

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 *Hypericum 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- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

آموزش و ترویج کشاورزی

Shafaei M¹, Ebrahimi M^{2*}, Khosroshahli M¹, Majidi Heravan E¹, Azizinezhad R¹

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 تأثیر شرایط مزرعه‌ای محرک اصلی تحقیقات مرتبط با کشت در شرایط کنترل شده است. کشت ریشه موئین (ترازیخته)، به‌عنوان جایگزین تولید زراعی گیاهان دارویی 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 موئین 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 القای 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 (به ترتیب 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 القای ریشه نابجا 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

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 متابولیت‌های ثانویه در ریشه است (Choi et al. 2000; Gao et al. 2005; Zhai et al. 2015; Lee et al. 2017; Paek et al. 2005; Zhai et al. 2015). تشکیل ریشه نابجا به دلیل 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 (الیستور) 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. 2018; Batista et al. 2016). 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، مورفونز و تمایز گیاهان با کیفیت، شدت و مدت زمان نور کنترل می‌شود. کیفیت نور بر عملکرد فتوسنتز و گلدھی و همچنین بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر قابل توجهی دارد (Batista et al. 2018).

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 (هایپرین و سودوهایپرین)، فلوروگلوکوسینول‌ها (هایپر فورین و ادهایپر فورین) 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، هایپرین و هایپر فورین 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. 2002; McCoy and Camper 2015). 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. 2007; Zobayed et al. 2005). در بسیاری از موارد کشت ریشه به دلیل 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. 2007; Koperdaková et al. 2008; Pavlík et al. 2008; 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).

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 القاء 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 القاء و میزان هایپرسیپین 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 آب مقطر استریل و حذف آب سطحی، وزن تازه آن محاسبه شد. سپس ریشه‌ها در آون با دمای ۶۰ 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 هایپرسیپین 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 زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. بعد از این مرحله ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Germany Eppendorf) با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس

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 حالی که نور آبی بر رشد و باز شدن روزنه، گسترش و آناتومی برگ و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار است.

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

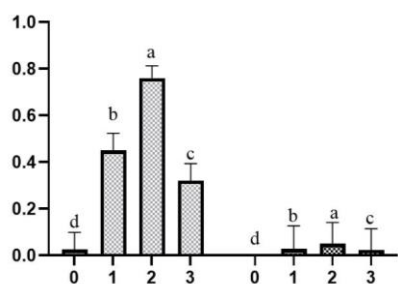
مواد و روش‌ها

بذر گل راعی ژنوتیپ توپاز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور استریل کردن، بذور ابتدا با آب مقطر آبشویی و سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه شسته شدند. بعد از این مرحله مجدداً آبشویی با آب مقطر استریل انجام شد. بذور به مدت ۵-۷ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و ۲-۱ قطره توتین ۲۰ تیمار شدند. بعد از این مرحله و در زیر لامینارفلو، ۳-۲ بار آبشویی با آب مقطر 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 ۲۰ دقیقه 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 القاء ریشه نابجا، تعداد ۵ ریزنمونه برگ‌گی در سه تکرار حاصل از گیاهچه‌های چهار هفته‌ای به محیط یک دوم MS حاوی

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 ریشه نابجا (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 ($p \geq 0.05$) کمتر (۰/۳۳ درصد) از کشت تحت تاریکی (۲۶/۳۳ درصد) و نور قرمز 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 ۰/۰۵٪ 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

به مدت ۱۰ دقیقه 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 هایپرین و هایپرفورین، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 هایپرین 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 هایپرین (شماره شناسایی ۵۴۸-۰۴-۹) و هایپرفورین (شماره شناسایی ۱۱۰۷۹-۵۳-۱) از شرکت سیگما (Sigma, Aldrich) تهیه شد. بررسی میزان هایپرین و هایپرفورین با تهیه منحنی استاندارد انجام شد.

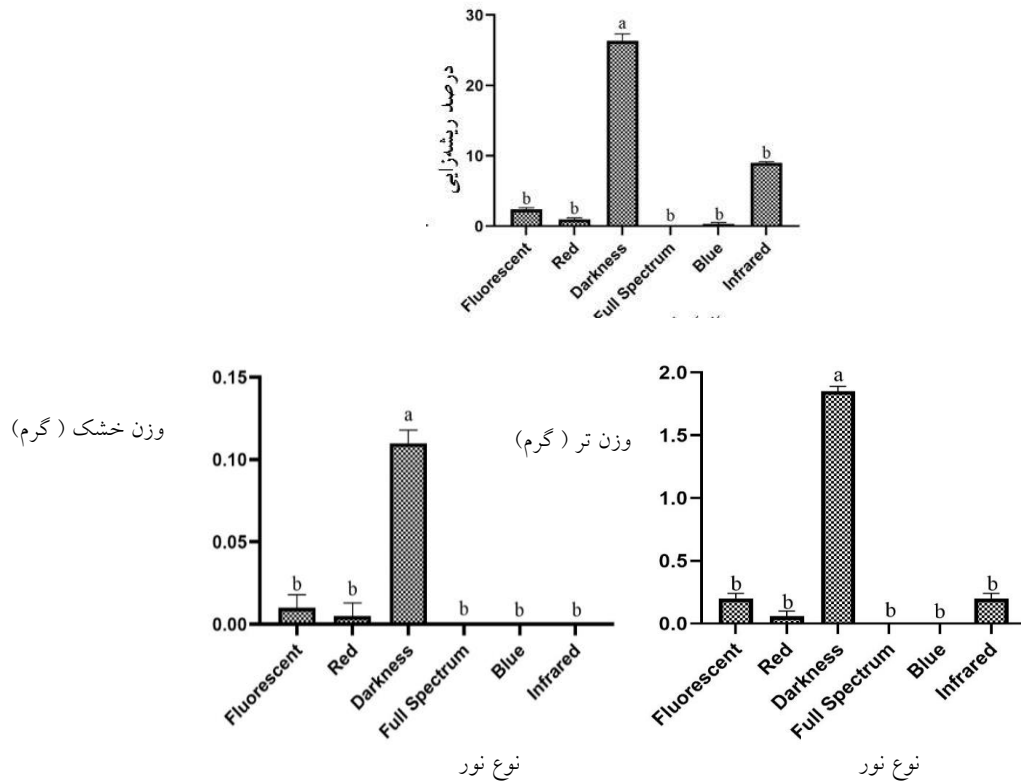
کلیه آزمایشات به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم‌افزار (Version 8.16 RStudio (easynova package) و انجام شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمار نوری و IBA بر پارامترهای مورد بررسی در لاین ریشه نابجای تولید شده از ریزنمونه برگ

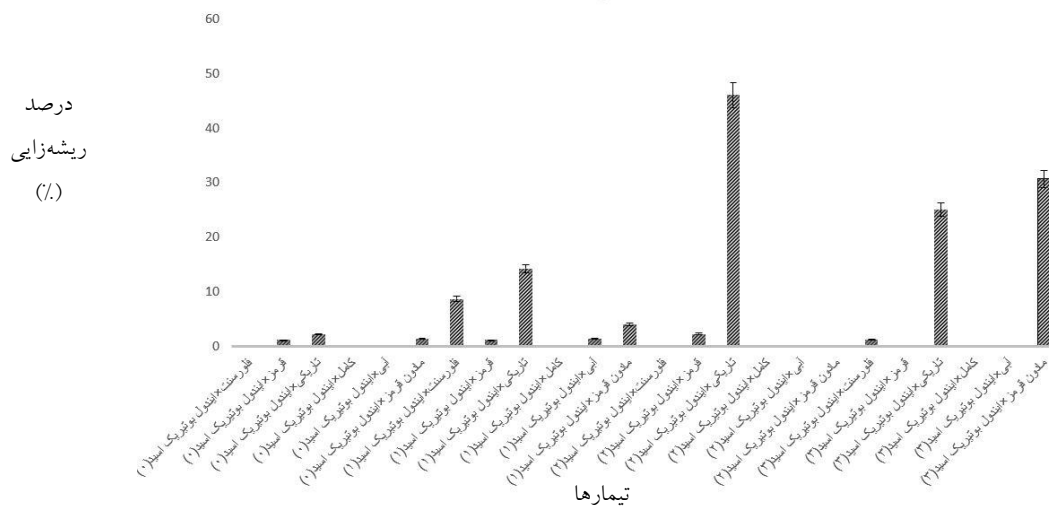
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		% ریشه‌زایی	وزن تر	وزن خشک	هایپرین (mg/gDW)
IBA	۳	۳۸۶/۰۱۷ ^{ns}	۱/۶۳ ^o	۰/۰۰۷ ^o	۰/۰۵۲ ^o
نور	۵	۱۲۵۹/۴۹ ^o	۶/۲۸ ^o	۰/۰۲ ^o	۰/۰۳۸ ^o
ایندول بوتریک × نور	۸	۶۴۵/۱۱ ^{**}	۲/۷۷ ^o	۰/۰۱۲ ^o	۰/۰۰۴ ^o
خطا	۳۰	۲۲۰/۱۰	۰/۳۹۶	۰/۰۰۳	۰
ضریب تغییرات		۱/۷۶	۰/۰۷	۰/۰۰۵	۰/۳۷

هایپرپیرسین (۰/۰۰۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود (شکل ۴). تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر IBA کمترین مقدار هایپرپیرسین را نسبت به سایر تیمارهای مورد استفاده داشت. در خصوص مقدار هایپر فورین، هیچ مقداری از هایپر فورین مشاهده نشد (شکل ۴).

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 هایپرپیرسین نشان داد که غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر IBA دارای بیشترین مقدار



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

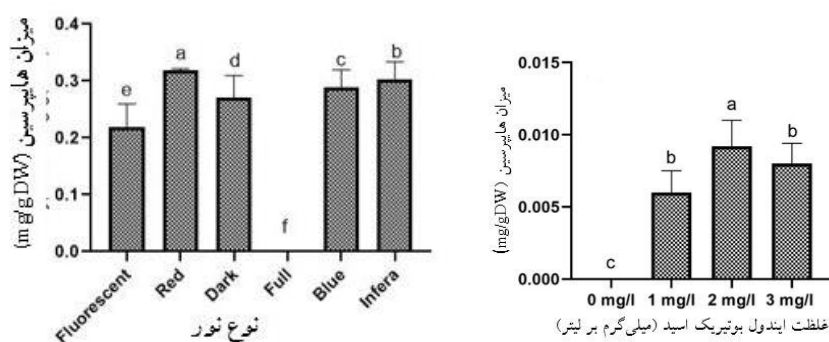


شکل ۳- مقایسه میانگین‌ها اثر متقابل تیمار نوری × IBA بر درصد ریشه‌زایی

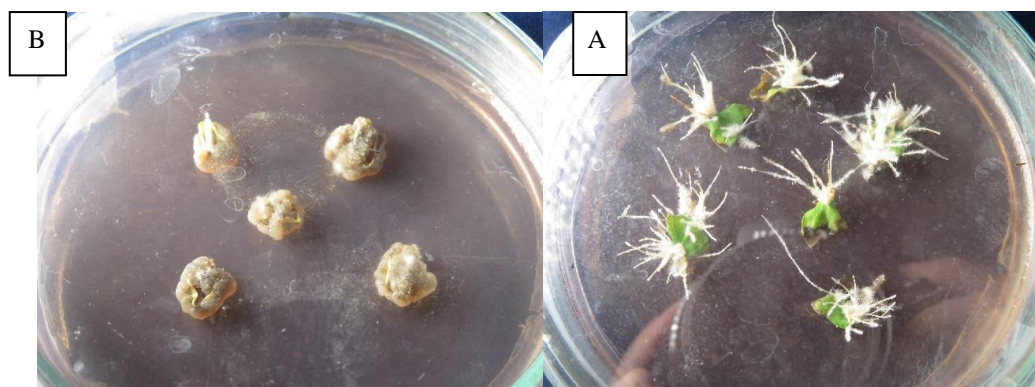
بحث

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 میلی گرم 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 القای ریشه‌های نابجا گزارش می‌دهند و سرآغازهای 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.

غلظت‌های مختلف IBA اثرات متفاوتی بر القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. perforatum* نشان دادند (شکل ۴). تحت شرایط نور، ریشه‌های متعدد با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر IBA القا شدند. در مقابل، با افزایش غلظت IBA، تعداد کمتری از ریشه‌های نابجا به دلیل 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 میلی گرم 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 به جای شرایط نوری به دست آمد.



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



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

القأ ریشه است. به نظر 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 القأ 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 هایپرین در منابع مختلف نور متفاوت بود. بالاترین میزان هایپرین تحت تاریکی و به دنبال آن نور قرمز دور بالاترین میزان بود. در هیچ یک از انواع نور هایپر فورین مشاهده نشد. تغییرات در محتوای متابولیتی تا حد زیادی تحت تأثیر 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 *Lippia* (Alvarenga et al. 2018) *Achillea millefolium* و *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 به طول 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 طولیل شدن سلولی را افزایش می‌دهد. این رویدادها می‌تواند باعث افزایش سطح برگ و افزایش طول ریشه شود که در نهایت می‌تواند منجر

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. perforatum* ژنوتیپ توپاز عمل می‌کند. تشکیل کالوس همراه با ریشه نابجا تحت نور فلورسنت اتفاق افتاد. شایان ذکر است که جداسازی ریشه نابجا 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 هایپرین نشان داد که تاریکی به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای القای ریشه نابجا از ریزنمونه‌های برگ *H. perforatum* ژنوتیپ توپاز مناسب است (شکل ۳). 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 (Koperdaková et al. 2008). این نشان‌دهنده دخالت سیستم گیرنده نوری جذب کننده آبی در فرآیند تشکیل کالوس و برای

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان بیان داشت که IBA به عنوان یکی از مهم ترین اکسین ها در محیط کشت ریشه زایی است، می تواند نقش مثبتی در تولید ترکیبات زیستی فعال و نیز متابولیت های ثانویه داشته باشد. غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر IBA تأثیر را بر القاء ریشه نابجا در برگ ژنوتیپ توپاز گل راعی داشت. از طرفی نور توانست مقادیر هایپرین و هایپر فورین را افزایش دهد. از آنجایی که پتانسیل تحریک متابولیت ثانویه در میان انواع کشت ها، ایستورها، شرایط اعمال و دیگر پارامترها متفاوت است، تحقیقات بیشتری برای درک مسیرهای متابولیکی که منجر به تولید متابولیت های ثانویه خاص و تنظیم آن ها می شوند با بهینه سازی دستورالعمل های مؤثر و کارآمدتر ضروری می باشد.

سپاسگزاری

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

به بهبود عملکرد گیاه شود، در حالی که نور آبی از تقسیم و بسط سلولی جلوگیری می کند
هم چنین در پژوهشی دیگر گزارش شد که گیاهان گل راعی در زیر لامپ های فلورسنت قرمز رشد بیشتری نسبت به گیاهان تحت لامپ های فلورسنت آبی داشتند گزارش شده است که گونه های مختلف علاوه بر رشد و نمو، عکس العمل های گلدهی متفاوتی نسبت به کیفیت نور نشان می دهند. گلدهی توسط گیرنده های نوری تنظیم می شود، به طوری که گیرنده های نوری کیفیت نور را درک کرده و زمان شروع گلدهی را تعیین می کنند تحریک به عنوان یک راهبرد مؤثر برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در گونه های گیاهی مانند گل راعی ذکر شده است، زیرا کاربرد ابزارهای مهندسی متابولیک یا زیست شناسی سنتزی به علت نبود روش های موفق تراریختی و اطلاعات ژنتیکی درباره مسیرهای بیوسنتزی، کار دشواری است (Hou et al. 2016).

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

- 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.
- Koperdaková 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.
- Pavlik M, Vacek J, Klejduš 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, Gerathanassis 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.