Research Article

Plant Prod., 2021, 44(1), 13-24
http://plantproduction.scu.ac.ir//

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

The Effect of Phosphorus and Nitrogen on Hairy Roots Production in *Nicotiana tobaccum* as a Model Plant

Mitra Khademi[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[2]*, Ahmad Ismaili[3]

1- Ph.D. Graduate of Plant Breeding, Departmant of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- *Corresponding Author: Professor, Departmant of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (nazarian.f@lu.ac.ir)
3- Professor of Plant Biotechnology, Departmant of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Citation: Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., & Ismaili, A. (2021). The effect of phosphorus and nitrogen on hairy roots production in *Nicotiana tobaccum* as a model plant. *Plant Productions,* 44(1), 13-24.

10.22055/ppd.2019.26865.1641

Received: 26 August, 2018 Accepted: 06 February, 2019

Abstract

Background and Objectives

Hairy root culture obtained via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation is considered an essential strategy for *in planta* enhancement of secondary metabolites/or recombinant protein production. High growth rates and genetic stability characterize hair roots compared to ordinary plant root systems. Low root biomass is one of the significant challenges in any hairy root establishment. To this end, the hairy root culture medium was supplemented with various nitrogen and phosphorus sources and combinations to increase the total biomass production.

Materials and Methods

Sterile leaf explants were excised from 10-day old tobacco plants and inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* to induce hairy roots formation. Inoculated leaf explants were kept in dark conditions for two days at 25±2 ˚C. Leaf explants were washed and transferred to the MS culture medium supplemented with cefotaxime at sterile conditions. The inoculated explants were kept in the tissue culture room at 25±2 ˚C until hairy roots appeared. Different ratios of nitrate to ammonium (5.1/5.1, 19/20, and 30/5.1 mM) and three potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) as a source of phosphorus (3, 6, and 12 mM) in two types of solid and liquid culture media were used to optimize hairy roots formation and compared in a factorial

© 2021 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

experiment based on a completely randomized design with three replications, each containing ten explants. The fresh and dry weight of hairy root was recorded 30 days after hairy root formation.

Results

Transgenic hairy roots were confirmed by PCR analysis using the *rol*C gene-specific primers. No bacteria contamination was found following PCR analysis of transgenic hairy roots. Analysis of the variance of hairy roots dry and fresh weight data showed that nitrogen, phosphorus, and culture media had a significant ($P<0.05$) effect on hairy roots biomass production. The highest biomass accumulation (11.66 gr/FW and 0.47 gr/DW) was recorded in the media containing 30/5.1mM ratio of NO_3/NH_4 ratio and 12 mM of KH_2PO_4, respectively. The lowest dry and fresh weight were obtained when 5.1/5.1 mM of NO_3/NH_4 and 3 mM KH_2PO_4 were used.

Discussion

This study suggested that a higher NO_3/NH_4 ratio and KH_2PO_4 can lead to the highest hairy roots biomass production. Therefore, it is recommended to use a higher proportion of NO_3/NH_4 to produce more *in planta* biomass needed for pharmaceutical and industrial products. Furthermore, it can be concluded that it is possible to optimize the hairy root production if hairy roots are used to scale up the amount of metabolite/recombinant proteins production in tobacco.

Keywords: Agrobacterium rhizogenes, Biomass, Hairy root

مقاله پژوهشی

Plant Prod., 2021, 44(1), 13-24
http://plantproduction.scu.ac.ir//

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

تأثیر فسفر و نیتروژن بر تولید ریشه‌های مویین در گیاه توتون (*Nicotiana tobaccum*) به‌عنوان یک گیاه مدل

میترا خادمی[۱]، فرهاد نظریان فیرزآبادی[۲]*، احمد اسماعیلی[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- ***نویسنده مسئول:** استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (nazarian.f@lu.ac.ir)
۳- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

چکیده

تولید ریشه مویین به کمک *Agrobacterium rhizogenes* یکی از مهم‌ترین روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نوترکیب است. یکی از چالش‌های مهم ریشه مویین، تولید کم زیست‌توده است. به منظور بهینه‌سازی محیط کشت ریشه مویین در گیاه توتون، تأثیر فاکتور نیتروژن با نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم (NO_3/NH_4) در سه غلظت ۱۹/۲۰، ۱/۵/۱/۵ و ۱/۵/۳۰ میلی‌مولار، میزان پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) به‌عنوان منبع تأمین‌کننده فسفر (۳، ۶ و ۱۲ میلی‌مولار) در محیط MS به‌صورت کشت جامد و مایع در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان در سال ۱۳۹۵ انجام شد. تراریخت بودن ریشه‌ها به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C تأیید شد. تجزیه واریانس داده‌های میزان وزن خشک و تر ریشه‌های مویین نشان داد که نیتروژن، فسفر و نوع محیط کشت روی میزان تولید زیست‌توده اثرات معنی‌دار ($P<0/05$) دارند. بیشترین زیست‌توده، مربوط به محیط کشت MS حاوی میزان بالای از نسبت نیترات به آمونیوم و ۱۲ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات با حداکثر وزن تر و خشک بعد از یک ماه به‌ترتیب با ۱۱/۶۶ و ۰/۴۷ گرم بود. کمترین وزن خشک و وزن تر در محیطی با میزان کمتری (۱/۵/۱/۵ میلی‌مولار) از نسبت نیترات به آمونیوم و ۶ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات مشاهده شد. همچنین در محیط کشت MS مایع همراه با میزان بالای نسبت نیترات به آمونیوم بیشترین میزان تولید زیست‌توده حاصل شد. با توجه به اهمیت تولید بیشتر زیست‌توده، از روش القاء ریشه مویین این مطالعه می‌توان برای افزایش زیست‌توده برای تولید ترکیبات دارویی و صنعتی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین، زیست‌توده

مقدمه

یکی از مهم‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی در کشت سلول‌ها و اندام‌ها، تولید ترکیبات مفید و متابولیت‌های ثانویه است (Mairet et al., 2009). کشت سلول‌های گیاهی به دلیل برخورداری از شرایط مناسبی چون بسته‌بندی صحیح و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی، امکان تجمع پروتئین‌های چند زیر واحدی و تغییرات پس از ترجمه یوکاریوتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Daniell et al., 2001; Giddings et al., 2000). با این حال، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در این زمینه، ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است (Kong et al., 2003). در میان فنون مختلف کشت بافت گیاهی، کشت ریشه مویین (Hairy

roots) حاصل از تلقیح سلول‌های گیاهی با اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) از قابلیت بالایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌های ثانویه برخوردار است (Borisjuk et al., 1999). کشت ریشه مویین به علت رشد سریع، کوتاه شدن زمان، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی از مزیت‌های بالایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌های ثانویه ارزشمند برخوردار است (Giri and Narasu, 2000). به‌علاوه، ریشه‌های مویین یک سیستم ارزشمند برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان محسوب می‌شود. تولید و افزایش زیست‌توده ی ریشه‌های مویین می‌تواند درنهایت به تولید بیشتر پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌هایی منجر شود که از طریق این ریشه‌ها تولید می‌شوند. برای افزایش زیست‌توده توسط ریشه‌های مویین، شرایط محیطی از قبیل دما، نوع ترکیبات، منبع کربن، pH محیط، نور، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، غلظت یون‌های محیط کشت (Arroo et al., 1995; Bhadra and Shanks, 1995; Christen et al., 1992; Morgan et al., 2000; Toivonen et al., 1991; Vanhala et al., 1998) و محرک‌های زیستی مؤثر هستند (Shahbazi and Riahi Madvar, 2014; Siahmansour et al., 2018). یکی از فاکتورهای تأثیرگذار در تولید زیست‌توده در ریشه‌های مویین، نوع منبع نیتروژن در محیط کشت برای تولید بیشتر زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه است (Lourenço et al., 2002; Oksman-Caldentey et al., 1994; Yu et al., 1996). هر یک از این منابع نیتروژن (نیترات و آمونیوم) تأثیر متفاوتی در رشد، مورفولوژی، فیزیولوژی، مسیرهای شیمیایی و تجمع ترکیبات فیتوشیمیایی زیست فعال (bioactive) در گیاهان دارند (Chen et al., 2005; Kotsiras et al., 2002; Zhonghua et al., 2011). بنابراین تعادل بین نسبت نیترات به آمونیوم به‌عنوان منابع تأمین‌کننده نیتروژن در محیط کشت (Murashige and Skoog, 1962) MS، از فاکتورهای مهم در کشت ریشه‌های مویین است (Pariz et al., 2015). در همین راستا مطالعات متعددی روی گونه‌های گیاهی مختلف و به بررسی بهینه‌سازی این نسبت پرداختند که نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که نسبت نیترات به آمونیوم و فسفر برای افزایش زیست‌توده و سنتز ترکیبات فعال زیستی در گیاهان مختلف متفاوت بوده و نیاز است برای هر گونه‌ی گیاهی بهینه‌سازی شود (Kotsiras et al., 2002; Tabatabaei et al., 2006; Tabatabaei et al., 2008; Zhu et al., 2014). این تحقیق با هدف بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه مویین در گیاه توتون برای افزایش میزان زیست‌توده در مقیاس وسیع انجام شد. بر اساس منابع علمی قابل دسترس، تاکنون مطالعات روی نسبت نیترات به آمونیوم روی گیاه توتون انجام نشده است. از این‌رو در این تحقیق، اثر نسبت نیترات به آمونیوم، پتاسیم دی هیدوژن فسفات و نوع محیط کشت (جامد و مایع) بر میزان تولید زیست‌توده مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

بذرهای توتون (*Nicotiana tabacum* رقم Xanthi از مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش (استان گرگان) تهیه شد. بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در یک محلول شوینده (حاوی ۳۰۰ µl هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، ۶ µl تریتون X100 و ۷۰۰ µl آب‌مقطر استریل) ضدعفونی شدند و سپس سه مرتبه با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها به‌صورت فاصله‌دار بر روی محیط کشت MS معمولی (pH =۵/۸) و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس با ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲± ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند. جهت القای ریشه مویین، از اگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC15834 استفاده شد. باکتری رایزوژنز در محیط کشت (Lauria-Bertani) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی بیوتیک ریفامپیسین در دمای۲۸ سانتی‌گراد بر روی شیکر (مدل JTSL20) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سوسپانسیون باکتری با OD برابر با ۰/۴ در دمای ۴ °C و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه (سانتریفیوژ مدل 5110R) رسوب داده شد و رسوب باکتری در محیط MS ۱/۲ به آرامی حل شده و از این سوسپانسیون به منظور تلقیح استفاده شد. نمونه برگی سترون از گیاهان سه هفته‌ای تهیه شدند. برگ‌ها در عرض به

فواصل یک سانتی‌متری برش داده شدند، سپس به درون مایع تلقیح حاوی اگروباکتریوم رایزوژنز منتقل و ۵ تا ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. برگ‌های آلوده بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا آبگیری شوند، سپس روی محیط کشت MS بدون هورمون، به مدت ۲ تا ۳ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی سفوتاکسیم (Cefotaxime) با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر جهت حذف اگروباکتریوم منتقل شدند و همچنین از کشت ریزنمونه‌های بدون تلقیح به‌عنوان شاهد استفاده شد (Tempe and Casse-Delbart, 1989). به‌منظور تثبیت کشت‌های ریشه مویین، ریشه‌های در حال رشد، قطعاتی به طول حدود ۵ سانتی‌متر جداشده و به محیط کشت MS شامل نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم (۲۰/۱۹ mM، ۵۱/۵/۱ و ۳۰/۵/۱) که از نیترات پتاسیم به‌عنوان منبع تأمین کننده NO_3، آمونیوم سولفات $(NH_4)_2SO_4$ به برای تأمین آمونیوم (NH_4) و از میزان پتاسیم دی هیدروژن فسفات (mM ۳، ۶ و ۱۲) برای تأمین فسفر استفاده شد. MS حاوی ترکیبات ذکرشده به‌صورت کشت جامد (با ۰/۶ درصد آگار) و مایع (بدون آگار) در مجموع با ۱۸ تیمار در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر چرخشی (مدل JTSL20) با سرعت ۹۰ دور در دقیقه نگهداری و کشت شدند. تیمارها در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار با همدیگر مقایسه شدند (جدول ۱). پس از گذشت یک ماه ریشه‌ها از محیط کشت خارج شدند و میزان وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌ها با آب‌مقطر شستشو شدند و در آون دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس میزان وزن خشک آن‌ها برای هر یک از تیمارها اندازه‌گیری شد. بررسی آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها برای صفات اندازه‌گیری‌شده به روش دانکن انجام پذیرفت.

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور تأیید تراریختی ریشه‌های مویین DNAی ژنومی از ریشه‌های مویین به روش CTAB استخراج شد (Gawel and Jarret, 1991). انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*C و آغازگرهای اختصاصی ژن *Vir*G روی DNA ژنومی به‌عنوان الگو انجام گردید (جدول ۲).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه یک بار در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل، واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و برای ۳۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بر حسب ۱ دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (در دستگاه BIO-RAD PCR) انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و به وسیله دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

Tabe 1. The combination of 18 different treatments used to study their effect on hairy roots biomass profuction

5.1/5.1 mM NO3/NH4* 3mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_1b_1c_1$	19/20 mM N03/NH4* 3 mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_2b_1bc_1$	30/5.1 mM NO3/NH4* 3 mM KH_2PO_4 * liquid cultuer =$a_3b_1c_1$
5.1/5.1 mM NO3/NH4* 3mM KH_2PO_4* solid cultuer =$a_1b_1c_2$	19/20 mM N03/NH4* 3 mM KH_2PO_4* solid cultuer =$a_2b_1c_2$	30/5.1 mM NO3/NH4* 3 mM KH_2PO_4 * solid cultuer =$a_3b_1c_2$
5.1/5.1 mM NO3/NH4* 6mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_1b_2c_1$	19/20 mM NO3/NH4* 6 mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_2b_2c_1$	30/5.1 mM NO3/NH4* 6 mM KH_2PO_4 * liquid cultuer =$a_3b_2c_1$
5.1/5.1 mM NO3/NH4* 6mM KH_2PO_4* solid cultuer =$a_1b_2c_2$	19/20 mM NO3/NH4* 6 mM KH_2PO_4* solid cultuer =$a_2b_2c_2$	30/5.1 mM NO3/NH4* 6 mM KH_2PO_4 * solid cultuer =$a_3b_2c_2$
5.1/5.1 mM NO3/NH4*12 mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_1b_3c_1$	19/20 mM NO3/NH4* 12 mM KH_2PO_4* liquid cultuer =$a_2b_3c_1$	30/5.1 mM NO3/NH4* 12 mM KH_2PO_4 * liquid cultuer =$a_3b_3c_1$
5.1/5.1 mM NO3/NH4* 12 mM KH_2PO_4* solid cultuer =$a_1b_3c_2$	19/20 mM NO3/NH4* 12 mM KH_2PO_4 * solid cultuer =$a_2b_3c_2$	30/5.1 mM NO3/NH4* 12 mM KH_2PO_4 * solid cultuer =$a_3b_3c_2$

Table 2. The sequence of primers used in this study

Primer	Sequence(5´-3´)	Amplification fragment length (bp)	Refernece
*rol*C-F	CTCCTGACATCAAAACTCGTC	626	Jalilian et al., 2015
*rol*C-R	TGCTTCGAGTTATGGGTACA	626	
VirG-F	CCGCGGTCAGCCGCAATTCT	819	Kortstee et al., 2011
VirG-R	CCTGCACGTCCGCGTCAAAGAAATA	819	

نتایج و بحث

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۲۶ bp گردید که با اندازه‌ی قطعه‌ای مورد انتظار ژن *rol*C در ژنوم ریشه‌های مویین مطابقت داشت (شکل ۱a). همچنین برای اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی و بقایای ژن‌های باکتری در روی لاین‌های تراریخت، انجامPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Vir*G صورت گرفت. عدم حضور ژن *Vir*G در ریشه‌های مویین، که در خارج از T-DNA قرار دارد دلیلی بر عدم وجود هر گونه آلودگی باکتریایی ریشه‌های مویین است (شکل ۱b).

تثبیت ریشه‌های مویین

داده‌های حاصل از وزن تر و خشک ریشه‌های مویین بعد از آزمون نرمال بودن داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول (۳) ارائه شده است. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر فاکتورهای نسبت نیترات به آمونیوم، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، محیط کشت جامد و مایع در سطح پنج درصد ($P\leq۰/۰۵$) اثر معنی‌داری روی وزن تر و خشک ریشه‌های مویین داشتند.

مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل سه‌گانه نسبت نیترات به آمونیوم، میزان پتاسیم دی هیدروژن فسفات و نوع محیط کشت (مایع و جامد) به کمک آزمون دانکن در سطح ۵ درصد به‌ترتیب برای صفات وزن تر و وزن خشک در شکل‌های (۲) و (۳) آورده شده است. بیشترین میزان زیست‌توده در محیط کشت مایع با میزان 30/5.1 میلی‌مولار از نسبت نیترات به آمونیوم و ۱۲ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات و همچنین در محیط مایع حاوی میزان بالای از این نسبت (نیترات به آمونیوم) به‌دست‌آمد. همچنین، کمترین میزان وزن تر و خشک در محیط کشت‌های با میزان کمتری (۵/۱/۵/۱ mM) از نسبت نیترات به آمونیوم و پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۳mM) مشاهده شد. از نتایج بالا چنین استنباط می‌شود که بین ۱۸ فاکتورهای مورد مطالعه نسبت بالای نیترات به آمونیوم نیز تأثیر بالایی روی میزان زیست‌توده داشته است و با کاهش این نسبت، میزان وزن تر و خشک به طبع کاهش می‌یابد.

بیان پروتئین‌های مهم در ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ارزشمند در گیاهان، یک هدف مهم در کشاورزی مولکولی است. مزایای بسیاری برای تولید پروتئین‌ها در ریشه‌های مویین وجود دارد، از جمله می‌توان به جلوگیری از کاهش انتشار پروتئین‌های نوترکیب دارویی در محیط، کنترل شرایط رشد و جلوگیری از آلودگی در تولید پروتئین اشاره نمود (Hakkinen et al., 2014).

بهینه‌سازی شرایط کشت برای افزایش زیست‌توده یک امر ضروری است، زیرا این موضوع باعث بهبود شرایط تولید زیست‌توده و تغییر مسیرهای متابولیکی در جهت تولید و سنتز متابولیت ثانویه و پروتئین‌ها می‌شود. معمولاً ترکیبات محیط کشت ریشه‌های مویین برحسب نسبت و غلظت منابعی از قبیل کربن، نیتروژن، فسفر و دیگر ماکروالمنت‌ها تغییر پیدا می‌کند تا بهترین شرایط برای تولید زیست‌توده حاصل شود. در همین راستا، شاخص مؤثر برای محیط مغذی- تولید زیست‌توده و روابط بین ترکیبات در سیستم‌های بیولوژیک (زیستی) انجام گرفته است (Georgiev et al., 2007). برای مثال، ریشه‌های مویین گیاه باکوچی (*Psoralea corylifolia*) در محیط کشت MS با تغییر غلظت‌های مختلف آمونیوم و نیترات برای تولید ایزوفلاون و افزایش زیست‌توده القاء شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش تولید زیست‌توده و ایزوفلاون در محیط MS با نسبت ۲۰/۱۰ mM از آمونیوم به نیترات حاصل شد و کاهش هر یک از منابع نیتروژن (NO_3 و NH_4) تأثیر معنی‌داری روی کاهش رشد ریشه‌های مویین داشت (Shinde et al., 2010).

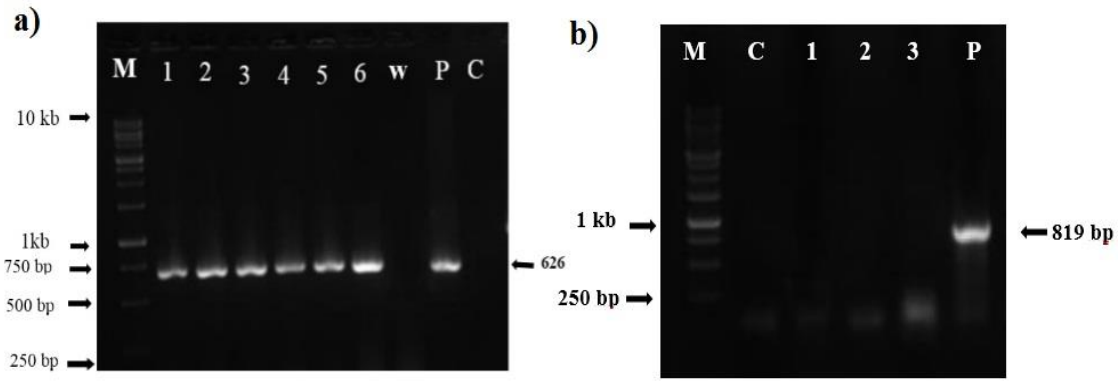

Figure 1. a) PCR analysis for transgenic hairy roots amplified using gene *rolC* primers b) Electrophoresis of PCR products of transgenic hairy roots by specific *virG* primers using *virG*-specific primers. M: 1 Kb DNA Lader, c: Negative control (water), p: Positive control (Ri plasmid of *A.rhizogenes)*, w: non-transformed control roots. 1-6: Transgenic hairy root clones

Table 3. Analysis of variance for hairy root biomass in tobacco plants

Source of variation	df	Mean squares	
		Fresh weight (gr)	Dry weight (gr)
NO_3/NH_4	2	3.797**	0.185 **
KH_2PO_4	2	0.771**	0.010**
NO_3/NH_4 ratio× KH_2PO_4	4	0.159**	0.006**
Liquid and solid cultuer	1	2.273**	0.188**
NO3/NH4 ratio× liquid and solid culture	2	0.667**	0.041**
KH_2PO_4× liquid and solid culture	2	0.016^{ns}	0.015**
NO_3NH_4× KH_2PO_4× liquid and solid culture		0.076*	0.004*
Error	36	0.022	0.001
C.V. (%)		5.79%	14.61%

**: Significant at 1%level, ns: not significant, * at 5% level.

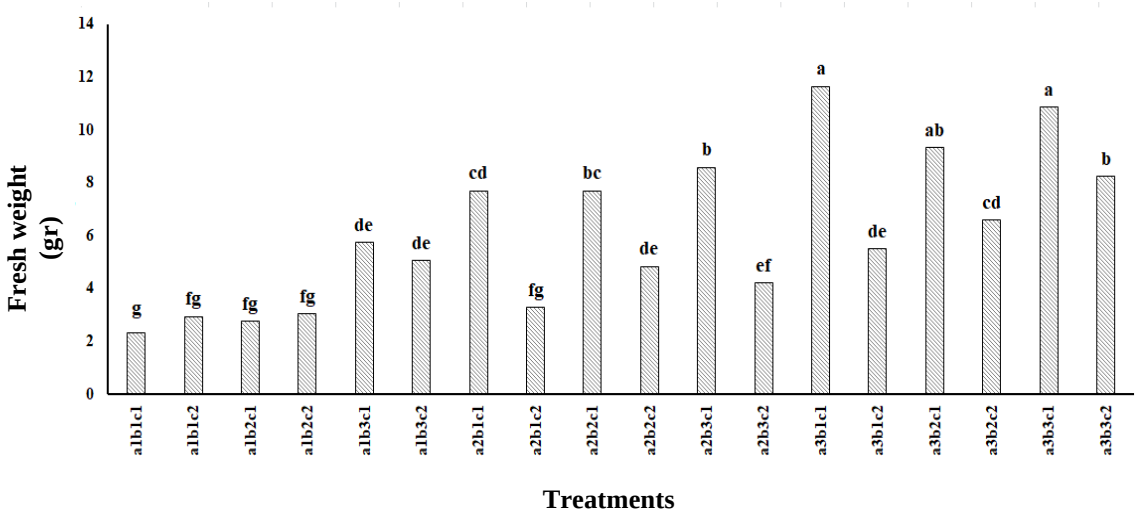

Figure 2. Mean comparison of interaction effect of NO_3/NO_4, KH_2PO_4 and type of culture media on hairy roots fresh weight, using Duncan's multiple reange test (α=0.05)

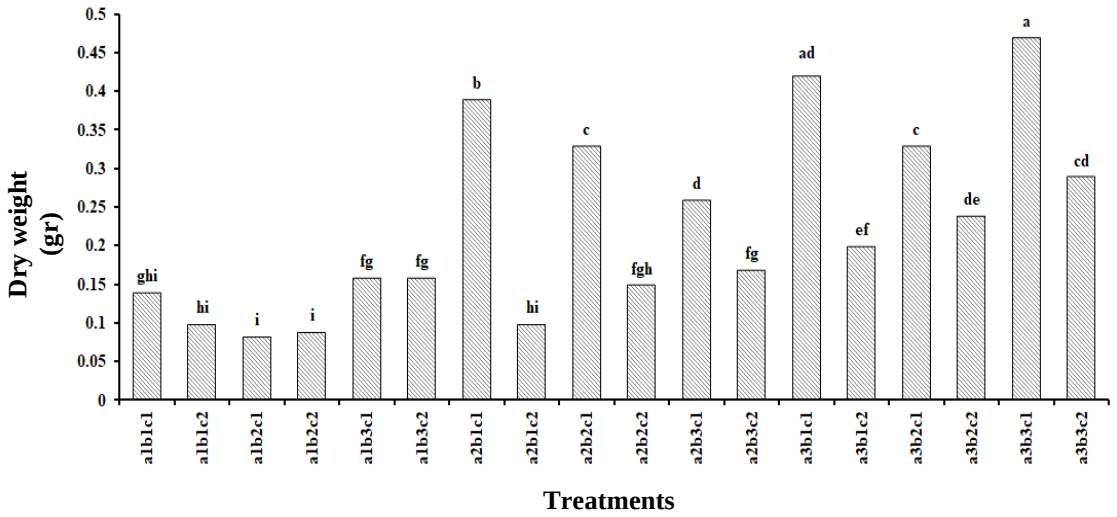

Figure 3. Mean comparison of interaction effect of NO_3/NO_4, KH_2PO_4 and type of culture media on hairy root dry weight, using Duncan's multiple reange test (α=0.05)

بر اساس آنچه در بالا اشاره شد لازم است پژوهش‌های گسترده‌تری جهت بهینه‌سازی شرایط تحریک رشد ریشه مویین در گیاه صورت بگیرد. بر این اساس عوامل مؤثر متنوعی در تولید زیست‌توده در گیاهان مختلف گزارش شده است و این تحقیق به منظور دستیابی به روش مناسب و کارایی بالا جهت تولید زیست‌توده در گیاه توتون به‌عنوان یک گیاه مدل در مهندسی ژنتیک طراحی گردید.

منبع نیتروژن به‌عنوان یکی از فاکتورهای کلیدی برای تولید زیست‌توده در کشت سلول گیاهی شناخته شده است. نیتروژن یکی از عناصر ضروری و جز ترکیبات مهم در گیاهان است که در حدود ۱/۵ تا ۲درصد از وزن خشک گیاه و در حدود ۱ درصد از تمام پروتئین‌های گیاه را شامل می‌شود (Stitt, 1999). همچنین نیتروژن برای مونتاژ و سرهم‌بندی عناصر ضروری برای سنتز چندین ماکرو مولکول‌ها دیگر از جمله DNA، RNA و پروتئین ضروری است (Manuhara et al., 2015).

در مطالعه حاضر با توجه به اهداف کشاورزی مولکولی در ریشه مویین گیاه توتون به بررسی فاکتورهای کلیدی در جهت افزایش زیست‌توده پرداخته شد. در همین راستا، نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم در محیط کشت MS برای تأمین میزان نیتروژن موردنیاز ریشه‌های مویین تغییر پیدا کرد. نتایج حاصل از بررسی در نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم در جهت تحریک و تثبیت ریشه‌های مویین حاکی از این بود که محیط کشتی با میزان ۶ برابر از نسبت نیترات به آمونیوم تأثیر ویژه‌ای در تحریک ریشه مویین در این گیاه داشت و میزان حداکثر وزن تر و خشک بعد از یک ماه (به‌ترتیب با ۱۱/۶۶ و ۰/۴۷گرم) به‌دست‌آمد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نسبت نیترات به آمونیوم نقش بسزایی در تحریک ریشه مویین و فراوانی آن‌ها دارد و کاهش این نسبت با وجود سایر فاکتورها باعث کاهش میزان زیست‌توده (۲/۳۳ و ۰/۰۸ گرم) شده است (شکل ۴).

نتایج ما با یافته‌های Ghorbani et al (2015) در رابطه با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم (۱/۵و ۳/۵ گرم بر لیتر) بر میزان زیست‌توده در گیاه خرفه مطابقت داشت. همچنین در مطالعه‌ی دیگری، منابع مختلفی از نیتروژن به‌صورت آمونیوم، نیترات، گلوتامین یا گلیسین را به محیط کشت MS چه به‌صورت مجزا یا ترکیبی از این منابع به محیط اضافه شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نه تنها منبع نیتروژن بلکه ترکیبی از این منابع نیز باعث افزایش زیست‌توده می‌شود. در مجموع گلوتامین و نیترات مهم‌ترین منبع تولید نیتروژن معرفی شدند. در این مطالعه همچنین ذکر شده است که آمونیوم به تنهایی نمی‌تواند یک منبع کافی برای رشد سلول گیاهی باشد (Holland et al., 2010).

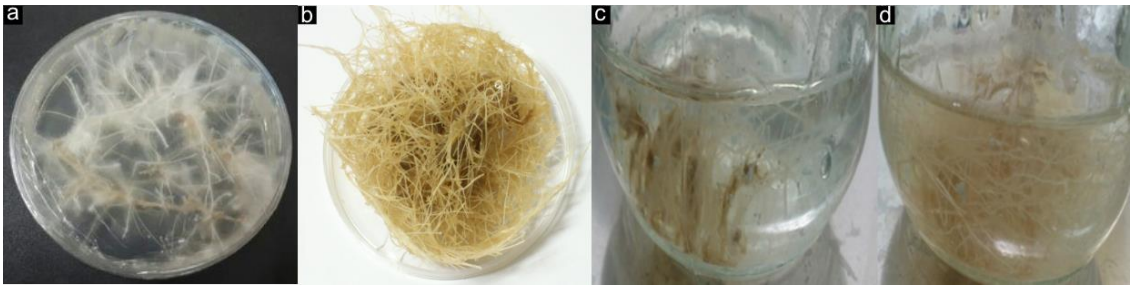

Figure 4. Production of hairy root in tabacco plant. (a) Extension of transformed roots in MS solid media. (b) Rapidly growing transformed roots in MS liquid medium with high levels of nitrogen and phosphorus (C-D) Production of hairy root in MS liquid media with minimum and maximum amount of NO_3/NH_4 and KH_2PO_4, respectively

در پژوهشی Muranaka et al.(1992) گزارش کردند که غلظت بالای نیترات (NO_3^-) در KNO_3 موجب اثرات سمی در محیط کشت ریشه‌های مویین شده است. در مطالعه‌ی دیگری توسط Franklin and Dixon (1994) نشان دادند که غلظت KNO_3 بیشتر از ۱۵ mM در محیط MS می‌تواند باعث کاهش رشد سریع در کشت ریشه‌ها شود. در یک مطالعه دیگر، بررسی اثرات هر یک از عناصر KNO_3 و NH_4 به‌صورت منفرد نشان داد که استفاده از آمونیوم (NH_4^+) نسبت به نیترات (NO_3^-) برای رشد، مطلوب‌تر است. به‌عبارت‌دیگر، میزان بالای غلظت KNO_3 باعث افزایش میزان NO_3 می‌شود، ولی در مقابل، تجمع K^+ و اثرات سمی را نیز در پی دارد (Mairet et al., 2009). در همین راستا، بررسی و مقایسه داده‌های حاصل از غلظت بالای نیترات به آمونیوم با شاهد (محیط کشت MS معمولی) انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم میزان زیست‌توده نسبت به شاهد افزایش یافت و اثری از کاهش رشد با روند افزایش این نسبت (30.5.1 mM NO_3/NH_4) مشاهده نشد. نسبت نیترات به آمونیوم باعث تغییر در مروفولوژی ریشه‌های مویین، با افزایش تولید ریشه و منشعب شدن آن‌ها می‌شود. قابل ذکر است که پاسخ گیاهان مختلف به میزان نسبت نیترات و آمونیوم برحسب نوع گیاه، شرایط محیطی، مرحله توسعه و نمو، غلظت نیتروژن و هدف مورد مطالعه می‌تواند متفاوت باشد، بنابراین برای هر گیاه نیاز به بهینه‌سازی نسبت نیترات به آمونیوم ضروری است (Stitt, 1999; Claussen, 2002; Kotsiras et al., 2002; Lu et al., 2009).

فسفر از جمله عناصر پرمصرفی است که تأثیر مثبتی بر رشد ریشه‌های مویین دارد. در مطالعات مختلف برای به‌دست آوردن رشد بهینه ریشه مویین، غلظت‌های مختلفی از سطوح فسفات (KNO_3 و KH_2PO_4) به محیط کشت اضافه شده است (Christen et al., 1992; Payne et al., 1987; Toivonen et al., 1992).

نتایج مطالعه Praveen and Murthy (2013) بر روی گیاه پنیر باد (Withania somnifera) نشان داد که غلظت‌های متفاوتی (صفر–۰/۸۵–۱/۲۷ و ۱/۷ گرم بر لیتر) از KH_2PO_4 یکی از فاکتورهای مهم در تولید ریشه مویین است. بیشترین میزان زیست‌توده در غلظت ۱/۷ گرم بر لیتر KH_2PO_4 با میزان وزن تر ۱۳۹/۲ گرم بر لیتر و وزن خشک با ۱۳/۱۱ گرم در لیتر به‌دست‌آمد و میزان فسفات تأثیر معنی‌داری روی زیست‌توده با افزایش رشد ریشه داشت است.

در مطالعه دیگری نیز ثابت شد که افزایش زیست‌توده و تولید بتالین در کشت ریشه مویین گیاه چغندر قند (beta vulgaris) با میزان پایین فسفات محیط مرتبط است (Pavlov et al., 2005). در مطالعه حاضر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۳ mM، ۶ و ۱۲) به‌عنوان منبع فسفر برای بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های مویین مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش میزان فسفر در کنار فاکتور نیتروژن باعث تحریک القاء ریشه‌های فرعی بیشتری در ریشه‌های مویین نسبت به شاهد مشاهده‌شده و با کم کردن غلظت این مواد تعداد ریشه‌ها کاهش یافت. با مقایسه داده‌های این مطالعه با سایر تحقیقات این‌گونه استنباط می‌شود که

فسفر در کنار فاکتور نیتروژن باعث تولید زیست‌توده در گیاه توتون می‌شود و سطح منبع فسفر در محیط کشت با میزان تولید ترکیبات مورد بررسی ارتباط دارد.

بنابراین بهینه‌سازی غلظت ماکروالمنت‌ها به‌ویژه نیتروژن و فسفر در محیط کشت یک مرحله کلیدی به سمت تولید بالای متابولیت‌های ثانویه و پروتئین در گیاه است (Mantell and Smith, 1983). در کنار این دو عنصر، محیط کشت مایع، به خاطر تهویه‌دهی، کنترل pH محیط و سهولت در دسترس قرار دادن یون‌ها به این امر کمک شایانی می‌کند (Manuhara et al., 2015).

نتیجه‌گیری

کشت ریشه‌های مویین یک فرصت جدید و یک چشم‌اندازه خوب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه است. ریشه‌های مویین به دلیل نگهداری آسان و مناسب برای سازگاری در سیستم‌های راکتورها، تولید ترکیبات فعال زیستی از نظر ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی کاربرد دارد و همچنین در آینده، ریشه‌های مویین برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دارویی و نگهدارنده در صنایع غذایی یک ابزار جدید محسوب می‌شود. در پژوهش حاضر نیز با توجه به اهمیت ترکیبات محیط بر میزان تولید ریشه‌های مویین، بهینه‌سازی این ترکیبات مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییر در هر یک از این ترکیبات می‌تواند در رشد ریشه‌های مویین، افزایش زیست‌توده و بازده تولید ترکیبات و پروتئین‌های نوترکیب پس از بیان آن‌ها از طریق کشت ریشه‌های مویین مؤثر باشد.

سپاس‌گزاری

از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به سبب فراهم آوردن شرایط تحقیق کمال تشکر را داریم.

References

Arroo, R. R., Develi, A., Meijers, H., Westerlo, E., Kemp, A., Croes, A. F., & Wullems, G. (1995). Effect of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in Tagetes patula hairy root cultures. *Physiologia Plantarum*, 93(2), 233-240.

Bhadra, R., & Shanks, J. V. (1995). Statistical design of the effect of inoculum conditions on growth of hairy root cultures of Catharanthus roseus. *Biotechnology Techniques*, 9(6), 681-686.

Borisjuk, N. V., Borisjuk, L. G., Logendra, S., Petersen, F., Gleba, Y., & Raskin , I. (1999). Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology*, 17(5), 466-469.

Chen, W., Luo, J., & Shen, Q. (2005). Effect of NH_4^+-N/NO_3^--N ratios on growth and some physiological parameters of Chinese cabbage cultivars. *Pedosphere*, 15(3), 310-318.

Christen, P., Aoki, T., & Shimomura, K. (1992). Characteristics of growth and tropane alkaloid production in Hyoscyamus albus hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A_4. *Plant Cell Reports*, 11(2), 597-600.

Claussen, W. (2002). Growth, water use efficiency, and proline content of hydroponically grown tomato plants as affected by nitrogen source and nutrient concentration. *Plant and Soil*, 247(2), 199-209.

Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6(5), 219-226.

Franklin, C., & Dixon, R. (1994). *Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures*: *Plant cell cultures a practical approach* (2nd ed). Oxford: IRL Press.

Gawel, N., & Jarret, R. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 262-266.

Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6),1175.

Ghorbani, M., Ghorbani, A., Omidi, M., & Hashemi, M. (2015). Response surface modelling of noradrenaline production in hairy root culture of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(6), 439-443.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1151-1155.

Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1-22.

Häkkinen, S. T., Raven, N., Henquet, M., Laukkanen, M. L., Anderlei, T., Pitkänen, J. P., Twyman, R. M., Bosch, D., Oksman-Caldentey, K. M., & Schillberg, S. (2014). Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), 336-346.

Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., Schmale, K., Altmann, F., Stadlmann, J., Fischer, R., & Hellwig, S. (2010). Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 278-289.

Jalilian, A., Ismaili, A., Nazarian Firouzabadi, F., & Hosseini, Z. (2015). *Optimization of hairy root induction and transformation,and cloning of over-expression of 4´OMT gene construct in opium poppy.* MSc thesis, Lorestan University, Khorramabad. [In Farsi]

Kong, J. M., Goh, N. K., Chia, L. S., & Chia, T. F. (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1), 7-21.

Kortstee, A., Khan, S., Helderman, C., Trindade, L., Wu, Y., Visser, R., Brendolise, C., Allan, A., Schouten, H., & Jacobsen, E. (2011). Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation. *Transgenic Research*, 20(6), 1253-1264.

Kotsiras, A., Olympios, C., Drosopoulos, J., & Passam, H. (2002). Effects of nitrogen form and concentration on the distribution of ions within cucumber fruits. *Scientia Horticulturae*, 95(3), 175-183.

Lourenço, P. M., de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A., & Domingos, A. (2002). Growth and proteolytic activity of hairy roots from Centaurea calcitrapa: Effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 242-249.

Lu, Y. L., Xu, Y. C., Shen, Q. R., & Dong, C. X. (2009). Effects of different nitrogen forms on the growth and cytokinin content in xylem sap of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) seedlings. *Plant and Soil*, 315(1), 67-77.

Mairet, F., Sierra, J., Glorian, V., Villon, P., Shakourzadeh, K., & Boitel-Conti, M. (2009). A new approach to define optimized range of medium composition for enhancement of hairy root production in fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(2), 257-265.

Mantell, S., & Smith, H. 1983. *Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures.* Paper presented at the Seminar series-Society for Experimental Biology.

Manuhara, Y. S. W., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W., & Yachya, A. (2015). Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of Talinum paniculatum Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1027-1032.

Morgan, J., Barney, C., Penn, A., & Shanks, J. (2000). Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of Catharanthus roseus hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(3), 262-265.

Muranaka, T., Ohkawa, H., & Yamada, Y. (1992). Scopolamine release into media by Duboisia leichhardtii hairy root clones. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 554-559.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Oksman-Caldentey, K. M., Sevón, N., Vanhala, L., & Hiltunen, R. (1994). Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of Hyoscyamus muticus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(2), 263-272.

Pariz, A. P., Farsi, M., Nematzadeh, G. A., & Mirshamsi, A. (2015). Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L. *Acta Agriculturae Slovenica*, 103(2), 299-305.

Pavlov, A., Georgiev, V., & Ilieva, M. (2005). Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. *Process Biochemistry*, 40(5), 1531-1533.

Payne, J., Hamill, J., Robins, R., & Rhodes, M. (1987). Production of hyoscyamine by 'hairy root'cultures of Datura stramonium. *Planta Medica*, 53(5), 474-478.

Praveen, N., & Murthy, H. N. (2013). Withanolide A production from *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements and nitrogen source in the medium. *Acta Physiol Plant*, 35(3), 811-816.

Shahbazi, E., & Riahi Madvar, A. (2014). Forskolin production and gene expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in treated (*Coleus forskohlii*) plant with Cu. *Plant Productions*, 6(2), 45-56. [In Farsi]

Shinde, A. N., Malpathak, N., & Fulzele, D. P. (2010). Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Natural Medicines*, 64(3), 346-353.

Siahmansour, S., Ismaili , A., & Nazarian Firouzabadi, F. (2018). Effect of different elicitor treatments on hairy root of medicinal plant poppies (*Papaver somniferum* L.). *Plant Productions*, 41(1), 29-42. [In Farsi]

Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3), 178-186.

Tabatabaei, S., Fatemi, L., & Fallahi, E. (2006). Effect of ammonium: Nitrate ratio on yield, calcium concentration, and photosynthesis rate in strawberry. *Journal of Plant Nutrition*, 29(7), 1273-1285.

Tabatabaei, S., Yusefi, M., & Hajiloo, J. (2008). Effects of shading and NO_3: NH_4 ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. *Scientia Horticulturae*, 116(3), 264-272.

Tempe, J., & Casse-Delbart, F. (1989). Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. In: Schell j, Vasil IK (EDS) Cell culture and somatic cell genetics of plants: the molecular biology of nuclear genes, vol 6. Academic Press,San Diego, Califonia, pp25-49.

Toivonen, L., Laakso, S., & Rosenqvist, H. (1992). The effect of temperature on hairy root cultures of Catharanthus roseus: Growth, indole alkaloid accumulation and membrane lipid composition. *Plant Cell Reports*, 11(8),395-399.

Toivonen, L., Ojala, M., & Kauppinen, V. (1991). Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of Catharanthus roseus. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(7), 673-680.

Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., & Oksman-Caldentey, K. M. (1998). Effect of growth regulators on transformed root cultures of Hyoscyamus muticus. *Journal of Plant Physiology*, 153(3), 475-481.

Yu, S., Kwok, K. H., & Doran, P. M. (1996). Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by Solanum aviculare hairy roots. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), 238-243.

Zhonghua, T., Yanju, L., Xiaorui, G., & Yuangang, Z. (2011). The combined effects of salinity and nitrogen forms on Catharanthus roseus: The role of internal ammonium and free amino acids during salt stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 135-144.

Zhu, Z. B., Yu, M. M., Chen, Y. H., Guo, Q.s., Zhang, L. X., Shi, H. Z., & Liu, L. (2014). Effects of ammonium to nitrate ratio on growth, nitrogen metabolism, photosynthetic efficiency and bioactive phytochemical production of *Prunella vulgaris*. *Pharmaceutical Bbiology*, 52(12),1518-1525.