مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۴ شماره ۱ صفحه های ۱ تا ۱۴ (۱۴۰۲)
مقاله پژوهشی

القای ریشه‌های مویین و کاربرد متیل‌جاسمونات و کیتوسان در تولید فیزالین B در گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi* L.)[۱]

Hairy roots induction and effect of methyl jasmonate and chitosan application on physalin B content in *Physalis alkekengi* L.

متین مقصودی، یوسف حمیداوغلی*، محمدمهدی سوهانی[۲]

چکیده

فیزالین‌ها مهمترین متابولیت ثانویه استخراج شده از گیاه دارویی *Physalis* spp. هستند که پتانسیل بالایی برای توقف رشد یاخته‌های سرطانی دارند. در این پژوهش القای ریشه‌های مویین با دو سویه باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834 و A4) در ریزنمونه‌های مختلف برگ، میان‌گره، هیپوکوتیل و ریشه گیاه *P. alkekengi* در ۶ محیط هم‌کشتی (1/2MS، MS و B5 در دو سطح ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز) مطالعه شد. بالاترین میزان القای ریشه‌های مویین، از سویه ATCC15834 در ریزنمونه‌های برگ روی محیط کشت B5 دارای ۱/۵ درصد ساکارز مشاهده شد. بررسی پرآوری ریشه‌های مویین در این محیط‌های کشت نشان داد که بیشترین میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در محیط کشت B5 دارای ۳ درصد ساکارز به‌دست آمد. همچنین در این مطالعه تاثیر محرک کیتوسان در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر و متیل‌جاسمونات در غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر بر میزان فیزالین B و رشد ریشه‌های مویین ارزیابی شد. تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر میزان فیزالین B معنی‌دار نبود اما، تاثیر آن بر رشد ریشه‌های مویین، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار بود. محرک متیل‌جاسمونات در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر، افزایش معنی‌دار ۳/۰۲۶ برابری تولید فیزالین B را نسبت به شاهد در پی داشت. رشد ریشه‌های مویین تیمار شده با محرک متیل‌جاسمونات در هر سه غلظت کاهش نشان داد که مقادیر آن معنی‌دار نبود. این بررسی اولین گزارش از تاثیر این محرک‌ها بر تولید ماده موثره فیزالین B است.

واژه‌های کلیدی: *Physalis* spp.، *Agrobacterium rhizogenes*، ریشه مویین، فیزالین، کیتوسان، متیل‌جاسمونات.

مقدمه

گیاه عروسک پشت پرده با نام علمی *Physalis* L. یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است. این جنس دارای ۱۲۰ گونه در سرتاسر جهان است که در مناطق معتدل و گرمسیری پراکنده شده‌اند و گیاهی است علفی که به حالت خودرو در زمین‌های آهکی می‌روید. این جنس در ایران شامل دو گونه علفی یکساله و چند ساله است. *P. divaricata* گونه یکساله است که معمولا به‌صورت علف هرز در اراضی زراعی می‌روید و *P. alkekengi* چند ساله بوده و معمولا در مناطق جنگلی و نسبتا مرطوب می‌روید (۲۰). ترکیب‌های شیمیایی این جنس شامل انواع فیزالین‌ها[۳]، ویتانولیدها[۴]، فلاونوییدها[۵]، آلکالوییدها[۶]، ترپنوییدها[۷] و فنیل‌پروپانوییدها[۸] هستند. مهمترین متابولیت ثانویه استخراج شده از این گیاه، فیزالین‌ها هستند که ترکیب‌های استرولیدی[۹] و شامل یک اسکلت واحد 13,14-seco-16,24-cycloergostane بوده و به واسطه سیستم حلقوی پیچیده با اکسیژن زیاد، شناخته می‌شوند. این ترکیب‌ها معمولا به شکل ایزومرهایی دیده می‌شوند که تعیین ساختارشان را پیچیده می‌کند (۳۹). تاکنون ۱۹ فیزالین (A تا S) شناسایی و به ۸ گروه تقسیم شده‌اند: گروه شیمیایی III شامل فیزالین‌های B، D، E، F، H، I، J و N می‌باشد

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری گرایش گیاهان دارویی و معطر، گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاه گیلان، دانشیار اصلاح و بیوتکنولوژی، گروه علوم باغبانی و دانشیار بیولوژی سلولی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (hamidoghli@gmail.com).

۳- Physalin ۴- Withanolide ۵- Flavonoid ۶- Alkaloid ۷- Terpenoid ۸- Phenylpropanoid ۹- Steroid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

با این توضیح که فیزالین B پیش‌ساز بیوژنتیک اکثریت فیزالین‌های دیگر است (۳۵). در طب سنتی ایران عصاره گیاه عروسک پشت پرده برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها همانند مشکل دفع ادرار، سنگ کلیه و مثانه، بیماری‌های تب‌دار، التهاب، یبوست، تورم، التهاب مفاصل و رماتیسم استفاده می‌شود (۳۸). ترکیب‌های استرویید‌ی موجود در گونه‌های مختلف این جنس شامل انواع ویتانولیدها و فیزالین‌ها دارای خواص درمانی قابل توجهی در انواع سرطان از جمله ملانوما[1] می‌باشند. ملانوما یکی از سرطان‌های بدخیم پوست است که به سرعت به مغز، ریه، کبد و پوست متاستاز می‌دهد و تا به امروز راه درمانی موثری برای آن شناخته نشده است. نتایج پژوهش‌های سال‌های اخیر نشان دهنده تاثیرات درمانی انواع فیزالین‌ها در درمان انواع سرطان‌ها و پتانسیل بالای این ترکیب‌ها برای توقف رشد یاخته‌های سرطانی بدون تاثیر بازدارندگی بر رشد یاخته‌های سالم انسانی بوده است (۱۰، ۲۱).

به دلیل اهمیت اقتصادی و افزایش تقاضا برای تولید متابولیت‌های ثانویه و به‌منظور پیشگیری از بهره‌برداری بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی و حفظ تنوع زیستی موجود در ژرم‌پلاسم‌های طبیعی، پژوهشگران به دنبال روش‌هایی برای تولید هرچه بیشتر و با کیفیت‌تر این ترکیب‌ها هستند. بیوتکنولوژی قادر است کارآیی گیاهان دارویی برای تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. کشت یاخته، بافت و اندام‌های گیاهی و بهره‌گیری از محرک‌ها امکان تولید سریع و انبوه متابولیت‌های با اهمیت را فراهم می‌سازد. در حال حاضر، از کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان شامل کشت کالوس، پروتوپلاست، سوسپانسیون یاخته‌ای، کشت مریستم، کشت ساقه و کشت دانه‌گرده برای تولید متابولیت‌های ثانویه بسیاری از گیاهان دارویی استفاده می‌شود. یکی از منابع امیدبخش و احتمالی برای تولید متابولیت‌های ثانویه، با ارزش بالای دارویی و اقتصادی، ریشه‌های مویین تغییر شکل یافته از نظر ژنتیکی هستند که از طریق آلودگی بافت‌های گیاهی با باکتری خاکزی *A. rhizogenes* تولید می‌شوند. این ریشه‌ها به سرعت در محیط بدون هورمون رشد می‌کنند و با نشان دادن پایداری ژنتیکی می‌توانند متابولیت‌های ثانویه را در یک بازه زمانی طولانی تولید کنند (۳).

تراریختگی گیاهان دو لپه‌ای با *A. rhizogenes* از طریق انتقال یک قطعه (T-DNA) پلاسمید القا کننده ریشه (Ri) از باکتری به داخل کروموزوم یاخته‌های گیاهی اتفاق می‌افتد. ژن‌های کد شده در داخل T-DNA تولید و توسعه ریشه‌ها را در قسمت تلقیح شده، افزایش می‌دهند. به‌طور طبیعی با انتقال ژن‌های باکتریایی به یاخته‌های گیاهی، مسیرهای علامت‌دهی[2] تحت تاثیر قرار گرفته و تنظیمات مسیرهای متابولیسمی اولیه و ثانویه با تغییرات بسیاری همراه می‌شود. در مهندسی ژنتیک، این تغییرات قادر به رفع محدودیت‌های موجود در بعضی از مسیرهای بیوسنتزی ترکیب‌های ثانویه بوده و در نتیجه منجر به تغییر تولید هدفمند فرآورده‌ها می‌شوند. بسته به گونه و نژادگان گیاهان تراریخته، این تغییرات می‌تواند آنقدر شدید باشد که به تولید ترکیب‌های جدید منجر شود. کلون‌های ریشه مویین به‌دست آمده از یک سویه باکتری دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند که از تفاوت در تعداد رونوشت و محل ورود ژن‌های Ri به درون ژنوم گیاهی ناشی می‌شود. ریشه‌های مویین دارای پایداری ژنتیکی بوده و بازکشت آنها آسان است؛ با این وجود، ریشه‌های مویین از نظر ژنتیکی غیریکنواخت[3] هستند و گزینش آنها به‌منظور دستیابی به لاین‌هایی با تولید بالا ضروری است (۱۱).

افزون بر این، تراریزش می‌تواند سبب مسدود شدن و مهار تولید ترکیب یا ترکیب‌های خاص از طریق کاهش یا خاموشی بیان ژن یا ژن‌های مربوط شود. از سوی دیگر ممکن است با تغییرات گسترده بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ایجاد شده، پیش‌سازهای مورد نیاز برای سنتز این ترکیب‌ها به سمت مسیرهای ثانویه دیگر سوق داده شوند و منجر به کاهش تولید ترکیب خاصی شوند (۴).

انتقال T-DNA از *Agrobacterium* به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است که کارایی آن تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری، دوره پیش‌کشتی، نوع ریزنمونه گیاهی، دما و دوره هم‌کشتی و غیره قرار می‌گیرد. کارایی همه سویه‌های *Agrobacterium* برای انتقال تراژن به یاخته گیاهی یا بیماری‌زایی یکسان نیست و نژادگان‌های گیاهی هم واکنش متفاوت در دریافت تراژن داشته و دارای کارایی باززایی گوناگونی هستند به عبارتی، یک واریته گیاهی به سویه‌های مختلف یک گونه

۱- Melanoma ۲- Signaling ۳- Heterogeneity

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

بیماری‌زای باکتری پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهد. دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و مرتبط با برهمکنش گیاه- پاتوژن است (۱۴).

یکی از اهداف مهم در کشت ریشه‌های مویین بهینه‌سازی ترکیب‌های محیط کشت به‌منظور افزایش رشد ریشه‌ها و هم‌زمان تجمع متابولیت‌های هدف است (۱۴). تجمع متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌های زیستی و غیرزیستی تهییج می‌شود. یکی از کاراترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم کشت درون‌شیشه‌ای، استفاده از محرک‌ها است. محرک‌ها ترکیب‌های علامت‌دهنده‌ای هستند که در پاسخ به تنش‌ها، از راه فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. هر دو گروه محرک‌های زیستی و غیرزیستی ممکن است تحریک کننده یا القا کننده سنتز طیف وسیعی از ترکیب‌های فعال زیستی در یاخته‌های گیاهی به عنوان نتیجه پاسخ دفاعی آنها در برابر حمله پاتوژن‌ها باشند (۳۷). کاربرد محرک‌ها به میزان محدود و در غلظت‌های پایین، بیوسنتز ترکیب‌های خاصی را در سیستم یاخته‌ای تحریک کرده و یا بهبود می‌بخشد و به‌طور کلی زمان دستیابی به مقادیر بالای متابولیت‌ها را کاهش می‌دهد. عوامل مختلفی مانند غلظت محرک، سن یاخته‌ها، نوع محیط کشت، زمان و مرحله افزودن محرک به محیط کشت و مدت زمانی که محیط کشت در معرض محرک قرار می‌گیرد، بر تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارند (۲۷).

کیتوسان[۱] از نظر فراوانی دومین پلیمر طبیعی روی زمین است. این ترکیب دارای دو عملکرد بیولوژیکی است؛ در غلظت‌های معین دارای خواص ضد قارچی است و از طرفی، باعث افزایش موثر مقاومت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها می‌شود که به‌طور عمده به واسطه افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در یاخته‌های مختلف گیاهی است (۱۵). جاسمونات‌ها[۲] سیگنال‌هایی مهم در پاسخ به بسیاری از تنش‌ها و فرایندهای رشد و نمو گیاه هستند. افزایش جاسمونیک‌اسید درون‌زا ممکن است از طریق تنش‌های زیست محیطی متعدد از جمله زخم توسط گیاه‌خواران و یا حمله توسط پاتوژن‌ها و همچنین در پی سیگنال‌های رشدی ایجاد شود. اولین مشاهدات در مسیرهای سیگنال‌دهی جاسمونات‌ها، ایجاد تغییر در بیان ژن به‌وسیله تجمع زیاد پروتئین‌های القا شده توسط جاسمونات بود. از دیگر مشاهدات ابتدایی فرایندهای القا شده توسط جاسمونات‌ها، شکل‌گیری ترکیب‌های ثانویه است (۳۶).

در گیاهان سنتز ترپن‌ها و استروئیدها از طریق مسیر موالونیک‌اسید[۳] (MVA) و یا مسیر متیل‌اریتریتول‌فسفات[۴] (MEP) انجام می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که تیمار متیل‌جاسمونات بر فعالیت مسیر MEP و MVA تاثیر می‌گذارد. در یک پژوهش در مورد سنتز نوعی دی‌ترپن[۵]، بیان آنزیم‌های DXS[۶]، DXR[۷]، HDS[۸] و ISPH[۹] که آنزیم‌های مسیر MEP هستند تحت تحریک متیل‌جاسمونات افزایش یافت. به‌طور مشابه بیان ژن‌های درگیر در مسیر MVA به‌ویژه HMGS[۱۰] و HMGR[۱۱] نیز با تیمار متیل‌جاسمونات افزایش یافت (شکل ۱) (۹).

با توجه به اهمیت تولیدات ترکیب‌های دارویی درون شیشه‌ای، در این پژوهش تاثیر ۲ سویه باکتری *A. rhizogenes* (A4 و ATCC15834) بر القای ریشه‌های مویین در ۴ نوع ریزنمونه برگ، میان‌گره، هیپوکوتیل و ریشه، روی ۶ محیط هم‌کشتی (1/2MS، MS و B5 در دو سطح ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز)، تاثیر محیط‌های هم‌کشتی آزمایش قبل روی رشد و پرآوری یک لاین انتخابی ریشه مویین و همچنین تاثیر دو محرک کیتوسان (در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و متیل‌جاسمونات (در غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان فیزالین B و رشد ریشه‌های مویین در قالب طرح کاملا تصادفی ارزیابی شد.

۱- Chitosan ۲- Jasmonate ۳- Mevalonic acid ۴- Methylerythritol phosphate ۵- Diterpene

۶- 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase ۷- 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

۸- 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase

۹- 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase ۱۰- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase

۱۱- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

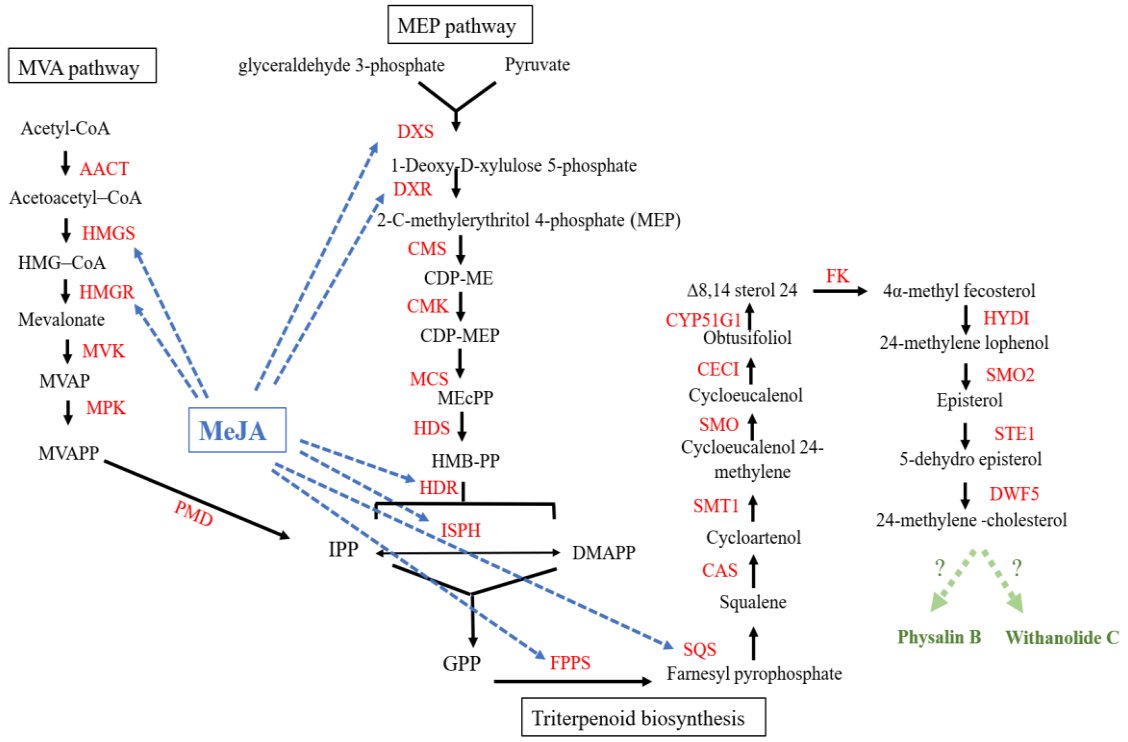

Fig. 1. Possible pathways of physalin B biosynthesis. Blue arrows show MeJA target genes in the mevalonic acid, methylerythritol phosphate and triterpenoid pathways.

شکل ۱- مسیر احتمالی بیوسنتز فیزالین B. فلش‌های آبی ارتباط بین متیل‌جاسمونات و ژن‌های هدف را در مسیرهای موالونیک‌اسید، متیل‌اریتریتول‌فسفات و تری‌ترپنوئید نشان می‌دهد (۶، ۹). لیست کلمات اختصاری را در زیرنویس بیابید[1].

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرها در اواخر تابستان از گیاهان بومی منطقه اشکورات با طول جغرافیایی ´۱۵ °۴۵، عرض جنوبی ´۴۵ °۳۶ و عرض شمالی ´۵۰ °۳۶ جمع آوری شدند. بذرها بعد از غوطه‌ور شدن در اتانول به مدت یک دقیقه، برای ۵۰ دقیقه در محلول نانوسیلور[2] با غلظت ۴۰۰ قسمت در میلیون، به‌طور سطحی استریل و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در آب مقطر استریل و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بذرها بعد از گندزدایی در ظرف‌های کشت دارای محیط 1/2MS کشت و درون اتاقک رشد در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند و ۳۰ روز بعد از آغاز جوانه‌زنی، ریزنمونه‌های مختلف از هیپوکوتیل، میان‌گره، برگ و ریشه برای تلقیح با باکتری و تراریزش تهیه شد.

1. AACT, Acetoacetyl-CoA thiolase. HMGS, HMG-CoA synthase. HMGR, HMG-CoA reductase. MVK, Mevalonate kinase. MPK, Mevalonate-3-phosphate-5-kinase. PMD, Mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. DXS, DOXP synthase. DXR, DOXP reductoisomerase. CMS, CDP-ME synthase. CMK, CDP-ME kinase. MCS, ME-2,4cPP synthase. HDS, HMBPP synthase. HDR, HMBPP reductase. ISPH, 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. CDP-ME, 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. CDP-MEP, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate. MEcPP, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate. ISPH, 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase.
GPPS, Geranyl diphosphate Synthase .FPPS, Farnesyl diphosphate Synthase. SQS, Squalene Synthase. CAS, Cycloartenol Synthase. SMT1, Cycloartenol C-24 methyltransferase. SMO, Sterol-4a-methyl oxidase. CECI, Cycloeucalenol cycloisomerase .CYP51G1, obtusifoliol 14-demethylase. FK, D14-sterol reductase. HYDI, C-7,8 sterol isomerase. SMO2, Sterol-4a-methyl oxidase 2 .STE1, C-5 sterol desaturase. DWF5, Sterol Δ7 reductase.

2 Nanosilver

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

القا و کشت ریشه‌های مویین

برای تلقیح نمونه‌های گیاهی از ۲ سویه وحشی باکتری *A. rhizogenes* سویه‌های A4 و ATCC15834 استفاده شد. باکتری‌ها در محیط مایع LB در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، با چرخش ۱۸۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی کشت شدند و در نهایت محلول با غلظت OD_{600nm}=۱ برای تلقیح ریزنمونه‌ها به‌کار گرفته شد. ریزنمونه‌ها چندین بار با یک سوزن استریل آغشته به کشت تازه باکتری و نمونه‌های شاهد نیز با سوزن استریل زخمی شدند و روی ۶ محیط کشت 1/2MS، MS و B5 در دو سطح ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت به‌منظور حذف باکتری از سطح ریزنمونه‌ها با محلول استریل آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[۱] با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۵ دقیقه و پس از آن با آب مقطر استریل به مدت یک دقیقه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت مربوط دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت شده و تا زمان القای ریشه‌ها هر هفت روز یک‌بار در محیط‌های جدید بازکشت شدند. میزان ریشه‌زایی بر اساس تعداد ریشه تولید شده در هر تیمار در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی محاسبه شد.

پس از القای ریشه‌های مویین در محل زخم‌های آلوده، کلون‌های ریشه‌ای به محیط مایع دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳ درصد ساکارز، بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی منتقل شده و در شیکر با چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها در فواصل زمانی مناسب (هر هفته یک‌بار) بازکشت شده و در هر بازکشت میزان استفاده از آنتی‌بیوتیک به نصف کاهش یافت تا به ۶۲/۵ میلی‌گرم در لیتر رسید. در نهایت کشت‌ها به محیط فاقد آنتی‌بیوتیک انتقال یافتند.

تایید تراریختگی ریشه‌های مویین

به‌منظور تایید تراریختگی ریشه‌های مویین از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن‌های *rolB* و *rolC* استفاده شد. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش CTAB انجام شد (۲۸). آغازگرهای با توالی 5’-GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT-3’ و 5’-GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC-3’ برای تکثیر ژن *rolB* و 5’-CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3’ و 5’-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3’ برای تکثیر ژن *rolC* استفاده شدند. به‌منظور تایید عدم آلودگی سطحی ریزنمونه‌ها به باکتری از تکثیر ژن *virD* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 5’-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3’ و 5’-GGA GTC TTT CAG CAG GAG CAA-3’ استفاده شد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن *rolB* و *rolC* شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و ۳۴ چرخه با برنامه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشت سازی، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای بسط و در نهایت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید[۲] مشاهده شدند.

پرآوری ریشه‌های تراریخت

یکی از کلون‌های ریشه‌های تراریخت به‌طور مشاهده‌ای بر اساس میزان پرآوری در بازه زمانی مشخص، انتخاب و به‌منظور بررسی تاثیر انواع محیط کشت بر رشد و میزان زیست‌توده ریشه‌های مویین بر مبنای وزن تر و خشک، استفاده شد. میزان ۰/۲ گرم ریشه در ۳ محیط کشت مایع ½MS، MS و B5 در دو سطح ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز کشت شدند. بعد از ۶ هفته، آبگیری سطحی از نمونه‌ها با کاغذ صافی انجام و وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. سنجش وزن خشک نیز پس از خشک کردن نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. داده‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد سنجش قرار گرفت. بهترین محیط کشت برای پرآوری ریشه‌های مویین، در آزمون تیمار با محرک‌ها استفاده شد.

آماده سازی و اعمال محرک‌ها در کشت ریشه‌های مویین

۱- Cefotaxime

۲- Ethidium bromide

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

برای تهیه محلول ذخیره متیل‌جاسمونات، ۲۵۰ میلی‌گرم از این ماده در اتانول ۷۰٪ حل و سپس با آب مقطر رقیق و با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد. برای آماده‌سازی محلول ذخیره کیتوسان، ۱ گرم از ماده در ۲ میلی‌لیتر گلاسیال‌استیک‌اسید[۱] در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه حل شد. حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و pH محلول روی ۵/۸ تنظیم و در نهایت اتوکلاو شد. غلظت‌های مورد استفاده برای کیتوسان (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و متیل‌جاسمونات (۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) بودند که ۲ هفته بعد از کشت، به مدت ۲۴ ساعت اضافه شدند. ۶ هفته بعد از تیمار، ریشه‌ها جمع‌آوری و پس از اندازه گیری وزن تر و خشک، برای استخراج فیزالین‌ها استفاده شدند. تیمارها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

استخراج و سنجش میزان فیزالین B

استخراج فیزالین‌ها بر اساس پروتکل Jualang Azlan و همکاران (۱۳) انجام شد. نمونه‌های ۱ گرمی از بافت‌های خشک و پودر شده با ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول برای ۲ هفته در دمای اتاق و در شرایط تاریکی استخراج شد. حجم استخراج شده در دمای اتاق و زیر هود شیمیایی تا ۵۰ میلی‌لیتر کاهش یافت و با حجم مساوی آب مقطر رقیق شد. به‌منظور حذف اسیدهای چرب، در دو مرحله ماده هگزان (۱۵ میلی‌لیتر)، به این مخلوط اضافه شد. سپس عصاره متانولی دوبار با استفاده از ماده کلروفرم (۱۵ میلی‌لیتر) تیمار شد. سرانجام عصاره حاصل (محتوی فیزالین‌های خام و مشتقات آنها) تبخیر و در یک میلی‌لیتر متانول ۶۵٪ (HPLC grade) حل و بعد از فیلتر شدن برای آنالیز HPLC استفاده شد. داده‌های نهایی در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد سنجش قرار گرفت.

واکاوی آماری

بررسی‌های آماری این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.00 TS level 00M0) انجام شد.

نتایج

بر اساس داده‌های به‌دست آمده از تاثیر ۲ سویه باکتری روی ۴ نوع ریزنمونه در ۶ محیط هم‌کشتی، از آنجا که تعدادی از ترکیب‌های آزمایشی به نتیجه صفر منتهی شدند، و با توجه به تاثیری که این عدد روی نرمال بودن داده‌ها در آنالیزهای آماری دارد، به منظور بررسی دقیق‌تر، داده‌های صفر از آنالیزها حذف شدند و سایر داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی به شرح ذیل سنجش شدند.

تاثیر محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ تحت تاثیر سویه A4

سویه A4 تنها در ریزنمونه‌های برگ و از توده‌های کوچک کالوس ایجاد شده در محل زخم‌های تلقیح شده، در محیط‌های کشت B5 دارای ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز به ترتیب با فراوانی ۸/۶۷ و ۵/۳۳ عدد، ریشه‌های مویین تولید کرد و در سایر ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشت، تولید ریشه مویین مشاهده نشد. از این میان، تولید ریشه‌های مویین در محیط کشت B5 دارای ۱/۵ درصد ساکارز در مقایسه با محیط MS دارای ۳ درصد ساکارز (بدون تولید ریشه مویین)، تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر محیط‌های کشت مختلف بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با باکتری سویه A4.

Table 1. Comparison of means for the effect of different media cultures on hairy root induction in transformed leaf explants using A4.

محیط کشت Culture medium	میانگین تعداد ریشه‌های مویین Means of hairy roots number
MS+3% sucrose	0.00
B5+1.5% sucrose	8.67 [a]
B5+3% sucrose	5.33 [ab]

حرف‌های مشابه دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Similar letter(s) shows insignificant difference.

۱- Glacial acetic acid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

تاثیر محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه های برگ تحت تاثیر سویه ATCC15834

در تلقیح با سویه ATCC15834 از آنجا که فراوانی تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه در همه محیط‌های کشت مورد بررسی، صفر و در ریزنمونه‌های میان‌گره، تنها در محیط 1/2MS دارای ۱/۵ درصد ساکارز، ۲/۳ عدد بود، بنابراین ارزیابی تاثیر محیط‌های کشت مختلف بر میزان تولید ریشه‌های مویین تنها روی ریزنمونه‌های برگ در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. این سویه بالاترین فراوانی ریشه‌زایی را در ریزنمونه‌های برگ در محیط B5 دارای ۱/۵ درصد ساکارز با تعداد ۳۴/۳۳ عدد نشان داد. این میزان تولید ریشه‌های مویین دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد با سایر تیمارها بود اما، با تیمار محیط کشت B5 دارای ۳ درصد ساکارز با فراوانی ۲۳/۶۷ عدد، تفاوت معنی‌دار نداشت (جدول ۲) (شکل ۲- a، b، c و d).

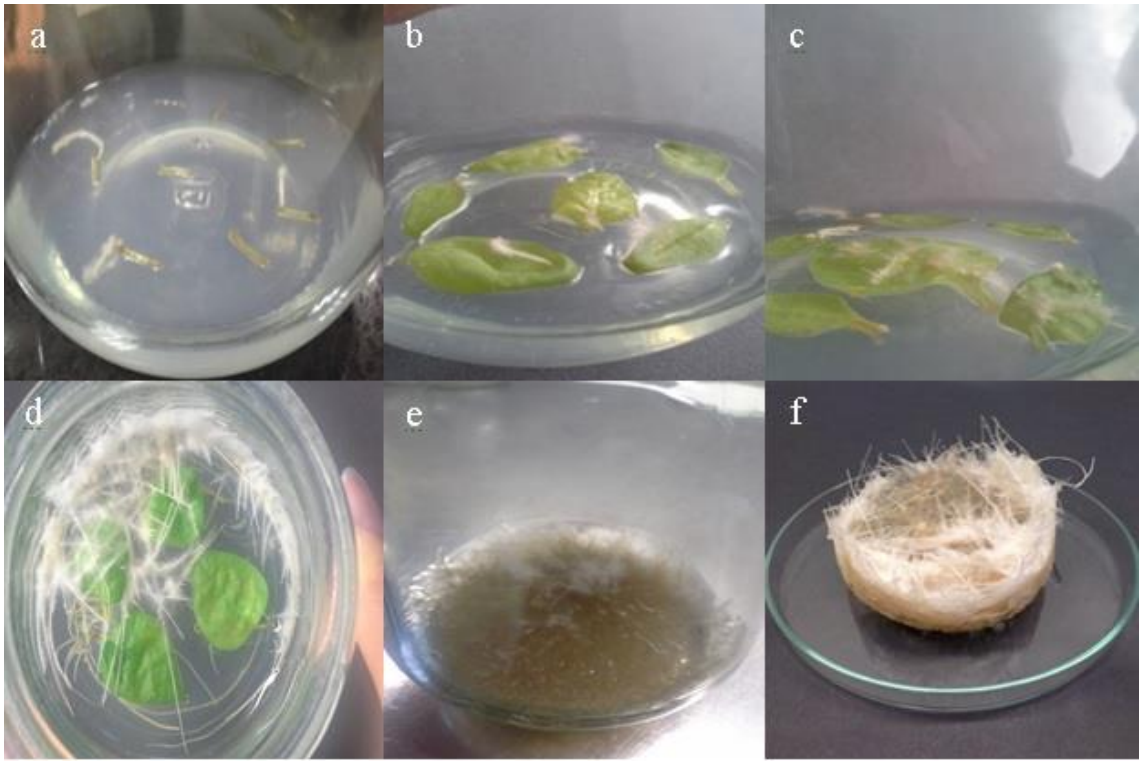

Fig. 2. Induction and growth of hairy roots in *P. alkekeng* explants by *A. rhizogenes* ATCC15834 strain. a) internode explants, b, c) leaf explants, d) agravitropic and plagiotropic growth of hairy roots, e, f) proliferation of hairy roots in *in vitro* liquid cultures.

شکل ۲- القا و رشد ریشه‌های مویین در گیاه *P. alkekengi* به‌وسیله *A. rhizogenes* سویه ATCC15834. a) القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های میان‌گره، b و c) القای ریشه در ریزنمونه‌های برگ، d) رشد فزاینده ریشه‌های مویین با زمین‌گرایی منفی، e و f) پرآوری ریشه‌های مویین در کشت مایع درون شیشه‌ای.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

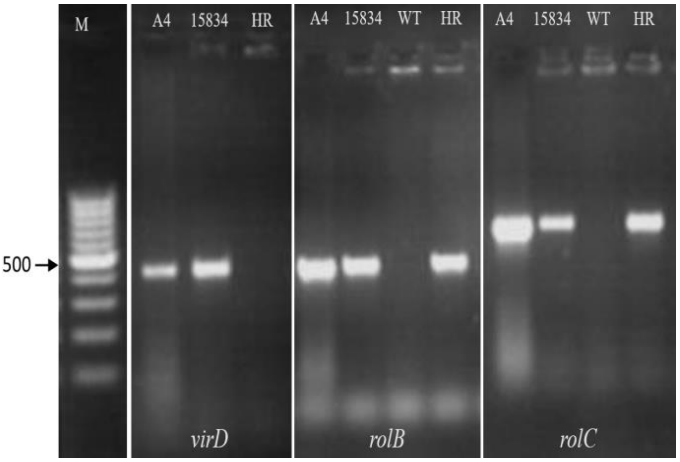

Fig. 3. PCR analysis of *virD* (438 bp), *rolB* (380bp) and *rolC* (534bp) genes with gene specific primers. A4: positive control (*A. rhizogenes* A4), 15834: positive control (*A. rhizogenes* ATCC15834), HR: transformed hairy root of *P. alkekengi*, WT: negative control (root of wild-type *P. alkekengi*), and M: 100kb DNA Ladder.

شکل ۳- تایید تراریختگی ریشه‌ها با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *VirD*، *rolB* و *rolC*. A4: کنترل مثبت (*A. rhizogenes* A4). 15834: کنترل مثبت (*A. rhizogenes* ATCC15834). HR: ریشه مویین تراریخت *P. alkekengi*. WT: کنترل منفی (ریشه طبیعی *P. alkekengi*).

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر محیط‌های کشت مختلف بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با باکتری سویه ATCC15834 و وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین.

Table 2. Comparison of means for the effect of different media cultures on hairy root induction in transformed leaf explants using ATCC15834 and the fresh and dry weights of hairy roots.

محیط کشت Culture medium	میانگین تعداد ریشه‌های مویین Means of hairy roots number	میانگین وزن تر ریشه‌های مویین Means of hairy roots fresh weight (g)	میانگین وزن خشک ریشه‌های مویین Means of hairy roots dry weight (g)
½ MS+1.5% sucrose	18.33 b	2.02 c	0.14 cd
½ MS+3% sucrose	15 b	2.35 bc	0.27 b
MS+1.5% sucrose	1.33 c	1.58 c	0.12 d
MS+3% sucrose	0.00 c	3.10 bc	0.26 b
B5+1.5% sucrose	34.33 a	3.86 ab	0.19 c
B5+3% sucrose	23.67 ab	4.75 a	0.33 a

حرف‌های مشابه دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Similar letter(s) shows insignificant difference.

تاثیر محیط‌های کشت بر پرآوری ریشه‌های مویین

اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط‌های کشت مایع 1/2MS، MS و B5 در دو سطح ۱/۵ و ۳ درصد ساکارز، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین تیمارهای محیط‌های کشت متفاوت وجود دارد. تجزیه آماری نشان داد محیط B5 دارای ۳ درصد ساکارز با میانگین ۴/۷۵ گرم وزن تر بالاترین میزان پرآوری را نسبت به سایر محیط‌ها داشت. بین محیط‌های 1/2MS و MS در میزان وزن تر ریشه‌های مویین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در مورد وزن خشک ریشه‌های مویین نیز محیط B5 دارای ۳ درصد ساکارز با میانگین ۰/۳۳ گرم اختلاف معنی‌دار با سایر محیط‌های کشت نشان داد و بهترین محیط برای پرآوری ریشه‌های مویین تعیین شد. مقایسه‌ها حاکی از آن بود که افزایش میزان ساکارز در هریک از انواع محیط‌های کشت بر ویژگی وزن تر ریشه‌های مویین تاثیر معنی‌دار نداشت اما، موجب افزایش میزان وزن خشک ریشه‌های مویین در سطح احتمال ۱ درصد شد (جدول ۲) (شکل ۲- e و f).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

تاثیر محرک‌های کیتوسان و متیل‌جاسمونات بر میزان فیزالین B و رشد ریشه‌های مویین

بررسی جدول مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف محرک‌های کیتوسان و متیل‌جاسمونات نشان داد که بیشترین تغییر در میزان تولید فیزالین B مربوط به غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر محرک متیل‌جاسمونات با میانگین تولید ۹/۴۱ میکروگرم در یک گرم وزن خشک، دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد (با میانگین ۳/۱۱ میکروگرم در یک گرم وزن خشک) و معادل ۳/۰۲۶ برابر آن بود.

در ویژگی وزن تر ریشه‌های مویین، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان افزایش غیرمعنی‌دار نسبت به شاهد مشاهده شد. اما، با افزایش غلظت به ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن تر با میانگین ۵/۰۹ گرم نسبت به شاهد با میانگین ۹/۹۶ گرم کاهش معنی‌دار یافت. از سوی دیگر افزایش غلظت محرک متیل‌جاسمونات نیز در هر سه سطح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه‌های مویین به ترتیب با میانگین ۵/۹۱، ۴/۶۷ و ۲/۷۳ گرم در مقایسه با شاهد شد. این در حالی است که مقایسه میانگین‌ها در مورد ویژگی وزن خشک ریشه‌های مویین، نشان داد که استفاده از محرک کیتوسان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک با میانگین ۱/۲۷ گرم نسبت به شاهد با میانگین ۰/۸۶ گرم شد. روند کاهشی مشاهده شده در وزن خشک ریشه‌های مویین در پی افزایش غلظت محرک‌ها نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف محرک‌های کیتوسان و متیل‌جاسمونات بر میزان فیزالین B و وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین.

Table 3. Comparison of means for the effect of different concentrations of elicitors on the measured traits.

محرک Elicitor	غلظت محرک Elicitor concentration (mg $L.^{-1}$)	میانگین مقدار فیزالین **B** Means of physalin B content (µg g^{-1}dw)	میانگین وزن خشک ریشه‌های مویین Means of hairy roots dry weight (g)	میانگین وزن تر ریشه‌های مویین Means of hairy roots fresh weight (g)
شاهد control	0	3.11 ^{b}	0.86 ^{b}	9.96 ^{a}
کیتوسان Chitosan	50	2.54 ^{b}	1.27 ^{a}	11.15 ^{a}
	100	4.20 ^{b}	0.78 ^{b}	10.13 ^{a}
	150	2.68 ^{b}	0.59 ^{b}	5.09 ^{b}
متیل‌جاسمونات Methyl jasmonate	20	5.59 ^{b}	0.70 ^{b}	5.91 ^{b}
	40	6.06 ^{ab}	0.66 ^{b}	4.67 ^{b}
	60	9.41 ^{a}	0.54 ^{b}	2.73 ^{b}

حرف‌های مشابه دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Similar letter(s) shows insignificant difference.

بحث

عوامل مختلفی می‌تواند بر کارایی تراریختی و انتقال T-DNA به یاخته گیاهی و میزان القای ریشه‌های مویین تاثیر بگذارد که از آن میان می‌توان به سویه‌های مختلف باکتری و تفاوت در پتانسیل بیماری‌زایی آنها، غلظت مایه تلقیح، گونه گیاهی و حساسیت یاخته‌های گیاه میزبان، نوع و سن ریزنمونه، مدت زمان هم‌کشتی و نوع و غلظت ترکیب‌های محیط هم‌کشتی اشاره نمود (۵).

در این پژوهش بالاترین میزان القای ریشه‌های مویین مربوط به سویه ATCC15834 در ریزنمونه‌های برگ روی محیط B5 دارای ۱/۵ درصد ساکارز به‌دست آمد.

در گونه *P. minima* سویه ATCC15834 در محیط 1/2MS تولید ریشه مویین نمود (۲۵). درصد القای ریشه‌های مویین در گونه *P. ixocarpa* با سویه‌های ATCC15834 و A4، یکسان و معادل ۱۰۰ درصد ساقه‌های تلقیح شده با باکتری بود. ظرفیت

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

رشد دو کلون ریشه مویین به‌دست آمده از این دو سویه باکتری متفاوت بود. کلون ATCC15834 قوی‌تر و پر رشدتر و زمان دو برابر شدن زیست‌توده آن کوتاه‌تر بود همچنین میزان تولید تروپان‌آلکالوئید[1] و ظرفیت بیوترنسفورم هیدروکینون[2] به آربوتین[3] در آن بالاتر بود (۳). در پژوهش‌های مشابهی که روی گیاهان دیگر انجام شده سویه ATCC15834 بهترین کارایی القای ریشه‌های مویین را به میزان ۶۱ درصد در نمونه‌های برگی گیاه *Semecarpus anacardium* داشت و القای ریشه‌های مویین در نمونه‌های ساقه کمتر (۵۲ درصد) بود. سویه‌های A4 و LBA9402 به ترتیب ۴۹ درصد و ۳۶ درصد القا در ریزنمونه‌های ساقه نشان دادند. قابل ذکر است که زمان هم‌کشتی با باکتری نیز روی درصدها تاثیر دارد (۲۳). در بررسی اثر انواع محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین در گیاه *Raphanus sativus* L.، محیط کشت 1/2B5 بهترین محیط کشت تعیین شد. همچنین در ریزنمونه‌های کوتیلدون در مقایسه با برگ و ساقه بیشترین تعداد ریشه مویین مشاهده شد (۸). سنجش تاثیر غلظت‌های متفاوت عناصر ماکرو بر القای ریشه‌های مویین در گیاه *Cichorium intybus* نشان داد محیط MS و یا غلظت ۱/۵ برابری آن کارایی تلقیح و تولید متابولیت‌ها را افزایش می‌دهد (۱۹). تفاوت در نتایج پژوهش‌های مختلف حاکی از آن است که گونه‌های مختلف گیاهی شرایط متابولیکی متفاوتی دارند. همچنین میزان افزایش یا کاهش فعالیت ژن‌های بیماری زای باکتری‌ها تحت تاثیر ترکیب و غلظت عناصر محیط هم‌کشتی می باشد.

در این پژوهش بهترین رشد و پرآوری ریشه مویین و بالاترین زیست‌توده تولید شده بر مبنای وزن تر و خشک، در محیط B5 دارای ۳ درصد ساکارز مشاهده شد. رشد و پرآوری ریشه‌های مویین گیاه *Valeriana officinalis* L. در محیط کشت B5 و 1/2B5 در مقایسه با MS و N6 به میزان بیشتری برآورد شد که دلیل آن ترکیب مختلف عناصر و احتمالا تاثیر نسبت منابع نیتروژن بر رشد ریشه‌های مویین است (۲۴). در گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni بهترین محیط برای پرآوری ریشه‌های مویین 1/2MS دارای ۱/۵ درصد ساکارز بود (۳۲). ریشه‌های مویین به ترکیب‌های محیط کشت به‌خصوص NH_4^+، NO_3^- و منبع فسفات و کربن حساس هستند. تغییر مقادیر عناصر و نوع ترکیب‌ها تاثیر معنی‌داری بر رشد ریشه‌های مویین دارد. بنابراین، بهینه‌سازی محیط کشت به‌منظور رشد بیشتر و افزایش تولید مواد موثره دارای اهمیت می‌باشد (۳۳).

در مورد اثر محرک‌های متیل‌جاسمونات و کیتوسان بر میزان متابولیت‌های این گونه گیاهی تاکنون گزارشی منتشر نشده است. در پژوهش حاضر اثر متیل‌جاسمونات بر افزایش میزان تولید ماده موثره فیزالین B هم‌راستا با تاثیر این ماده روی سایر متابولیت‌ها در بسیاری از مطالعات دیگر بوده است. در یک مطالعه روی گیاه همیشه بهار مشاهده شد که جاسمونیک‌اسید به‌صورت یک محرک قوی برای سنتز گلیکوزیدهای اولانولیک‌اسید[4] عمل کرد (۱). در پژوهشی دیگر تیمار جاسمونیک‌اسید باعث افزایش میزان جینسنوزید[5] در کشت ریشه‌های مویین *Panax ginseng* شد (۲۲). در آزمایشی دیگر استفاده از متیل‌جاسمونات (۱۰۰ میکرومول) به عنوان محرک، مقدار تریگونلین[6] را در ریشه‌های مویین شنبلیله به بیش از دو برابر افزایش داد (۲۶). متیل‌جاسمونات و جاسمونیک‌اسید به‌طور وسیعی در گیاهان ساخته می‌شوند و به عنوان هورمون استرس شناخته شده و از جمله در پاسخ به حمله حشرات تولید می‌شوند. از آنجایی که متابولیت‌های ثانویه در سیستم دفاعی گیاه نقش دارند کاربرد جاسمونیک‌اسید روی گیاه، آن را در موقعیتی مشابه حمله حشرات قرار می‌دهد، بنابراین، سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک‌اسید و مشتقات آن می‌شود. تیمار با متیل‌جاسمونات می‌تواند بیوسنتز هر سه گروه اصلی متابولیت‌های ثانویه (ترپنوئیدها، فنیل‌پروپانوئیدها و آلکالوئیدها) را افزایش دهد (۱۸).

در پژوهشی گزارش شد که بیان فارنسیل‌پیروفسفات‌سنتاز[7] توسط متیل‌جاسمونات القا شد و فارنسیل‌دی‌فسفات[8] را برای بیوسنتز اسکوالن[9] تولید کرد (شکل ۱) (۹). با توجه به اینکه مسیرهای اولیه بیوسنتز فیزالین‌ها با ترپنوییدها مشترک است بنابراین در این پژوهش فرض شده بود استفاده از محرک متیل‌جاسمونات می‌تواند باعث افزایش فیزالین B در گیاه شود که نتایج آزمایش این نظریه را تایید کرد.

با این وجود، تیمار جاسمونیک‌اسید همواره اثر افزایشی بر متابولیت‌ها ندارد و تاثیر این محرک روی میزان ساخت متابولیت‌ها به مسیر بیوسنتز آنها نیز بستگی دارد. به عنوان مثال، اثر تیمار متیل‌جاسمونات روی متابولیت‌های ثانویه مختلف موجود در

۱- Tropane alkaloid ۲- Hydroquinone ۳- Arbutin ۴- Oleanolic acid ۵- Ginsenosides ۶- Trigonelline
۷- Farnesyl pyrophosphate synthase ۸- Farnesyl diphosphate ۹- Squalene ۱۰- Verbascoside

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

ریشه مویین گیاه قاشقک (*Scutellaria lateriflora*) مطالعه و مشخص شد که این محرک باعث افزایش تولید ورباسکوزید[۱۰] و اسکوتلارئین۲[۱] و کاهش ووگونین۷[۲] و اسکوتلارئین۴[۳] می‌شود و بر میزان تولید ووگونین۵[۴] و بایکالین[۵] در گیاه تاثیری ندارد (۱۶).

در ارتباط با تاثیر کیتوسان بر میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف نیز نتایج متفاوتی به‌دست آمده است. در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Panax ginseng*، تیمار کیتوسان منجر به کاهش میزان جینسنوزید شد (۲۲). اما، تاثیر کیتوسان بر ریشه‌های مویین گیاه همیشه‌بهار باعث افزایش بیوسنتز و تجمع گلیکوزیدهای اولانولیک‌اسید در بافت ریشه‌های مویین شد و مقدار این افزایش بین لاین‌ها متفاوت بود (۱). همچنین مدت زمان تیمار ریشه‌های مویین با محرک بر میزان متابولیت‌های آن تاثیر گذار است. این زمان در گیاهان گوناگون و برای ترکیب‌های مختلف متفاوت است. به عنوان مثال، تیمار ریشه‌های مویین گیاه روناس با کیتوسان به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر و به مدت ۱۵ روز، میزان آلیزارین[۶] را تا ده برابر شاهد افزایش داد اما، در تیمار ۶ روزه مقدار آلیزارین کم و غیرقابل اندازه‌گیری و کمتر از شاهد بود (۷). شاید دلیل این تاثیرات متفاوت کیتوسان، میزان متفاوت بیان آنزیم کیتیناز[۷] در شرایط گوناگون و در گیاهان مختلف باشد. اعضای خانواده آنزیم کیتیناز که توانایی تجزیه کیتین[۸]، کیتوسان و مشتقات آن را دارند در همه گیاهان یافت می‌شوند و بیان آنها در گیاهان متفاوت در شرایط گوناگون متغیر است. به عنوان مثال، غلاف‌های گیاه نخود با محرک قارچی کیتوسان تیمار و افزایش بالای بیان RNA کیتیناز در آنها مشاهده شد. از آنجایی که این آنزیم در سیستم دفاعی گیاه نقش دارد و متابولیت‌های ثانویه نیز نقش دفاعی در گیاه دارند تغییرات میزان بیان آنزیم کیتیناز و فعال شدن مسیرهای پیام‌رسان بعدی می‌تواند بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تاثیر داشته باشد که با توجه به مسیر بیوسنتز این ترکیب‌ها تاثیر آن متفاوت خواهد بود (۱۷). تاثیرگذاری تحریک به عنوان یک ابزار افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه پیچیده بوده و به برهم‌کنش بین محرک و یاخته گیاهی بستگی دارد (۲۷).

نتایج به‌دست آمده از اثر محرک متیل‌جاسمونات بر کاهش ماده خشک ریشه‌های مویین گیاه فیزالیس در این بررسی هم‌راستا با بعضی از مطالعات است. در گیاه همیشه بهار جاسمونیک‌اسید رشد ریشه‌های مویین را تا حدی مهار کرد و وزن خشک ریشه در لاین تحت تیمار تا ۲۶ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش یافت. افزون بر این رنگ ریشه‌ها نیز پس از تیمار با جاسمونیک‌اسید تغییر یافته و تیره‌تر شد که احتمالا به دلیل تجمع پلی‌فنول‌ها می‌باشد (۱). در پی تیمار گیاهچه‌های شیرین‌بیان با متیل‌جاسمونات کاهش وزن خشک ریشه و افزایش تولید گلیسیریزین[۹] گزارش شد (۳۰). اما، در ریشه‌های مویین گیاه شیرین‌بیان جاسمونیک‌اسید باعث افزایش وزن خشک در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار شد ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (۳۴). همان‌گونه که پیش از این بیان شد زمانی که جاسمونات‌ها مانند جاسمونیک‌اسید و استر متیله آن یعنی متیل‌جاسمونات به صورت خارجی بر بافت‌های گیاهی اعمال می‌شوند اثرات مهارکنندگی در پدیده‌های مربوط به رشد و نمو، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان را از خود نشان می‌دهند و جنبه‌های مختلف رشدی از جمله رشد گیاهچه، رشد ریشه اولیه، گسترش برگ و کشیدگی هیپوکوتیل را مهار می‌کنند. این اثرات مهاری جاسمونات‌ها بر رشد، باعث زنده ماندن گیاهان در شرایط تنش می‌شود و به گیاه این امکان را می‌دهد تا آمادگی لازم در دفاع از تنش‌های مختلف را داشته باشد (۱۲).

در پژوهش حاضر کیتوسان ابتدا باعث افزایش رشد ریشه‌های مویین شد و سپس با افزایش غلظت آن رشد ریشه‌ها کاهش یافت. روند کاهش ماده خشک ریشه‌ها در تیمار کیتوسان ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند با افزایش جاسمونیک‌اسید درون‌زا مرتبط باشد که این کاهش در تیمار متیل‌جاسمونات نیز دیده می‌شود. همچنین کیتوسان در غلظت‌های بالا می‌تواند برای گیاه سمی باشد و باعث تخریب یاخته‌ی شود (۲، ۲۶). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از کیتوسان روی ساقه برش‌خورده گیاه، منجر به افزایش سریع در میزان جاسمونیک‌اسید درون‌زا می‌شود که نشان دهنده فعال شدن مسیر اکتادکانوئید[۱۰] می‌باشد (اکتادکانوئید مسیر بیوسنتزیک برای تولید جاسمونیک‌اسید است) و باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی متکی به این مسیر مانند افزایش بیان کیتیناز، گلوکاناز[۱۱]، پراکسیداز[۱۲] و همچنین ژن‌های دیگری می‌شود که عملکرد بسیاری از این ژن‌ها مشخص نیست (۲۹). از سوی دیگر نقش بالقوه کیتوسان به عنوان کود زیستی بررسی و مشاهده شده است که کارایی جذب عناصر معدنی در

۱- Scutellarin2 ۲- Wogonin7 ۳- Scutellarein4 ۴- Wogonin5 ۵- Baicalin ۶- Alizarin ۷- Chitinase
۸- Chitin ۹- Glycyrrhizin ۱۰- Octadecanoid ۱۱- Glucanase ۱۲- Peroxidase

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

حضور کیتوسان بالاتر است (۳۱). در آزمایش حاضر به نظر می‌رسد که کیتوسان به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیش از اینکه از طریق افزایش جاسمونیک‌اسید درون‌زا باعث کاهش رشد شود به عنوان تقویت کننده رشد عمل کرده است. اما، با افزایش غلظت کیتوسان، بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی افزایش یافته و به همین دلیل رشد ریشه‌های مویین کاهش یافت. در مطالعه‌ای دیگر نیز که روی گیاه همیشه‌بهار انجام شد تیمار کیتوسان تاثیر منفی بر رشد ریشه‌های مویین و همچنین وزن تر و خشک ریشه‌های کشت شده گیاه داشت (۱). همچنین در تحقیقی روی توت هندی *Morinda citrifolia* تاثیر کیتوسان بر رشد رویشی ریشه‌های مویین کاهشی بود و با افزایش مقدار کیتوسان میزان توده زیستی در آن کاهش یافت (۲).

با بررسی کلیه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، با توجه به اینکه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم کیتوسان، رشد رویشی افزایش معنی‌دار داشت ولی در مقدار فیزالین B تغییر معنی‌داری دیده نشد، می‌توان در مراحل اولیه رشد از محرک کیتوسان به عنوان تقویت کننده رشد رویشی استفاده کرد و بعد از دو تا سه هفته از متیل‌جاسمونات ۶۰ میلی‌گرم در لیتر برای افزایش ماده موثره فیزالین استفاده نمود. با توجه به بررسی‌های گوناگون انجام شده و نتایج متفاوت به‌دست آمده در گیاهان مختلف تصور می‌شود که اثر محرک در افزایش متابولیت‌های ثانویه به گونه گیاهی و مسیر بیوسنتز آنها بستگی دارد. باید توجه داشت که هر لاین از ریشه مویین از نظر محل تلفیق و تعداد کپی‌های T-DNA درون ژنوم با دیگری فرق دارد (۱۱) و در نتیجه رشد آنها و تولید متابولیت‌های ثانویه لاین‌ها با یکدیگر متفاوت است. از آنجایی که در این بررسی انتخاب اولیه لاین‌ها بر اساس رشد رویشی صورت گرفته است ممکن است این موضوع نتایج آزمایش را تحت تاثیر قرار داده باشد و احتمال دارد در صورتی که در مطالعه‌ای دیگر انتخاب لاین بر اساس میزان ماده موثره صورت گیرد، تیمار با محرک‌ها اثر متفاوتی روی میزان تولید ماده موثره نشان دهد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نخستین مطالعه در مورد اثرات دو محرک متیل‌جاسمونات و کیتوسان بر تولید فیزالین B در کشت ریشه‌های مویین گیاه *P. alkekengi* است. از آنجا که گزارش‌های محدودی مبنی بر استقرار کشت ریشه‌های مویین تراریخته و نیز استفاده از محرک‌ها به جهت افزایش تولید ترکیب‌های موثر دارویی در مورد گونه‌های مختلف جنس فیزالیس ارائه شده است، این مطالعه می‌تواند به عنوان یک سیستم مدل در بهره‌برداری از کشت‌های ریشه مویین برای تولید تجاری ترکیب‌های دارویی با استفاده از بیوراکتورهای بزرگ باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، برای طراحی یک پروتکل مناسب در راستای دستیابی به چنین هدفی، استفاده از سویه ATCC15834، ریزنمونه‌های برگ و محیط کشت B5 دارای ۱/۵ درصد ساکارز برای القای ریشه‌های مویین در این گونه گیاهی توصیه می‌شود. انتخاب لاین برتر بر اساس میزان تولید ماده موثره و پرآوری ریشه‌ها در محیط کشت B5 دارای ۳ درصد ساکارز می‌تواند در افزایش محصول نهایی تاثیرگذار باشد. استفاده از محرک کیتوسان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در اوایل دوره رشد برای افزایش زیست‌توده ریشه‌های مویین و سپس استفاده از محرک متیل‌جاسمونات با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر برای افزایش تولید فیزالین پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از مدیریت و پرسنل محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور جهت فراهم نمودن امکانات مورد نیاز این پژوهش و همچنین جناب آقای دکتر جمالعلی الفتی عضو محترم هیات علمی گروه باغبانی دانشگاه گیلان برای همراهی و مساعدت ایشان قدردانی می‌نمایم.

منابع

References

1. Alsoufi, A.Sh.M., C. Pączkowski, A. Szakiel and M. Długosz. 2019. Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in *Calendula officinalis* hairy root cultures. Phytochem. Lett. 31: 5-11.
2. Baque, M.A., M.H.K. Shiragi, E.J. Lee and K.Y. Paek. 2012. Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). Austral. J. Crop Sci. 6(9): 1349-1355.
3. Bergier, K., E. Kuzniak, M. Wielanek, A. Krolicka and M. Sklodowska. 2012. Antioxidant profiles and selected parameters of primary metabolism in *Physalis ixocarpa* hairy roots transformed by two *Agrobacterium rhizogenes* strains. Acta Boil. Cracov. Ser. Bot. 54(1): 24-33.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

4. Bulgakov, V.P., M.V. Veselova, G.K. Tchernoded, K.V. Kiselev, S.A. Fedoreyev and Y.N. Zhuravlev. 2005. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. Planta, 221: 471-478.
5. Bulgakov, V.P., T.Y. Gorpenchenko, G.N. Veremeichik, Y.N. Shkryl, G.K. Tchernoded, D.V. Bulgakov, D.L. Aminin and Y.N. Zhuravlev. 2012. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. Plant Physiol. 158: 1371-1381.
6. Fukushima, A., M. Nakamura, H. Suzuki, M. Yamazaki, E. Knoch, T. Mori, N. Umemoto, M. Morita, G. Hirai, M. Sodeoka and K. Saito. 2016. Comparative characterization of the leaf tissue of *Physalis alkekengi* and *Physalis peruviana* using RNA-seq and metabolite profiling. Front Plant Sci. 7: 1883.
7. Ghatge (Patil), S., S. Kudale, S. Dalvi and Gh. Dixit. 2014. Effect of chitosan elicitation on Alizarin production in hairy root cultures of *Rubia cordifolia* (L.). J. Chitin and Chitosan Sci. 2: 1-8.
8. Gholami, Z., N. Babaeian Jelodar, A. Pakdin Parizi and M. Dadmehr. 2019. Optimization of hairy root induction conditions in radish (*Raphanus sativus* L.) and evaluation of biosynthesis ability of secondary metabolites in hairy root cultures. Agr. Biotech. J. 11(1): 99-118. (In Persian)
9. Ho, Th.T., H.N. Murthy and S.Y. Park. 2020. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. Int. J. Mol. Sci. 21: 716.
10. Hsu, C.C., Y.C. Wu, L. Farh, Y.C. Du, W.K. Tseng, C.C. Wu and F.R. Chang. 2012. Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells. Food Chem. Toxic. 50: 619-624.
11. Hu, Z.B. and M. Du. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. J. Integ. Plant Biol. 48(2): 121-127.
12. Huang, H., B. Liu, L. Liu and S. Song. 2017. Jasmonate action in plant growth and development. J. Exp. Bot. 68(6): 1349-1359.
13. Jualang Azlan, G., M. Marziah, M. Radzali and R. Johari. 2002. Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 69: 271-278.
14. Kabirnetaj, S., J. Zolala, G.A. Nematzadeh and E. Shokri. 2012. Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Agr. Biotech. J. 4(2): 61-75. (In Persian)
15. Lei, C., D. Ma, G. Pu, X. Qiu, Zh. Du, H. Wang, G. Li, H. Ye and B. Liu. 2011. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* (L.). Industrial Crops Prod. 33: 176-182.
16. Marsh, Z., T. Yang, L. Nopo-Olazabal, Sh. Wu, T. Ingle, N. Joshee and F. Medina-Bolivar. 2014. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora*. Phytochemistry, 107: 50-60.
17. Chang, M.M., D. Horovitz, D. Culley and L.A. Hadwiger. 1995. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. Plant Mol. Biol. 28: 105-111.
18. Misra, R.Ch., P. Maiti, Ch.S. Chanotiya, K. Shanker and S. Ghosh. 2014. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in Sweet Basil. Plant Physiol. 164: 1028-1044.
19. Mohebodini, M. and R. Fathi. 2020. The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (*cichorium intybus* L.) and enhancement of secondary metabolites. Agr. Biotech. J. 12(3): 67-90. (In Persian)
20. Mozaffarian, V. 1996. Dictionary of Iranian plant names. Farhang moaser. 740. (In Persian)
21. Ooi, K.L., T.S. Muhammad and S.F. Sulaiman. 2013. Physalin F from *Physalis minima* (L.) triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3- and c-myc-dependent pathways. J. Ethnopharmacol. 150(1): 382-388.
22. Palazón, J., R.M. Cusidó, M. Bonfill, A. Mallol, E. Moyano, C. Morales and M.T. Piñol. 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiol. Biochem. 41: 1019-1025.
23. Panda, B.M., U.J. Mehta and S. Hazra. 2017. Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* (L.). Biotech. 7: 21.
24. Pakdin Parizi, A., M. Farsi, G.A. Nematzadeh and A. Mirshamsi. 2014. Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* (L.). Acta Agr. Slovenica. 103(2): 299-305.
25. Putalun, W., P. Prasarnsiwamai, H. Tanaka and Y. Shoyama. 2004. Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* (L.). Biotechnol. Lett. 26: 545-548.
26. Qaderi, A., Z. Akbari, S. Kalateh-jari, F. Fatehi, M. Tolyat, M. Jalali Moghadam and H. Naghdi Badi. 2016. Improving trigonelline production in hairy root culture of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). J. Medic. Plants. 15(59): 73-80.
27. Raei, M., M. Esna-Ashari and M. Khodayari. 2017. Abiotic elicitors and medicinal plants biotechnology. J. Cell Tissue. 7(4): 333-343. (In Persian)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

28. Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5: 69-76.
29. Ramonell, K.M., B. Zhang, R.M. Ewing, Y. Chen, D. Xu, G. Stacy and S. Somerville. 2002. Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Pathol. 3(5): 301-311.
30. Shabani, L., A.A. Ehsanpour, G. Asgari and J. Emami. 2009. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. Russian J. Plant Physiol. 56(5): 621-626.
31. Sharif, R., M. Mujtaba, M. Rahman, A. Shalmani, H. Ahmad, T. Anwar, D. Tianchan and X. Wang. 2018. The multifunctional role of chitosan in horticultural crops. A Review. Molecules, 23: 872.
32. Sharifpour, R., Aazami, M. and M. Hassanpouraghdam. 2020. Optimization of hairy root production for *Stevia rebaudiana* Bertoni through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Crop Biotechnol. 10(30): 15-29. (In Persian)
33. Shinde, A.N., N. Malpathak and D.P. Fulzele. 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. J. Nat. Med. 64: 346-353.
34. Shirazi, Z., Kh. Piri, A. Mirzaie Asl, T. Hasanloo and T. Ghiasvand. 2014. The effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on production amount of glycyrrhizin and isoliquiritigenin in hairy roots of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). J. Plant Res. 27(3): 440-449. (In Persian)
35. Tomassini, T.C.B., R.R. Dos Santos, M.B.P. Soares, D.C.D. Xavier, N.S. Barbi, I.M. Ribeiro, R.O. de A. Soares and E. Fernandez-Ferreira. 2006. Process for isolating physalins from plants and pharmaceutical compositions containing physalins. U.S. Patent. Patent No.:US 6,998,394 B2.
36. Wasternack, C. 2014. Action of jasmonates in plant stress responses and development- applied aspects. Biotechnol. Adv. 32: 31-39.
37. Wiktorowska, E., M. Długosz and W. Janiszowska. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* (L.). Enzyme Microbial Technol. 46: 14-20.
38. Zargari, A. 2003. Medical plants. Tehran University. 3595-3596. (In Persian)
39. Zheng, Y., L. Luan, Y. Chen, Y. Ren and Y. Wu. 2012. Characterization of physalins and fingerprint analysis for the quality evaluation of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* by ultra-performance liquid chromatography combined with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Pharmaceu. Biomed. Anal. 71: 54-62.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 24 (1): 1-14 (2022)
Research article

Hairy roots induction and effect of methyl jasmonate and chitosan application on physalin B content in *Physalis alkekengi* L.

M. Maghsoudi, Y. Hamidoghli*, M.M. Sohani[1]

Physalins are the most important secondary metabolites extracted from *Physalis* spp. medicinal plant that have a high potential to stop the growth of cancer cells. In this research, induction of hairy roots by two strains of *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834 and A4) in different explants consist of leaves, internodes, hypocotyl, and roots of *P. alkekengi* in 6 media culture (1/2MS, MS, and B5 each of them containing two levels of 1.5 and 3% sucrose) were studied. The highest hairy roots numbers were inducted by ATCC15834 strain in leaf explants on B5 medium containing 1.5% sucrose. The highest fresh and dry weights of hairy roots were obtained in B5 culture medium containing 3% sucrose. In addition, the effects of chitosan elicitor at concentrations of 0, 50, 100, and 150 mg $L.^{-1}$ and methyl jasmonate at concentrations of 0, 20, 40, and 60 mg $L.^{-1}$ on physalin B content and hairy root growth were evaluated. Chitosan treatment had no significant effect on the production of physalin B, but its effect on the growth of hairy roots was significant at 50 mg $L.^{-1}$ concentration. Methyl jasmonate at a concentration of 60 mg $L.^{-1}$ resulted in a significant increase of 3.026 times in the production of physalin B compared to the control, however, none of the three concentrations of methyl jasmonate had a significant effect on hairy roots growth. This study is the first report on the effect of these elicitors on the secondary metabolite physalin B.

Keywords: *Physalis* spp., *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy roots, Physalin, Chitosan, Methyl jasmonate.

1. Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, University Campus2, University of Guilan; Associate Professor, Department of Horticultural Sciences and Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
* Corresponding author, Email: (hamidoghli@gmail.com)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1402.24.1.1.6]