تأثیر اکسین و منبع کربن بر میزان رشد ریشه‌های مویین در گیاه دارویی کاسنی (*Cichoriumintybus* 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

القای ریشه‌های مویین در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی، روش مناسبی برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد ریشه‌های مویین از رشد سریع برخوردارند و با داشتن انشعابات فراوان، توانایی مشابه یا حتی بیشتر نسبت به ریشه‌های طبیعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارا می‌باشند. کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاه دارویی متعلق به تیره‌ی Asteraceae می‌باشد و حاوی ترکیبات دارویی بسیار مهمی از جمله شیکوریک اسید، اینولین، اسکولین، کومارین و فلاونوئیدها می‌باشد. بیش از ۱۰۰ ترکیب منحصر به فرد و ارزشمند در این گیاه دارویی گزارش شده است که بیشتر این ترکیبات در ریشه هستند. در این تحقیق، القای ریشه‌های مویین توسط *A. rhizogenes* سویه‌ی A_4 انجام شد. تأثیر نوع ریزنمونه و سه مدت هم‌کشتی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر کارایی القای ریشه‌های مویین بررسی شد. بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۱۰۰ درصد) و تعداد ریشه (۱۴/۷۲ ریشه در هر ریزنمونه) در ریزنمونه‌ی کوتیلدون و ۷۲ ساعت هم کشتی حاصل شد. تائید مولکولی ریشه‌های مویین به‌وسیله‌ی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B انجام شد. در آزمایش دیگری، تأثیر غلظت‌های مختلف NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز (۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) بر میزان تجمع زیست‌توده بررسی شد و بیشترین وزن تر (۱/۹۳ گرم) و وزن خشک (۰/۱۳ گرم) ریشه‌های مویین در محیط کشت MS حاوی ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز حاصل شد.

***کلمات کلیدی:* ریشه‌های مویین، ژن *rol*B، متابولیت‌های ثانویه، نفتالین استیک اسید، هم‌کشتی.**

مقدمه

سیستم کشت ریشه‌های مویین، به علت 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. باکتری خاکزی *Agrobacterium rhizogene* از طریق درج قسمتی از ژن‌های خود موسوم به ناحیه‌ی T-DNA در ژنوم گیاهی، موجب القای ریشه‌های مویین در نزدیکی محل ورود خود به داخل گیاه می‌شود. بخش T-DNA شامل ژن‌هایی است که آنزیم‌های سنتز هورمون‌های اکسین و سایتوکینین را رمز می‌کنند.

کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. گونه‌ای از تیره‌ی Asteraceae می‌باشد که بسته به مناطق مختلف، به‌صورت یک‌ساله، دوساله و چندساله رشد می‌کند. تقریباً تمام قسمت‌های گیاه کاسنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله ترکیبات برگ کاسنی شیکوریک اسید، سولفات و فسفات‌های سدیم، منیزیم، پتاسیم و نیترات پتاسیم است. ریشه دارای ۱۵-۱۱درصد اینولین، قندهای مختلف از قبیل گلوکز، فروکتوز و ساکارز، شیکوریک‌اسید، پکتین، سسکویی‌ترپن‌لاکتون، اسید تارتاریک می‌باشد. از ریشه‌ی این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی و التیام زخم، همچنین به‌عنوان اشتهاآور، محرک صفرا و کمک‌کننده به عمل هضم غذا و تب‌بر استفاده می‌شود (Yang *et al.*,

2009). اینولین موجود در کاسنی تا حدود ۴۰ درصد از میزان تری‌گلیسریدها می‌کاهد و تا ۳ درصد در کاهش کلسترول خون مؤثر است (Ewa *et al*., 2002) همچنین تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی بوده و بدن را در مقابل عوامل بیماری‌زا مقاوم می‌کند (Taper *et al*., 2002). شیکوریک اسید خواص ضدویروس HIV داشته و همچنین با تحریک ترشح انسولین و جذب گلوکز، برای کاهش قند خون مفید می‌باشد (Lee *et al*., 2010). با توجه به اهمیت کبد در تصفیه‌ی بدن از سموم، و کمبود داروهای کبدی در کشور، اهمیت ریشه‌ی کاسنی در درمان بیماری‌های کبدی و صفراوی بیش از پیش مورد توجه است.

بسته به گونه‌ی گیاهی روش‌های زراعی سنتی اغلب نیاز به ماه‌ها و حتی سال‌ها زمان جهت تولید محصول دارند. به‌علاوه مقدار متابولیت تولید شده تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله عوامل بیماری‌زا یا تغییرات آب و هوایی می‌باشد. کشت بافت گیاهان دارویی و به‌ویژه کشت ریشه‌های مویین به‌عنوان یک راه حل جهت تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش معرفی شده است (Hasanlu *et al*., 2009). لذا هدف از این تحقیق بهینه‌سازی القا و کشت ریشه‌ی مویین گیاه کاسنی با استفاده از *A. rhizogenes* و NAA در شرایط درون شیشه‌ای خواهد بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه‌ی ریزنمونه

به‌منظور تهیه‌ی گیاهچه‌ی استریل، بذور کاسنی به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بنومیل ۲ درصد قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر استریل، به داخل هود لامینار انتقال داده شد و ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در دو مرحله و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه (و یک دقیقه آبکشی در بین دو مرحله) شستشو داده شد و پس از چند بار آبکشی، در نهایت با الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه ضدعفونی گردید و پس از ۱۵ دقیقه شستشو با آب استریل، در محیط کشت MS جامد کشت گردید و در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ۵ روزه جهت تلقیح با باکتری استفاده شد.

القای ریشه‌های مویین

به‌منظور القای ریشه‌های مویین، از *A.rhizogenes* سویه‌ی A_4 استفاده شد. تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری به شرح زیر انجام شد. یک کلونی از باکتری در محیط کشت LB (Bertani, 1952) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، کشت گردید. کشت باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و با چرخش ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. میزان OD_{600} سوسپانسیون باکتری برای تلقیح در محیط کشت LB ، ۰/۶ در نظر گرفته شد. ریزنمونه‌ها در شرایط استریل در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی 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 در آب استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک شدن در روی کاغذ صافی، 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 و میانگین تعداد ریشه‌ها محاسبه گردید.

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین

جهت تأیید مولکولی ریشه‌های مویین، استخراج DNA به روش CTAB (Khan *et al.*, 2007) از ریشه‌های مویین و همچنین ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تلقیح نیافته به‌عنوان شاهد انجام شد. پلاسمید *A. rhizogenes* سویه A_4 نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برنامه‌ی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن*rol*B 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.

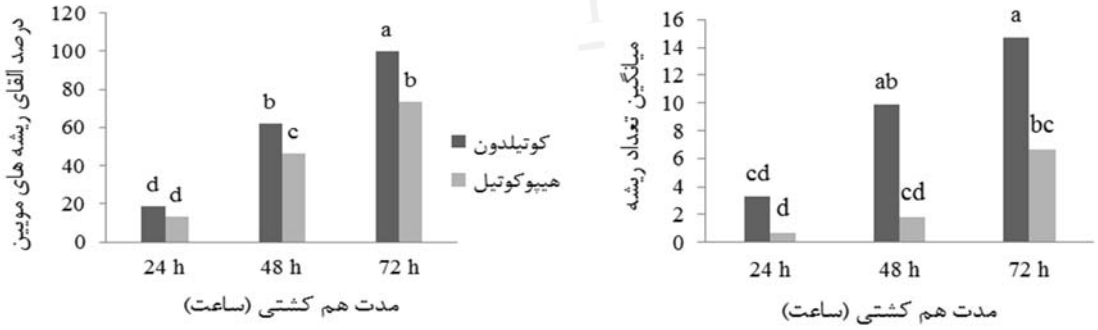
تیمار غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن و بر کشت ریشه‌های مویین

ریشه‌های مویین حاصل از کوتیلدون‌های ۵ روزه به طول ۲ سانتی‌متر برش داده شدند و به ظروف شیشه مربا حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ۳ تکرار انتقال یافت . در هر تکرار ۵۰ میلی‌گرم ریشه کشت گردید. هورمون NAA در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز در چهار غلظت (۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) به‌تنهایی یا به‌صورت ترکیب مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بعد از کشت، ریشه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. بعد از چهار هفته، وزن تر ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. پس از خشک کردن ریشه‌ها در آون در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک ریشه‌ها اندازه‌گیری شد

نتایج و بحث

تأثیر نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدون

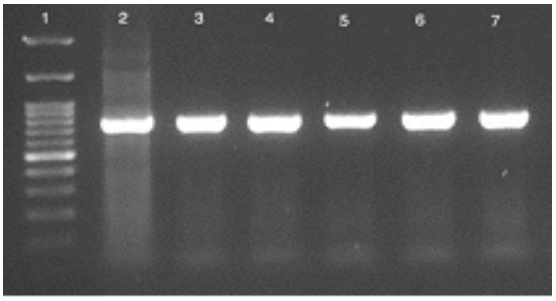
نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه‌ها معنی‌دار نبوده اما اثرات اصلی نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد تولید ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد مدت ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه‌های کوتیلدون با *A. rhizogenes*، با ۱۰۰ درصد تراریختی و میانگین ۱۴/۷۲ عدد ریشه در هر ریزنمونه بیشترین تأثیر را در القای ریشه‌های مویین داشته است (شکل ۲). سن ریزنمونه عاملی تأثیرگذار در القای ریشه‌های مویین می‌باشد و هرچه ریزنمونه از گیاهچه‌ی جوان‌تر تهیه شود درصد القای ریشه‌های مویین بیشتر است(Zhi-Bi & min, 2006).



شکل ۱- تأثیر نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر درصد القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه‌ها

تائید مولکولی ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز، حضور نوار bp ۷۶۰ 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 ۲- تکثیر قطعهDNA به‌اندازه‌ی bp ۷۶۰ در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن Brol بر روی DNA ریشه‌های مویین:. 1- نشانگر اندازه‌ی DNA یک کیلوبازی، 2-*A. rhizogenes* سویه‌ی A_4 به‌عنوان کنترل مثبت، 8-3- ریشه‌های مویین،

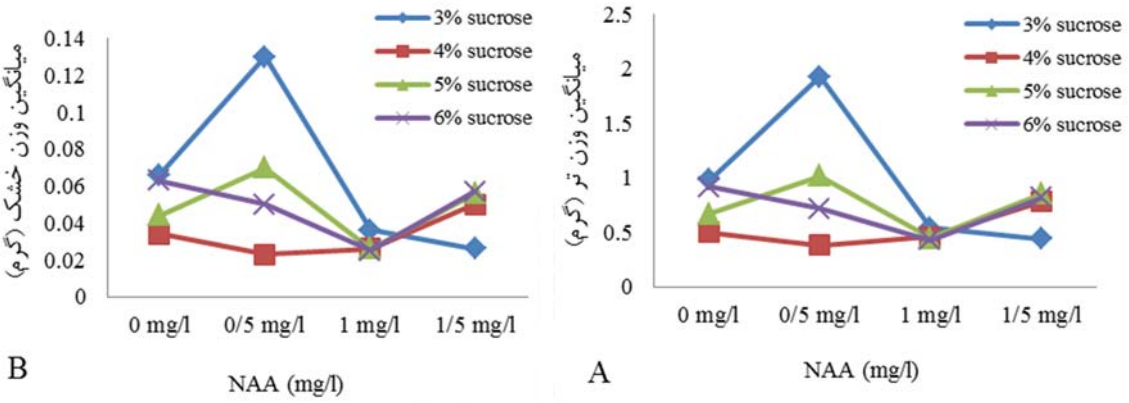
بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن بر کشت ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل هورمون NAA و غلظت‌های مختلف ساکارز بر وزن‌تر و خشک و شاخص رشدی ریشه‌های مویین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین وزن تر (۱/۹۳ گرم)، وزن خشک (۰/۱۳ گرم) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز بدست آمد و بعد از آن، بیشترین وزن تر (۱/۰۲ گرم) و وزن خشک (۰/۰۷ گرم) متعلق به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵ درصد ساکارز بود (شکل ۳). مطابق با نتایج حاصل، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم NAA بیشترین تأثیر را در تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاه *Plumbagoindica* نسبت به GA_3، IBA و IAA داشته است (Gangopadhyay*et al.*, 2011). همچنین استفاده از منبع مناسب برای کربن در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه حائز اهمیت است (Wu *et al.*, 2006). ساکارز به‌عنوان منبع کربن نقش بسزایی در رشد ریشه و افزایش انشعابات ریشه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Malamy and Ryan, 2001). البته در برخی موارد افزایش غلظت ساکارز موجب بازدارندگی از رشد ریشه شده است که احتمالاً به علت تنش اسمزی می‌باشد (Nguyen *et al.*, 1992).

جدول۱- تجزیه واریانس تأثیر NAA و ساکارز بر روی وزن‌تر و خشک ریشه‌های مویین

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات	
		وزن تر	وزن خشک
NAA	۳	۰/۵۹**	۰/۰۰۳**
ساکارز	۳	۰/۳۹**	۰/۰۰۲**
NAA × ساکارز	۹	۰/۳۹**	۰/۰۰۲**
اشتباه آزمایشی	۳۲	۰/۰۳	۰/۰۰۰۲

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳- مقایسه‌ی تأثیر محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA و ساکارز بر میزان رشد و تجمع زیست‌توده در ریشه‌های مویین. A: میزان وزن تر ریشه‌های مویین، B: میزان وزن خشک ریشه‌های مویین.

منابع

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

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

Gangopadhyaya, M., Dewanjeeb, S., Chakrabortyc, D. and Bhattacharyaa, S. 2011. Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Industrial Crops and Products*; 33: 445-450.

Hasanlu, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H. 2008. Hairy roots sources for the production of valuable pharmaceutical compounds. *Journal of Medicinal Plants*; 29: 1-17. (In Persian).

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.

Malamy, J.E. and Ryan, K.S. 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology*; 127: 899–909.

Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. & Giri, A. 1992. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*;11: 424–427.

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

Wu, C.H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J. and Paek, K.Y. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*, J. *Plant Biol*; 49: 193–199.

Yang, Y. 2009. Process Optimization of Extracting Phenols from *Cichorium intybus* cv. Puna with Response Surface Methodology. *Journal of Northwest Forestry University*; 24: 118-120.

Effects of Auxin and Carbon Source on Hairy Roots Growth in Medicinal Plant Chicory (*Cichorium intybus* L.)

Mohebodini M*, Fathi R, Chamani E
Department of Horticutural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili,
*Corresponding Author: Mohebodini@uma.ac.ir

Abstract

Hairy roots induction in medicinal plants in vitro culture is a useful method to increase the production of secondary metabolites. Because hairy roots culture systems have fast growth rate and highly branching and able to produce secondary metabolites in same or greater amount compare to the normal roots. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a medicinal plant from *Asteraceae*. This plant contains many important metabolites include chicoric asid, inulin, scoline, coumarin and flavonoids. Over 100 individual and important compounds have been identified from this medicinal plant and the majority of which are from the roots. In this research, hairy root induction was established through the mediation of the A_4 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. The effects of type of explant and three different co-culture times (24, 48 and 72 Hours) on the efficiency of hairy root induction were investigated. Maximum hairy root induction (100 percent) and number of roots (14.72 roots per explant) induced from 5-day-old cotyledon in 72 hours co-culture. Hairy roots were confirmed by PCR using *rol*B gene-specific primers. In other experiment the effect of various concentration of NAA (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) and sucrose (3, 4, 5 and 6%) were investigated. Maximum fresh weight (1.93g) and dry weight (0.13g) of hairy roots was reached by MS medium supplemented with combination of 0.5 mg/l NAA and 3% sucrose.

***Keywords*: Co-culture, Hairy roots, NAA, *Rol*B gene, Secondary metabolites.**