تأثیر محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بر رشد ریشه موین در گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

شیوا سیاه منصور[۱]، احمد اسماعیلی[۲]* و فرهاد نظریان فیروزآبادی[۳]

۱- دانشجوی کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (ismaili.a@lu.ac.ir)

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.)، از مهم‌ترین گیاهان در صنعت دارویی جهان و منشأ تولید آلکالوئیدها می‌باشد. یکی از تکنیک‌های تولید آلکالوئید، استفاده از کشت ریشه موین می‌باشد؛ امّا در بیشتر مواقع تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش آن‌ها، نیاز به تحریک تولید با روش‌های مختلفی از جمله استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی است. در این پژوهش، به منظور افزایش زیست‌توده ریشه‌های موین، اثر ٤ نوع محرک (سالیسیلیک اسید، نیترات نقره، سولفات مس و عصاره مخمّر) به‌صورت آزمایش‌های جداگانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. جهت انجام این آزمایش‌ها، ریشه‌های موین اولیه تولید شده در نهایت درون ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت ½MS اضافه شدند و هر ارلن به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. تأیید تراریختگی ریشه‌های موین با تکثیر اختصاصی ژن‌های *rol*C، انجام شد و باندی با اندازه‌ای مطابق انتظار، روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از محرک عصاره مخمّر بیش‌ترین تأثیر را بر صفات مورفولوژیکی داشت. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که محرک‌های زیستی، نقش مؤثرتری نسبت به تیمارهای غیرزیستی دارند و غلظت‌های بالای محرک‌ها، اعم از زیستی و غیرزیستی، بر زیست‌توده ریشه‌های موین، تأثیر منفی دارند.

کلید واژه‌ها: اگروباکتریوم رایزوژنز، تراریختگی، زیست‌توده، زیستی، غیرزیستی

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه[۱]، ترکیبات آلی هستند که برخلاف متابولیت‌های اولیه به شکل مستقیم در رشد و نمو و تولیدمثل یک موجود زنده دخیل نیستند. فقدان متابولیت‌های ثانویه، باعث مرگ فوری موجود نمی‌شود، بلکه در طولانی مدت می‌تواند سبب اختلال در بقاء، باروری و یا تغییرات ظاهری شده و گاهی نیز تغییری ایجاد نمی‌کند. متابولیت‌های ثانویه گیاهان در آغاز زندگی بشر، برای درمان عفونت‌ها و بیماری‌ها استفاده شده‌اند (Van Wyk and Wink, 2004).

گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) یکی از گیاهان دارویی مهمی است که قابلیت بیوسنتز بیش از ۸ نوع آلکالوئید مختلف از کلاس تتراهیدروبنزیل ایزوکوینولین‌ها[۲] را دارد (Weid *et al.*, 2004). روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از محرک‌ها[۳]، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موین[۴] و مهندسی متابولیت می‌باشد (Tepfer, 1984). طی سال‌های اخیر، کشت

1- Secondary metabolites

2- Tetrahydro benzyl isoquinoline alkaloids
3- Elicitor
4- Hairy roots

© 2018 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.

ریشه‌های مویین، به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش در تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی، در مقیاس تجاری صورت گرفته است (Yang *et al.*, 2011). شاید مهم‌ترین راهکار برای افزایش و بهبود میزان متابولیت‌ها در کشت سلول گیاهی، استفاده از محرک‌ها باشد. یک محرک را می‌توان ترکیبی دانست که سبب افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز تولید یک متابولیت می‌گردد. محرک‌ها، شامل هورمون‌های طبیعی، مواد غذایی و ترکیبات شیمیایی با منشاء قارچ یا باکتری هستند. محرک‌ها، پیام‌های رهاشده‌ای برای تولید متابولیت‌های ثانویه بوده و مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در مواجهه با تنش فعال می‌شوند. محرک‌های زیستی و غیرزیستی مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شوند. محرک‌های مختلف ممکن است مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را مورد هدف قرار دهند. از طرفی می‌توان با افزودن برخی محرک‌های خارجی ازجمله محرک‌ها، مقدار آلکالوئید را بالا برد. از محرک‌های زنده و غیرزنده به منظور تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در زمان کوتاه و هم‌چنین رسیدن به بیش‌ترین زیست‌توده[1] ریشه مویین و افزایش مقدار متابولیت در ریشه مویین استفاده می‌شود (Rao and Ravishankar, 2002).

با توجه به مباحث گفته شده، لازم است پژوهش‌های گسترده‌ای جهت افزایش زیست‌توده در ریشه‌های مویین این گیاه صورت پذیرد، بنابراین در این پژوهش، استفاده از تیمارهای مختلف محرکی به جهت تأثیر بر افزایش زیست‌توده ریشه مویین بررسی شد. قابل ذکر است تاکنون پژوهشی در مورد تأثیر تیمارهای مختلف محرکی بر ریشه مویین گیاه دارویی خشخاش صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. در این پژوهش تأثیر تیمارهای مختلف محرکی بر ریشه مویین گیاه دارویی خشخاش به صورت آزمایش‌های مجزا مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه به تشریح دستورالعمل تولید و کشت ریشه مویین در این گیاه پرداخته شده است و سپس نحوه اعمال تیمارهای محرکی بیان شده است.

روش تولید ریشه مویین

ابتدا بذرهای گیاه خشخاش (*P. somniferum*) در زیر لامینار[2] به مدت ۶۰-۴۵ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد، ضدعفونی سطحی شد و سپس ۴-۳ بار توسط آب مقطر گندزدایی شده، شست و شو گردید. در مرحله بعد، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر هیپوکلرید سدیم (وایتکس یا آب‌ژاول[3])، اضافه گردید. در نهایت، بذور ۱۰-۸ مرتبه با آب مقطر گندزدایی شده شست و شو داده شدند. سپس به‌طور میانگین، ۳۰ عدد بذر ضدعفونی شده، در هر شیشه حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS[4] (شامل ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار، ۴/۴ گرم بر لیتر MS و با pH = ۵/۷-۵/۸) کاشته شد. توجه شود که آگار بعد از تنظیم pH اضافه گردید. بعد از کشت، شیشه‌ها به مدت ۴۸ ساعت به منظور تحریک جوانه‌زنی، در یخچال ۴°C+ گذاشته و سپس به اتاق کشت بافت، با دمای ۲۵±۲ °C+ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، منتقل شدند.

برای کشت و تکثیر اگروباکتریوم رایزوژنسیس[5] سویه ATCC15834، از (محیط کشت LB[6] با pH حدود ۷/۳-۷/۲) استفاده شد و آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین جهت جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها، به آن اضافه گردید. این کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C+ و در شرایط تاریکی درون شیکر قرار داده شد تا به OD_{600} = ۱[7] جهت جهت تلقیح ریزنمونه‌ها برسد.

از گیاهچه‌های گندزدایی شده تولید شده برای تهیه

1- Biomass

2- Laminar air flow
3- Bleach
4- Murashige and Skoog
5- *Agrobacterium rhizogenesis*
6- Luria–Bertani
7- Optical Density

ریزنمونه و تلقیح آن‌ها با اگروباکتری استفاده گردید. ریزنمونه‌های اندام هوایی[1] (شامل لپه‌ها و محور زیرلپه) پس از جدا شدن از گیاهچه‌های ۱۲-۱۰ روزه در شرایط کاملاً گندزدایی شده، در زیر لامینار، توسط تیغ اسکالپل زخمی شدند. سپس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در سوسپانسیون تلقیح اگروباکتریوم سویه ATCC15834، غوطه‌ور شدند. بعد از تلقیح، محلول باکتری توسط سمپلر خارج گردید و ریزنمونه‌ها به روی کاغذ صافی[2] گندزدایی شده انتقال داده و آبگیری شدند. بعد از آبگیری شدن، ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش ۱۰ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت ½MS و شرایط تاریکی جهت دوره هم‌کشتی[3] انتقال یافتند. ۴۸ ساعت بعد از زمان تلقیح، به منظور حذف اگروباکتریوم گیاهچه‌های تلقیح داده شده با باکتری توسط آب مقطر گندزدایی شده، شست و شو داده شدند. سپس روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار گرفتند تا آبگیری سطحی صورت گیرد. بعد از آبگیری، ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت ½MS (حاوی ۱۵ گرم بر لیتر ساکاروز، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۶ گرم در لیتر آگار) انتقال داده شدند؛ در نهایت در اتاقک کشت بافت قرار گرفتند تا ریشه مویین تولید شود. سپس از ریشه‌های مویین تولید شده به‌عنوان ریزنمونه جهت انجام آزمایش‌های محرکی در ارلن استفاده گردید.

بررسی تراریختگی ریشه‌های مویین

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود روی T-DNA این باکتری که مهم‌ترین آن‌ها ژن‌های *rol*B، *rol*A و *rol*C می‌باشند، بررسی کرد. تأیید ترایختگی ریشه‌های مویین، از طریق تکنیک PCR و پس از اطمینان از حذف باکتری در ریشه‌ها انجام شد. بدین منظور ابتدا استخراج DNA از ریشه‌های مویین و ریشه‌های طبیعی گیاه (به‌عنوان شاهد)، با استفاده از بافر استخراج CTAB انجام گرفت (Richards *et al.*, 1997). به منظور تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ri در ریشه‌ها، از آغازگرهای ژن *rol*C، با توالی آغازگر رو به جلو:

(5′CTCCTGACATCAAACTCGTC3′)

و آغازگر برگشتی:

(3′TGCTTCGAGTTATGGGTACA5′)

برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید (Furner *et al.*, 1986). در این تحقیق کنترل منفی ریشه‌های طبیعی گیاه خشخاش و کنترل مثبت ناقل Ri از اگروباکتریوم رایزوژنز بود. در این مطالعه جهت بررسی محصول PCR از الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد، استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، به‌وسیله دستگاه پرتوتاب ماوراءبنفش[4]، تصویربرداری صورت پذیرفت.

آماده‌سازی محرک‌ها

از سالسیلیک اسید محلول یک مولار تهیه گردید و زیر هود، با فیلتر ۰/۲ ضدعفونی شد. سپس غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار در لیتر، از این محرک استفاده شد. از نیترات نقره ($AgNo_3$) محلول یک مولار تهیه شد. جهت حل شدن این ماده، به مدت ۱۵ دقیقه روی هات‌پلیت قرار داده شد و در نهایت، نیترات نقره کامل در آب حل شد. سپس محلول حاصل، زیر لامینار با فیلتر ۰/۲ گندزدایی شد و غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در لیتر، از این محرک استفاده شد. از سولفات مس یا کات‌کبود ($CuSo_4$) ۵ آبه[5] استفاده گردید. غلظت‌های مورد استفاده به‌عنوان محرک در این آزمایش شامل: صفر (شاهد)، ۴ میکرومولار، ۸ میکرومولار و ۱۶ میکرومولار بود. برای این منظور، از سولفات‌مس محلول یک مولار تهیه شد. سپس این محلول نیز، زیر لامینار توسط فیلتر ۰/۲ گندزدایی شد.

1- Excised shoot
2- Filter paper
3- Filter paper
4- UV transsluminator
5- Pentahydrate

از عصاره مخمّر[1]، به‌عنوان محرک زیستی استفاده شد و غلظت‌های انتخاب شده از این ماده شامل: صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با توجه به این‌که حجم نهایی محیط کشت در کل این آزمایش‌ها ۳۰ میلی‌لیتر بود، بنابراین، غلظت‌های یاد شده طبق تناسب، در ۳۰ میلی‌لیتر محاسبه و بر روی ریشه مویین‌ها اعمال گردید.

نحوه اعمال محرک

برای اعمال محرک‌ها (سالیسیلیک اسید، نیترات نقره و سولفات مس)، بعد از گندزدایی کردن محیط کشت و اضافه کردن سفوتاکسیم، به میزان یکسانی از ریشه‌های مویین تولید شده در پتری‌دیش‌ها (۰/۲ گرم) درون همه ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت ½MS تازه، ریخته شد. سپس، غلظت‌های یاد شده از هر کدام از محرک‌ها، طبق تناسب در حجم ۳۰ میلی‌لیتر محاسبه شد و توسط سمپلر، بر ریشه‌های مویین اضافه گردید و دوباره درب آن‌ها توسط فویل گندزدایی شده، کاملاً بسته شد؛ امّا در عصاره مخمّر قبل از گندزدایی کردن محیط کشت، غلظت‌های مذکور اضافه گردید و سپس pH محیط تنظیم گردید و بعد گندزدایی شد. قبل از اعمال محرک، ریشه‌های مویین درون هر ارلن وزن گردید و به میزان یکسانی از ریشه مویین‌ها درون هر ارلن قرار داده شد تا بعد از مدت معین از اعمال محرک، تغییرات آن‌ها بررسی شود. هم‌چنین مجموع طول ریشه‌های مویین اندازه‌گیری و یادداشت گردید تا بعد از اعمال محرک نیز تغییرات مجموع طول ریشه مویین اندازه‌گیری شود. پس از اعمال تیمارهای محرکی در محیط کشت حاوی ریشه مویین، روی شیکر و با دور ۱۰۰ rpm، به مدت ۷۲ ساعت درون اتاقک کشت بافت، قرار داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، ترازو به زیر هود انتقال و سپس ریشه مویین‌ها از ارلن خارج و روی کاغذ صافی قرارداده شدند، تا آبگیری سطحی شوند. سپس، روی ترازو انتقال و وزن تر آن‌ها یادداشت‌برداری شد. هم‌چنین، مجموع طول ریشه مویین‌ها، توسط خط‌کش، اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، ریشه‌های مویین به مدّت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰-۴۵°C+ درون آون گذاشته و خشک گردید (Shi *et al.*, 2007).

آنالیزهای آماری

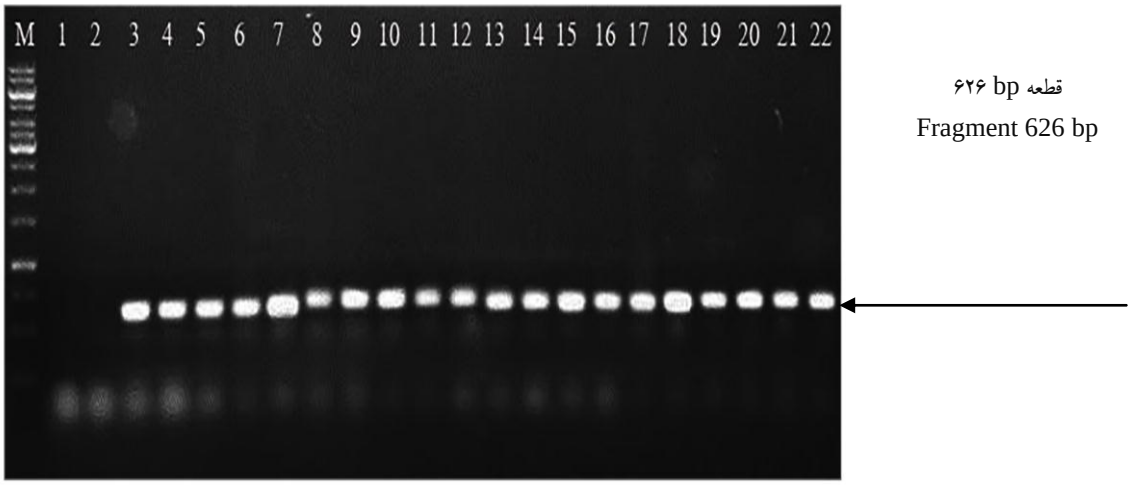
به منظور آنالیز داده‌های یادداشت‌برداری شده برای صفات مورد اندازه‌گیری، از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده گردید. جهت این امر، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون‌های مقایسه میانگین چند دامنه‌ای LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد. نمودارها با ذکر خطای استاندارد و گروه‌بندی آزمون مقایسه میانگین، با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 رسم شدند.

نتایج و بحث

اثبات تراریختی ریشه‌های مویین

به منظور بررسی تراریختگی ریشه‌های مویین در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از آغازگرهای ویژه *rol*C، استفاده گردید و مطابق انتظار، قطعاتی به طول ۶۲۶bp تکثیر گردید. این نشان‌دهنده تراریخت بودن ریشه‌های مویین است. در حالی‌که این قطعات بر روی ژل الکتروفورز برای ریشه‌های غیر تراریخت (ریشه‌های طبیعی)، ظاهر نشد (شکل ۱). اگروباکتریوم رایزوژنز عامل بیماری ریشه‌های مویین می‌باشد. پلاسمید بزرگ موجود در آن به نام Ri، با اتصال این باکتری‌ها به نواحی زخمی گیاهان میزبان قسمت بیماری‌زای خود که T-DNA نام دارد و در برگیرنده ژن‌های C، B و *rol*A است را به ژنوم یاخته‌های میزبان، منتقل می‌نمایند و باعث افزایش مواد مؤثر دارویی می‌شود و این ریشه‌ها، به‌صورت ژنتیکی تغییر کرده و قابلیت بروز صفت ریشه‌ای را به نسل بعد دارا هستند (Alderete *et al.*, 2009؛ Tzfira and Citovsky, 2006).

1- Yeast extract



شکل ۱- نتایج بررسی تراریختگی ریشه‌های مویین توسط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C در خشخاش. M: DNA Lader 1000 bp، ۱ و ۲: کنترل منفی (ریشه‌های طبیعی و آب)، ۳: کنترل مثبت (پلاسمید Ri از *A. Rhizogenes*)، ٤ تا ۲۲: کلنی‌های ریشه‌های مویین تراریخت

Figure 1. Results of PCR reactions in transgenic hairy roots of poppy using specific primers of *rol*C gene. M: DNA Lader 1000 bp, 1-2: negative control (natural roots and water), 3: positive control (Ri plasmid of *A. Rhizogenes*), 4-22: colonies of transgenic hairy root

نتایج تأثیر سالیسیلیک اسید بر ریشه مویین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر سالیسیلیک اسید بر ریشه مویین گیاه خشخاش نشان داد که وزن تر و وزن خشک و مجموع طول ریشه مویین، در سطح احتمال یک درصد، معنی‌دار شده‌اند (جدول ۱). در بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر وزن تر ریشه‌های مویین، مشاهده شد که غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار، بیشترین اختلاف معنی‌دار را با بقیه تیمارها داشته است. بعد از آن، تیمار شاهد که در واقع همان غلظت صفر میلی‌مولار سالیسیلیک اسید می‌باشد، نتیجه بهتری بر افزایش وزن تر ریشه مویین، نسبت به ۲ تیمار دیگر، نشان داد. از طرفی تیمارهای ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌مولار، با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و در واقع افزایش غلظت این محرک از ۰/۰۱ میلی‌مولار به بالا نه تنها مثبت نبود، بلکه تأثیر منفی بر افزایش وزن تر ریشه مویین، داشت، زیرا از تیمار شاهد نیز عملکرد کمتری، نشان دادند (شکل ۲، a). در بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر وزن خشک ریشه مویین نیز دیده شد بین تیمار شاهد و غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی این دو تیمار با ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری اختلاف داشتند (شکل ۲، b). نتایج تأثیر محرک سالیسیلیک اسید بر افزایش مجموع طول ریشه مویین مثبت بود و همانند دو صفت بررسی شده قبلی، غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار از سالیسیلیک اسید، بیشترین اختلاف معنی‌دار را با بقیه تیمارها نشان داد. از طرفی تیمار شاهد، عملکرد بهتری در افزایش مجموع طول ریشه مویین، نسبت به دو تیمار ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌مولار، نشان داد (شکل ۲، c). به‌طورکلی، الیسیته کردن توسط محرک‌ها مانند متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید تأثیر منفی بر تجمع زیست‌توده و منجر به بهره‌وری کلّی کم در کشت درون شیشه‌ای می‌شود. کاهش تجمع زیست‌توده توسط متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، قبلاً در ریشه‌های مویین جینسینگ چینی با نام علمی *Panax ginseng*، ریشه‌های مویین گیاهی از خانواده سولاناسه با نام علمی *Scopolia parviflora* و ریشه‌های مویین جینسینگ سیبری با نام علمی *Eleuterococcus koreanum*، گزارش شده است (Kang *et al.*, 2004؛ Kim *et al.*, 2006؛ Lee *et al.*, 2015).

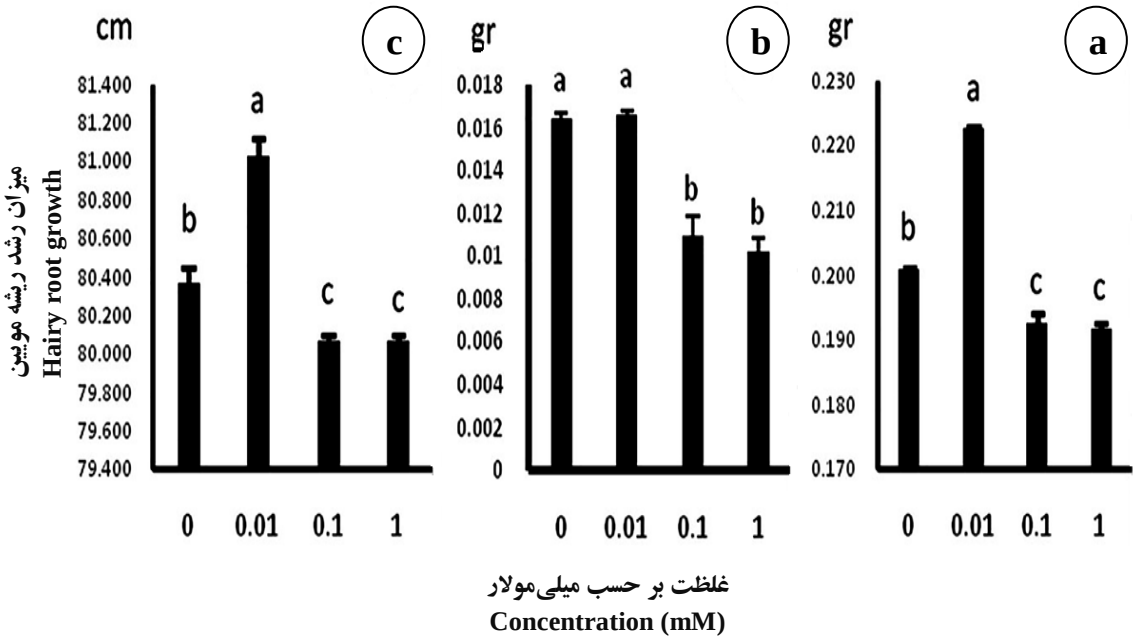
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای محرکی سالیسیلیک اسید بر ریشه مویین

Table 1. Results of analysis of variance for effect of Salicylic acid elicitor treatments on hairy root

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of traits		
		وزن خشک ریشه Dry root weight	وزن تر ریشه Fresh root weight	مجموع طول ریشه مویین Total length of hairy root
تیمار Treatment	3	0.00003551**	0.0006115**	0.6233**
خطا Error	8	0.00000098	0.0000019	0.0133
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		7.33	0.76	0.14

**: Significant at 1%

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۲- تأثیر تیمارهای محرکی سالیسیلیک اسید بر میزان رشد صفات شامل وزن تر (a)، وزن خشک (b) و مجموع طول ریشه مویین (c) در گیاه خشخاش. ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

Figure 2. Effect of salicylic acid elicitor treatments on growth parameters including fresh weight (a) dry weight (b) and total length of hairy roots (c) in poppy plant. Columns represent the average of 3 replicates and treatments with at least one common letter, have no significant differences

در ریشه‌های مویین تراریخت نیز با توجه به این‌که تأثیر غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید باعث کاهش رشد آن‌ها و توقف رشد شد؛ می‌توان بیان کرد که در غلظت بالای این ترکیب، به علت ایجاد تنش و نیز آسیب شدید بافت ریشه موجب ممانعت رشد و کاهش متابولیسم سلول شده است. هم‌چنین گزارش شده است که استفاده از غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید تأثیر منفی بر رشد ریشه‌های مویین *Scopolia parviflora*، دارد. کاربرد خارجی غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید، موجب افزایش رشد ریشه‌های مویین تراریخته گیاهانی مانند

گل‌پریوش (*Cataranthas roseus*)، شده است (Echevarria-Machado *et al.*, 2007). اثر متفاوت غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر رشد ریشه‌های مویین تراریخته، می‌تواند به علت نقش آن در غلظت پایین برای پیام‌رسانی سلولی باشد زیرا سالیسیلیک اسید در غلظت پایین برای پیام‌رسانی سلول سودمند است، اما در غلظت بالا موجب اختلال در رشد می‌شود (Ahmadian *et al.*, 2010). این ترکیبات می‌توانند با القای مسیرهای پیام‌رسانی، باعث فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه شده و در نتیجه باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گردد (Zhao *et al.*, 2004). در تحقیق حاضر نیز مطابق تحقیقات یاد شده، سالیسیلیک اسید در غلظت پایین تأثیر مثبت بر افزایش زیست‌توده نشان داد و در غلظت‌های بالاتر، تأثیر منفی مشاهده گردید. به عبارتی این بررسی‌ها نشان داد که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۰/۰۱ میلی‌مولار به بالا، باعث تأثیر منفی بر وزن تر، وزن خشک و مجموع طول ریشه مویین این گیاه داشته است.

نتایج تأثیر نیترات نقره بر ریشه مویین

نتایج تجزیه واریانس نیترات نقره در جدول (۲) آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد، وزن خشک، تر و مجموع طول ریشه مویین در تیمارهای مختلف، در سطح احتمال یک درصد، با هم اختلاف معنی‌داری دارند. با بررسی تأثیر این محرک بر وزن تر ریشه‌های مویین گیاه خشخاش مشاهده شد، تیمار ۵۰ میکرومولار نیترات نقره، بیش‌ترین اختلاف معنی‌دار را با بقیه تیمارها نشان داد. تیمار ۲۵ میکرومولار از این محرک، بهتر از دو تیمار شاهد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیترات نقره، عمل نمود. تیمار شاهد، عملکرد بهتری نسبت به تیمار نیترات نقره در سطح ۱۰۰ میکرومولار نشان داد. می‌توان گفت نیترات نقره با غلظت ۶ میکرومولار، نه تنها موجب افزایش وزن تر نشد، بلکه تأثیر منفی بر عملکرد افزایش وزن تر ریشه‌های مویین داشت (شکل ۳، a). با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محرک نیترات نقره بر وزن خشک ریشه مویین مشاهده شد که تیمار نیترات نقره با غلظت ۲۵ میکرومولار، بیشترین اختلاف معنی‌دار را نشان داد. هم‌چنین تیمار ۵۰ میکرومولار از این محرک، نسبت به تیمار ۱۰۰ میکرومولار و شاهد، بهتر عمل نمود؛ در صورتی‌که تیمار ۱۰۰ میکرومولار، کاهش معنی‌داری را نسبت به بقیه تیمارها و حتی نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۳، b). در بررسی تأثیر این محرک بر مجموع طول ریشه مویین مشاهده شد نیترات نقره با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار، بیشترین اختلاف معنی‌دار را با بقیه سطوح این محرک داشت. بین دو سطح نیترات نقره با غلظت‌های ۱۰۰ و صفر میکرومولار (تیمار شاهد)، از نظر تغییر مجموع طول ریشه مویین، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳، c).

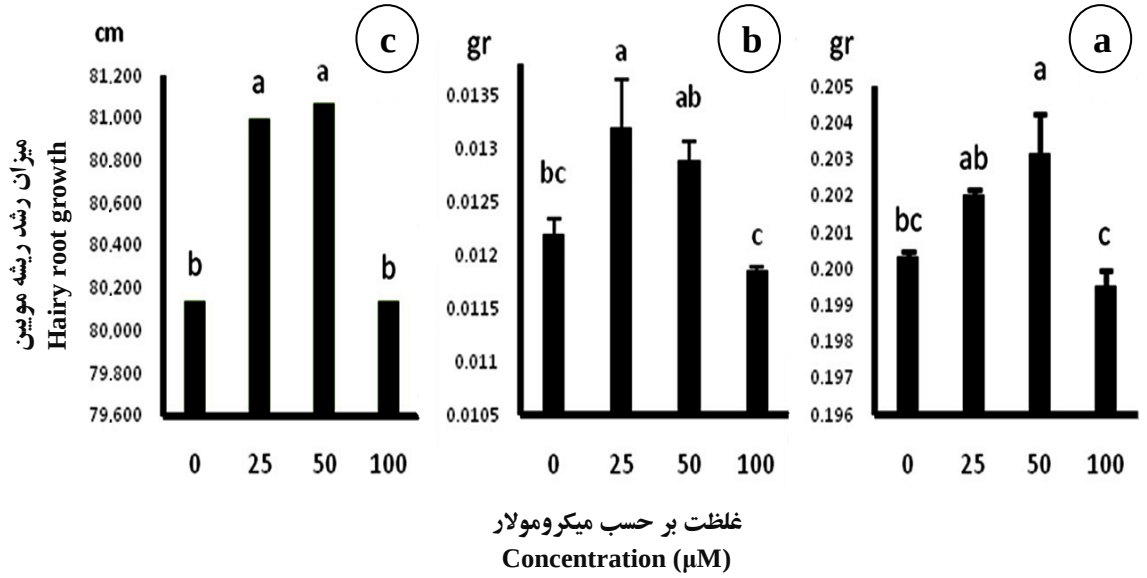
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای محرکی نیترات نقره بر ریشه مویین

Table 2. Analysis of variance for silver nitrate elicitor treatments on hairy root

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of traits		
		وزن خشک ریشه Dry root weight	وزن تر ریشه Fresh root weight	مجموع طول ریشه مویین Total length of hairy root
تیمار Treatment	3	0.0000076**	0.0000081**	0.81222**
خطا Error	8	0.0000006	0.0000011	0.01000
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		3.50	0.38	0.12

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: Significant at 1%



شکل ۳- تأثیر محرکی نیترات نقره بر میزان رشد صفات شامل وزن تر (a)، وزن خشک (b) و مجموع طول ریشه مویین (c) در گیاه خشخاش. ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

Figure 3. Effect of silver nitrate on growth parameters including fresh weight (a) dry weight (b) and hairy root length (c) in poppy plant. Columns represent the average of 3 replicates and treatments with at least one common letter, have no significant differences

به‌طورکلی، نقش تعیین‌کننده ترکیبات نیتروژنه، در افزایش آلکالوئیدها، ناشی از این است که نیتروژن مولکول اصلی در ترکیب اسیدهای آمینه و متابولیت‌های حاصل از آلکالوئیدها، می‌باشد (Facchini, 2001). تحقیق دیگر نیز، وجود ارتباط مستقیم میان مقدار تریگونلین و میزان ترکیبات نیتروژنه محیط کشت را نشان داده است. این امر را می‌توان ناشی از افزایش یون آمونیوم (NH_4^+) دانست (Akbari *et al.*, 2012). Akbari *et al.* (2012) در پژوهشی نشان دادند که افزایش زیست‌توده توسط ریشه‌های مویین، نسبت به ریشه‌های طبیعی، یکی از عوامل افزایش عملکرد تریگونلین می‌باشد. از سوی دیگر، نتایج حاکی از توانایی بیشتر ریشه‌های مویین در استفاده از مقادیر بیشتر نیتروژن و تولید آلکالوئید تریگونلین در مقایسه با ریشه‌های معمولی می‌باشد (Sharp and Doran, 2001). از اثرات نقره (Ag^+) در محرک نیترات نقره می‌توان گفت که فلزات سنگین از طریق تحریک سنتز یک‌سری مولکول‌های سیگنالینگ از قبیل رادیکال‌های آزاد (H_2O_2) و جاسمونات‌ها بر بیان ژن‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان، تأثیر می‌گذارند و محتوی متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند (Zhu and Stefano, 2004). از اثرات این محرک، ایجاد تنش در گیاهان و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد (Savitha *et al.*, 2006). نقش این ترکیب‌ها در بیوسنتز انواع متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها، گلیکوزینولات و فنیل پروپانوئیدها در گونه‌های گیاهی مختلف مشخص شده است (Memelink *et al.*, 2001). در کشت مایع ریشه مویین در گیاه *Saivia miltiorrhiza*، که تحت تیمار با نقره، قرار داشتند، افزایش زیست‌توده مشاهده گردید. به‌طوری‌که در وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین بعد از ۱، ۲، ۶ و ۹ روز تیمار با این محرک، افزایش معنی‌داری گزارش شد (Xing *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد که علت کاهش زیست‌توده در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به علت سمیّت ایجاد شده توسط تجمع فلزات سنگین می‌باشد.

نتایج تأثیرسولفات مس بر ریشه مویین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر محرکی سولفات مس بر ریشه مویین، در جدول (۳)، آورده شده است که بیانگر این است که وزن تر، وزن خشک و مجموع طول ریشه مویین در سطح احتمال یک درصد، هر سه معنی‌دار شدند. پس از انجام آزمون مقایسه میانگین، مشاهده

گردید این محرک، در غلظت ۸ میکرومولار بیشترین اختلاف معنی‌دار را نشان داده است. تیمار ۱۶ میکرومولار از سولفات مس نیز اختلاف معنی‌داری با شاهد، نشان داده است. در حالی‌که غلظت پایین این محرک، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد، نشان نداد (شکل ۴، a)؛ اما با بررسی تأثیر تیمارهای مختلف این محرک بر وزن خشک ریشه مویین گیاه خشخاش، مشاهده شد بین تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۴، b). در بررسی تأثیر تیمارهای مختلف این محرک بر مجموع طول ریشه مویین، مشاهده شد، تیمار ۸ میکرومولار سولفات مس، بیشترین اختلاف معنی‌داری را داشته است. بعد از این تیمار، تیمار ۱۶ میکرومولار، بیشترین تأثیر را بر افزایش مجموع طول ریشه مویین داشته است؛ اما بین تیمار شاهد و ۴ میکرومولار، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و این تیمارها، کم‌ترین تأثیر را بر افزایش مجموع طول ریشه مویین خشخاش داشته‌اند (شکل ۴، c).

مطالعات گذشته نشان دادند که مس در چندین مسیر فیزیولوژیکی، از قبیل ساخت و ثبات کلروفیل و رنگدانه‌های گیاهی و هم‌چنین در عملکرد بسیاری از آنزیم‌های اکسیدکننده که در تنفس نقش دارند، مؤثر است (Bustin and Dorudi, 1998). تیمار این گیاه با غلظت‌های پایین مس، شرایط بهبود رشد را برای گیاه فراهم می‌کند که با افزایش محتوی کلروفیل کارتنوئیدها همراه است در حالی که افزایش غلظت آن در محیط کشت (تا ۸ میکرومولار) سبب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی گیاه شد. در عین حال افزایش بیشتر محرک در محیط کشت، با کاهش بیان ژن‌ها و محتوی کلروفیل و کارتنوئیدها همراه می‌باشد (Shahbazi and Riahi Madvar, 2014). از طرفی، یکی از نتایج تجمع فلزات سنگین در گیاهان، تولید ROSها می‌باشد. به‌عنوان نمونه، افزایش تولید H_2O_2 در تیمار گیاه آرابیدوپسیس با کادمیوم و مس گزارش شده است (Maksymiec and Krupa, 2006). تجمع سریع جاسمونیک اسید تحت تیمار با مس در گونه‌های گیاهی لوبیای قرمز با نام علمی *Phaseolus coccineus* و آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است (Maksymiec *et al.*, 2005). احتمال می‌رود که علت افزایش زیست‌توده در غلظت بالای این محرک بر ریشه مویین گیاه خشخاش، وجود ازت در ساختار آلکالوئید باشد. چون همان‌گونه که قبلاً هم اشاره شد، یکی از تأثیرات مس، تثبیت ازت درگیاهان می‌باشد.

نتایج تأثیرعصاره مخمّر بر ریشه مویین

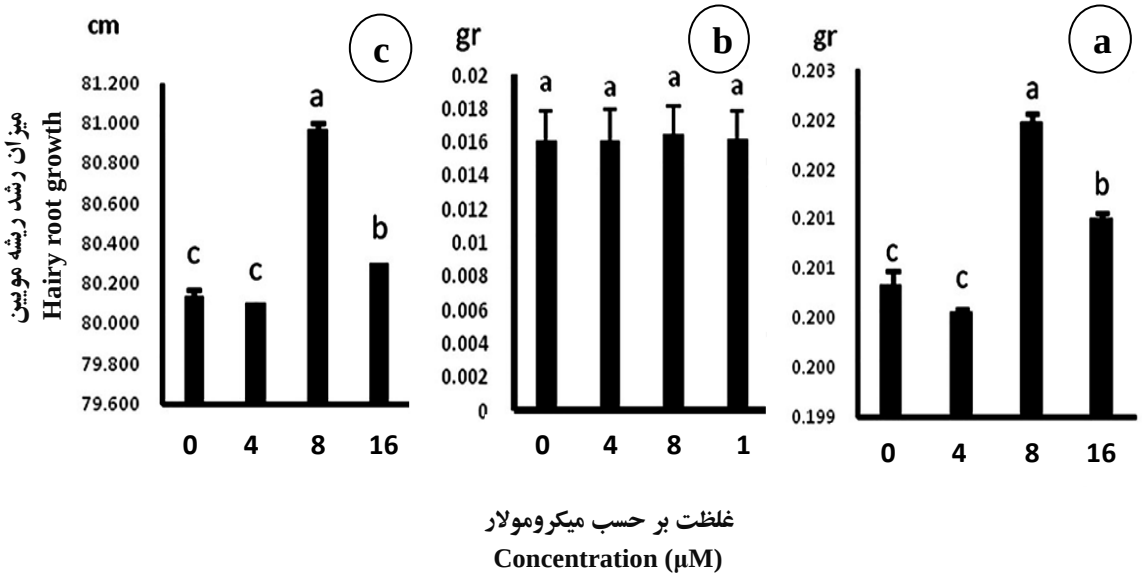
نتایج تجزیه وارایانس این محرک نشان داد که بین تیمارهای مختلف عصاره مخمّر در وزن تر، وزن خشک و مجموع طول ریشه مویین، در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). بررسی تأثیر عصاره مخمّر بر وزن تر ریشه‌های مویین نشان می‌دهد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بهترین نتیجه را بر عملکرد وزن تر ریشه مویین داشته است (شکل ۵، a). با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محرک عصاره مخمّر بر وزن خشک ریشه مویین مشاهده گردید که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره مخمّر، بیشترین اختلاف معنی‌دار را با بقیه تیمارها داشته است. بین شاهد و تیمار ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۵، b). در تأثیر این محرک بر مجموع طول ریشه مویین مشاهده شد تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و شاهد، کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از این محرک داشته‌اند (شکل ۵، c). Rahimi *et al.* (2014) در پژوهشی گزارش دادند که استفاده از عصاره مخمّر به منزله محرک زیستی موجب افزایش زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. در آزمایشی اخیراً به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های بالای عصاره مخمّر، اثر منفی بر وزن تر ریشه‌های مویین در گیاه *Panax ginseng* داشت. این نتایج تأییدی بر نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نیز می‌باشد. در پژوهش کنونی، غلظت‌های پایین این محرک اثر تحریک‌کنندگی داشت و زیست‌توده را افزایش داد در حالی‌که، غلظت‌های بالای این محرک، باعث قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین گردید. احتمالاً علت کاهش زیست‌توده در غلظت‌های بالای این محرک، مرگ سلولی ریشه‌های مویین می‌باشد.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای محرکی سولفات مس بر ریشه مویین

Table 3. Analysis of variance for copper sulfate treatments elicitor on hairy root

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of traits		
		وزن خشک ریشه Dry root weight	وزن تر ریشه Fresh root weight	مجموع طول ریشه مویین Total length of hairy root
تیمار Treatment	3	0.000000633	0.0000021**	0.48972**
خطا Error	8	0.00000930	0.00000001	0.00167
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		18.80	0.14	0.05

**: Significant at 1% **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ٤- تأثیر محرکی سولفات مس بر میزان رشد صفات شامل وزن تر (a)، وزن خشک (b)، مجموع طول ریشه مویین (c) در گیاه خشخاش. ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

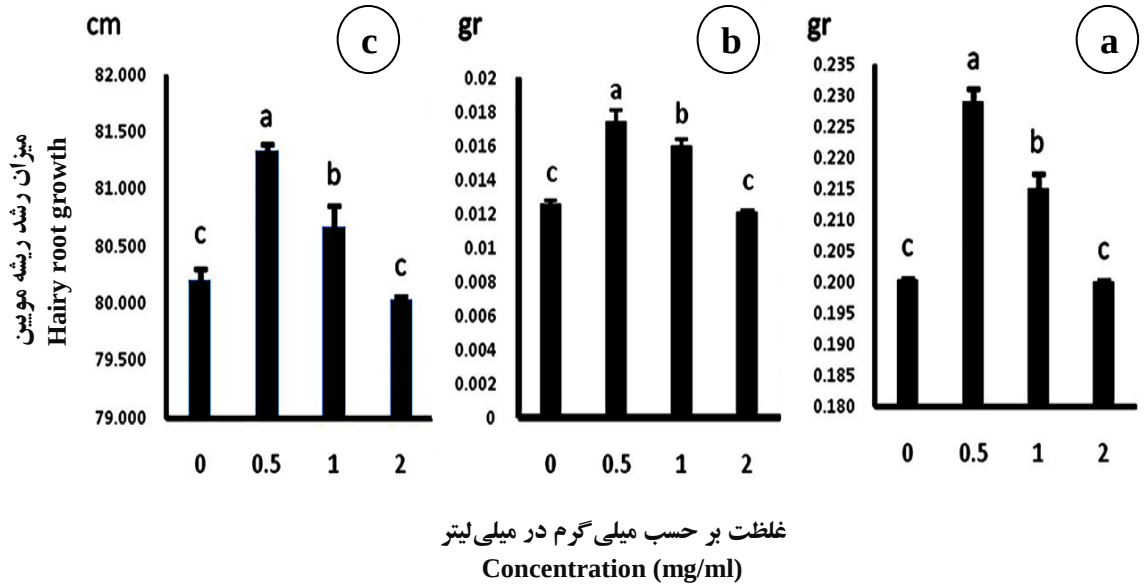
Figure 4. The effect of copper sulphate on growth parameters including fresh weight (a) dry weight (b) and total length of hairy root (c) in poppy plant. Columns represent the average of 3 replicates and treatments with at least one common letter, have no significant differences

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای محرکی عصاره مخمّر بر ریشه مویین

Table 4. Analysis of variance of yeast extracts elicitor treatments on hairy root

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of traits		
		وزن خشک ریشه Dry root weight	وزن تر ریشه Fresh root weight	مجموع طول ریشه مویین Total length of hairy root
تیمار Treatment	3	0.00002058**	0.0005780**	1.0164**
خطا Error	8	0.00000053	0.0000070	0.0375
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		5.01	1.25	0.24

**: Significant at 1% **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۵- تأثیر تیمارهای محرکی عصاره مخمّر بر میزان رشد صفات شامل وزن تر (a)، وزن خشک (b) و مجموع طول ریشه مویین (c) در خشخاش. ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

Figure 5. The effects of yeast extract on growth parameters including weight elicitors (a), dry weight (b) and the total length of root hairs (c) in plant poppy. Columns represent the average of 3 replicates and treatments with at least one common letter, have no significant differences

نتیجه‌گیری

با توجه به مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف محرکی، اعم از زیستی و غیرزیستی، بر ریشه مویین گیاه خشخاش، مشاهده شد که غلظت‌های بالای محرک‌ها، اعم از زیستی و غیرزیستی، بر افزایش زیست‌توده در این گیاه تأثیر منفی داشته و در مقابل، غلظت‌های پایین محرک‌ها، نقش مثبتی در افزایش زیست‌توده در ریشه‌های مویین خشخاش، دارد. نتایج آزمایش نشان داد ترکیبات فعال محرک‌های زیستی، نقش مؤثرتری در القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به ترکیبات غیرزیستی دارند.

References

Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H. (2010). Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of (*Atropa belladonna* L.) by salicylic acid treatments. Iranian Journal of Plant Biology, 2(3), 63-76. [In Farsi]

Akbari, Z., Qaderi, A., Kalate-Jari, S., Mehrafarin, A. and Naghdi Badi, H. A. (2012). Changes of Trigonelline Biosynthesis under Nitrogenous Compounds in Hairy-root Culture of Iranian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Medicinal Plants, 11(2), 128-135. [In Farsi].

Alderete, L. G. S., Talano, M. A., Ibanez, S. G., Purro, S., Agostini, E., Milrad, S. R. and Medina, M. I. (2009). Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing

basic peroxidases and its application for phenol removal. Journal of Biotechnology, 139(4), 273-279.

Bustin, S. and Dorudi, S. (1998). Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. Molecular Medicine Today, 4(9), 389-396.

Echevarria-Machado, I., Escobedo-G, M. R. M. and Larque-Saavedra, A. (2007). Responses of transformed (*Catharanthus roseus*) roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. Plant Physiology and Biochemistry, 45(6-7), 501-507.

Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Biology, 52, 29-66.

Furner, I. J. Huffman, G. A. Amasino, R. M. Garfinkel, D. J. Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1986). An Agrobacterium transformation in the evolution of the genus Nicotiana. Nature, 319, 422-427.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K. and Choi, M. S. (2004). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of (*Scopolia parviflora*). Plant Science, 166(3), 745-751.

Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N. C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(6), 2327-2332.

Lee, E., Park, S. and Paek, K. (2015). Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 120(1), 1-10.

Maksymiec, W. and Krupa, Z. (2006). The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in (*Arabidopsis thaliana*). Environmental and Experimental Botany, 57(1-2), 187-194.

Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A. L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M. and Krupa, Z. (2005). The level of jasmonic acid in (*Arabidopsis thaliana*) and (*Phaseolus coccineus*) plants under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology, 162(12), 1338-1346.

Memelink, J., Verpoorte, R. and Kijne, J. W. (2001). ORC Anization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science, 6(5), 212-219.

Rahimi, S. Devi, B. Khorolragchaa, A. Kim, Y. Kim, J. Jung, S. and Yang, D. (2014). Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in Panax. Plant Physiology, 61(6), 811-817.

Rao, S. R. and Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2), 101-153.

Richards, E., Reichardt, M. and Rogers, S. (1997). Preparation of plant DNA using CTAB. Short Protocols in Molecular Biology, 3(2), 101-111.

Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of Beta vulgaris in shake-flask and bioreactor. Process Biochemistry, 41(1), 50-60.

Shahbazi, E. and 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 Production Technology, 6(2), 45-56. [In Farsi].

Sharp, J. M. and Doran, P. M. (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnology Progress, 17(6), 979-992.

Shi, M., Kwok, K. and Wu, J. Y. (2007). Enhancement of tanshinone production in (*Salvia miltiorrhiza*) Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. Biotechnology and Applied Biochemistry, 46(4), 191-196.

Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell, 37(3), 959-967.

Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current opinion in Biotechnology, 17(2), 147-154.

Van Wyk, B. E. and Wink, M. (2004). Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses. Portland (Oregon): Timber Press.

Weid, M., Ziegler, J. and Kutchan, T. M. (2004). The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *(Papaver somniferum*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(38), 13957-13962.

Xing, B., Yang, D., Guo, W., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y. and Liu, Y. (2014). Ag+ as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Molecules, 20(1), 309-324.

Yang, C., Chen, M., Zeng, L., Zhang, L., Liu, X., Lan, X., Tang, K. and Liao, Z. (2011). Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and h6h genes. Plant Omics Journal, 4(1), 29-33.

Zhao, D., Fu, C., Chen, Y. and Ma, F. (2004). Transformation of (*Saussurea medusa*) for hairy roots and jaceosidin production. Plant Cell Reports, 23(7), 468-474.

Zhu, W. and Stefano, G. (2004). Reticuline exposure to invertebrate ganglia increases endogenous morphine levels. Neuroendocrinology Letter, 25(5), 323-330.

Effect of Different Elicitor Treatments on Hairy Root of Medicinal Plant Poppies (*Papaver somniferum L.*)

Sh. Siahmansour[1], A. Ismaili[2]* and F. Nazarian Firouzabadi[3]

1- M.Sc. Student of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (ismaili.a@lu.ac.ir)
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 20 September, 2016 Accepted: 5 July, 2017

Abstract

Background and Objectives

As a source of alkaloids, Poppy (*Papaver somniferum* L.), is one of the most important plants in the field of pharmaceutical industry. Various methods including use of elicitors, adding precursor, optimizing culture, culture of hairy roots and its metabolites engineering are used to increase the production of secondary metabolites in plant cell cultures. In recent years, cultivation of hairy roots, to the production of valuable metabolites in a number of species of medicinal plants, has taken on commercial scale; but in most cases, this technique produces low amount of alkaloid in commercial scale. Hence, it is needed to optimize the production rate using biological and non-biological elicitors.

Materials and Methods

This experiment was conducted in 2015 in biotechnology laboratory of Lorestan University, Khorramabad, Iran. Sterile explants were prepared from seedling and were then inoculated with Agrobacterium. Inoculated explants were kept in a dark condition for 2 days and then washed and transferred to glasses containing ½ MS medium complemented with cefotaxime. Finally, the glasses were kept in tissue culture room until production of hairy roots. The produced hairy roots were used as explants for elicitors' experiments in flask containers. In this study, in order to increase biomass of hairy roots, 4 types of elicitor treatments (salicylic acid, silver nitrate, copper sulphate and yeast extract) were evaluated in separate experiments based on a completely randomized design with 3 replicates.

Results

Confirmation of transgenic hairy roots was tested by PCR using the *rol*C gene primers to ensure the removal of bacteria from the produced roots. Results of PCR products were separated by electrophoresis and expected fragments were observed in gel. The results showed that the concentration of 5.0 mg/mL of yeast extract elicitor had the most impact on morphological traits. Totally, results showed that biotic elicitors had better effects in comparison to abiotic elicitors. Also, high concentrations of elicitors in all biotic and abiotic cases had a negative impact on biomass of hairy roots.

Discussion

It was shown that biotic elicitors had better effects than abiotic elicitors. The remarkable result of this study was that the high concentration of elicitors had negative effects on biomass hairy root production in poppies plants. It seems that bio-active compounds elicitors induce the plant responses but high concentration of biotic and abiotic elicitors may cause cell death and browning of hairy root tissues.

Keywords: Abiotic, Agrobacterium rhizogenesis, Biomass, Biotic, Transgenic