

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 Khademi¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2*}, Ahmad Ismaili³

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

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 *rolC* 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

تأثیر فسفر و نیتروژن بر تولید ریشه‌های موین در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) به‌عنوان یک گیاه مدلمیترا 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 پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۴

چکیده

تولید ریشه موین به کمک *Agrobacterium rhizogenes* یکی از مهم‌ترین روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نو ترکیب است. یکی از چالش‌های مهم ریشه موین، تولید کم زیست‌توده است. به منظور بهینه‌سازی محیط کشت ریشه موین در گیاه توتون، تأثیر فاکتور نیتروژن با نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم (NO_3/NH_4) در سه غلظت $^{20}/^{19}$ ، $^{51}/^{51}$ و $^{30}/^{51}$ میلی‌مولار، میزان پتاسیم دی‌هیدروژن 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 پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تأیید شد. تجزیه واریانس داده‌های میزان وزن خشک و تر ریشه‌های موین 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 دی‌هیدروژن 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 ($^{51}/^{51}$ میلی‌مولار) از نسبت نیترات به آمونیوم و ۶ میلی‌مولار پتاسیم دی‌هیدروژن 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 موین این مطالعه می‌توان برای افزایش زیست‌توده برای تولید ترکیبات دارویی و صنعتی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آگروباکتریوم رایزوزنز، ریشه موین، زیست‌توده

مقدمه

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 موین (Hairy

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

نسبت پرداختند که نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که نسبت نیترات به آمونیوم و فسفر برای افزایش زیست توده 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;). با هدف بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه موین در گیاه توتون برای افزایش میزان زیست توده 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 این رو در این تحقیق، اثر نسبت نیترات به آمونیوم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات و نوع محیط کشت (جامد و مایع) بر میزان تولید زیست توده 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 $300 \mu\text{l}$ هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، $6 \mu\text{l}$ تریتون X100 و $700 \mu\text{l}$ آب مقطر استریل) ضدعفونی شدند و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها به صورت فاصله‌دار بر روی محیط کشت MS معمولی ($\text{pH} = 5/8$) و در شرایط نوری 1000 لوکس با 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی در دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند. جهت القای ریشه موین، از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه ATCC15834 استفاده شد. باکتری رایزوزنز در محیط کشت (Lauria-Bertani) مایع حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر از آنتی بیوتیک ریفاامپسین در دمای 28 سانتی‌گراد بر روی شیکر (مدل JTSL20) با سرعت 120 دور در دقیقه به مدت 48 ساعت کشت داده شد. سوسپانسیون باکتری با OD برابر با $0/4$ در دمای 4°C و با 4000 دور در دقیقه (سانتریفیوژ مدل 5110R) رسوب داده شد و رسوب باکتری در محیط MS $1/2$ 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

roots) حاصل از تلقیح سلول‌های گیاهی با آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) از قابلیت بالایی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌های ثانویه برخوردار است (Borisjuk et al., 1999). کشت ریشه موین به علت رشد سریع، کوتاه شدن زمان، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی از مزیت‌های بالایی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌های ثانویه ارزشمند برخوردار است (Giri and Narasu, 2000). به علاوه، ریشه‌های موین یک سیستم ارزشمند برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان محسوب می‌شود. تولید و افزایش زیست توده ی ریشه‌های موین می‌تواند در نهایت به تولید بیشتر پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌هایی منجر شود که از طریق این ریشه‌ها تولید می‌شوند. برای افزایش زیست توده توسط ریشه‌های موین، 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, 2018; Madvar, 2014; Siahmansour et al., 2018). یکی از فاکتورهای تأثیرگذار در تولید زیست توده در ریشه‌های موین، نوع منبع نیتروژن در محیط کشت برای تولید بیشتر زیست توده 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 موین است (Pariz et al., 2015). در همین راستا مطالعات متعددی روی گونه‌های گیاهی مختلف و به بررسی بهینه‌سازی این

(جدول ۱). پس از گذشت یک ماه ریشه‌ها از محیط کشت خارج شدند و میزان وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌ها با آب مقطر 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 اندازه‌گیری شده به روش دانکن انجام پذیرفت.

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 *rolC* و آغازگرهای اختصاصی ژن *VirG* روی DNA ژنومی به‌عنوان الگو انجام گردید (جدول ۲).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز 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 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 PCR BIO-RAD) انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و به وسیله دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

فواصل یک سانتی‌متری برش داده شدند، سپس به درون مایع تلقیح حاوی اگروباکتریوم رایزوزنز 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 24 ± 2 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 جدا شده و به محیط کشت MS شامل نسبت‌های مختلف نترات به آمونیوم ($20/19$ ، $4/5$ و $3/5$ mM) که از نترات پتاسیم به‌عنوان منبع تأمین‌کننده NO_3 ، آمونیوم سولفات $(NH_4)_2SO_4$ به‌عنوان منبع تأمین آمونیوم (NH_4) و از میزان پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۳، ۶ و ۱۲ mM) برای تأمین فسفر استفاده شد. MS حاوی ترکیبات ذکر شده 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 با ۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار با همدیگر مقایسه شدند

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

5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 3mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₁ b ₁ c ₁	19/20 mM NO_3/NH_4^* 3 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₂ b ₁ c ₁	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 3 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₃ b ₁ c ₁
5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 3mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₁ b ₁ c ₂	19/20 mM NO_3/NH_4^* 3 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₂ b ₁ c ₂	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 3 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₃ b ₁ c ₂
5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 6mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₁ b ₂ c ₁	19/20 mM NO_3/NH_4^* 6 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₂ b ₂ c ₁	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 6 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₃ b ₂ c ₁
5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 6mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₁ b ₂ c ₂	19/20 mM NO_3/NH_4^* 6 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₂ b ₂ c ₂	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 6 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₃ b ₂ c ₂
5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₁ b ₃ c ₁	19/20 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₂ b ₃ c ₁	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ liquid cultuer =a ₃ b ₃ c ₁
5.1/5.1 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₁ b ₃ c ₂	19/20 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₂ b ₃ c ₂	30/5.1 mM NO_3/NH_4^* 12 mM $KH_2PO_4^*$ solid cultuer =a ₃ b ₃ c ₂

Table 2. The sequence of primers used in this study

Primer	Sequence(5'-3')	Amplification fragment length (bp)	Referenece
<i>rolC</i> -F	CTCCTGACATCAAAAACCTCGTC	626	Jalilian et al., 2015
<i>rolC</i> -R	TGCTTCGAGTTATGGGTACA	626	
<i>VirG</i> -F	CCGCGGTCAGCCGCAATTCT	819	Kortstee et al., 2011
<i>VirG</i> -R	CCTGCACGTCCGCGTCAAAGAAATA	819	

نتایج و بحث

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

تثیت ریشه‌های موین

داده‌های حاصل از وزن تر و خشک ریشه‌های موین 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 ($P \leq 0.05$) اثر معنی‌داری روی وزن تر و خشک ریشه‌های موین داشتند.

مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل سه گانه نسبت نیترات به آمونیوم، میزان پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و نوع محیط کشت (مایع و جامد) به کمک آزمون دانکن در سطح ۵ درصد به ترتیب 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 دی‌هیدروژن فسفات و همچنین در محیط مایع حاوی میزان بالای از این نسبت (نیترات به آمونیوم) به‌دست آمد. همچنین، کمترین میزان وزن تر و خشک در محیط کشت‌های با میزان کمتری (۵/۱/۵۱ mM) از نسبت

نیترات به آمونیوم و پتاسیم دی‌هیدروژن 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 موین و تولید متابولیت‌های ارزشمند در گیاهان، یک هدف مهم در کشاورزی مولکولی است. مزایای بسیاری برای تولید پروتئین‌ها در ریشه‌های موین 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 موین 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 موین 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 موین داشت (Shinde et al., 2010).

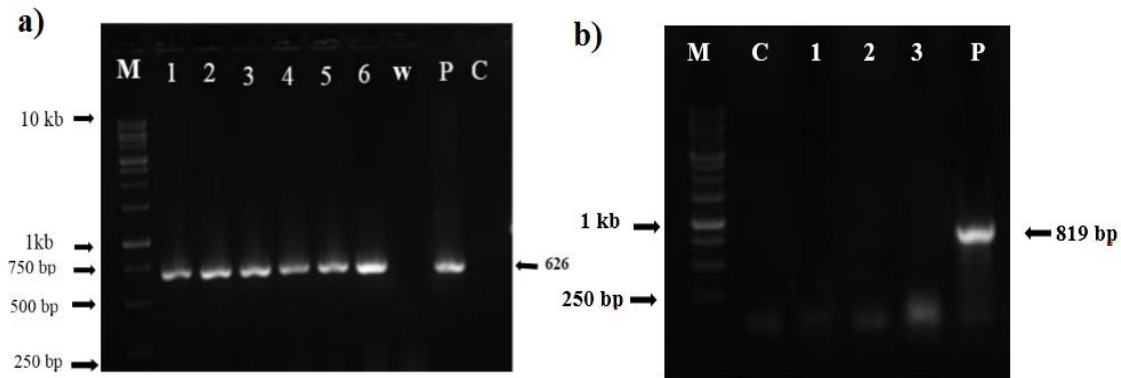


Figure 1. a) PCR analysis for transgenic hairy roots amplified using gene *rolC* primers
b) Electrophoresis of PCR products of transgenic hairy roots by specific *virG* primers
using *virG*-specific primers. M: 1 Kb DNA Lader, c: Negative control (water),
p: Positive control (Ri plasmid of *A.rhizogenes*), 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 ₂ PO ₄	2	0.771**	0.010**
NO ₃ /NH ₄ ratio× KH ₂ PO ₄	4	0.159**	0.006**
Liquid and solid cultuer	1	2.273**	0.188**
NO ₃ /NH ₄ ratio× liquid and solid culture	2	0.667**	0.041**
KH ₂ PO ₄ × liquid and solid culture	2	0.016 ^{ns}	0.015**
NO ₃ /NH ₄ × KH ₂ PO 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.

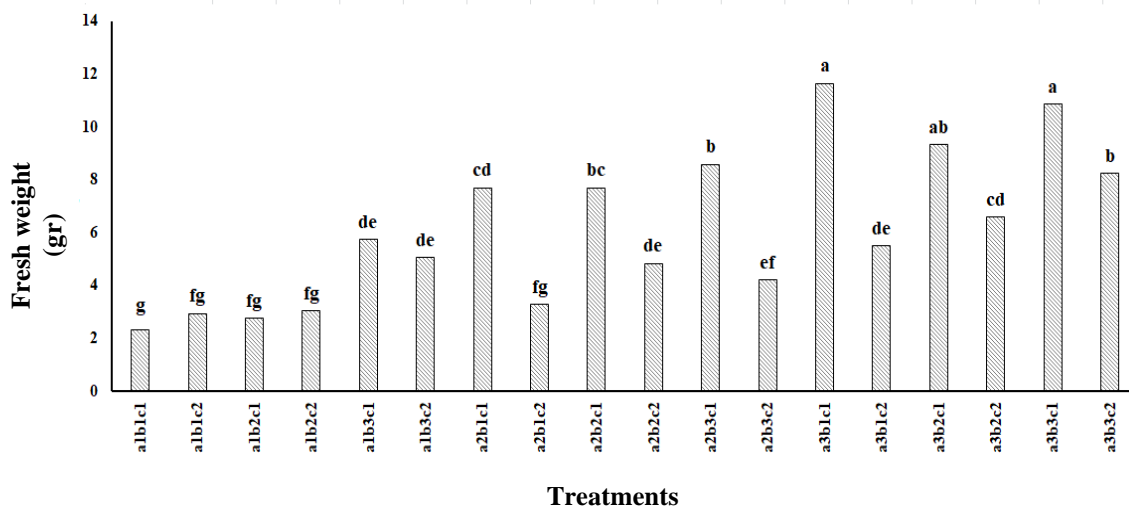


Figure 2. Mean comparison of interaction effect of NO₃/NO₄, KH₂PO₄ and type of culture media on hairy roots fresh weight, using Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

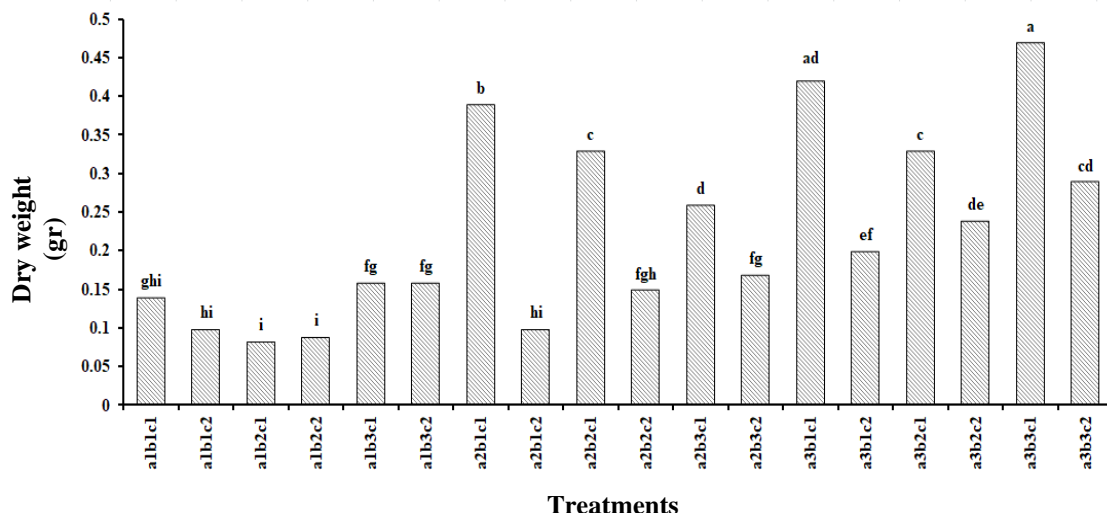


Figure 3. Mean comparison of interaction effect of NO_3/NO_4 , KH_2PO_4 and type of culture media on hairy root dry weight, using Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

آمونیم در جهت تحریک و تثبیت ریشه‌های موین حاکی از این بود که محیط کشتی با میزان ۶ برابر از نسبت نیترات به آمونیم تأثیر ویژه‌ای در تحریک ریشه موین در این گیاه داشت و میزان حداکثر وزن تر و خشک بعد از یک ماه (به ترتیب با ۱۱/۶۶ و ۰/۴۷ گرم) به دست آمد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نسبت نیترات به آمونیم نقش بسزایی در تحریک ریشه موین و فراوانی آن‌ها دارد و کاهش این نسبت با وجود سایر فاکتورها باعث کاهش میزان زیست توده (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 آمونیم (۱/۵ و ۳/۵ گرم بر لیتر) بر میزان زیست توده در گیاه خرفه مطابقت داشت. همچنین در مطالعه‌ی دیگری، منابع مختلفی از نیتروژن به صورت آمونیم، نیترات، گلوتامین یا گلیسین را به محیط کشت MS چه به صورت 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 زیست توده می‌شود. در مجموع گلوتامین و نیترات مهم‌ترین منبع تولید نیتروژن معرفی شدند. در این مطالعه همچنین ذکر شده است که آمونیم به تنهایی نمی‌تواند یک منبع کافی برای رشد سلول گیاهی باشد (Holland et al., 2010).

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

منبع نیتروژن به عنوان یکی از فاکتورهای کلیدی برای تولید زیست توده 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 ۲ درصد 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 موین گیاه توتون به بررسی فاکتورهای کلیدی در جهت افزایش زیست توده پرداخته شد. در همین راستا، نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیم در محیط کشت MS برای تأمین میزان نیتروژن مورد نیاز ریشه‌های موین تغییر پیدا کرد. نتایج حاصل از بررسی در نسبت‌های مختلف نیترات به

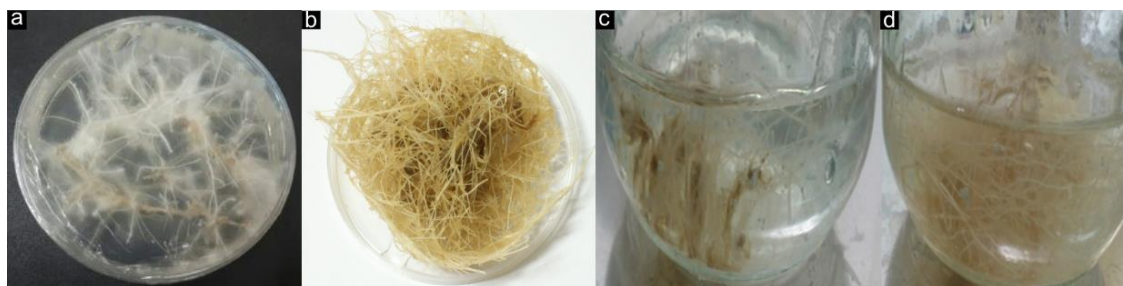


Figure 4. Production of hairy root in tobacco plant. (a) Extension of transformed roots in MS solid media. (b) Rapidly growing transformed roots in MS liquid medium with high levels of nitrogen and phosphorus (C-D) Production of hairy root in MS liquid media with minimum and maximum amount of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ and KH_2PO_4 , respectively

فسفر از جمله عناصر پرمصرفی است که تأثیر مثبتی بر رشد ریشه‌های موئین دارد. در مطالعات مختلف برای به‌دست آوردن رشد بهینه ریشه موئین، 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 موئین 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 به‌دست آمد 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 موئین گیاه چغندر قند (*beta vulgaris*) با میزان پایین فسفات محیط مرتبط است (Pavlov et al., 2005). در مطالعه حاضر، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۳، ۶ و ۱۲ mM) به‌عنوان منبع فسفر برای بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین 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 موئین نسبت به شاهد مشاهده شده و با کم کردن غلظت این مواد تعداد ریشه‌ها کاهش یافت. با مقایسه داده‌های این مطالعه با سایر تحقیقات این‌گونه استنباط می‌شود که

در پژوهشی Muranaka et al. (1992) گزارش کردند که غلظت بالای نیترات (NO_3^-) در KNO_3 موجب اثرات سمی در محیط کشت ریشه‌های موئین 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 ($30.5.1 \text{ mM NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) مشاهده نشد. نسبت نیترات به آمونیوم باعث تغییر در مورفولوژی ریشه‌های موئین، با افزایش تولید ریشه و منشعب شدن آن‌ها می‌شود. قابل ذکر است که پاسخ گیاهان مختلف به میزان نسبت نیترات و آمونیوم بر حسب 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 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 موین یک فرصت جدید و یک چشم‌انداز خوب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه است. ریشه‌های موین 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 موین برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب 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 موین، بهینه‌سازی این ترکیبات مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییر در هر یک از این ترکیبات می‌تواند در رشد ریشه‌های موین، افزایش زیست‌توده و بازده تولید ترکیبات و پروتئین‌های نو ترکیب پس از بیان آن‌ها از طریق کشت ریشه‌های موین 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 $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ 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* A4. *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., Helderma, 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 NO₃: NH₄ 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, California, 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.

