

## The effect of phenylalanine and salicylic acid facilitators on the production of secondary metabolites in the capillary roots of *Silybum marianum* L. under in vitro conditions

Mohsen Sanikhani<sup>1</sup>, Seyede Arezoo Mirbabaiyan<sup>2</sup>, Mitra Alaei<sup>\*3</sup>, Fahimeh Salehi<sup>4</sup>

1. Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: [sani@znu.ac.ir](mailto:sani@znu.ac.ir)

2. M.Sc. Student, Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: [fahime.salehi@znu.ac.ir](mailto:fahime.salehi@znu.ac.ir)

3. Corresponding Author, Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: [maelaei@znu.ac.ir](mailto:maelaei@znu.ac.ir)

4. Ph.D. Student, Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: [fahimesalehi2015@gmail.com](mailto:fahimesalehi2015@gmail.com)

### Article Info

**Article type:**  
Full Length Research Paper

**Article history:**  
Received: 06.09.2021  
Revised: 07.17.2021  
Accepted: 10.12.2021

**Keywords:**  
Agrobacterium  
rhizogenesis,  
Hairy root,  
Phenylalanine,  
Silymarin

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** *Silybum marianum* as a member of the Asteraceae family, commonly acknowledged as a weed. Nevertheless, silymarin as one of the major secondary metabolites in this plant proved to have positive effects on liver, heart and cancer diseases. The aim of this study was to induce hairy roots using elicitors towards elevate silymarin production in milk thistle plants.

**Materials and Methods:** The objective of this study was to induce hairy roots in milk thistle using salicylic acid and phenylalanine as elicitors to enhance silymarin production. Current research was conducted as two distinct experiments at University of Zanjan. The first trial was performed in a completely randomized design with nine replications to evaluate the production of hairy using three strains of *Agrobacterium rhizogenesis* including A7, R1000 and ATCC. Morphological traits, root number and root length were measured. The second experiment was conducted as a completely randomized design with three replicates to evaluate the impact of salicylic acid (0, 50 and 100  $\mu$ M) and phenylalanine (0, 100 and 200  $\mu$ M) on hairy roots induction, and total phenol, flavonoids, antioxidants and silymarin production.

**Results:** Larger and higher number of hairy roots were induced by ATCC strain. The results showed that all physiological and biochemical attributes were significant ( $P > 0.01$ ). The highest content of total phenols was recorded in 200  $\mu$ M phenylalanine while hairy roots induced by ATCC. The highest silymarin was induced following the treatment of 200  $\mu$ M phenylalanine in roots were induced by R1000 and ATCC.

**Conclusion:** Due to high potential of *Agrobacterium rhizogenesis* to induce hairy roots in diverse range of host plants, it considers as a robust approach for production of secondary metabolites. On the other hand, elicitors alongside hairy roots improved the biochemical and physiological traits of marigold. The amount of silymarin in hairy roots transfected with R1000 and ATCC alongside 200  $\mu$ M phenylalanine was significantly higher.

Cite this article: Sanikhani, Mohsen, Mirbabaiyan, Seyede Arezoo, Alaei, Mitra, Salehi, Fahimeh. 2022. The effect of phenylalanine and salicylic acid facilitators on the production of secondary metabolites in the capillary roots of *Silybum marianum* L. under in vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, 29 (3), 17-34.



## تأثیر الیستورهای فنیل آلانین و اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه موئین گیاه ماریتیغال تحت شرایط درون‌شیشه‌ای

محسن ثانی‌خانی<sup>۱</sup>، سیده آرزو میربابائیان<sup>۲</sup>، میترا اعلایی<sup>۳\*</sup>، فهیمه صالحی<sup>۴</sup>

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: [sani@znu.ac.ir](mailto:sani@znu.ac.ir)
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: [fahime.salehi@znu.ac.ir](mailto:fahime.salehi@znu.ac.ir)
۳. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: [maelaei@znu.ac.ir](mailto:maelaei@znu.ac.ir)
۴. دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: [fahimesalehi2015@gmail.com](mailto:fahimesalehi2015@gmail.com)

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰</p>	<p>سابقه و هدف: گیاه خار مریم یا ماریتیغال (<i>Silybum marianum</i> L.) عضوی از خانواده کاسنی (Asteraceae) است که معمولاً به‌عنوان علف هرز شناخته می‌شود، اما وجود سیلیمارین به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه اصلی این گیاه اثرات مثبتی بر بیماری‌های کبد، قلب و سرطان دارد. این پژوهش با هدف تولید ریشه موئین در گیاه ماریتیغال به منظور افزایش سیلیمارین در ریشه‌های تراریخت شده و استفاده از الیستورها در راستای تسریع تولید این ماده صورت گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها: به منظور القای ریشه موئین در گیاه ماریتیغال با استفاده از اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین به عنوان الیستور در راستای افزایش تولید سیلیمارین بود. پژوهش‌ها به صورت دو آزمایش مجزا در دانشگاه زنجان انجام شد. آزمایش اول در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تکرار برای ارزیابی تولید ریشه موئین با استفاده از سه سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز شامل A7، R1000 و ATCC صورت گرفت. صفات ریخت‌شناسی شامل تعداد ریشه و طول ریشه اندازه‌گیری شد. آزمایش دوم نیز به صورت طرح کاملاً تصادفی با تیمار اسید سالیسیلیک در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و فنیل آلانین در سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در سه تکرار، به منظور بررسی اثرات این تیمارها روی ریشه‌های موئین بدون تلقیح باکتری و حاصل از باکتری‌های ATCC و A7 و R1000 به منظور اندازه‌گیری صفات میزان فنل کل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان و میزان سیلیمارین انجام شد.</p>
<p>واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، ریشه موئین، سیلیمارین، فنیل آلانین</p>	<p>یافته‌ها: بیش‌ترین طول و تعداد ریشه‌های موئین نسبت به شاهد توسط سویه ATCC نسبت به سویه‌های دیگر بود. هم‌چنین نتایج نشان داد که تمامی صفات فیزیولوژی و زیست-شیمیایی</p>

---

اندازه گرفته شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. میزان فنل کل ریشه‌های موئین در تیمار فنیل آلانین ۲۰۰ میکرومولار به همراه باکتری ATCC بیش‌ترین میزان فنل کل را نشان داد. میزان سیلیمارین در ریشه‌های موئین تراریخت شده با باکتری R1000 و ATCC با فنیل آلانین با غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار بیش‌ترین میزان را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که توانایی آگروباکتریوم رایزوزنز در القاء ریشه‌های موئین در گستره‌ای از گیاهان میزبان، نسبت به سایر سویه‌ها روش مناسبی را جهت مطالعه تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم آورد. همچنین سهولت به‌دست آوردن ریشه‌های موئین و قابلیت سنتز مداوم ترکیبات شیمیایی مختلف را ایجاد نمود. این عوامل سبب برتری آن نسبت به سایر روش‌ها در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه در ریشه گردیده است. از طرفی اضافه کردن الیستور در کنار حضور باکتری‌ها به‌عنوان عامل تراریختگی سبب بهبود در صفات زیست-شیمیایی و فیزیولوژیکی ماریتیغال شد. از جمله میزان متابولیت ثانویه سیلیمارین که در ریشه‌های موئین تراریخت شده با باکتری R1000 و ATCC همراه با تیمار فنیل آلانین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیش‌ترین میزان را نشان داد.

---

**استناد:** ثانی‌خانی، محسن، میربابائیان، سیده آرزو، اعلائی، میترا، صالحی، فهیمه (۱۴۰۱). تأثیر الیستورهای فنیل آلانین و اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه موئین گیاه ماریتیغال تحت شرایط درون‌شیشه‌ای. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۹ (۳)، ۱۷-۳۴.

DOI: 10.22069/JOPP.2022.19220.2836



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

### مقدمه

گیاه ماریتیغال با نام انگلیسی Milk thistle و نام علمی (*Silybum marianum* L.) گیاهی دولپه‌ای، علفی و از خانواده Asteraceae است. این گیاه، به صورت یکساله یا دو ساله کشت می‌شود. منشأ آن شرق مدیترانه گزارش شده است و بومی جنوب اروپا، شمال آفریقا، آسیا و استرالیا می‌باشد (۱). این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی، قلبی و سرطان مؤثر است (۲). ارزش گیاهان دارویی به دلیل توانایی آن‌ها در تولید انواع زیادی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. این گیاه نیز به دلیل حضور گروهی از فلاونولیگنان<sup>۱</sup> به نام سیلیمارین<sup>۲</sup> که ترکیبی از انواع فلاونوئیدها می‌باشد بسیار دارای اهمیت است (۳). روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیستورها، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (۴). با توجه به دلایل مختلفی مانند وحشی و نادر بودن اکثر گیاهان دارویی، وجود مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی آن‌ها، غلظت پایین ترکیبات مؤثره دارویی در برخی گیاهان، اهمیت متابولیت‌های ثانویه گیاهی و کندی در سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه سبب می‌شود که در این راستا برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از روش‌های زیست‌فناوری استفاده گردد (۵). یکی از روش‌های متداول تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌ها و تولید ریشه‌های موئین، تلقیح ریشه با آگروباکتریوم رایزوزنز<sup>۳</sup> است (۶). از جمله طی آزمایشی در گونه *Plumbago indica* ریشه‌های حاصل از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز در مقایسه با

گیاهان غیرتراریخته مقادیر بیش‌تری از پلامباگین<sup>۴</sup> تولید کردند. در نتیجه آزمایش‌ها نشان داد که تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه موئین تلقیح شده با آگروباکتریوم که به طور معمول نسبت به گیاهان بدون تلقیح عملکرد بالاتری نشان داد (۷). در پژوهشی میزان رشد و تولید متابولیت ثانویه در ریشه‌های موئین حاصل از اثر آگروباکتریوم رایزوزنز، سوبه LMG 150 در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که این تیمار باعث افزایش ۱/۵۷ برابری رشد ریشه تراریخته نسبت به ریشه غیرتراریخته شد (۸). طی آزمایشی ریشه‌های موئین تراریخته نسبت به گیاه کامل درمنه (*Artemisia annua*) مقدار سزکویی ترپن بیش‌تری را تولید کردند (۹). در بررسی‌های انجام گرفته توسط سوون و همکاران (۱۹۸۹) تفاوت رشد قابل ملاحظه‌ای در بین کلون‌های ریشه موئین بذرالبنج مصری حاصل از سوبه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز و نیز مقدار آلکالوئیدهای تولیدی توسط کلون‌های مختلف در مقایسه با شاهد گزارش شد (۱۰). طبق بررسی‌های انجام شده توسط اسکالا و همکاران (۲۰۱۵) سطح تولید caffeoylquinic در ریشه‌های تراریخته در گیاه *Rhaponticum carthamoides* از تیره کاسنیان، به خصوص در معرض نور به مقدار بالایی افزایش یافت (۱۱). امروزه استفاده از الیستورها برای فعال کردن متابولیت‌های ثانویه کاربرد فراوانی دارد که این فعالیت، با اثرگذاری بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهند. در نتیجه یکی از راهبردهای مفید در راستای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده از الیستورهای زنده و غیرزنده است. یکی از این الیستورها اسید سالیسیلیک می‌باشد. اسید سالیسیلیک یا اسید اورتو هیدروکسی

- 1- Flavonolignans
- 2- Silymarins
- 3- *Agrobacterium rhizogenes*

4- Plumbagin

### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی القای ریشه‌های موئین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز و اثرات تیمارهای فنیل آلانین و اسید سالیسیلیک بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ماریتیغال در شرایط درون‌شیشه‌ای دو آزمایش مجزا در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان انجام شد.

**آزمایش اول:** این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به منظور بررسی تأثیر باکتری‌های ATCC, R1000 و A7 بر صفاتی مانند طول و تعداد ریشه موئین انجام گرفت. محیط کشت مورد استفاده برای این پژوهش MS و 1/2 MS بود. برای تهیه این محیط کشت، از محلول‌های ذخیره شامل عناصر درشت مغذی، عناصر ریزمغذی، ویتامین‌ها، آهن، ساکارز و آگار استفاده شد. به منظور تهیه ریز نمونه گیاهی، بذور گیاه ماریتیغال از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. حدود ۵ ساعت قبل از کشت، برای شکستن دوره خواب، بذرها در محلول جیبرلین به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه ضدعفونی شد و با آب مقطر استریل شست و شو شد. در مرحله آخر هفت دقیقه بذرها را در محلول کلرید جیوه ۵ درصد قرار می‌دهیم و در نهایت ۳ بار آبکشی با آب مقطر استریل انجام شد. پس از ضدعفونی بذرها در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS 1/2 کشت و سپس به اتافک رشد با شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگاه‌داری شدند. بعد از گذشت ۵-۷ روز جوانه‌زنی بذرها آغاز و پس از دستیابی به گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای از قسمت‌های مختلف گیاه برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های

بنزوئیک از ترکیبات فنلی است که دارای یک حلقه آروماتیک متصل به یک گروه هیدروکسیل می‌باشد. این ماده در تعداد زیادی از گیاهان به وسیله سلول‌های ریشه تولید و نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان ایفا می‌کند (۱۲). الیستور دیگر فنیل آلانین است که یک اسید آمینه معطر می‌باشد. اسیدهای آمینه به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک، رشد و نمو گیاهان مؤثر واقع می‌شوند (۱۳) در نتیجه این ماده در گیاهان نه تنها از اجزای ضروری برای ساخت پروتئین‌ها است، بلکه به عنوان پیش‌ساز در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه دارای اهمیت می‌باشد. هم‌چنین آزمایش‌ها نشان داد که اثر فنیل آلانین بر رشد و نمو گیاهان از طریق تأثیر بر هورمون جیبرلین نیز صورت می‌گیرد (۱۴). طی آزمایشی که توسط رجبی (۱۳۹۵) انجام شد تأثیر اسید سالیسیلیک باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گل راعی گردید (۱۵). هم‌چنین نتایج مطالعه پارسا و زینالی (۱۳۹۵) نشان داد که اسید سالیسیلیک می‌تواند تیمار مناسبی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در ریشه موئین گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger L.*) باشد (۱۶). طی پژوهش‌های انجام شده اسید سالیسیلیک، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاژ (PAL) و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در گیاه سیاهدانه (۱۷) و مقدار فلاونوئید را در گل همیشه بهار افزایش داد (۱۸). در مجموع گزارش‌ها و مقالات اندکی در خصوص تأثیر تیمار فنیل آلانین و اسید سالیسیلیک در شرایط درون‌شیشه‌ای بر روی گیاهان دارویی ماریتیغال وجود دارد. در نتیجه در این راستا آزمایشی با هدف بررسی تیمارهای فنیل آلانین و اسید سالیسیلیک بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه ماریتیغال در شرایط درون‌شیشه‌ای و هم‌چنین القای ریشه‌های موئین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز طراحی و اجرا شد.

دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در تاریکی به منظور آزمایش دوم نگهداری شدند.

**آزمون گاس به منظور ارزیابی تظاهر ژن:** آزمایش هیستوشیمیایی گاس برای نمونه‌های تراریخت شده انجام شد. اثر آنزیم گاس روی سوسترای مربوط (*x-gluc*) سبب تبدیل فرآورده واکنش به رنگ آبی در نمونه‌های تراریخته می‌شود. بر این اساس ابتدا ریشه‌ها به طول ۱ سانتی‌متر از گیاهچه‌ها جدا شده و سپس درون تیوب‌های حاوی ۱ ml محلول گاس (۸/۹ میلی‌لیتر آب استریل، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات نیم میلی‌مولار  $\text{NaPo}_4$ ، ۱۰ میکرولیتر tween 20 و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر  $\text{x-gluc}$  2 Mm) منتقل شدند. تیوب‌ها را سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه تحت شرایط خلاء قرار داده تا ریزنمونه‌ها، محلول را به طور کامل جذب کرده و تیره رنگ شوند. این کار هر بار تا جوش آمدن محلول داخل تیوب ادامه می‌یابد. تیوب‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از گذشت این مدت محلول گاس حذف و شست‌وشوی نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۱۰۰ درصد انجام شد. در نهایت نمونه‌ها برای مشاهده رنگ آبی، بررسی شدند (۱۹).

**آزمایش دوم:** این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی بر روی تیمار اسید سالیسیلیک در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و فنیل آلانین در سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در سه تکرار، به منظور بررسی اثرات این تیمارها بر روی ریشه‌های موئین بدون تلقیح باکتری، *ATCC* و *A7* و *R1000*، ریشه‌های موئین را به قطعات ۲ سانتی‌متر برش زده و از آنها به منظور اندازه‌گیری صفات فیزیولوژی و زیست-شیمیایی استفاده شد. بعد از تکثیر ریشه‌های موئین در روز پانزدهم بعد از واکنشی، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار فنیل آلانین به این کشت‌ها اعمال گردید.

*R1000*، *ATCC* و *A7* در محیط کشت LB به منظور تکثیر باکتری‌ها استفاده شد و پس از تلقیح باکتری و ریزنمونه گیاهی به محیط کشت MS مایع برای ایجاد ریشه‌های موئین منتقل گردید. به عبارتی پس از برداشتن تک کلونی باکتری از محیط کشت LB جامد، به منظور ایجاد شرایط محیطی رشد باکتری، آن‌ها را در ارلن‌هایی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB هستند برای تسهیل تهویه قرار داده و آن‌ها را در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ rpm به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. بعد از جوانه‌زنی بذور و سپس رشد گیاهچه‌ها (هفته سوم کشت) ریزنمونه‌های برگ گیاه ماریتیغال به قطعاتی به اندازه ۱-۲ سانتی‌متر به وسیله اسکالپل استریل در زیر هود برش داده شده و به ظروف پتری‌دیش منتقل گردیدند. ریزنمونه‌های تهیه شده در سوسپانسیون تلقیح که باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به غلظتی معادل ۱ رسیدند به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. تنظیم غلظت باکتری از طریق سانتی‌فیوژ باکتری و افزودن مقادیر مناسبی از محیط کشت LB برای رسیدن به غلظت مورد نظر ( $\text{OD}=1$ ) صورت گرفت. پس از حذف محیط کشت اضافی با کاغذ صافی استریل به محیط کشت MS عاری از هورمون منتقل گردیدند و به مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ریزنمونه‌ها به محیط MS حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین جهت جلوگیری از رشد باکتری و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین جهت گزینش ریشه‌های تراریخت منتقل شدند. پس از ۸ هفته از تلقیح باکتری و رشد ریشه‌های موئین اندازه‌گیری صفات طول ریشه و تعداد ریشه انجام شد. تعدادی از ریزنمونه‌های جدا شده به محیط کشت MS مایع بدون هورمون منتقل شدند. این کشت‌ها روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و شرایط

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: جهت تعیین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های کشت بافتی ماریتغال از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با استفاده از ۲، ۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد. برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به ۱/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر محلول متانولی با غلظت ۰/۰۳ درصد DPPH اضافه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگه‌داری شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (۲۲). درصد رادیکال آزاد هر عصاره به کمک رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(Abs\ control - Abs\ sample / Abs\ control) \times 100$$

مایل به سیاه ایجاد شد. پس از چند دقیقه یک میلی‌لیتر از محلول حاصل به داخل لوله سانتریفیوژ ریخته و به آن ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی جدا و به داخل یک لوله آزمایش منتقل و به محلول باقی‌مانده حاصل از سانتریفیوژ، ۱۰ میلی‌متر متانول اضافه شد و مجدداً برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس قسمت رویی جدا و به محتویات لوله آزمایش قبلی اضافه شد. در نهایت جذب نهایی محلول در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتری اندازه‌گیری شد و درصد سیلیمارین طبق رابطه‌های زیر محاسبه گشت (۲۳).

$$(100E \times 50 \times 100) / (E_{\%1} \times 100 \times b) = 2500 E / 537 b$$

همه داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش توسط نرم‌افزار SAS تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید.

در دوره زمانی ۱۴ روز از اعمال تیمار، اقدام به نمونه‌برداری از ریشه‌ها گردید. هدف از نمونه‌برداری ریشه‌های موئین بررسی صفات فیزیولوژی و زیست-شیمیایی مانند فنول، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان و سنجش میزان متابولیت ثانویه سیلیمارین می‌باشد. **تهیه عصاره:** جهت تهیه عصاره‌ها ابتدا ۱۰ گرم پودر گیاه تهیه و سپس از روش خیساندن در حلال‌های مختلف و به ترتیب قطبیت از حلال‌های هگزان، دی کلرومتان، اتیل استات، متانول استفاده شد و عصاره‌های حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ شدند. سپس محتوای فنل کل با روش فولین سیکالچو (۲۰)، فلاونوئید کل با روش آلومینیوم-کلراید (دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Uplab) اندازه‌گیری شد (۲۱).

(۱)

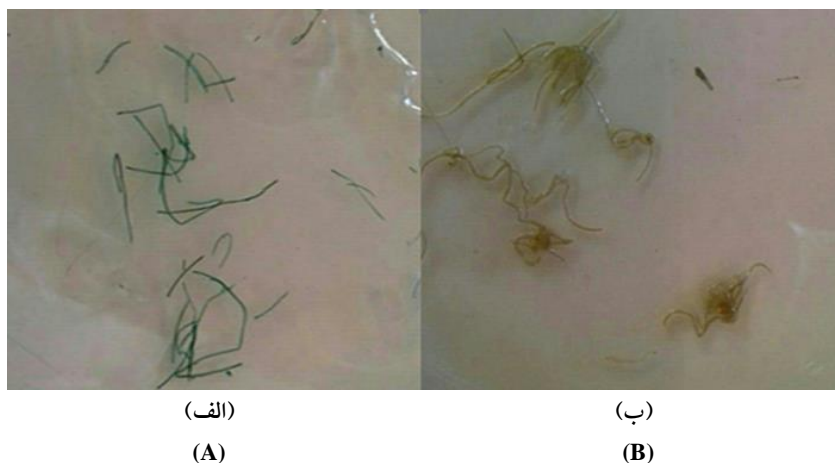
که در آن، Abs control جذب طول موج شاهد، Abs sample جذب طول موج نمونه‌ها. **اندازه‌گیری میزان سیلیمارین:** پس از تهیه عصاره، یک میلی‌لیتر از محلول حاصل را به داخل یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و سپس ۲ میلی‌لیتر معرف ۲ و ۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین به آن اضافه نموده و پس از بستن درب بالن به مدت ۵۰ دقیقه بر روی بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از سرد شدن بالن، حجم آن توسط محلول پتاس الکی ۱۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از حل شدن کامل، محلولی با رنگ قرمز تیره

که در آن، E جذب محلول نمونه و b وزن نمونه گیاهی مورد آزمایش می‌باشد.

### نتایج و بحث

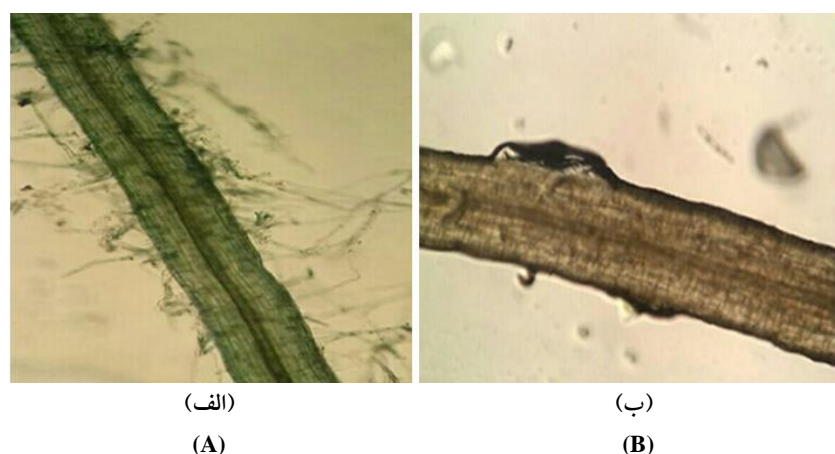
نتایج آزمون هیستوشیمیایی گاس: طبق نتایج به دست آمده به منظور تعیین ریشه‌های موئین تراریخت از طریق آزمون گاس مشخص شد که ریشه‌های حاصل از سویه‌های ATCC، R1000 و A7 در نتیجه سنجش، رنگ آبی گرفتند که نشان‌دهنده تراریخته بودن ریشه‌های موئین تولید شده توسط سویه‌های ذکر شده باکتری است (شکل‌های ۱ و ۲). طی آزمایش‌های صورت گرفته در قطعات برگ گیاه

*Rubia tinctorum* در بحث تراریختگی توسط سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز درصد ایجاد ریشه‌های موئین بسته به سویه باکتری متفاوت بود که حداکثر درصد ایجاد ریشه در سویه AR15843 با هفتاد و پنج درصد افزایش گزارش شد (۲۴). سپه‌وند (۱۳۹۱) نشان داد که بین سویه‌های مختلف از نظر میزان تراریختگی در گیاه شیرین بیان اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۲۵).



شکل ۱- تست هیستوشیمیایی GUS (الف) تظاهر رنگ آبی در بافت تراریخته (ب) گیاه شاهد.

Fig. 1. GUS Histochemical Test. A) The appearance of blue in transgenic tissue, B) Control plant.



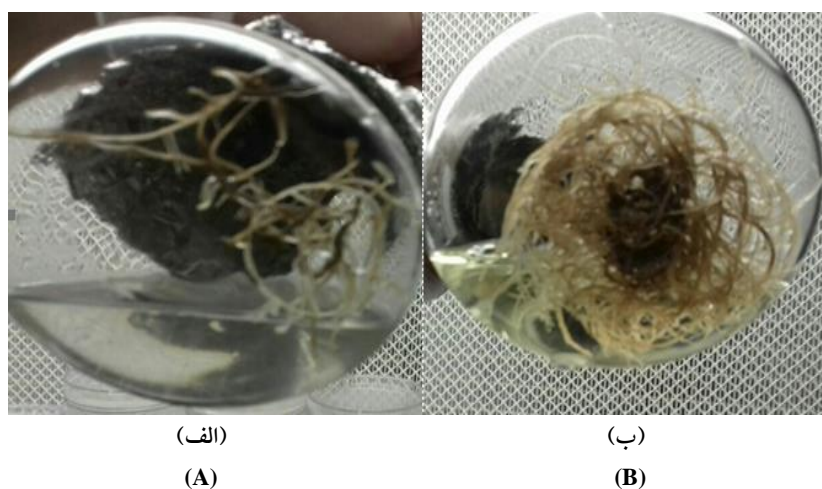
شکل ۲- تست هیستوشیمیایی GUS (الف) تظاهر رنگ آبی در بافت تراریخته (ب) گیاه شاهد.

Fig. 2. GUS Histochemical Test. A) The appearance of blue in transgenic tissue, B) Control plant.



در کوتاه‌ترین زمان و بالاترین درصد تراریختگی و بیش‌ترین طول و تعداد ریشه موئین در هر ریزنمونه گردید. دلیل اختلاف بین ریشه‌های موئین در سویه‌های مختلف به دلیل حذف یا تکرار توالی T-DNA گزارش شده است و این‌که همه باکتری‌ها در ایجاد ریشه‌های موئین از کارایی یکسانی برخوردار نیستند در واقع به خاطر تصادفی بودن محل درج T-DNA در ژنوم گیاه میزان اغلب نتایج کشت ریشه‌های موئین تنوع قابل‌ملاحظه‌ای را در رشد و الگوهای تجمع متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهد. فرآیند تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز تحت‌تأثیر عواملی مانند ژنوتیپ، ساختار قطعه جداکشت، سن قطعه، نوع سویه‌های باکتری و عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط کشت قرار می‌گیرد (۲۸). نتایج مطالعه نشان داد که القای ریشه موئین در گونه مورد بررسی تحت‌تأثیر سویه‌های آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت. ریشه‌های موئین که در اثر آلودگی گیاه با باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز تولید می‌شود دارای سرعت رشد بالا و پایداری ژنتیکی زیادی بوده و به عنوان منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۹).

تعداد و طول ریشه: براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) تعداد ریشه و اندازه آن در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. طبق اندازه‌گیری‌های صورت گرفته مشخص شد ریشه‌های موئین ایجاد شده در مطالعه حاضر در مقایسه با ریشه‌های شاهد انشعابات بیش‌تری داشتند و اندازه آن‌ها نیز نسبت به شاهد بیش‌تر می‌باشد (شکل ۳). به طوری که طبق نمودار مقایسه میانگین (شکل ۴) بیش‌ترین تعداد ریشه‌های موئین در نمونه‌های تراریخت با باکتری ATCC مشاهده شد. همین‌طور بیش‌ترین تعداد ریشه نیز مربوط به باکتری ATCC بود که اختلاف زیادی با سایر تیمارها داشت (شکل ۴). ریشه‌های موئین از سرعت رشد نامحدود و زیادی برخوردارند (۲۶). نتایج به دست آمده از مطالعات شعبانی (۱۳۹۷) بر روی گیاه خرفه نشان داد که بیش‌ترین درصد القای ریشه‌های موئین در محیط کشت حاوی سویه‌های K599 و ATCC11325 بوده است و بیش‌ترین طول ریشه و تعداد آن به ترتیب در سویه‌های K599 و A13 مشاهده شد (۲۷). طی مطالعاتی که پناهی (۱۳۹۵) بر روی گیاه انگور وحشی انجام داد مشخص شد که تلقیح ریزنمونه میانگره ژنوتیپ W16 با سویه ATCC15834 منجر به تولید ریشه‌های موئین



شکل ۳- الف) ریشه‌های شاهد ب) ریشه‌های القاء شده توسط باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز.  
**Fig. 3. A) The root of the control. B) Roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*.**

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر تعداد ریشه و طول ریشه.

**Table 1. Results of analysis of variance of experimental treatments on root number and root length.**

میانگین مربعات Mean squares		درجه آزادی DF	منابع تغییرات SOV
طول ریشه Root length	تعداد ریشه Number of roots		
4.03**	73.42**	3	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments
0.45	1.75	8	خطا Error
9.61	7.67	-	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

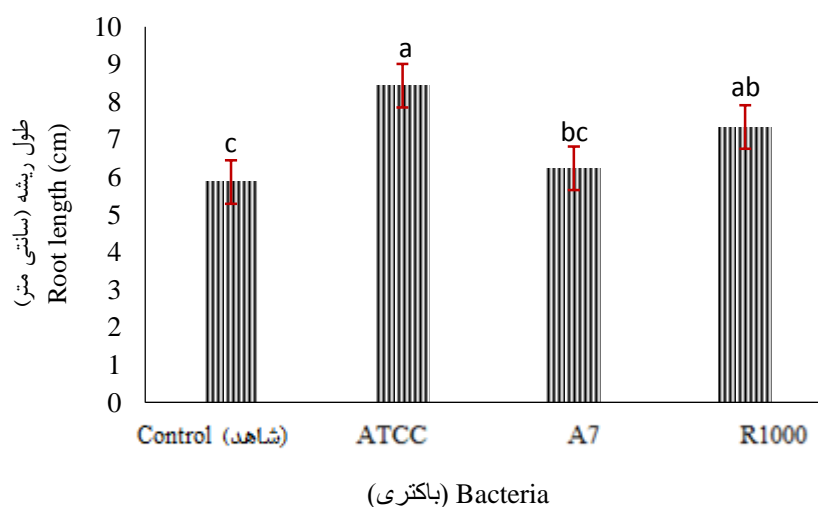
ns, \*\* and \* Non-significant and significant at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر صفات فیزیولوژیکی ماریتغال.

**Table 2. Results of analysis of variance of experimental treatments on physiological characteristics of *Silybum marianum* L.**

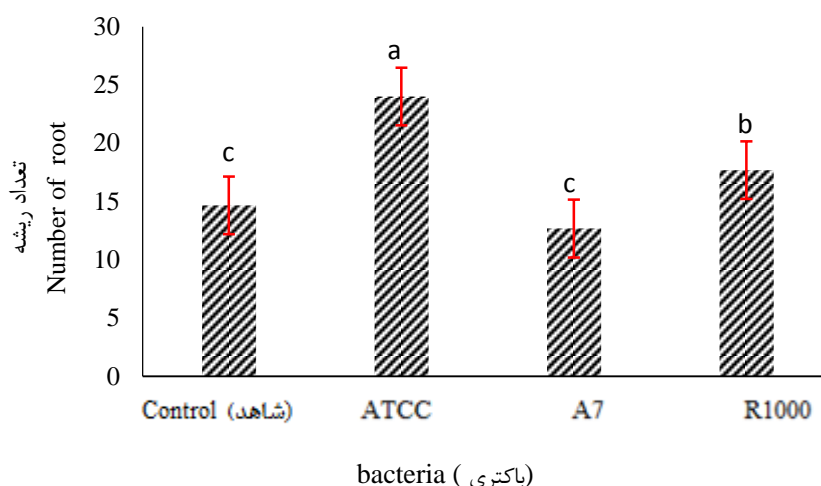
میانگین مربعات Mean squares				درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
سیلیمارین Silimarin	آنتی اکسیدان Anti-oxidan	فلانونوئید Phlavanoid	فنل کل Total phenol		
1.05**	133.37**	3.68**	31.87**	14	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments
0.001	0.34	0.013	0.99	30	خطا Error
2.12	0.74	5.03	2.21	-	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

ns, \*\* and \* Non-significant and significant at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.



شکل ۴- طول ریشه توسط سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم.

**Fig. 4. Root length by different strains of Agrobacterium.**

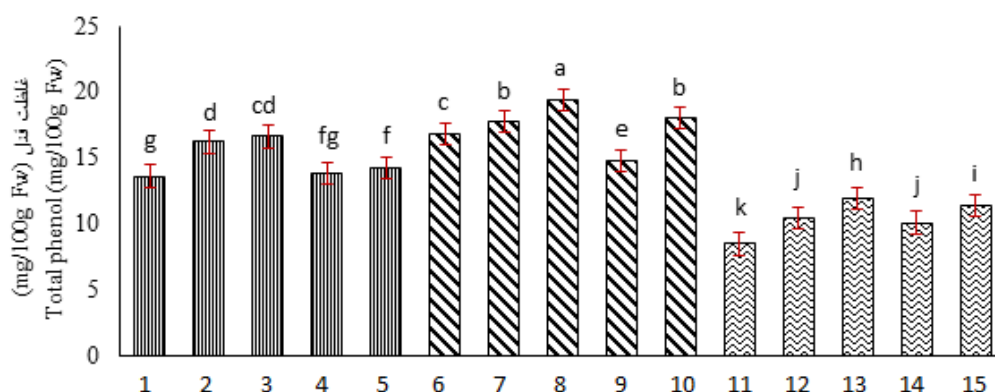


شکل ۵- تعداد ریشه توسط سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم.

Fig. 5. Number of roots by different strains of Agrobacterium.

رزمارینیک و اسید کافئیک افزایش یافت. اسید سالیسیلیک بیوستز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه از جمله اندول آلکالوئیدها، سزکوئی‌ترین‌ها و فنل‌ها را تحریک می‌کند و سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز (PAL) و نیز چالکون سینتاز (CHS) می‌شود (۳۰) و سبب فعال کردن مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی را سبب می‌شوند (۳۱). در مطالعات انجام شده بر روی بابونه آلمانی نیز تأثیرات مثبت فنیل آلانین مشاهده شد (۳۲). در واقع فنیل آلانین، یک اسید آمینه آروماتیک است که پیش ماده فنیل آلانین آمینولیز است که کاهش دامیناسیون L-phe به ترس اسید سینامیک نخستین گام از بیوستز ترکیبات فنلی گیاه است (۳۳). اضمحله کردن غلظت‌های مختلف فنیل آلانین به محیط کشت گل ماهور (*Verbascum thapsus L.*) سبب افزایش ترکیبات فنلی در بافت کالوس شد (۳۴).

میزان فنل کل تحت تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین: نتایج تجزیه واریانس به دست آمده نشان داد که میزان فنل کل در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲). میزان فنل کل ریشه‌های موئین در تیمار فنیل آلانین ۲۰۰ میکرومولار به همراه باکتری ATCC بیش‌ترین میزان فنل کل را نشان داد. همچنین میزان فنل کل در تیمارهای اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میکرومولار به همراه باکتری ATCC، فنیل آلانین ۱۰۰ میکرومولار و باکتری ATCC و فنیل آلانین ۲۰۰ میکرومولار به همراه باکتری R1000 نیز میزان بالایی از فنل را نشان داد. در باکتری A7 میزان فنل کل در غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار فنیل آلانین و ۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک نتایج مشابهی را ارائه دادند (شکل ۶). در مطالعه جوکار (۱۳۹۶) بر روی گیاه نوروک مشخص شد با افزایش اسید سالیسیلیک مقدار محتوای فنل، فلاونوئید، اسید



شکل ۶- غلظت فنل کل ریشه موئین ماریتیغال تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین (۱: شاهد + باکتری R1000، ۲: فنیل آلانین +۱۰۰ باکتری R1000، ۳: فنیل آلانین +۲۰۰ باکتری R1000، ۴: اسید سالیسیلیک +۵۰ باکتری R1000، ۵: اسید سالیسیلیک +۱۰۰ باکتری R1000، ۶: شاهد+ باکتری ATCC، ۷: فنیل آلانین +۱۰۰ باکتری ATCC، ۸: فنیل آلانین +۲۰۰ باکتری ATCC، ۹: اسید سالیسیلیک +۵۰ باکتری ATCC، ۱۰: اسید سالیسیلیک +۵۰ باکتری ATCC، ۱۱: شاهد+ باکتری A7، ۱۲: فنیل آلانین +۱۰۰ باکتری A7، ۱۳: فنیل آلانین +۲۰۰ باکتری A7، ۱۴: اسید سالیسیلیک +۵۰ باکتری A7، ۱۵: اسید سالیسیلیک +۱۰۰ باکتری A7).

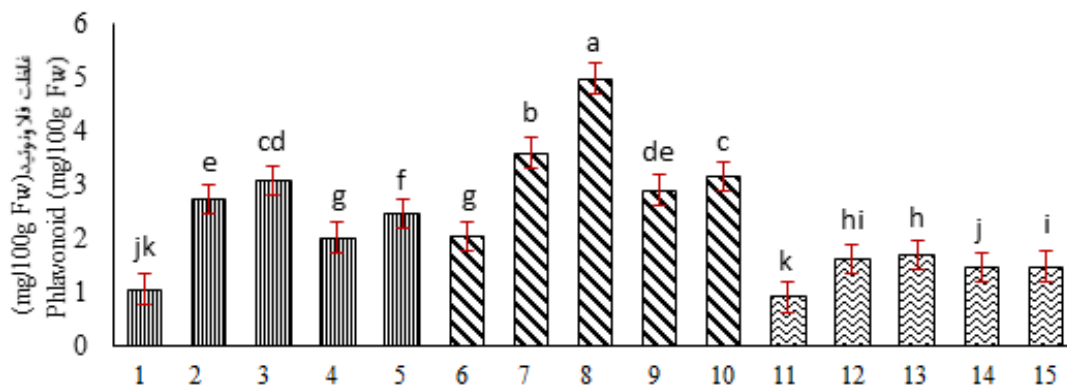
**Fig. 6. Total phenol concentration of marigold capillary root under the influence of salicylic acid and phenylalanine treatment. (1: control + bacterium R1000, 2: phenylalanine 100+ bacterium R1000, 3: phenylalanine 200+ bacterium R1000, 4: salicylic acid 50+ bacterium R1000, 5: salicylic acid 100+ bacterium R1000, 6: control + bacterium ATCC, 7: phenylalanine + 100 ATCC bacteria, 8: phenylalanine 200+ ATCC bacteria, 9: salicylic acid + 50 ATCC bacteria, 10: salicylic acid 50+ ATCC bacteria, 11: control + A7 bacteria, 12: phenylalanine + 100 Bacteria A7, 13: Phenylalanine + 200 Bacteria A7, 14: Salicylic 50+ Bacteria A7, 15: Salicylic + 100 Bacteria A7).**

انجام داد مشخص شد که محتوای فلاونوئید در غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد (۳۶). القا با اسید سالیسیلیک فعالیت آنزیم آمونیا لیاز را افزایش داده است، که روند افزایش آن کم و بیش موازی با الگوی تجمع ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل می‌باشد که این نتایج پیشنهاد می‌کند اسید سالیسیلیک القاکننده تجمع ترکیبات فنولیک کل به‌واسطه افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز می‌باشد. بنابراین اسید سالیسیلیک نقش مهمی را در فرآیند انتقال پیام‌رسان ایفا می‌کنند که تولید ترکیبات فنولیک کل و بیان ژن‌های دفاعی در گیاه را القا می‌کنند. هم‌چنین فنیل آلانین پیش‌ساز تشکیل فلاونوئیدها می‌باشد، بنابراین افزایش فنیل آلانین می‌تواند به صورت قابل‌ملاحظه‌ای میزان فلاونوئیدها را افزایش دهد (۲۷). متابولیت‌هایی که در نتیجه

میزان فلاونوئید کل تحت تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان فلاونوئید کل در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲). میزان فلاونوئید در ریشه‌های موئین تیمار شده با باکتری ATCC به‌همراه فنیل آلانین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار و هم‌ین‌طور غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل را دارا می‌باشند (شکل ۷). هم‌چنین در باکتری R1000 در تیمار با فنیل آلانین ۲۰۰ میکرومولار مقدار بالایی فلاونوئید حاصل شد (شکل ۷). کوهساری و همکاران (۱۳۹۹) بیان داشتند غلظت‌های مختلف الیستورها در محیط کشت سبب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاه کاسنی می‌گردد (۳۵). در مطالعه قربانی (۱۳۹۲) که روی اثر اسید سالیسیلیک بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه بنفشه

صورت گرفت، مقادیر ویژه‌ای از فنیل آلانین، هم‌چون غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر، می‌تواند جهت به دست آمدن میزان بیش‌تری از فلاونوئید در محیط کشت استفاده شود (۳۲).

فعالیت فنیل آلانین به وجود می‌آید به عنوان مشتقات فنلی طبقه‌بندی می‌شوند که شامل کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین و تانن می‌باشند (۳۷). طی پژوهش‌هایی که توسط ماتور و گوسوامی (۲۰۱۴)



شکل ۷- غلظت فلاونوئید ریشه موئین ماریتیغال تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین. (۱: شاهد+ باکتری R1000، ۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری R1000، ۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری R1000، ۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری R1000، ۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری R1000، ۶: شاهد+ باکتری ATCC، ۷: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری ATCC، ۸: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری ATCC، ۹: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری ATCC، ۱۰: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری ATCC، ۱۱: شاهد+ باکتری A7، ۱۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری A7، ۱۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری A7، ۱۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری A7، ۱۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری A7).

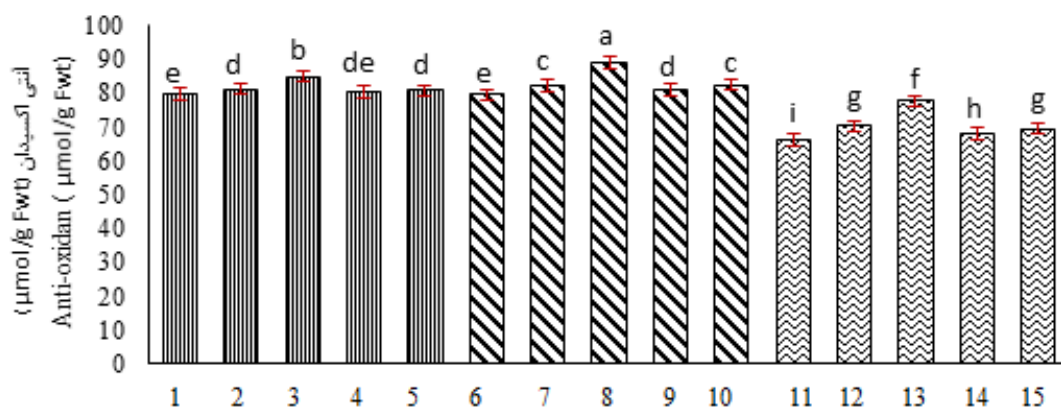
**Fig. 7. Flavonoid concentration of marigold capillary root under the influence of salicylic acid and phenylalanine treatment. (1: control + bacterium R1000, 2: phenylalanine 100+ bacterium R1000, 3: phenylalanine 200+ bacterium R1000, 4: salicylic acid 50+ bacterium R1000, 5: salicylic acid 100+ bacterium R1000, 6: control + bacterium ATCC, 7: phenylalanine + 100 ATCC bacteria, 8: phenylalanine 200+ ATCC bacteria, 9: salicylic acid + 50 ATCC bacteria, 10: salicylic acid 50+ ATCC bacteria, 11: control + A7 bacteria, 12: phenylalanine + 100 Bacteria A7, 13: Phenylalanine + 200 Bacteria A7, 14: Salicylic 50+ Bacteria A7, 15: Salicylic + 100 Bacteria A7).**

عبدخانی و سلوکی (۱۳۹۵) به نظر می‌رسد افزایش محتوی فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان ریحان تحت تیمار با اسید سالیسیلیک به احتمال زیاد به دلیل القای سنتز ROS ها و ژن‌های درگیر در سامانه دفاعی می‌باشد (۳۸). هم‌چنین پژوهش‌ها نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد. به‌طوری‌که گیاهان دارای ترکیبات فنلی بالاتر، فعالیت ضد رادیکالی آزاد بیش‌تری نیز دارند (۳۹). در مطالعه عسکری (۱۳۹۳) کاربرد اسید سالیسیلیک بر گیاه رازیانه سبب افزایش

فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۲) میزان آنتی‌اکسیدان در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است. طبق نتایج حاصل از آزمایش در ریشه‌های موئین R1000 تیمار شده با فنیل آلانین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار و در ریشه‌های حاصل از باکتری ATCC به همراه تیمار فنیل آلانین ۲۰۰ میکرومولار بیش‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان را مشاهده شد (شکل ۸). ریشه‌های حاصل از غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین در باکتری ATCC نتایج مشابهی را نشان داد. طبق نتایج پژوهش

مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد (۵ و ۴۱) در نتیجه میزان آنتی‌اکسیدان نیز نسبت به شاهد افزایش یافت.

شاخص‌های رشدی، میزان آنتی‌اکسیدان و بهبود صفات ریشه گردید (۴۰). با توجه به افزایش میزان فنل و فلاونوئید در این آزمایش، از آنجایی که ارتباط



شکل ۸- فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه موئین تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین. (۱: شاهد+ باکتری R1000، ۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری R1000، ۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری R1000، ۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری R1000، ۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری R1000، ۶: شاهد+ باکتری ATCC، ۷: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری ATCC، ۸: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری ATCC، ۹: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری ATCC، ۱۰: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری ATCC، ۱۱: شاهد+ باکتری A7، ۱۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری A7، ۱۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری A7، ۱۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری A7، ۱۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری A7).

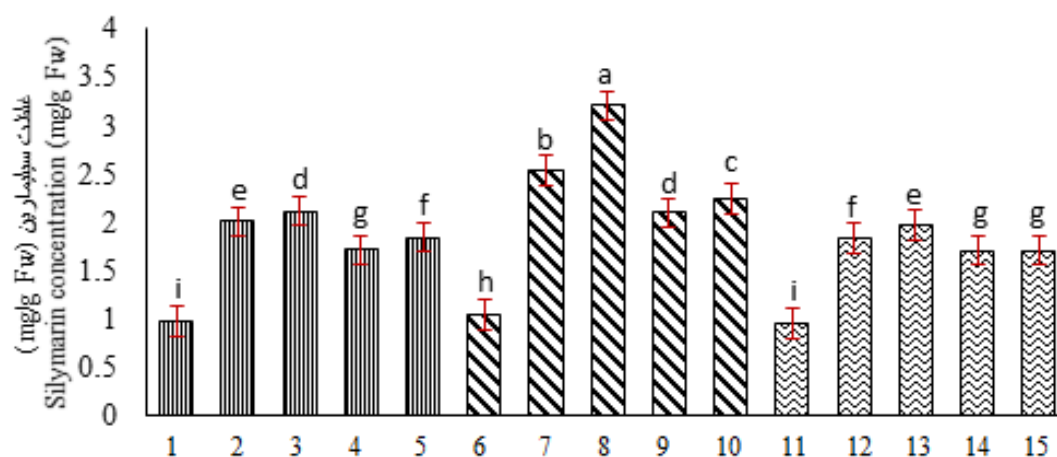
**Fig. 8. Antioxidant activity of capillary root under the influence of salicylic acid and phenylalanine treatment.** (1: control + bacterium R1000, 2: phenylalanine 100+ bacterium R1000, 3: phenylalanine 200+ bacterium R1000, 4: salicylic acid 50+ bacterium R1000, 5: salicylic acid 100+ bacterium R1000, 6: control + bacterium ATCC, 7: phenylalanine + 100 ATCC bacteria, 8: phenylalanine 200+ ATCC bacteria, 9: salicylic acid + 50 ATCC bacteria, 10: salicylic acid 50+ ATCC bacteria, 11: control + A7 bacteria, 12: phenylalanine + 100 Bacteria A7, 13: Phenylalanine + 200 Bacteria A7, 14: Salicylic 50+ Bacteria A7, 15: Salicylic + 100 Bacteria A7).

میکرومولار بیش‌ترین میزان سیلیمارین مشاهده شد (شکل ۹). در ریشه‌های موئین R1000 تیمار شده با اسید سالیسیلیک بیش‌ترین میزان سیلیمارین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد. ریشه‌های موئین آلوده شده به باکتری A7 و تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین نشان دادند که بیش‌ترین میزان سیلیمارین در اثر فنیل آلانین مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار و میزان سیلیمارین در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک یکسان بوده است (شکل ۹). نتایج مطالعه حسنلو و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد که ریشه‌های موئین گیاه خار مریم

میزان سیلیمارین تحت تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین: با توجه به جدول ۲ تجزیه واریانس تیمارهای آرایشی بر میزان سیلیمارین مشخص شد که میزان سیلیمارین در سطح یک درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین بر اساس نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۹) با توجه به سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز مشخص شد تیمار ریشه‌های موئین با هر کدام از سویه‌های باکتری نتایج متفاوتی را در پی داشته است. با توجه به بررسی‌های انجام شده میزان سیلیمارین در ریشه‌های موئین آلوده به باکتری R1000 و ATCC با فنیل آلانین با غلظت‌های ۲۰۰

گاهی با افزودن الیسیتورهایی مانند اسید سالیسیلیک به عنوان عامل تحریک‌کننده تولید متابولیت‌های ثانویه کمک شایانی می‌توان کرد. زیرا الیسیتورها سبب تسریع در تشکیل متابولیت‌های ثانویه و کاهش زمان فرآیند دستیابی به مقادیر بالای آن‌ها می‌شوند. الحاک و همکاران (۲۰۱۶) تجمع ماده دارویی سیلیمارین را در کشت بافت ماریتیغال طی کاربرد فنیل آلانین بررسی نمودند و نشان داد که فنیل آلانین به عنوان پیش‌ساز فلاونوئیدها موجب انباشت سیلیمارین شد و در غلظت ۲۵ میکرومولار، تجمع این ماده را به میزان ۳۱/۴ درصد افزایش داد (۴۳).

حاوی مقادیر بالایی از فلاونولیگنان‌ها از جمله سیلیمارین می‌باشد و تیمار ریشه‌های موئین این گیاه با عصاره قارچی باعث تولید اسید سالیسیلیک و در نتیجه افزایش تولید سیلیمارین گردید (۶). بررسی تولید سیلیمارین در ریشه‌های موئین حاضر افزایش قابل توجهی را در ریشه موئین ATCC تیمار شده با فنیل آلانین ۲۰۰ میکرو مولار نشان داد که بیانگر نقش این پیش ماده در افزایش تولید سیلیمارین می‌باشد. طی آزمایشی که دیانت و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند محلول‌پاشی به لیمو با اسید سالیسیلیک سبب افزایش میزان اسانس گیاه در برگ شد (۴۲). در نتیجه



شکل ۹- میزان غلظت سیلیمارین ریشه موئین تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین. (۱: شاهد+ باکتری R1000، ۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری R1000، ۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری R1000، ۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری R1000، ۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری R1000، ۶: شاهد+ باکتری ATCC، ۷: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری ATCC، ۸: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری ATCC، ۹: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری ATCC، ۱۰: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری ATCC، ۱۱: شاهد+ باکتری A7، ۱۲: فنیل آلانین ۱۰۰+ باکتری A7، ۱۳: فنیل آلانین ۲۰۰+ باکتری A7، ۱۴: اسید سالیسیلیک ۵۰+ باکتری A7، ۱۵: اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ باکتری A7).

**Fig. 9. Capillary root silymarin concentration under the influence of salicylic acid and phenylalanine treatment. (1: control + bacterium R1000, 2: phenylalanine 100+ bacterium R1000, 3: phenylalanine 200+ bacterium R1000, 4: salicylic acid 50+ bacterium R1000, 5: salicylic acid 100+ bacterium R1000, 6: control + bacterium ATCC, 7: phenylalanine + 100 ATCC bacteria, 8: phenylalanine 200+ ATCC bacteria, 9: salicylic acid + 50 ATCC bacteria, 10: salicylic acid 50+ ATCC bacteria, 11: control + A7 bacteria, 12: phenylalanine + 100 Bacteria A7, 13: Phenylalanine + 200 Bacteria A7, 14: Salicylic 50+ Bacteria A7, 15: Salicylic + 100 Bacteria A7).**

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این آزمایش مشخص شد که تیمار آگروباکتریوم رایزوزنز تأثیر به‌سزایی روی ریشه‌زایی دارد به عبارتی این باکتری طی تراریختگی تأثیر مثبتی بر روی ریشه‌زایی و افزایش طول و تعداد ریشه موئین در گیاه دارد. به‌خصوص سویه ATCC که اختلاف بسیار زیادی را در تعداد و طول ریشه با سایر سویه‌ها و شاهد نشان داد. از طرفی اضافه کردن ایسیتور در کنار حضور باکتری‌ها به عنوان عامل تراریختگی سبب بهبود در صفات زیست-شیمیایی و

فیزیولوژیکی ماریتیغال شد. از جمله میزان متابولیت ثانویه سیلیمارین که در ریشه‌های موئین تراریخت شده با باکتری R1000 و ATCC همراه با تیمار فنیل‌آلانین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیش‌ترین میزان را نشان داد. در نتیجه کاربرد باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز و هم‌چنین ایسیتورها روش مناسبی به‌منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد.

### منابع

- Valková, V., Ďúranová, H., Bilčíková, J. and Habán, M. 2020. Milk thistle (*Silybum marianum*): a valuable medicinal plant with several therapeutic purposes. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 9: 4. 836-843.
- Osuchowski, M.F., Johson, V.J. and Sharma, R.P. 2004. Alteration in regional brain neurotransmitters by silymarin a natural antioxidant flavonoid mixture in BALB/c mice. Pharm. Biol. 42: 384-389.
- Abouzid, S.F., Chen, S.N. and Pauli, G.F. 2016. Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. J. Ind. Crop Prod. 83: 729-737. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.12>.
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol ADV. 20: 2. 101-153.
- Arumugam, P., Ramamurthy, P. and Ramesh, A. 2010. Antioxidant and cytotoxic activities of lipophilic and hydrophilic fractions of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). J. Food Prop. 13: 1. 23-31.
- Hasanloo, T., Rezazadeh, Sh. and Rahnema, H. 2008. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. J. Med. Plants. 29: 1-17. (In Farsi)
- Gangopadhyay, M., Chakraborty, D., Bhattacharyya, S. and Bhattacharya, S. 2010. Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. Plant Cell Tiss Org. 102: 109-114.
- Bais, H.P., Govindaswamy, S. and Aswathnarayana Ravishankar, G. 2000. Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. J. Biosci. Bioeng. 90: 6. 648-653.
- Souret, F.F., Yoojeong, K., Barbara, E.W., Kristin, K.W. and Pamela, J.W. 2003. Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produce complex patterns of terpenoid gene expression. Biotechnol. Bioeng. 83: 2. 653-657.
- Sevon, N., Hiltunen, R. and Oksman Caldentey, K.M. 1998. Somaclonal variation in *Agrobacterium* transformed roots and protoplast-derived hairy root clones of *Hyoscyamus muticus*. Planta Med. 64: 37-41.
- Skala, E., Kicel, A., Olszewska, M.A., Kiss, A.K. and Wysokinska, H. 2015. Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. Biomed Res. Int. 41: 8. 423-428. ID article:181098. doi:10.1155/2015/181098.
- Khan, M.I., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A. and Khan, N.A. 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress



- tolerance and underlying mechanisms in plants. *Plant Sci. J.* 6:462.
13. Faten, S.A., Shaheen, A.M., Ahmed, A.A. and Mahmoud, A.R. 2010 Effect of foliar application of amino acids as antioxidants on growth, yield and characteristics of Squash. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6: 583-588.
  14. Tzin and Galili. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Mol Plant.* 3: 6. 956-972.
  15. Rajabi, A., Abbaspoor, H.M. and Sinaki, J. 2016. Study the chemical stimuli effects of Methyl Jasmonate and Salicylic acid on stimulation of Hypericin production in *Hypericum perforatum* L.). *NCMBJ.* 6: 22. 41-50.
  16. Parsa, M. and Zinali, A. 2016. The effect of salicylic acid elicitor on the level of tropane, alkaloids of atropine and scopolamine in capillary roots and roots obtained from tissue culture of *Hyoscyamus niger* L. *Iran. Plant Prod.* 32: 4. 666-655. (In Farsi)
  17. Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. 2014. Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of water stress in *Nigella sativa* plant under hydroponic culture. *Plant Prot. Sci.* 50: 43-51.
  18. Pacheco, A.C., Cabral, A.S., Fermino, E.S.S. and Aleman, C.C. 2013. Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *J. Med. Plants Res.* 1: 95-100.
  19. Demeke, T., Hucl, P., Baga, M., Caswell, K., Leung, N. and Chibbar, R.N. 1999. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99: 947-953.
  20. Pirian, K., Piri, K. and Ghiyasvand, T. 2012. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.* 3: 3. 642-649.
  21. Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, P.L., Yang, N.S. and Shyur, L.F. 2002. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J. Agric. Food Chem.* 49: 7. 3420-3424.
  22. Barros, L., Baptista, P. and Ferreira, I.C.F.R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Lactarius piperatus*. *Food Chem. Toxicol.* 45: 9. 1731-1737.
  23. Qasemi Dehkordi, N. and Talib, A.M. 2001. Extraction, identification and quantification of compounds in index medicinal plants. Polo Publications. Esfahan. (In Farsi)
  24. Ercan, A., Gülhan, T., Melih, K., Turgut, K. and Yuce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes* - mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. *Am. J. Bot.* 23: 373-377.
  25. Sepahvand, Kh. 2012. Optimization of gene transfer to capillary roots of licorice plant using *Agrobacterium rhizogenes* carrying gus reporter gene. Master Thesis. Biotechnology. Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan. (In Farsi)
  26. Ebrahimi, R., Jafari, M., Ghadimzadeh, M. and Abdullahi Mendulkani, B. 2015. Optimization of induction and culture conditions of transgenic hair roots in the medicinal plant *Scrophularia deserti*. *J. Agric. Biotech.* 7: 4. 123-125.
  27. Shabani Hamidabadi, Sh. 2018. Optimization of capillary root induction in *Portulaca oleracea* L. and the effect of nanoparticles on root growth in vitro. Master Thesis. Faculty of Agriculture and Natural Resources Mohaghegh Ardabili. (In Farsi)
  28. Ahmadi Moghadam, Y., Piri, Kh., Bahramnejad, B. and Ghiasvand, T. 2014. Dopamine Production in Hairy Root Cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) Using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agr. Sci. Tech.* 16: 409-420.
  29. Doran, P.M. 2002. Properties and Applications of Hairy-root Cultures. In: "Plant Biotechnology and Transgenic Plants", (Eds.): Okasman-Caldenty, K. M. and Barz, W.H. Mercel Dekker Inc., New York. 2: 143-162.

30. Raman, V. and Ravi, S. 2011. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiol. Plant.* 33: 2. 1043-1049.
31. Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* 116: 1. 240-248.
32. Mathur, S. and Goswami, A. 2014. Effect of precursor  $\beta$ -phenylalanine on production of flavonoids of *Maytenus emarginata* in vitro. *Int. J. Sci. Res.* 3: 7. 333-335.
33. Kubota, N., Yakushiji, H., Nishiyama, N., Mimura, H. and Shimamura, K. 2001. Phenolic contents and L-phenylalanine ammonia-lyase activity in peach fruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 2. 151-156.
34. Al-Jibouri, A.M.J., Abed, A.S., Ali, A.J.A. and Majeed, D.M. 2016. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *Am. J. Pol. Sci.* 7: 01. 84-85.
35. Koohsari, A., Chaloui, V. and Akbarpour, V. 2020. Effect of explant type and growth regulators on callus formation and chicory secondary metabolites (*Chicory intybus* L.). *J. Plant Pro.* 27: 2. 32-36. (In Farsi)
36. Meek, C.R. and Bidlack, J.E. 2005. Arthropod population, phenylalanine ammonia-lyase activity and fresh weight of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by plant age and *Bacillus thuringiensis* treatment. *Plant Sci. J.* 85: 9-17.
37. Ghorbani Meshkini, M., Jalali Jawaran, M. and Sepahvand, N. 2005. Study of gene transfer to *Arabidopsis* and rapeseed using a relative vacuum. The Fourth National Conference of the Islamic Republic of Iran. Kerman. (In Farsi)
38. Abdekhani, S. and Solouki, M. 2016. Changes in phenolic compounds, anthocyanin and antioxidant enzymes in different growth stages basil (*Ocimum basilicum* L.), using growth regulators. *J. Med. Plants.* 15: 58. 164-175. (In Farsi)
39. Arumugam, B., Manaharan, T.H., Kek Heng, C., Kuppasamy, U.R. and Palanisamy, U.D. 2014. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. *LWT-Food Sci. Technol.* 59: 2, Part 1, December. 3: 707-712.
40. Askari, E. and Ehsanzadeh, P. 2015. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. *Acta Physiol Plant.* 37: 2-14.
41. Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M.H. and Ho, C.T. 2010. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9. 5363-5367.
42. Dianat, M., Saharkhi, M.J. and Tavassolian, I. 2016. Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8: 286-289.
43. Silvestrini, A., Pasqua, G., Botta, B., Monacelli, B., Van der Heijden, R. and Verpoorte, R. 2002. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 9. 749-753.