DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109714

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، صفحه ۱۰۲-۹۰ (۱۳۹۶)

تأثیر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم بر القای ریشه‌های موئین و میزان فنل و پلی‌ساکارید کل در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.)

مریم نوری[۱]، شاهرخ قرنجیک[۲]، اکبر صفی‌پور افشار[۳*] و فاطمه سعید نعمت‌پور[۴]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه پژوهشی زیست‌فناوری، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

۲- استادیار، گروه پژوهشی زیست‌فناوری، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

۳*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران، پست الکترونیک: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۵

چکیده

ریشه‌های موبین القاء شده به‌وسیله باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) به علت پایداری و تولید زیاد ریشه‌ها در شرایط کشت عاری از هورمون، بافتی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند و میزان متابولیت‌های تولید شده می‌تواند تحت تأثیر سویه باکتری قرار بگیرد. در این تحقیق، ابتدا تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز شامل A13، 15834 و A4 بر درصد القای ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفت. سپس در آزمایشی دیگر میزان فنل و پلی‌ساکارید کل ریشه‌های موبین تشکیل شده در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته (شاهد) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که درصد القای ریشه‌های موئین به‌طور معنی‌داری از سویه‌های باکتری تأثیر پذیرفته است، به‌طوری که در برگ‌های گیاه سرخارگل در اثر تلقیح با سویه‌های A13، 15834 و A4 به‌ترتیب ۶۰، ۴۰ و صفر درصد و در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل به‌ترتیب ۸۵، ۴۵ و ۷۰ درصد القای ریشه‌های موبین مشاهده شد. بیشترین مقدار فنل کل در ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 مشاهده شد. همچنین محتوای پلی ساکاریدی ریشه‌های موئین در اثر القاء توسط سویه‌های 15834 و A13 افزایش و در اثر القاء توسط سویه A4 نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. بنابراین تفاوت‌های مشاهده شده در این تحقیق بر درصد القای ریشه‌های موبین و مقدار ترکیب‌های ثانویه می‌تواند به‌دلیل توانایی متفاوت سویه‌های مختلف اگروباتریوم رایزوژنز در انتقال T-DNA به سلول‌های گیاه باشد.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.)، ریشه موئین، متابولیت‌های ثانویه، تراریخته.

مقدمه

گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) از تیره Asteraceae است که از دیرباز مورد توجه بوده و در طب سنتی کاربرد داشته است. مهمترین ترکیب‌های فعال بیولوژیکی این گیاه شامل فلاونوئیدها، اسانس، پلی‌استیلن‌ها، آلکامیدها، ترکیب‌های فنلی و ترکیب‌های پلی‌ساکاریدی مانند اکیناسئین، اکیناکوزید و اکینولون هستند. سرخارگل محرک سیستم دفاعی بدن،

ضدالتهاب، ضدسرطان، ضدمیکروب و عفونت‌های معمولی، ضدعفونت‌های دستگاه تنفسی و ضدویروس است. این گیاه برای پیشگیری و درمان سرماخوردگی‌های ضعیف تا متوسط و آنفولانزا مناسب می‌باشد (Manayi *et al.*, 2015). القای ریشه‌های موئین نتیجه ترانسفورماسیون ژنتیکی باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز است که از طریق انتقال T-DNA پلاسمید Ri باکتری حاوی ژن‌های *rol* و *aux* به گیاه می‌باشد (Sharifi *et al.*, 2014). بنابراین به نظر می‌رسد که ژن *rolB* با افزایش حساسیت به اکسین و ژن‌های *aux1* و *aux2* از طریق بیوسنتز اکسین در سلول‌های تراریخت شده سبب القای پاسخ اکسین و تشکیل ریشه‌های مویین می‌شوند (Majumdar *et al.*, 2011). مطالعات نشان می‌دهد در اثر تراریختی توسط اگروباکتریوم و ایجاد ریشه‌های مویین میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و ترکیب‌های فنلی به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی ازجمله ترکیب‌های گیاهی نقش مهمی را در حذف رادیکال‌های آزاد دارند و موجب افزایش می‌شوند (Cheynier *et al.*, 2013). ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز دارای رشد سریع، پایداری فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و انتقال‌پذیری بوده و اغلب میزان رشد آنها سریع‌تر از کشت سلول‌های گیاهیست. البته سیستم ریشه‌های موئین تراریخت، منبعی نویدبخش در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی با ارزش دارویی بالا می‌باشند (Aarrouf *et al.*, 2012).

ترکیب‌های فنلی یکی از مهمترین دسته ترکیب‌هایی هستند که اثرات محرک سیستم ایمنی آنها اثبات شده‌است. گیاهان، انواع زیادی از ترکیب‌های ثانویه را تولید می‌کنند که دارای یک گروه فنلی هستند. گروه فنلی یک گروه با کارکرد هیدروکسیلی است که روی یک حلقه آروماتیک قرار می‌گیرد و به‌عنوان ترکیب‌های فنلی طبقه‌بندی می‌شود (Cheynier *et al.*, 2013). بیوسنتز ترکیب‌های فنلی گیاه از مسیر شیکمیک اسید آغاز می‌شود و مهمترین آنزیم بیوسنتزکننده این ترکیب‌ها، فنیل‌آلانین آمونیوم‌لیاز (PAL) است. ترکیب‌های فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیب‌ها ازجمله اثر آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و ضدالتهابی آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده‌است. ترکیب‌های فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی می‌توانند نقش مهمی را در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفاء کنند (Dai & Mumper, 2010). پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از گیاه سرخارگل دارای خاصیت تحریک‌کنندگی سلول‌های ایمنی هستند، به‌طوری که باعث افزایش قدرت فاگوسیتوز و ایمنی سلولی لنفوسیت‌هایT می‌شوند. تحقیقات جدید نشان‌دهنده این مطلب است که تأثیر سرخارگل در تقویت سیستم دفاعی بدن مربوط به ترکیب‌های پلی‌ساکاریدی این گیاه مانند اکیناسن و اکیناکوزید و ترکیب‌های آلکیل‌آمیدی آن می‌باشد (Modarresi & Asadi, 2012).

هدف از این تحقیق، مطالعه توانایی سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در تشکیل ریشه‌های موئین و نیز مقایسه محتوای فنل و پلی‌ساکارید کل در ریشه‌های موئین بدست آمده در گیاه دارویی سرخارگل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تیمارها و طرح آزمایش

این پژوهش در سال ۱۳۹۴ و در محل آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور و در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل سویه باکتری با سه سطح (A4، A13، 15834) و ریزنمونه با دو سطح (برگ و هیپوکوتیل) بود. این آزمایش برای بررسی درصد القای ریشه‌های موئین توسط سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز انجام شد و آزمایش دیگر بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار (سویه‌های A13، A4، 15834 و بدون باکتری (شاهد)) و چهار تکرار برای اندازه‌گیری مقدار فنل کل و محتوای پلی‌ساکاریدی انجام گردید.

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذر گیاه سرخارگل از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرهای سرخارگل در الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و بعد سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی، بذرها روی محیط کشت جامد MS (Murashige & Skoog, 1962) قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل برای تلقیح با باکتری استفاده گردید.

آماده‌سازی سویه‌های اگروباکتریوم و تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم

در این مطالعه از باکتری *A. rhizogenes* سویه‌های A_4 و 15834 تیپ اگروپین (Sevon & Oksman-Caldentey, 2002) و سویه A_{13} تیپ میکی‌موپین (Pakdin *et al.*, 2013) برای تلقیح استفاده شد. سویه های باکتری در محیط کشت LB مایع (LB حاوی: عصاره مخمر پنج گرم در لیتر، پپتون ۱۰ گرم در لیتر، NaCl ۱۰ گرم در لیتر، PH:۷) حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپیسین (به‌استثنای سویه A13، به‌دلیل حساسیت این سویه به آنتی‌بیوتیک) کشت و بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از رشد و اندازه‌گیری OD_{600}=۰/۴-۰/۵ (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر) سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۳۸۰۰ دور در دقیقه انجام شد و رسوب حاصل برای تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. برای تراریخت کردن از روش هم‌کشتی تحت شرایط استریل استفاده شد. در این روش، ابتدا ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون تلقیح حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط MS½ مایع، ۱۰۰۰ میکرولیتر رسوب باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و ۱۰۰ میکرومولار ماده القاءکننده استوسرینگون به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند، بعد از این مدت ریزنمونه های تلقیح شده روی کاغذ صافی استریل خشک و به محیط MS ½ جامد فاقد هورمون انتقال داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. نمونه شاهد نیز با آب مقطر استریل شستشو و بدون تلقیح با باکتری در محیط کشت قرار گرفت. دو روز بعد از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط تازه MS ½ جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای حذف باکتری منتقل شدند و کشت ها در فواصل دو هفته‌ای تا حذف کامل باکتری واکشت شدند. ریشه‌های موئین بعد از هفت تا ۱۴روز ظاهر شدند.

بررسی مولکولی ریشه‌های موئین

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های موئین و طبیعی به روش CTAB انجام شد (Cullings, 1992؛ Doyle & Doyl, 1987). برای تأیید تراریختی ریشه‌های موئین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از طریق تکثیر قطعه‌ای از ژن *rolB* انجام شد. به این منظور از توالی آغازگر اختصاصی ژن *rolB* استفاده شد:

F-*rolB*: 5’ -ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA- 3’

R-*rolB*: 5’ -TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3’

همچنین از پلاسمید القاءکننده ریشه‌های موئین (Ri) باکتری آگروباکتریوم سویه A_4 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته‌سازی DNA الگو به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای به مدت یک دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در

۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بررسی محصول واکنش PCR، از الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱٪ به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده گردید.

روش عصاره‌گیری برای استخراج ترکیب‌های فنلی

برای عصاره‌گیری از روش عصاره‌گیری گرم استفاده شد (Hajimahdipour *et al.*, 2009). ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌گرم از پودر خشک شده ریشه‌های موئین و ریشه‌های غیرتراریخته (شاهد) به دقت وزن شده و در داخل دو میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ کاملاً ساییده شد، آنگاه مخلوط حاصل به مدت دو ساعت در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از گذشت دو ساعت سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و مایع رویی با حلال متانول ۸۰٪ به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. این عصاره بدست آمده برای اندازه‌گیری فنل کل مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فنل کل

مقدار فنل کل به روش فولین سیوکالتو (Hajimahdipour *et al.*, 2009) و بر مبنای منحنی استاندارد اسیدگالیک (R^2=0.9863, y=3.7303+0.0595) محاسبه گردید. بدین منظور ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار ریخته شد و پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق شده با آب به نسبت (۱:۱۰)، در بن‌ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ۶٪ افزوده و دوباره در بن‌ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه، جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد آب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ($T80^+$, PG Instruments, UK) در کوت ۳ میلی‌لیتری اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است در نمونه به جای عصاره ۴۰۰ میکرولیتر، آب مقطر درون لوله آزمایش ریخته شد. این مراحل روی هر یک از محلول‌های استاندارد اسید گالیک با غلظت‌های مورد نظر نیز انجام شد و منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر جذب رسم شد.

اندازه‌گیری پلی‌ساکارید کل

محتوای پلی‌ساکارید به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از روش فنل- اسید سولفوریک (Sheligl, 1986) و بر مبنای منحنی استاندارد گلوکز (R^2= 0.9886, y= 6.9629x-0.0054) محاسبه گردید. در این روش ابتدا مقدار ۰/۱۱ گرم پودر گیاهی به ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس به‌منظور جدا کردن فاز جامد از مایع، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از تبخیر الکل (در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها افزوده، آنگاه ورتکس شد. به‌منظور حذف رسوبات اضافی و ترکیب‌های دیگر، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ سولفات روی و ۴/۷ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید باریوم ۳٪ به آن اضافه و دوباره ورتکس انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره شناور به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. به هر لوله مقدار یک میلی‌لیتر محلول ۵٪ فنل اضافه و فالکون به‌شدت تکان داده شد تا کف کند. یک تیوب نیز به‌عنوان شاهد با همین محتویات آماده گردید. مقدار ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ به داخل هر یک از نمونه‌ها افزوده شد، آنگاه به‌دلیل وجود قند رنگ نمونه به سمت رنگ نارنجی تغییر پیدا کرد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه‌ای مایل به زرد، میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید.

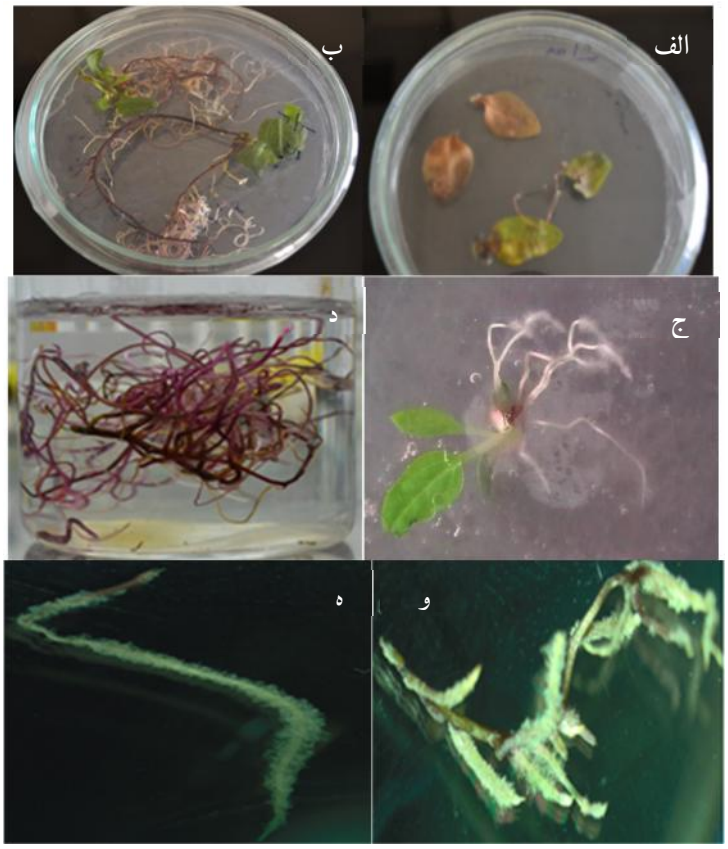
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج

تأثیر انواع سویه باکتری و ریزنمونه در میزان القای ریشه موئین

در این مطالعه قدرت بیماری‌زایی اگروباکتریوم رایزوژنز توسط کارایی ترانسفورماسیون (زمان تشکیل ریشه موئین براساس تعداد روز بعد از تلقیح با باکتری) و درصد تشکیل ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل تعیین گردید. نتایج نشان داد از بین سویه‌های مورد مطالعه سویه‌های A4، 15834 و A13 در ریزنمونه هیپوکوتیل و سویه‌های 15834 و A13 در ریزنمونه برگ موفق به القای ریشه موئین شدند (شکل ۱). در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، هفت تا ۱۰ روز و در ریزنمونه‌های برگی ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از هم‌کشتی و شستشو با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (برای حذف باکتری) و انتقال یافته به محیط فاقد هورمون ریشه‌های موئین ظاهر شدند. در این بررسی مشاهده شد که کارایی ترانسفورماسیون در انواع ریزنمونه و سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز متفاوت می‌باشد، به‌طوری که در ریزنمونه هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه A4، هفت روز بعد از هم کشتی، ریشه‌های مویین ظاهر شدند. از این‌رو کارایی ترانسفورماسیون در این سویه سریع‌تر از سایر سویه‌ها بود. در ریزنمونه‌های برگی تلقیح یافته با سویه‌های A13 و 15834، به‌ترتیب ۱۰ و ۱۵ روز بعد از تلقیح، ریشه‌های موئین مشاهده شدند. در ریزنمونه‌های برگی تلقیح یافته با سویه A4 نیز هیچ ریشه‌ای مشاهده نشد و بعد از گذشت یک ماه ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند.



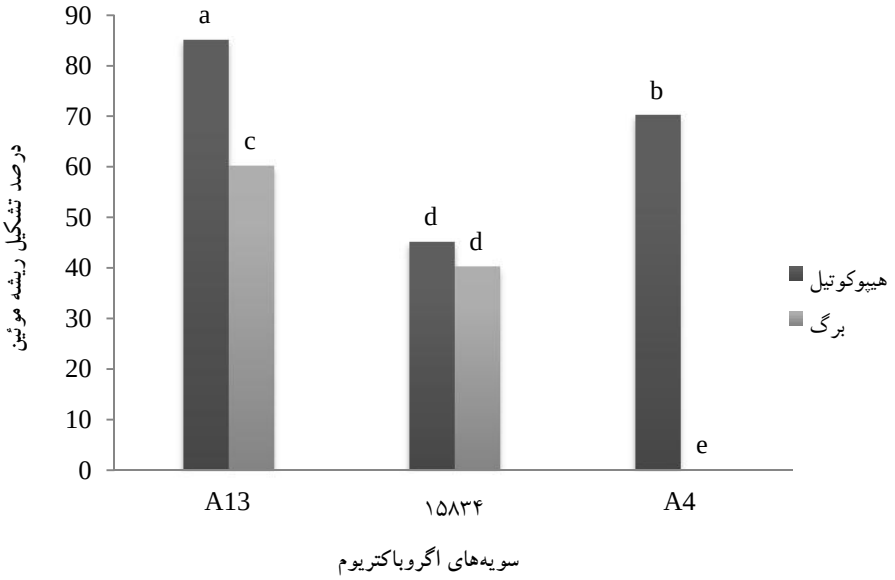
شکل ۱- تشکیل ریشه‌های موئین در ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل

الف) عدم تلقیح (شاهد)؛ ب) ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با سویه A13 در ریزنمونه برگ؛

ج) ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با سویه A13 در ریزنمونه هیپوکوتیل؛ د) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع؛

ه) تصاویر تهیه شده از ریشه‌های مویین با استرئومیکروسکوپ ۲۴ روز بعد از تلقیح

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش بین سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و انواع ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بر درصد تشکیل ریشه موئین در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۲) نشان داد که سویه A13 در ریزنمونه هیپوکوتیل، بالاترین درصد تشکیل ریشه موئین (۸۵٪) را دارد و اختلاف معنی‌داری با ترکیب تیماری سویه A13 و ریزنمونه برگ (۶۰٪) نشان داد. همچنین در اثر تلقیح با سویه‌های A4 و 15834 به‌ترتیب ۷۰٪ و ۴۵٪ ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل تولید شد. کمترین میزان درصد القای ریشه موئین از ترکیب تیماری سویه A4 و ریزنمونه برگ (صفر) بدست آمد. بین ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه 15834 از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.



شکل ۲- مقایسه میانگین سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر تشکیل ریشه موئین

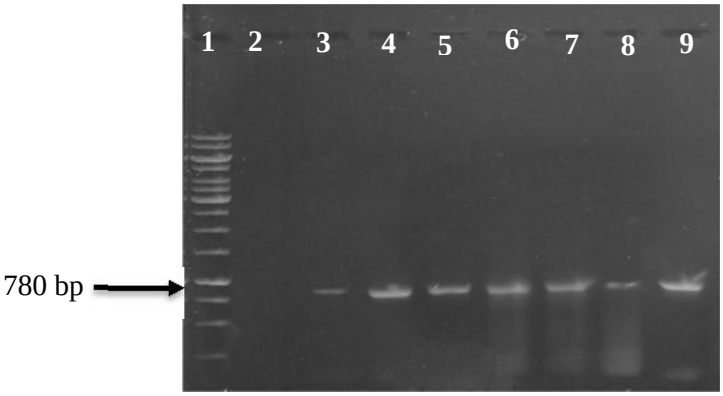
جدول ۱- میانگین مربعات درصد القاء ریشه موئین تحت تأثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه گیاهی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد القاء ریشه موئین
سویه باکتری	۲	۰/۳۱ **
ریزنمونه	۱	۰/۶۶ **
ریزنمونه × سویه باکتری	۲	۰/۲۲ **
خطا	۱۵	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات		۱۲/۶۴

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.

بررسی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

برای اثبات تراریختی ریشه‌های موئین، از روش PCR برای تکثیر قسمتی از ژن *rolB* استفاده شد. آغازگرهای طراحی شده برای ژن *rolB* طبق پیش‌بینی، قطعه‌ای به اندازه ۷۸۰ جفت باز را تکثیر کردند که در نمونه‌های تراریخت و شاهد مثبت پلاسمیدی وجود داشت، اما شاهد منفی (نمونه غیرتراریخت) فاقد باند در این محل بود (شکل ۳).



شکل ۳- تکثیر قطعه DNA منطبق بر اندازه مورد انتظار (780bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* اگروباکتریوم رایزوژنز روی DNA ژنومی ریشه‌های موئین سرخارگل

۱: نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی، ۲: عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی، ۳ و ۴: قطعه تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه A4، ۵ و ۶: قطعه تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه A13، ۷ و ۸: قطعه تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه 15834، ۹: قطعه تکثیر شده از DNA باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A13

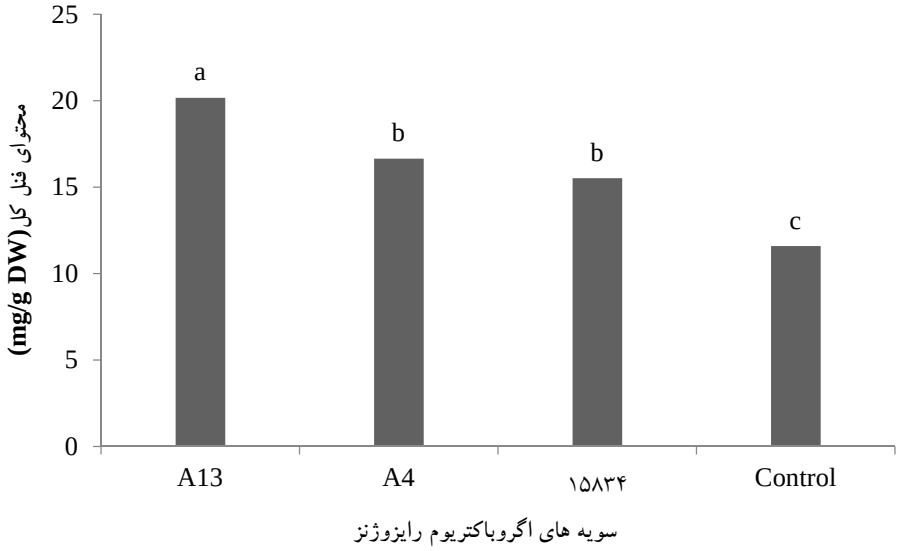
محتوای فنل و پلی‌ساکارید کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان فنل کل در ریشه‌های موئین نسبت به نمونه شاهد (ریشه طبیعی) براساس سویه باکتری استفاده شده برای القای ریشه‌های موئین، در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان فنل (۲۰/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مربوط به کشت‌های بدست آمده از سویه A13 و کمترین مقدار فنل (۱۱/۵۸ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مربوط به نمونه‌های شاهد بود (شکل ۴).

جدول ۲- میانگین مربعات محتوای پلی‌ساکاریدی و میزان ترکیب‌های فنلی تحت تأثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز

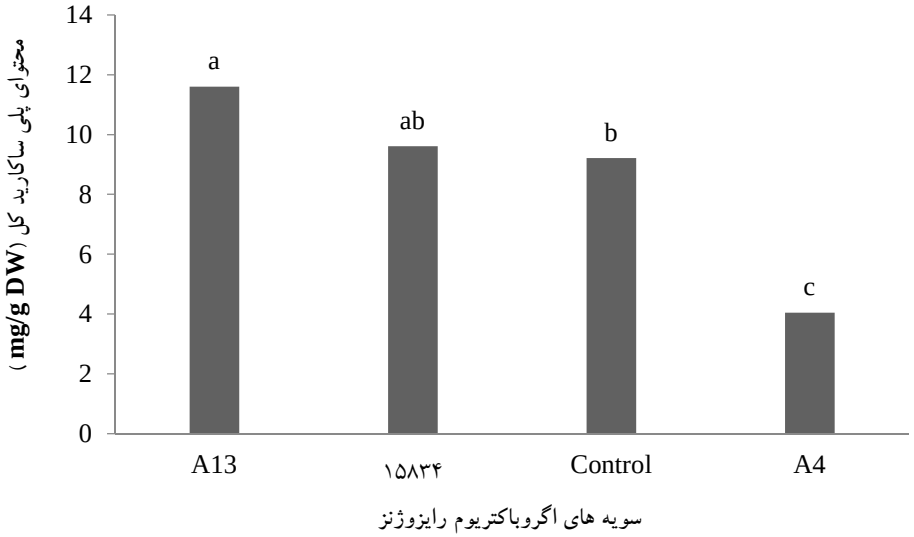
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		محتوای پلی‌ساکارید	میزان ترکیب‌های فنلی
سویه باکتری	۳	۰/۱۸ **	۰/۰۶۸ **
خطا	۱۲	۰/۰۰۷ **	۰/۰۰۵ **
ضریب تغییرات		۱۴/۳۶	۱۱/۲۹

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.



شکل ۴- تغییرات میزان فنل کل ریشه‌های موئین براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح آماری ۵٪ برای سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان محتوای پلی‌ساکارید کل ریشه‌های موئین در مقایسه با نمونه شاهد (ریشه طبیعی) در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان پلی‌ساکاریدها (۱۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به کشت‌های حاصل از سویه A13 بود، در حالی‌که کشت‌های حاصل از سویه A4 کمترین میزان پلی‌ساکارید (۴/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را نشان داد که حتی از نمونه شاهد (۷/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) کمتر بود (شکل ۵).



شکل ۵- محتوای پلی‌ساکارید کل ریشه براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح آماری ۵٪ برای سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز

بحث

در سال‌های اخیر، کشت ریشه موئین به‌عنوان یک راهکار مناسب برای توسعه گیاهان دارویی ازجمله گیاه دارویی سرخارگل انتخاب شده است. ازجمله مزایای کشت ریشه‌های موئین، افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه برای اهداف صنعتی و همچنین پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی آنها می‌باشد. انتقال T-DNA از طریق آگروباکتریوم به عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ و نوع ریزنمونه گیاهی، عوامل فیزیکی و شیمیایی مانند دما و دوره هم‌کشتی، سویه باکتری و مولکول‌های پیام‌رسان مانند استوسرینگون وابسته است (Zhou *et al.*, 2012). از این‌رو یکی از فاکتورهای اصلی در القای ریشه‌های موئین، نوع ریزنمونه استفاده شده می‌باشد. در این آزمایش دو نوع ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل و سه نوع سویه باکتری A4، 15834 و A13 استفاده شد. درصد تشکیل ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل، در اثر تلقیح با سه سویه 15834، A4 و A13 به‌طور میانگین بین ۸۵٪-۴۵٪ بود و میانگین درصد القای ریشه موئین در ریزنمونه برگ با دو سویه 15834 و A13، ۴۰٪ تا ۶۰٪ بود. از این‌رو نتایج نشان می‌دهند که هر دو نوع ریزنمونه در القای ریشه موئین مؤثر هستند. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، پاسخ سریع ریزنمونه هیپوکوتیل سرخارگل به آگروباکتریوم رایزوژنز می‌تواند ناشی از چند عامل باشد؛ اول اینکه ممکن است در زمان تلقیح محل زخم در ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه برگ، بیشتر در تماس با باکتری قرار گرفته باشد. عامل دوم ممکن است به‌دلیل تفاوت در شرایط فیزیولوژیکی باشد، زیرا قابلیت ریزنمونه‌ها در پاسخ به آگروباکتریوم رایزوژنز در بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت است. در ریزنمونه هیپوکوتیل به‌دلیل وجود سلول‌های مریستمی، تقسیمات سلولی در محل زخم ایجاد شده سریع‌تر آغاز می‌شود. سلول‌های غیر فعال برگ به زمان بیشتری برای تقسیمات سلولی نیاز دارند، همچنین فاکتورهایی مثل هورمون‌ها، فشار تورژسانس و کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) در گسترش و تمایز این سلول‌ها تأثیرگذار می‌باشند (Ishida *et al.*, 2011).

در این مطالعه تأیید شده که توانایی سویه‌های مختلف در انتقال ژن به سلول گیاهی متفاوت است. از بین سویه‌های بررسی شده در این آزمایش، سویه A13 بیشترین کارایی را در تشکیل ریشه‌های موئین داشت. این تفاوت در بیماری‌زایی و ریخت‌شناسی، به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه‌های باکتری مرتبط است (Ooi *et al.*, 2013). همچنین دلیل دیگر این تفاوت‌ها، بیان متفاوت ژن‌های T-DNA ریشه‌های تراریخته، تعداد کپی‌های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNA به ژنوم گیاه می‌باشد (Akramian *et al.*, 2008). موفقیت در تولید ریشه موئین با سویه A13 اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاهان دارویی متعددی گزارش شده‌است. به‌عنوان نمونه، ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل گرفته شده از محور جنینی بادام زمینی با سویه A13 ریشه‌های موئین را ایجاد کردند (Geng *et al.*, 2012). در مطالعه Kabirnataj و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد که سویه A13 بالاترین کارایی را در انتقال T-DNA به گیاه کاسنی دارد. در تحقیق Ooi و همکاران (۲۰۱۳) سویه‌های A13 و A4 اگروباکتریوم رایزوژنز بالاترین درصد القای ریشه‌های موئین را در گیاه تاجریزی (*Solanum mammosum*) به‌ترتیب با ۸/۱۳٪ و ۱۰/۶۰٪ نشان دادند.

از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بین ریشه‌های طبیعی و ریشه‌های موئین تفاوت وجود داشت. ریشه‌های طبیعی دارای الگوی رشد زمین‌گرایی (Geotropic) بودند، در حالی‌که ریشه‌های موئین انشعابهای فراوان، رشد سریع و پاسخ رشد عدم زمین‌گرایی (Plagiotropic) را نشان دادند که ممکن است رشد عدم زمین‌گرا به‌دلیل فقدان آمیلوپلاست در دانه‌های نشاسته‌ای ریشه‌های موئین باشد. آمیلوپلاست‌های نوک ریشه به‌عنوان حسگر ثقلی عمل کرده و رشد ریشه را به سمت پایین هدایت می‌کنند (Zheng *et al.*, 2015).

طی سال‌های اخیر، کشت ریشه‌های موئین برای تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعه مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها کمک قابل توجهی به بهبود و تقویت تحقیقات در زمینه بیوسنتز

متابولیت‌های ثانویه کرده است. نتایج بدست آمده از این مطالعه نیز حکایت از این دارد که ترکیب‌های فنلی در ریشه‌های موئین نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در بررسی‌های انجام شده توسط Kabirnataj و همکاران (۲۰۱۳) در بین کلون‌های ریشه‌های موئین کاسنی حاصل از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، مقدار ترکیب‌های فنلی تغییرات معنی‌داری نشان دادند. دلیل این تفاوت را می‌توان به علت حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف دانست. باتوجه به عدم قطعیت در تعداد کپی و مکان ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان و همچنین برهم‌کنش آنها با ژن‌های اطراف، ریشه‌های موئین ایجاد شده اغلب الگوهای متفاوتی را از تجمع متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهند. از مهمترین دلایل اهمیت ترکیب‌های فنلی، عملکرد آنها در مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد. تنش‌هایی مانند جراحت و آلودگی میکروبی سبب افزایش بیوسنتز ترکیب‌های فنلی می‌شود، بنابراین فاکتورهای محیطی تأثیر به‌سزایی در محتوای فنل‌ها دارند (Cheynier *et al.*, 2013). همچنین بیان آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) نیز در اثر زخم و جراحت افزایش یافته و منجر به بیوسنتز محصولات فنلی بیشتری می‌شود. از آنجا که استفاده از آگروباکتریوم به‌منظور تلقیح و ایجاد ریشه موئین خود می‌تواند به‌عنوان نوعی عامل پاتوژن برای گیاه عمل کند، به نظر می‌رسد که گیاه با بکارگیری سیستم دفاعی خود اقدام به مقابله با باکتری می‌کند و درپی آن مقادیر فنل تولید شده بالا می‌رود. در مطالعه انجام شده توسط Lee و همکاران (۲۰۱۰)، مقدار فنل کل در برگ و ساقه دو واریته ریحان (*Ocimum basilicum*) شامل *Sweet basil* و *Thai basil* سنجیده شد. مقدار فنل کل در *Sweet basil*، ۵/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و ۲/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ساقه و در *Thai basil*، ۶/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و ۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ساقه بود. براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، محتوای پلی‌ساکارید کل در ریشه‌های القاء شده توسط سویه‌های A13 و 15834 افزایش و این ترکیب‌ها در کشت‌های حاصل از سویه A4 کاهش یافتند. نتایج موجود، تثبیت پایداری کشت ریشه‌های موئین با افزایش سرعت رشد و نیز تولید متابولیت‌های ثانویه را در این گیاه نشان دادند.

رشد پایدار ریشه‌های تراریخته و وجود طیف گسترده‌ای از تولیدات ثانویه مهم ازجمله مشتقات اسید کافئیک، ترکیب‌های فنلی و آلکامیدها بیانگر این است که کشت ریشه‌های موئین سرخارگل، قابلیت شگرفی را به‌عنوان یک سیستم تولیدی مناسب دارند. این ریشه‌ها می‌توانند منبعی نویدبخش در تولید پایدار و متوازن متابولیت‌ها تحت شرایط کنترل شده باشند، بدون اینکه توانایی بیوسنتزی و ژنتیکی خود را از دست بدهند (Samadi *et al.*, 2012). همچنین می‌توان بیان کرد که آنها بهترین انتخاب در مهندسی متابولیک مسیرهای متابولیت‌های ثانویه در افزایش تجمع و ترشح متابولیت‌های با ارزش بالا خواهند بود (Setamam *et al.*, 2014). حتی در مورد گیاهانی که متابولیت‌های ثانویه آنها در بخش هوایی انباشته می‌شوند در کشت ریشه‌های موئین این گیاهان نیز تجمع متابولیت‌ها دیده شده‌است (Chattopadhyay *et al.*, 2011).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی در این مطالعه می‌توان گفت که ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل استفاده شده موفق به تولید ریشه موئین شدند. نتایج تلقیح سه سویه A13، A4 و 15834 و انواع ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های موئین و فراوانی تشکیل ریشه‌ها معنی‌دار شد. داده‌های بدست آمده در این مطالعه نیز افزایش میزان فنل و پلی‌ساکارید کل را در ریشه‌های تراریخت نسبت به نمونه‌های غیرتراریخت تأیید می‌کند. از نتایج این پژوهش می‌توان استنباط کرد که سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار می‌باشند. بنابراین می‌توان با انتخاب سویه مناسب تولید این ترکیب‌ها را در کشت‌های ریشه موئین افزایش داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور که تمامی امکانات لازم را برای انجام این پژوهش فراهم کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Aarrouf, J., Castro-Quezada, P., Mallard, S., Caromel, B., Lizzi, Y. and Lefebvre, V., 2012. *Agrobacterium rhizogenes*-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. Plant cell reports, 31(2): 391-401.
- Akramian, M., Fakhr Tabatabaei, S.M. and Mirmasoumi, M., 2008. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 3(5): 759-763.
- Chattopadhyay, T., Roy, S., Mitra, A. and Maiti, M.K., 2011. Development of a transgenic hairy root system in jute (*Corchorus capsularis* L.) with gusA reporter gene through *Agrobacterium rhizogenes* mediated co-transformation. Plant Cell Reports, 30(4): 485-493.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V. and Martens, S., 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant physiology and biochemistry: PPB/Societe francaise de physiologie vegetale, 72: 1-20.
- Cullings, K.W., 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology, 1: 233-240.
- Dai, J. and Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules (Basel, Switzerland), 15(10): 7313-7352.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.
- Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P.M., Shu, C., Song, F., Huang, D. and Zhang, J., 2012. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109(3): 491-500.
- Hajimahdipour, H., Khanavi, M., SHekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M., 2009. Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plants, 4(8): 145-152.
- Ishida, J.K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S. and Shirasu, K., 2011. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. PloS one, 6(10): e25802.
- Kabirnataj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G.A. and Shokri, E., 2013. Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Crop Biotechnology, 4: 61-75.
- Lee, S.Y., Kim, S.G., Song, W.S., Kim, Y.K., Park, N.I. and Park, S.U. 2010. Influence of different strains *of Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubiaakane nakai*. Romanian Biotechnological Letters, 15: 5405-5409.
- Majumdar, S., Garai, S. and Jha, S., 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant cell Reports, 30(5): 941-954.
- Manayi, A., Vazirian, M. and Saeidnia, S., 2015. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. Pharmacognosy Reviews, 9(17): 63-72.
- Modarresi, M. and Asadi, S., 2012. Study the effect of Echinacea hydroalcoholic extract on blood parameters in mice. Yafteh, 4(2): 43-49.
- Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J. and Maziah, M., 2013. Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 29(3): 421-430.
- Pakdin, A., Farsi, M., Nematzadeh, G.A. and Mirshamsi, A., 2013. Effect of diferent *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Valeriana officinalis* L. Continental Journal of Biological Sciences, 6(2): 9-15.
- Samadi, A., Carapetian, J., Heidari, R., Jafari, M. and Hassanzadeh ghortapeh, A., 2012. Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. *mucronatum*, an anti-tumor lignans producing plant. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(1): 125-131.
- Setamam, M.D., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, N.Z. and Che Mohd Zain, Ch.R., 2014. Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium*

- Sheligl, H.G., 1986. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta journal, 47-51.
- Zheng, Z., Zou, J., Li, H., Xue, S., Wang, Y. and Le, J., 2015. Microrheological insights into the dynamics of amyloplasts in root gravity-sensing cells. Molecular Plant, 8(4): 660-663.
- Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Wu, Y.M. and Tang, Y.X., 2012. An protocol for genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes* A4. Applied biochemistry and biotechnology, 166(7): 1674-1684.

rhizogenes in different types of *Capsicum* species explants. BMC Research Notes, 7: 414.
- Sevon, N. and Oksman-Caldentey, K.M., 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica, 68: 859-868.
- Sharifi, S., Sattari, T.N., Zebarjadi, A., Majd, A. and Ghasempour, H., 2014. The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and ss-carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L. Physiology and molecular biology of plants, 20(1): 69-80.

The influence of different strains of Agrobacterium on hairy root induction and the content of total phenolics and polysaccharides in medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) moench.

M. Noori[1], Sh. Gharanjik[2], A. Safipour Afshar[3*] and F. Saeid Nematpur[4]

1- MSc. of Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2- Department of Agricultural Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
3*- Corresponding author, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran
E-mail: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir
4- Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

Received: February 2016 Revised: May 2016 Accepted: June 2016

Abstract

The hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* due to the stability and mass production in hormone free culture provide an appropriate tissue for secondary metabolite production, and the content of metabolites produced could be affected by bacterial strain. In the current study, the effect of different strains of *A. rhizogenes* including A4, A13 and 15834 on the percentage of hairy root induction of *Echinacea purpurea* (L.) moench. in the leaf and hypocotyl explants were studied. In another experiment, total phenolics and polysaccharides content of hairy roots were measured compared to the control (untransformed) roots. The results showed that the percentage of hairy root induction was significantly affected by bacterial strains, so that in *E. purpurea* leaves incubated by strains A13, 15834 and A4, the hairy root induction was 60%, 40% and 0, and in hypocotyl explants was 85%, 45% and 70%, respectively. Maximum total phenolic compounds were observed in A4 strain. As well, in comparison to control, the polysaccharide content in hairy root induced by strains 15834 and A13 increased and by A4 strain decreased significantly. Differences observed in this study about hairy root induction and secondary metabolites production could be due to different ability of *A. rhizogenes* strains in T-DNA transferring to plant cells.

Keywords: *Echinacea purpurea* (L.) Moench., hairy root, secondary metabolites, transgenic.