تأثیر سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* بر القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

مهدی محب‌الدینی*، رقیه فتحی و اسماعیل چمنی
گروه علوم باغبانی،دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
*نویسنده مسئول: mohebodini@uma.ac.ir

چکیده

کشت ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح با *A. rhizogenes* ابزار مؤثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی است زیرا ریشه‌های مویین از پایداری ژنتیکی و بیولوژیکی برخوردارند و قادر به تولید متابولیت‌ها در زمان کوتاه و سرعت رشد زیاد در محیط کشت بدون هورمون می‌باشد. کاسنی از جمله گیاهان دارویی ارزشمند از تیره‌ی Asteraceae می‌باشد. ریشه و برگ و بذر آن شامل ترکیبات دارویی مختلف از جمله اینولین، شیکوریک اسید، سسکوئی‌ترپن‌ها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها و ویتامین‌ها است. در این تحقیق، ریشه‌های مویین توسط سویه‌های A4 ، ۱۱۳۲۵ و ۱۵۸۳۴ *A. rhizogenes* تولید شدند. تأثیر نوع سویه و سه مدت هم‌کشتی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر کارایی القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ی برگ بررسی شد. بیشترین میزان تراریختی (۶۶/۶۶ درصد) و تعداد ریشه‌های مویین (۹/۵۶ ریشه در هر ریزنمونه) و بیشترین طول ریشه (۱۰/۶ سانتی‌متر) در اثر تیمار ۷۲ ساعت هم کشتی ریزنمونه‌ها با سویه‌ی A4 به‌دست آمد. اثبات تراریختی ریشه‌های مویین به‌وسیله‌ی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B انجام شد. تأثیر سه نوع محیط کشت مختلف (محیط کشت MS مایع، MS ۱/۲مایع و MS نیمه جامد) بر میزان رشد بهینه‌ی ریشه‌های مویین بررسی شد. نتایج نشان داد سویه‌ی ۱۵۸۳۴ و محیط کشت MS ۱/۲ مایع، بهترین تأثیر را در تولید بیشترین وزن تر (۱/۷) و خشک (۰/۱۴) دارند.

***کلمات کلیدی*:ریشه‌های مویین، ژن *rol*B، کاسنی، متابولیت‌های ثانویه، هم‌کشتی**

مقدمه

امروزه گرایش عمومی جوامع به استفاده از داروهای گیاهی به علت سالم و کم‌خطر بودن آن‌ها، در حال گسترش روزافزون می‌باشد. اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی، هزینه‌های تولید و واردات و آلودگی‌های زیست‌محیطی، باعث افزایش توجه به سمت درمان از طریق گیاهان دارویی شده است به‌طوری‌که حدود ۵۰ درصد داروهای تولید شده در جهان منشأ طبیعی و گیاهی دارند. تولید متابولیت‌های گیاهی در روش‌های سنتی کشت گیاهان دارویی اغلب نیاز به زمان طولانی داشته همچنین تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله عوامل بیماری‌زا یا تغییرات آب و هوایی می‌باشد. به‌علاوه مقدار متابولیت تولید شده بسیار اندک می‌باشد (Ritala *et al*., 2014). کشت بافت گیاهان دارویی به‌عنوان یک راه‌حل جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش معرفی شده است. یکی از روش‌های نوین که امروزه برای افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است استفاده از کشت بافت ریشه‌های مویین می‌باشد (Srivastava *et al*., 2013) که از طریق تلقیح گیاه با *A. rhizogenes* صورت می‌گیرد. ریشه‌های مویین، با داشتن سرعت رشدی بسیار زیاد، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش، در زمان کم با بازده فراوان و بدون نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، راهکاری سودمند برای تولید ترکیبات دارویی می‌باشد.

گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intybus* L.) حاوی مواد دارویی ارزشمندی از جمله شیکوریک اسید، اینولین، اسکولین، کومارین و فلاونوئیدها می‌باشد. اینولین به علت غیر قابل هضم بودن، دارای انرژی‌زایی بسیار کم بوده و خواص یک فیبر تغذیه‌ای را دارند که به بهبود عملکرد روده کمک می‌کند (Flamm *et al*., 2001) و می‌توانند تا حدود ۴۰ درصد از میزان تری گلیسریدها و تا ۳ درصد در کاهش کلسترول خون مؤثر باشد (Ewa *et al*., 2002). همچنین خواص ضد تومور و تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی بدن را دارد و به‌عنوان سرکوب‌کننده‌ی عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Taper *et al*., 2002).

فنل‌ها به دلیل ساختار و گروه‌های هیدروکسیلی که دارند عموماً ترکیباتی با قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند (دگل اینوسنتی[۴]، ۲۰۰۸). شیکوریک اسید به دلیل توانایی در مهار آنزیم HIV integrase فعالیت ضدویروس HIV دارد و همچنین به علت تحریک ترشح انسولین و درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی مورد توجه قرار گرفته است Lee and (Scagel, 2010). در این پژوهش، تأثیر سویه‌های مختلف *A. rhizogenes*، مدت هم‌کشتی گیاه و باکتری و تأثیر محیط کشت‌های مختلف در میزان رشد و تجمع زیست‌توده در لاین‌های پر رشد ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شدند .سپس به مدت ۹۰ ثانیه در محلول اتانول ۷۰ درصد، و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در زیر هود لامینار شستشو داده شد. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند .بعدازآن در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶ گرم در لیتر آگار کشت شدند. و به اتاقک رشد با دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. از برگ‌های گیاهچه‌ی ۲۰ روزه ریزنمونه تهیه شد.

القای ریشه‌های مویین

القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگی گیاهچه‌ی ۲۰ روزه، با استفاده از سویه‌های A_4، ۱۱۳۲۵ و ۱۵۸۳۴ *A.rhizogenes* انجام شد. کلونی‌های باکتری که ۲۴ ساعت قبل از تلقیح، در محیط کشت LB (Bertani, 1952) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، کشت شده و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و با چرخش ۱۲۰rpm رشد کرده بودند، برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شدند. ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی، در محیط کشت MS جامد، کشت و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به‌عنوان شاهد در شرایطی مشابه با تیمار کشت گردیدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

پس از سپری شدن مدت هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انتقال داده شدند. پس از گذشت چهار هفته از ظهور ریشه‌ها، درصد القای ریشه‌ی مویین، میانگین تعداد و طول ریشه‌ها محاسبه گردید. سپس قطعاتی به طول ۲ سانتی‌متر از نوک انشعابات لاینی از ریشه‌های مویین که بیشترین رشد را داشت، برش داده و در ظروف شیشه مربا حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS جامد، MS مایع و ۱/۲MS مایع که حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بودند کشت گردید. در هر شیشه ۰/۱ گرم ریشه کشت شد. سپس در شیکر با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. هر دو هفته یک‌بار واکشت ریشه‌ها انجام گردید. پس از پنج هفته، وزن تر و وزن خشک ریشه‌ها بر حسب گرم در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت اندازه‌گیری شد.

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

استخراج DNA به روش CTAB (Khan *et al*., 2007) انجام گرفت. برنامه‌ی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن B *rol* روی DNA استخراج شده انجام شد. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). برنامه‌ی RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک، مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج القای ریشه‌های مویین در ریز نمونه‌های برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع سویه و مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین طول ریشه‌ها معنی‌دار نبوده اما اثر اصلی مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد و طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگ با سویه‌ی A_4، با ۶۶/۶۶ درصد تراریختی و میانگین ۹/۵۶ عدد ریشه و طول ریشه ۱۰/۶ سانتی‌متر بیشترین تأثیر را در القای ریشه‌های مویین داشته‌است. در ریزنمونه‌های غیرتراریخت، بیشترین القای ریشه‌های نابجا ۶/۶۶ درصد مشاهده شد (جدول ۱).

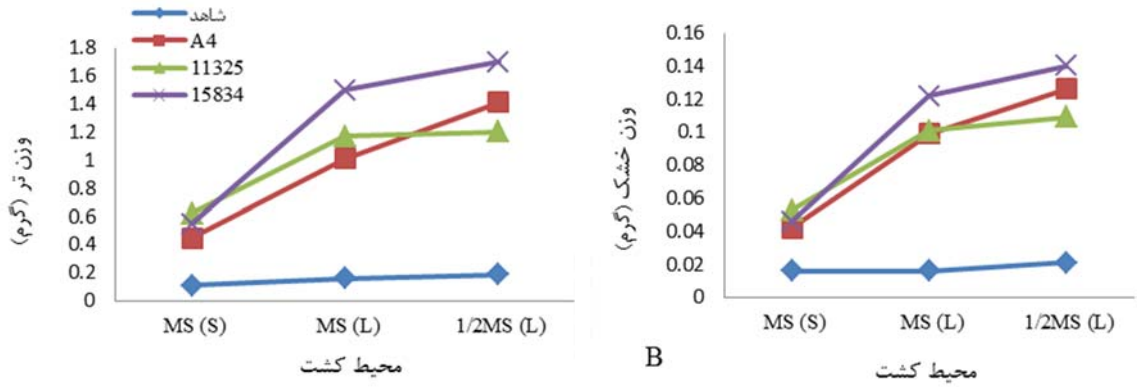
جدول۱- مقایسهٔ میانگین تأثیر نوع سویه و مدت هم‌کشتی بر روی صفات ریشه‌های مویین

نوع سویه + مدت هم‌کشتی (ساعت)	درصد القای ریشه	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه (سانتی‌متر)
۲۴ + A_4	۱۳ ^{b}	۲/۱۶ ^{de}	۲/۷ ^{c}
۴۸ + A_4	۴۶/۶۶ ^{ab}	۵/۲۳ ^{bcd}	۶/۲ ^{abc}
۷۲ + A_4	۶۶/۶۶ ^{a}	۹/۵۶ ^{a}	۱۰/۶ ^{a}
۲۴ + ۱۱۳۲۵	۲۰ ^{b}	۱/۶۶ ^{de}	۳/۵ ^{c}
۴۸ + ۱۱۳۲۵	۲۶/۶۶^{b}	۲/۸۳ ^{de}	۵/۰۳ ^{bc}
۷۲ + ۱۱۳۲۵	۴۶/۶۶^{ab}	۸/۳۳ ^{ab}	۸/۸۳ ^{ab}
۲۴ + ۱۵۸۳۴	۱۳/۳۳^{b}	۱ ^{e}	۳/۱ ^{c}
۴۸ + ۱۵۸۳۴	۲۶/۶۶^{b}	۷ ^{ab}	۷ ^{abc}
۷۲ + ۱۵۸۳۴	۴۰ ^{ab}	۸/۵ ^{a}	۹/۸۳ ^{a}

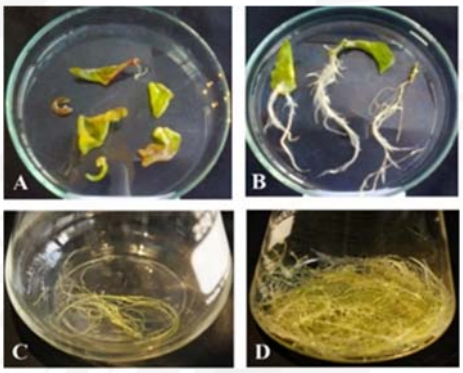
اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند

مقایسه‌ی تأثیر نوع سویه و نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه و نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. جدول مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر (۱/۷ گرم) و وزن خشک (۰/۱۴ گرم) در ریشه‌های حاصل از برگ‌های تلقیح یافته با سویه‌ی ۱۵۸۳۴ و کشت ریشه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ حاصل شد (شکل ۱).



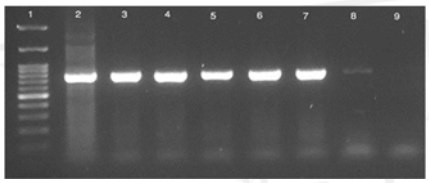
شکل ۱- تأثیر نوع سویه و نوع محیط کشت (از چپ به راست: MS جامد، MS مایع و MS ۱/۲ مایع) بر میزان وزن تر (A) و وزن خشک (B) ریشه‌ها.



شکل ۲- مقایسه‌ی رشد ریشه‌های مویین و ریشه‌های نابجا. A: القای ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌های برگ غیر تراریخت، B: القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ تراریخت ، C: رشد ریشه‌های نابجا در محیط کشت MS مایع. D: رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت MS مایع

تائید مولکولی ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار ۷۶۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rol*B را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود اما برای ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نشده نواری تکثیر نشد (شکل ۴).



شکل ۴- تکثیر قطعه DNA به اندازه‌ی ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* B بر روی DNA ریشه‌های مویین.: 1- نشانگر اندازه‌ی DNA یک کیلوبازی، 2- *A. rhizogenes* به‌عنوان کنترل مثبت، 3-8- ریشه‌های مویین، 9- ریشه نابجا به‌عنوان شاهد منفی.

منابع

Bertani, G. 1952. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology; 62: 293-300.

Degl,innoocenti, E., pardossi, A., Tattini, M. and guidi L. 2008. Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. Journal of Food Biochemistry; 32:642–653.

Ewa, C., Aneta, K. and Werner, P. 2002. functional properties of fructun. Ninth seminar on inulin. Budapest.

Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L. and Roberfroid, M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of the evidence. journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition; 41:353-362.

Khan, S., Irfan Q. M., Kamaluddin A. and Abdin M. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology, 6, 175-178.

Lee, J. and Scagel; C. F. 2010. Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products, *Journal of functional foods*, 2:77-84.

Ritala, A., Dong L., Imseng N., Seppänen-Laakso T., Vasilev N. and Krol S. 2014. Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committedstep in terpenoid indole alkaloid pathway. Journal of Biotechnology; 176: 20-28.

Srivastava, V., Kaur R., Chattopadhyay S.K., and Banerjee S. 2013. Production of industrially important cosmaceutical and pharmaceutical derivatives of betuligenolby *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. Industrial Crops and Products; 44, 171–175.

Taper, H. S., Roberfroid, M.B. 2002. Inulin/oligofructose and anticancer therapy. British Journal of Nutrition; 87(2):283-286.

Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction in Medicinal Plant Chicory (*Cichorium intybus* L.)

Mehdi Mohebodini*, Roghayeh Fathi, Esmaeil Chamani
Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili,
*Corresponding Author: mohebodini@uma.ac.ir

Abstract

Hairy root cultures obtained by *Agrobacterium rhizogenes* infection are an effective method for production of secondary metabolites, because hairy roots are genetically and biologically stable and they are able to produce metabolite within a short time and high growth rate on hormone-free media. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is one of the important medicinal plants that belong to the family Asteraceae. Its root, leaf and seed contain important medicinal compounds such as inulin, sesquiterpen, cumarins, flavonoids and vitamins. In this research, hairy root induction was established through the mediation of the A4, 11325 and 15834 strains of *A. rhizogenes*. The effects of strain type and three different co-culture times (24, 48 and 72 Hours) on the efficiency of hairy root induction in leaf explant were investigated. Maximum hairy root induction (66.66 percent), roots number (9.56 roots per explant) and maximum root length (10.6 cm) were induced from 72 hours co-culture of explant with A4 strain. Hairy roots were confirmed by PCR using *rol*B gene-specific primers. Three different culture media (solid MS, liquid MS and 1/2 MS media) was tested to determine the best suitable strain and media for the maximum Biomass of hairy root lines which had a highest growth rates. The results revealed that 15834 strain and liquid 1/2 MS media was superior for high fresh weight (1.7 g) and dry weight (0.14 g) production of hairy roots.

***Keywords*: Co-culture, *Cichorium intybus* L., Hairy roots, *Rol*B gene, Secondary metabolites.**