد.

## سپاسگزاری

با تشکر از مدیریت و کارشناسان محترم پژوهشکده متابولیت‌های ثانویه باغی و زراعی اصفهان که امکان انجام این پژوهش را با حمایت مالی و معنوی خود فراهم ساختند.

## منابع

Aliakbari M, Behzadian F, Deldar AA (2015) *Bacillus subtilis* as a Host for Recombinant Hemagglutinin Production of the Influenza A (H5N1) Virus. Iranian Journal of Virology 9:8-13.

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Alvarenga AA, Bertolucci S. KV, Pinto JEBP (2018) Growth and production of volatile compounds of yarrow (*Achillea millefolium* L.) under different irrigation depths. Anais da Academia Brasileira de Ciências 90:3901-3910.

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 122:299-308.

Andrade HB, Braga AF, Bertolucci SKV, Hsie BS, Silva ST, Pinto JEBP (2017) Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* L. Poit in vitro plantlets. Acta Horticulturae (1155):277-284.

Batista DS, de Castro KM, da Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, das Graças Cardoso M, de Oliveira Santos M, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). In Vitro Cellular and amp; Developmental Biology - Plant 52:276-282.

Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, de Castro KM, Mamedes-Rodrigues, TC, Miranda, NA, Ríos-Ríos, AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter In Vitro Cellular and amp; Developmental Biology - Plant 54:195-215.

Bertoli A, Giovannini A, Ruffoni B, Guardo AD, Spinelli G, Mazzetti M, Pistelli L (2008) Bioactive Constituent Production in St. John's Wort in Vitro Hairy Roots. Regenerated Plant Lines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:5078-5082.

Blakesley D (1994) Auxin Metabolism and Adventitious Root Initiation. In Biology of Adventitious Root Formation (pp. 143-154): Springer US.

Butterweck V (2003) Mechanism of Action of St John???s Wort in Depression. CNS Drugs 17:539-562.

Choi SM, Ho Son S, Rho Yun S, Woung Kwon O, Hoon Seon J, Yoeup Paek K (2000) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62:187-193.

Cui XH, Chakrabarty D, Lee EJ, Paek KY (2010) Production of adventitious roots and secondary



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]

metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. Bioresource Technology 101:4708-4716.
Fett-Neto AG, Fett JP, Goulart LWV, Pasquali G, Termignoni RR, Ferreira AG (2001) Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in Eucalyptus saligna and *Eucalyptus globulus*. Tree Physiology 21:457-464.
Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.
Gao X, Zhu C, Jia W, Gao W, Qiu M, Zhang Y, Xiao P (2005) Induction and Characterization of Adventitious Roots Directly from the Explants of *Panax notoginseng*. Biotechnology Letters 27:1771-1775.
Holobiuc I, Blindu R, Cristea V (2009) Researches Concerning In Vitro Conservation of the Rare Plant Species *Dianthus Nardiformis* Janka. Biotechnology and amp; Biotechnological Equipment 23:221-224.
Hou W, Shakya P, Franklin G (2016) A Perspective on *Hypericum perforatum* Genetic Transformation. Frontiers in plant science 7:879-879.
Jung ES, Lee S, Lim SH, Ha SH, Liu KH, Lee CH (2013) Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves (*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities. Plant Science 210:61-69.
Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004) Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. Journal of Plant Biology 47:356-360.
Kirakosyan A, Sirvent Tara M, Gibson Donna M, Kaufman Peter B (2004) The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). Biotechnology and Applied Biochemistry 39:71.
Koperdáková J, Komarovská H, Košuth J, Giovannini A, Čellárová E (2008) Characterization of hairy root-phenotype in transgenic *Hypericum perforatum* L. clones. Acta Physiologiae Plantarum 31:351-358.
Lee YS, Park HS, Lee DK, Jayakodi M, Kim NH, Lee SC, Kundu A, Lee DY, Kim YC, In JG, Kwon SW, Yang TJ (2017) Comparative analysis of the transcriptomes and primary metabolite profiles of adventitious roots of five *Panax ginseng* cultivars. Journal of ginseng research 41:60-68.
McCoy JA, Camper ND (2002) Development of a Micropropagation Protocol for St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). HortScience 37:978-980.
Michler CH, Lineberger RD (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11:189-207.
Nhut DT, Huy NP, Tai NT, Nam NB, Luan VQ, Hien V T, Tung HT, Vinh BT, Luan TC (2015) Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Biotechnology, biotechnological equipment 29:299-308.
Nishimura T, Zobayed SMA, Kozai T, Goto E (2007) Medicinally Important Secondary Metabolites and Growth of *Hypericum perforatum* L. Plants as Affected by Light Quality and Intensity. Environment Control in Biology 45:113-120.
Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81:287-300.
Park JE, Kim H, Kim J, Choi SJ, Ham J, Nho CW, Yoo G (2019) A comparative study of ginseng berry production in a vertical farm and an open field. Industrial Crops and Products 140:111612.
Pavlík M, Vacek J, Klejdus B, Kubáň V (2007) Hypericin and Hyperforin Production in St. John's Wort in Vitro Culture: Influence of Saccharose, Polyethylene Glycol, Methyl Jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens* . Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:6147-6153.
Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP (2005) Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. Food Chemistry 90:157-167.
Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. The Plant cell 17:1343-1359.
Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, Troganis AN, Vervoort, J, Gerothanassis IP (2007) Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. Phytochemistry 68:383-393.
Vinterhalter B, Ninković S, Cingel A, Vinterhalter D (2006) Shoot and root culture of Hypericum perforatum L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. Biologia plantarum 50:767-770.
Yoshikawa T, Furuya T (1987) Saponin production by cultures of Panax ginseng transformed with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Reports 6:449-453.
Yu KW, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2005) Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. Biochemical Engineering Journal 23:53-56.
Zhai H, Wang F, Si Z, Huo J, Xing L, An Y, He S, Liu Q (2015) A myo -inositol-1-phosphate synthase gene, IbMIPS1, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. Plant Biotechnology Journal 14:592-602.
Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T (2007) Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. Environmental and Experimental Botany 59:109-116.

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-18 ]