القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی باباآدم (*Arctium lappa* L.)

طیبه سلیمانی[۱]، مهرناز کیهانفر[۲]*، خسرو پیری[۳]، طاهره حسنلو[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، همدان

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

٤- استادیار پژوهش، بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

*آدرس مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، کدپستی: ۷۳٤٤۱ – ۸۱۷٤٦، تلفن: ۷۹۳٤٤۰۲ (۰۳۱۱)، نمابر: ۷۹۳۲۳٤۲ (۰۳۱۱)

پست الکترونیک: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/٤/۷ **تاریخ تصویب:** ۹۱/۲/۱۰

چکیده

مقدمه: باباآدم یکی از گیاهان دارویی بومی ایران و حاوی متابولیت‌های ثانویه مهمی مانند ترکیبات ضدسرطان آرکتین و آرکتی ژنین می‌باشد. استفاده از روش‌های زیست فناوری برای افزایش تولید این قبیل متابولیت‌های ثانویه اهمیت زیادی دارد. یکی از روش‌هایی که امروزه برای افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است القای ریشه‌های مویین می‌باشد.

هدف: استفاده از باکتری *Agrobactrium rhizogenes*، استرین **AR15834** به منظور القای ریشه‌های مویین در باباآدم بود.

روش بررسی: از ریزنمونه‌های برگی و گیاهچه‌های کامل باباآدم برای القاء ریشه های مویین استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی محیط کشت و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های باباآدم، آنتی‌اکسیدان‌های مختلف شامل، اسید آسکوربیک (Ascorbic acid) (ASC)، اسید سیتریک (Citric Acid) (CIT)، پلی‌وینیل‌پیرولیدون (Polyvinylpyrrolidone) (PVP) و اِل- سیستئین (L-Cysteine) (CYS)، به تنهایی و یا به صورت ترکیب با هم در چند غلظت مختلف به محیط کشت افزوده شدند. برای تأیید مولکولی ریشه‌های مویین، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) برای ژن *rol*B انجام گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که که پلی‌وینیل‌پیرولیدون با غلظت ۰/۵ درصد (w/v)، بهترین اثر آنتی‌اکسیدانی را داشت هر چند این آنتی‌اکسیدان نتوانست از قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه در مرحله آلودگی با باکتری آگروباکتریوم جلوگیری کند. وقتی از گیاهچه‌های کامل ۲ تا ۳ هفته‌ای برای القای ریشه‌های مویین استفاده شد، دو هفته پس از آلودگی، ریشه‌های مویین با فراوانی ۵ درصد ظاهر شدند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق، *A. rhizogenes* ریشه های مویین را در باباآدم القاء نمود. طبق بررسی‌های ما این اولین گزارش از القای ریشه‌های مویین در گیاه باباآدم می‌باشد.

گل‌واژگان: باباآدم، ریشه‌های مویین، اگروباکتریوم رایزوژنز

مقدمه

گیاه باباآدم با نام انگلیسی Burdock و نام علمی *Arctium lappa* L. گیاهی است از خانواده کاسنی (Asteraseae) که دارای خواص دارویی متعددی می‌باشد [۱]. باباآدم دارای ترکیبات لیگنانی فراوانی از جمله آرکتین و آرکتی‌ژنین است که این متابولیت‌های ثانویه دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از جمله ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و ضدمیکروبی می‌باشند [۲،۳]. به عنوان نمونه، دی‌آرکتی‌ژنین که از بذر گیاه استخراج می‌شود، بازدارنده تولید اکسید نیتریک در ماکروفاژها می‌باشد. قابل ذکر است که اکسید نیتریک رادیکال آزادی است که در فرآیندهای فیزیولوژی بیماری، از جمله در ایجاد شوک‌های عفونی و تصلب شراین نقش مهمی دارد [۳]. همچنین چندین ترکیب لیگنانی با اثرات ضدویروس (بخصوص ضدویروس HIV)، در این گیاه شناسایی شده‌اند [٤]. تحقیقات بسیار محدودی بر روی گیاه دارویی باباآدم به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مهم آن با استفاده از روش‌های زیست فن‌آوری انجام شده است و اکثر مطالعات به بررسی خواص دارویی عصاره حاصل از این گیاه و مکانیسم‌های تأثیر آن بر درمان بیماری‌ها پرداخته‌اند. پاگلیارلو (Pagliarulo) و هیدن (Hayden) در سال ۲۰۰۰ سیستم کشت ایرو پونیک (Aeroponic) را برای باباآدم به کار برده و نشان دادند که این گیاه قادر است با عملکرد بالایی در این سیستم تولید ریشه نماید [۵]. همچنین هی (He) و همکاران به منظور ریزازدیادی این گیاه در شرایط in vitro، پس از القای کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدونی، باززایی گیاه کامل را از کالوس‌های به دست آمده گزارش کردند [٦]. ریشه‌های مویین دارای ویژگی‌هایی چون رشد سریع و زمان دو برابر شدن پایین، دست ورزی ژنتیکی آسان، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه و قابلیت رشد در بیوراکتور می‌باشند. این ویژگی‌ها آنها را به یک منبع دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مهم مانند متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی، که از نظر اقتصادی قابلیت تجاری شدن را دارا هستند، تبدیل کرده است. امروزه استفاده از کشت ریشه‌های مویین به منظور تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه با ارزش از گیاهان دارویی بسیار گسترش یافته است [۷]. از آنجایی که آرکتین و آرکتیژنین ترکیبات بسیار با اهمیتی می‌باشند و انتظار می‌رود که در آینده به عنوان داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گیرند، بهینه‌سازی سیستم کشتی که بتواند قابلیت تولید صنعتی این ترکیبات را فراهم نموده و امکان کشت آنها را در بیوراکتورها ایجاد کند، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی باباآدم ارایه نشده است و یکی از روش‌هایی که امروزه برای افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است استفاده از ریشه‌های مویین می‌باشد، هدف اصلی از تحقیق حاضر تولید این ریشه‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

استریل کردن و کشت بذور باباآدم

بذور باباآدم از باغ گیاهان دارویی همدان جمع‌آوری شد. بذور به منظور استریل شدن به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد (v/v) و سپس ۱۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (v/v) قرار گرفتند. در نهایت سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شده و در کاغذ صافی استریل و مرطوب کشت شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری *A. rhizogenes*

کشت باکتری *A. rhizogenes* استرین AR15834، در محیط کشت LB (Luria Bertani) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت انجام شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتری مدل Lambda 45UV/Visibel، در جذب نوری بین ۰/۵ تا ۱ در OD600 nm تنظیم شد. این باکتری برای آلوده نمودن گیاه باباآدم مورد

استفاده قرار گرفت. استرین مزبور از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد.

بهینه‌سازی محیط کشت برای ریزنمونه‌های باباآدم

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۱۰ تیمار انجام شد. در هر تکرار (هر پتری دیش)، ۸ ریزنمونه کشت شد و کشت‌ها، در اتاق رشد، در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. بعد از ٤٨ ساعت، مشاهدات ماکروسکوپی به صورت روزانه تا ۱۲ روز انجام شد. هدف از انجام این آزمایش جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گیاه باباآدم در شرایط کشت in vitro و در محیط کشت MS (Murashing & Skoog) [۸] بوده است که بدین‌منظور به محیط کشت MS، غلظت‌های مختلفی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل اسید آسکوربیک (ASC) ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اسید سیتریک (CIT) ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۰/۲ درصد و ۰/۵ درصد (w/v) و اِل- سیستئین (CYS) ۳۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به تنهایی و یا به صورت ترکیب با هم افزوده شد [۹،۱۰]. در این تحقیق، فقط از ریزنمونه‌های برگی باباآدم استفاده شد که از گیاهچه‌های ۳ تا ٤ هفته‌ای به دست آمده بودند. شاخص مورد بررسی میزان درصد قهوه‌ای شدن سطح ریزنمونه‌ها بود که این شاخص در سطح ۲۰ درصد قهوه‌ای شدن (ریزنمونه‌هایی که حداقل تا ۲۰ درصد سطح آنها رنگ قهوه‌ای گرفتند، به عنوان ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در نظر گرفته شدند) بررسی گردید. در تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده و به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح احتمال ۱ درصد= α) استفاده شد.

نحوه آلوده کردن ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها توسط باکتری، جهت القای ریشه‌های مویین

برای آلوده کردن گیاهچه‌ها و ریزنمونه‌ها، به ترتیب از دو روش تزریق با سوزن سرنگ انسولین و شناورسازی در سوسپانسیون باکتری استفاده شد.

در آلوده‌سازی به وسیله تزریق، ۱۰۰ عدد گیاهچه که ۲ تا ۳ هفته سن داشتند، در نواحی ساقه، طوقه و ریشه، آلوده شدند. در هر گیاهچه ۲ جایگاه زخمی ایجاد شد. گیاهچه‌های آلوده در محیط کشت جامد MS، حاوی ۰/۵ درصد PVP و در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متر کشت شدند. به عنوان شاهد، تعدادی گیاهچه، در نواحی ساقه، طوقه و ریشه، توسط سرنگ آغشته به محیط بدون باکتری LB، آلوده و سپس تحت شرایط مساوی کشت و نگهداری شدند.

در روش شناورسازی ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری، از گیاهچه‌های ۲ تا ۳ هفته‌ای ریزنمونه‌هایی تهیه شد. این ریزنمونه‌ها که شامل اندام‌های ساقه، ریشه و برگ بودند، با ابعاد تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر در ۰/۵ سانتی‌متر برش یافته و سپس به مدت یک هفته در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ درصد PVP پیش کشت شدند. پس از گذشت این زمان، ریزنمونه‌های پیش‌کشت شده برای هم‌کشتی با باکتری *A. rhizogenes* مورد استفاده قرار گرفتند. برای آلوده کردن ریزنمونه‌ها با باکتری، پس از ایجاد زخم در سطوح، نمونه‌ها به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند. سپس در محیط کشت جامد MS، حاوی ۷ g/L آگار و ۰/۵ درصد PVP و در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متر کشت شدند. برای تهیه نمونه‌های شاهد، تعدادی ریزنمونه به مدت‌های مشابه فوق در آب مقطر استریل قرار گرفته، سپس در شرایط کاملاً مشابه کشت و نگهداری شدند.

در هر دو روش، کشت‌ها در شرایط اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی: تاریکی (۸ : ۱٦ ساعت) نگهداری شدند. چهل و هشت ساعت بعد از آلوده شدن گیاهچه‌ها و ریزنمونه‌ها، آنها را به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) و ۰/۵ درصد PVP در پتری دیش ۱۰ سانتی‌متر انتقال داده و هر دو هفته یک بار واکشت نمونه‌ها به محیط کشت جدید انجام شد. واکشت نمونه‌ها در محیط کشت حاوی سفوتاکسیم ۱ تا زمان حذف کامل باکتری از گیاهچه‌های آلوده ادامه پیدا کرد.

بـرای اطمینـان از حـذف کامـل بـاکتری، از روش کومـار (Kumar) و همکاران، ۲۰۰٦ اسـتفاده شـد. بـدین‌ترتیـب کـه مقداری از ریشه‌های مویین به محیط کشت LB منتقـل شـد و بر روی شیکر، با سـرعت حرکـت ۱۲۰ rpm در شـرایط اتـاق رشد قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت نمونه‌ها به منظـور بررسـی وجود باکتری مورد مشاهده قرار گرفتند [۱۱].

تراریختی ریشه‌های مویین بابا آدم از طریـق روش PCR و پس از اطمینان از حذف کامل باکتری در ریشه‌ها انجام شد. به این منظور، استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های مویین حاصـل با استفاده از روش CTAB انجـام شـد [۱۲]. همچنـین DNA ژنـومی گیـاه طبیعـی (غیـرترنسـفرم) و پلاسـمید بـاکتری *A. rhizogenes* به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند [۱۳]. DNA استخراج شده به وسیله واکـنش زنجیره‌ای پلیمـراز (PCR) بـرای تعیـین وجـود ژن *rol*B مـورد بررسی قرار گرفت. تکثیر ژن *rol*B با آغازگرهای اختصاصی

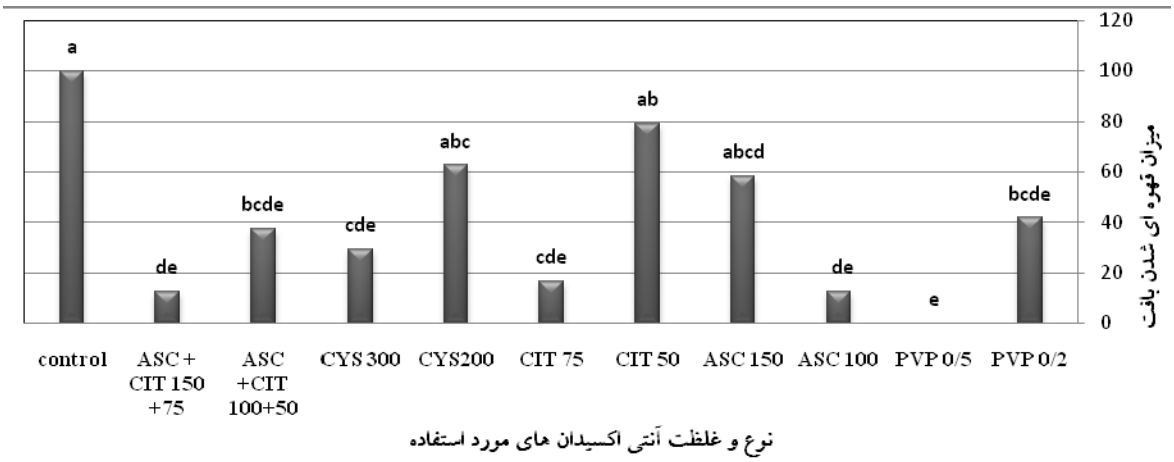
Forward primer 5′-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3′
Reverse primer 5′-TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3′

و برای ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گـراد برای یک دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۳ درجه سـانتی‌گـراد بـرای یک دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یـک دقیقه، انجام شد [۱٤].

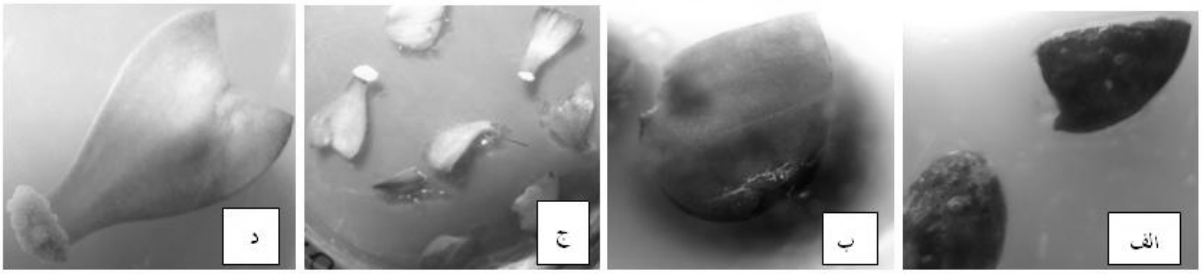
نتایج

بهینه‌سازی محیط کشـت بافـت گیـاه دارویـی بابـا آدم در شرایط *in vitro*

استفاده از تیمارهای آنتی‌اکسیدانی در برطرف کردن قهـوه‌ای شدن بافت گیاه بابا آدم تاثیرگذار بود و آزمـون مقایسـه میـانگین درصد قهوه‌ای شدن بـر روی ریزنمونـه‌هـای بابـا آدم در محـیط کشت حاوی آنتی‌اکسیدان (نمودار شماره ۱)، تفاوت معنـی‌داری را نشان داد. براساس ایـن نتـایج، ترکیـب PVP بـا غلظـت ۰/۵ درصد (w/v) که در آن هـیچ ریزنمونـه‌ای قهـوه‌ای نشـده بـود، بهترین اثر آنتی‌اکسیدانی را نشان داد و بعـد از آن بهتـرین اثـر از ترکیب دوتایی ASC+CIT (۷۵ + ۱۵۰ میلی‌گـرم بـر لیتـر) بـه دست آمد (نمودار شماره ۱ و شکل شماره ۱). همچنین CIT بـا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بـر لیتـر کمتـرین تـأثیر را بـر جلـوگیری از قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه نشان داد (نمودار شماره ۱). لازم به ذکر است که در محیط کشت بدون آنتی‌اکسیدان (نمونه شـاهد)، همه ریزنمونه‌ها در مدت ۳ الـی ٤ روز قهـوه‌ای شـده و از بـین رفتند.



نمودار شماره ۱- نمودار ستونی نشان‌دهنده اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف موجود در محیط کشت بر میانگین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های باباآدم. تیمارهای دارای حروف غیرمشابه از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد = α می‌باشند.



شکل شماره ۱- استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌های باباآدم الف و ب) کشت ریزنمونه‌های باباآدم در محیط کشت MS، بدون استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها (نمونه شاهد) و قهوه‌ای شدن بافت. ج و د) کشت ریزنمونه‌های گیاه باباآدم در محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد PVP و توقف کامل قهوه‌ای شدن بافت

القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی باباآدم

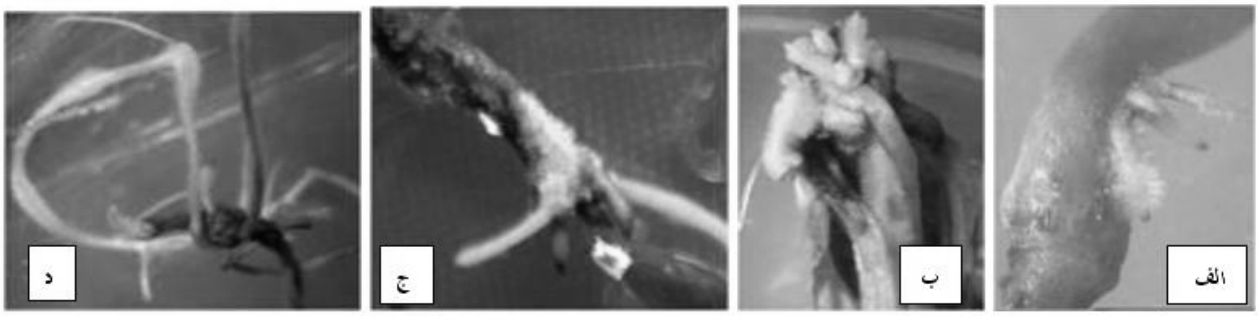
وقتی از ریزنمونه‌های بابا آدم و سوسپانسیون باکتری برای القای ریشه‌های مویین استفاده شد، از روز دوم یا سوم پس از آلودگی، قهوه‌ای شدن بافت آغاز شد و ریشه‌های مویین ایجاد نشدند. مشاهدات نشان داد که طول زمان قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری تأثیری بر جلوگیری از این پدیده نداشته و ریزنمونه‌های شاهد که محیط کشت آنها فاقد باکتری *A. rhizogenes* بود قهوه‌ای نشدند. اما وقتی از گیاهچه کامل برای آلوده شدن با باکتری *A. rhizogenes* استفاده شد، از حدود ۲۰۰ جایگاه زخمی در گیاهچه‌ها، در ۹ جایگاه ریشه‌های مویین ظاهر شدند. محل ظهور این ریشه‌ها، طوقه (شکل شماره ۲- الف و ب) و ریشه (شکل شماره ۲- ج و د) گیاهچه‌ها بود. ظهور این ریشه‌های مویین، در فاصله زمانی ۲ تا ٦ هفته بعد از آلوده شدن گیاهچه‌ها با باکتری، اتفاق افتاد. مورفولوژی ریشه‌ها با ریشه طبیعی گیاه متفاوت بوده و آنها به صورت متراکم و از یک نقطه منفرد در محل زخم و یا نزدیک به آن ظاهر شدند. این ریشه‌ها از نظر مورفولوژی، ریشه‌های مویین محسوب می‌شوند. محل برخورد سوزن در گیاهچه‌هایی که موفق به تولید ریشه مویین نشدند، قهوه‌ای شد و گیاهچه از بین رفت. در برخی از نمونه‌های شاهد، در محل‌های زخم و نزدیک به آنها، کالوس تولید شد ولی هیچ‌گونه ریشه‌ای ظاهر نشد.

تأیید آنالیز PCR برای ریشه‌های مویین

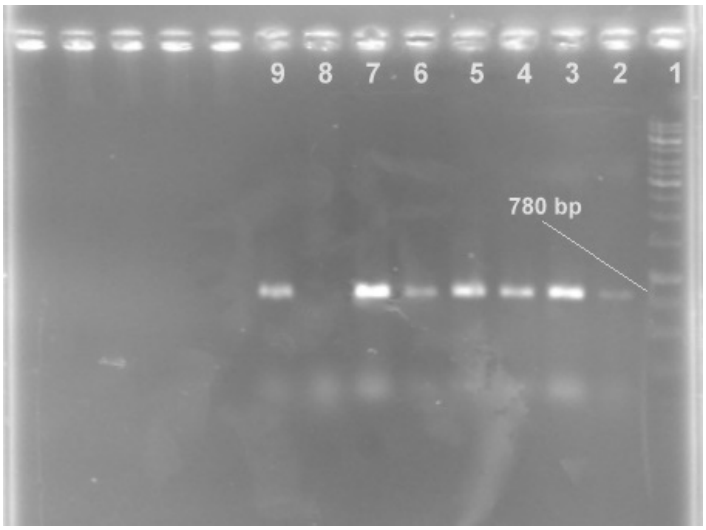
الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مشاهده شد. مطابق انتظار برای هر یک از نمونه‌های ریشه مویین و پلاسمید باکتری (کنترل مثبت) تک باند در ناحیه ۷۸۰bp به دست آمد. (شکل شماره ۳). چاهک مربوط به نمونه کنترل منفی (DNA گیاه طبیعی) نیز بدون باند بود. این نتایج دلالت می‌کند که ژن *rol*B موجود در T-DNA پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* به ژنوم ریشه‌های مویین گیاه باباآدم انتقال یافته است.

بحث

یکی از مشکلات اصلی در کشت بافت گیاه دارویی باباآدم، قهوه‌ای شدن و از بین رفتن ریزنمونه‌های این گیاه پس از کشت در محیط in vitro است. بنابراین برای ایجاد ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های این گیاه و یا انتقال ژن به آنها، ابتدا لازم است که این مشکل را برطرف نمود. برای این منظور، بهینه‌سازی و فراهم نمودن یک محیط کشت استاندارد برای کشت بافت گیاه باباآدم در شرایط in vitro ضروری به نظر می‌رسد. علت قهوه‌ای شدن را می‌توان وجود ترکیبات فنولی فراوان در این گیاه و اکسید شدن آنها توسط آنزیم پلی‌فنول اکسیداز دانست که شاید تقریباً در تمام گیاهان وجود داشته باشد. این آنزیم در بافت‌های گیاهی مسئول قهوه‌ای شدن آنها



شکل شماره ۲- القای ریشه‌های مویین در ناحیه طوقه، ساقه و ریشه گیاه باباآدم الف) خروج ریشه‌ها از منطقه طوقه ب) خروج ریشه‌ها از منطقه ساقه، ج و د) خروج ریشه‌ها از منطقه ریشه



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن rolB. چاهک ۱ مارکر مولکولی 1 Kb، چاهک‌های شماره ۲ تا ۷ ریشه‌های مویین باباآدم، چاهک ۸ نمونه کنترل منفی (ریشه طبیعی گیاه) و چاهک ۹ کنترل مثبت (پلاسمید باکتری) می‌باشد

می‌باشد و نقش با اهمیتی در کنترل فرآیندهای اکسیداتیو دارد. فعالیت پلی‌فنول اکسیداز تحت شرایط تنش‌زا، چون آسیب مکانیکی و تغییر در موقعیت بیوشیمیایی افزایش می‌یابد [۹]. با توجه به اهمیت دارویی که گیاه باباآدم دارد، تنها یک گزارش از کشت بافت این گیاه در شرایط in virto و به منظور باززایی گیاه، موجود می‌باشد که در این گزارش هیچ نوع اشاره‌ای به وجود مسأله قهوه‌ای شدن بافت این گیاه در شرایط کشت in virto نشده است [٦] که علت آن را می‌توان در تنوع ژنتیکی موجود در طبیعت دانست. قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه در آواکادو [۱۵]، *Musa acuminata* [۱٦]، *Withania simniferafvo* و *Solanum surattense* [۱۷] و چندین گونه گیاهی دیگر نیز گزارش شده است. قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های باباآدم از بخش‌های زخمی آن آغاز شد و سپس به کل ریزنمونه سرایت کرد. روش‌های مختلفی چون قرار دادن گیاهان در تاریکی، کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع، واکشت فراوان کشت‌ها به محیط کشت جدید، انتخاب ریزنمونه مناسب و استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای بهبود قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در گیاهانی چون انبه، موز و لوبیا مورد استفاده قرار گرفته است [۹،۱۰،۱۸].

آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان بازدارنده فرآیند اکسیداتیو و به عنوان خورنده (از بین برنده) رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و به تبدیل شدن رادیکال‌های آزاد به گونه‌های با فعالیت کمتر

کمک نموده و به این طریق مانع اکسید شدن ترکیبات فنولی و قهوه‌ای شدن بافت گیاهی می‌شوند. گیاهان در طبیعت، سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را، به عنوان یک استراتژی دفاعی برای مقابله با استرس‌های اکسیداتیو توسعه داده‌اند [۹]. در یک تحقیق با استفاده از ۰/۵ درصد PVP در محیط کشت *Myrica esculenta* قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها تا ۷۹/۶۱ درصد کاهش داده شد [۱۹]. همچنین تأثیر مثبت PVP در کاهش ترکیبات فنولی و کاهش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای در گیاه *Cleistanthus collinus* [۲۰]، *Tectona grandis* [۲۱] و *Gossypium hirsutum* [۲۲] گزارش شده است. در یک مطالعه دیگر برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های *Litchi chinensis*، وقتی از اسید آسکوربیک و اسید سیتریک به همراه هم استفاده شد، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها متوقف شد و استفاده از هر یک از این آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی تأثیری بر بهبود کشت ریزنمونه‌ها در شرایط in vitro نشان نداد [۲۳]. همچنین مخلوط اسید آسکوربیک و اسید سیتریک و یا PVP برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های انبه به کار گرفته شد و کاهشی در قهوه‌ای یا نکروزه شدن ریزنمونه‌ها مشاهده شد [۹].

در تحقیق حاضر استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی توانست جلوی قهوه‌ای شدن ریزنمونه را (بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد) بگیرد که بیانگر این نکته است که ریزنمونه‌ها شادابی خود و در نتیجه توانایی تکثیر سلول‌ها را حفظ نمودند. این ویژگی، لازمه کشت در شرایط درون شیشه چه به منظور ریزازدیادی و تکثیر گیاه و چه با سایر اهداف از جمله تراریختی گیاه می‌باشد.

در این تحقیق، وقتی از ریزنمونه‌هایی که به مدت یک هفته در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ درصد PVP پیش کشت شده بودند، برای آلودگی با سوسپانسیون باکتری استفاده شد، ریزنمونه‌های حاصل مجدداً قهوه‌ای شده و از بین رفتند. این ریزنمونه‌ها در مدت پیش کشت شادابی خود را حفظ کرده بودند. پس از آلوده کردن ریزنمونه‌ها با باکتری با وجود انتقال مجدد ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ درصد PVP، دوباره به تدریج مسأله قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه به وجود آمد. به عبارتی این بار ریزنمونه‌ها در اثر هم‌کشتی با باکتری قهوه‌ای شدند و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها با غلظت مصرفی در این آزمایش، نتوانست قهوه‌ای شدن بافت را برطرف کند. سرعت قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در این مرحله (هم‌کشتی آن با باکتری) کندتر بود اما در مجموع این روند قهوه‌ای شدن مانع حفظ شادابی ریزنمونه بوده و باعث کاهش توانایی تکثیر سلولی ریزنمونه‌ها شد و در نهایت به مرگ سلولی ریزنمونه‌ها منجر شود. به عبارت دیگر استفاده از این روش (شناورسازی ریزنمونه در سوسپانسیون باکتری)، در تولید ریشه‌های مویین در گیاه باباآدم مؤثر واقع نشده و تمامی ریشه‌های مویین حاصل، با استفاده از روش تزریق باکتری با سرنگ انسولین به گیاهچه کامل به دست آمد.

در یک تحقیق دیگر نشان داده شده است که باکتری *Agrobacterium tumefaciens* می‌تواند موجب قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گیاه *Phalaenopsis violacea* شود [۲٤]. این پدیده مشابه پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده در شرایط طبیعی می‌باشد و آن را می‌توان به مکانیسم دفاعی و مقاومت گیاه در مقابل آلودگی با باکتری *A. rhizogenes* نسبت داد. اولین مرحله اصلی فعال شدن مکانیسم دفاعی گیاه در آلودگی باکتریای یا زخم شدن، شیوع واکنش‌های اکسیداتیو است واکنش‌های اکسیداتیو در تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر درگیر هستند که خود منجر به فعال شدن مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Programmed Cell Death (PCD)) و تولید سدی از سلول‌های مرده در جایگاه‌های آلوده می‌شود.

در حقیقت تنها زمانی که از گیاهچه کامل برای القای ریشه‌های مویین استفاده نمودیم، توانایی گیاه در حفظ بنیه آن و تکثیر سلولی بیشتر شد به خصوص که در این روش، برای آلوده‌سازی این گیاهچه‌ها از سرنگ انسولین استفاده شد. سرنگ انسولین سطح زخمی کمتری ایجاد کرده و از طرفی نسبت به روش سوسپانسیون گیاهچه با هجوم کمتری از باکتری‌ها مواجه می‌شود. استفاده از این روش، اگرچه باعث تولید ریشه‌های مویین در گیاه باباآدم شد، اما بسیاری از

جایگاه‌های آلوده در اثـر قهـوه‌ای شـدن، دچـار مـرگ سـلولی شدند. بنابراین تراریختی در بسیاری از این جایگـاه‌هـا ممکـن نبوده و یا در صورت امکان آن، سـلول‌هـای تراریخـت در اثـر مـرگ سـلولی از بـین رفتـه‌انـد. در نتیجـه فراوانـی پـایینی از تراریختی در این گیاه به دست آمـد کـه بـا توجـه بـه مسـائل موجود نتیجه قابل قبولی به شمار می‌آید. دلیل قهوه‌ای شدن را می‌توان به این نسبت داد کـه چـون بـه طـور طبیعـی بـاکتری *A. rhizogenes* یک عامل بیماری‌زای گیاهی اسـت، قهـوه‌ای شدن به دلیل پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنـده در شرایط طبیعی اتفاق می‌افتد [۲٤]. در تحقیقات زیادی ظهور ریشه‌های مویین در سـطوح زخمـی ریزنمونـه‌هـای آلـوده بـه بـــاکتری *A. rhizogenes*، از جملـــه در گیاهـــان دارویـــی *Artemisia annua* [۲٥،۲٦]، *Saussurea involucrate* [۲۷]، *Silybum marianum* [۱٤] و *Hyoscyamus muticus* [۲۸] گزارش شـده اسـت. خـروج ریشه‌ها به صورت متراکم و در منطقه زخمـی شـده بـا سـوزن سرنگ انسولین در ناحیه ساقه و طوقه گیاه در چندین مـورد از جمله گیاه *Silybum marianum* به منظور القـای ریشـه‌هـای مویین گزارش شده است [۱٤].

منابع

1. Dweck A. Cosmetics and toiletries advanced technology coference. *Botanicals-Research of Actives.* 1995.

2. Awale S, Lu J, Kalauni SK, Kurashima Y, Tezuka Y, Kadota S and Esumi H. Identification of Arctigenin as an antitumor agent haiving the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient srarvation. *Cancer Res*. 2006; 66 (3): 1751 - 7.

3. Kim BH, Hong SS, Kwon SW, Lee HY, Sung H, Lee IJ, Hwang BY, Song S, Lee CK, Chung D, Ahn B, Nam SY, Han SB and Kim Y. Diarctigenin, a Lignan Constituent from *Arctium lappa*, Down-Regulated Zymosan-Induced Transcription of Inflammatory Genes through Suppression of DNA Binding Ability of Nuclear Factor-kappaB in Macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2008; 327 (2): 393 - 401.

4. Suzuki S, Umezawa T and Shimada M. Tereochemical diversity in lignin biosynthesis of *Arctium lappa* L. *Biosci. Biochem*. 2002; 66 (6): 1262 - 9.

5. Pagliarulo CL and Hayden AL. Potenital for greenhouse aeroponic cultivation of medicinal root crops. 30th National Agri. Plastics Congress 2000, pp: 23 - 6.

6. He WT, Hou SW and Wang CY. Callus induction and high-frequency plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of *Arctium lappa* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2006; 42: 411 – 14.

7. Giri A and Narasu L. Transgenic hairy root: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 2000; 18: 1 - 22.

8. Murashing T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco issue cultures. *Physiol. Plant* 1962; 15: 473 - 97.

9. Krishna H, Sairam RK, Singh SK, Patel VB, Sharma RR, Grover M, Nain L and Sachdev A. Mngo explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hortic-Amsterdam* 2008; 118 (2): 132 - 8.

10. Abdelwahd R, Hakam N, Labhilili M and Udupa SM. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean". *Afr. J. Biotechnol.* 2008; 7 (8): 997 - 1002.

11. Kumar V, Shrma A, Prasad BCN, Gururiaj HBG and Ravishankar GAR. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by

ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnol*. 2006; 9 (4): 349 - 57.

12. Cai DM, Kleine S, Kifle HJ, Horloff NN, Sandal KA, Marcker RMK, Lankhorst EMJ, Salentijn W, Lange WJ, Stiekema V, Wyss FMW and Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. *Science* 1997; 275: 832 - 4.

13. Sambrook J, Fritrsch EF and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold *Spring Laboratory Press, ColdSpring, Harbor, NY*. 1989, Vol. 1, pp: 31-8.

14. Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR and Sepehrifar R. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *I. J. B.* 2008; (6): 113 - 8.

15. Bates RP. The retardation of enzymatic browning *Avocado puree* and guacamole. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 1968; 81: 230 - 5.

16. Ko WH, Su CC, Chen CL and Chao CP. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of *Cavendish banana* cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009; 96: 137 – 41.

17. Murthy H N, Dijkstra C, Anthony P, White DA, Davey MR, Power JB, Hahn EJ and Paek KY. Establishment of *Withania somnifera* Hairy Root Cultures for the Production of Withanolide A. *JIPB*. 2008; 50: 975 – 81.

18. Titov S, Bhowmik S., Mandal A, Alam MS and Uddin SN. Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from *Musa* spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. *Afr. J. Biotechnol*. 2006; 2 (3): 97 - 104.

19. Bhatt ID and Dhar U. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *Afr. J. Biotechnol*. 2004; 3 (10): 534 - 40.

20. Quraishi A and Mishra SK. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell Rep*. 1998; 17: 430 - 3.

21. Gupta PK, Nadgir AL, Mascarenhas AF and Jagannathan V. Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Sci. Let*. 1980; 17: 259 - 68.

22. Ozyigit I and Gozukirmizi N. High efficiency shoot and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Pak. J. Bot.* 2008; 40 (4): 1665 - 72.

23. Puchoo, D. *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn). *Afr. J. Biotechnol*. 2004; 3 (11): 576 - 84.

24. Sreeramanan S, Vinod B, Sashi S and Xavier R. Optimization of the Transient *Gusa* Gene Transfer of *Phalaenopsis Violacea* Orchid via *Agrobacterium Tumefaciens*: an Assessment of Factors Influencing the Efficiency of Gene Transfer Mechanisms**.** *Adv. in Nat. Appl. Sci.* 2008; 2 (2): 77 - 88.

25. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H and Shoyama Y. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol Lett.* 2007; 29: 1143 - 6.

26. Weathers PJ, Bunk G and Mccoy MC. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 2005; 41: 47 – 53.

27. Fu CX, Zhao DX, Xue XF, Jin ZP and Ma FS. Transformation of *Saussurea involucrata* by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root induction and syringin production. *Process Biochem*. 2005; 40: 3789 - 94.

28. Zolala J, Farsi M, Gordan HR and Mahmoodnia M. Producing a High Scopolamine Hairy Root Clone in *Hyoscyamus muticus* through Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agric. Sci. Technol*. 2007; 9: 327 – 39.

Hairy Root Induction in Burdock (*Arctium lappa* L.)

Soleimani T (M. Sc. Student)[1], Keyhanfar M (Ph.D.)[2*], Piri KH (Ph.D.)[1], Hasanloo T (Ph.D.)[3]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4- Molecular Physiology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran
*Corresponding author: Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Zip Code: 81746-73441, Isfahan, Iran
Tel: +98 – 311 – 7934402, Fax: +98 – 311 - 7932342
E-mail: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

Abstract

Background: ***Arctium lappa* is a medicinal plant, which natively grows in Iran. Arctiin and arctigenin are two of the most important secondary metabolites produced in this plant and used as anticancer reagents. Application of biotechnological methods for increasing the production of these metabolites is very essential. Recently, induction of hairy roots in plants to improve the production of desirable secondary metabolites has been considered.**

Objective: In this study, hairy roots were induced in *Arctium lappa* using *Agrobacterium rhizogenes*, strain AR15834.

Methods: The leaf explants and seedlings of Burdock were used for the hairy roots induction. The leaf explants were turned brown and died when cultured *in vitro*. To improve the viability of these explants, different antioxidants including ascorbic acid (ASC), citric acid (CIT), polyvinylpyrrolidone (PVP) and L-cysteine were added to the MS medium, in different concentrations either alone or in combination with each other. Polymerase Chain Reaction (PCR) for *rol*B gene confirmed the morphological identification of the transformed hairy roots.

Results: Although the best antioxidant reagent was PVP 0.5% (w/v), it did not stop tissues browning of the leaf explants when they were co-cultured with *A. rhizogenes* for the hairy roots induction. When the two or three weeks old seedling were used for the hairy roots induction, the roots were observed 2 weeks after the bacterial infection with 5% frequency.

Conclusion: In this study, *A. rhizogenes* induced hairy roots in Burdock. To the best of our knowledge, this is a first report on the hairy roots induction in *Arctium lappa*.

Keywords: ***Arctium lappa* L, Burdock, *Agrobactrium rhizogenes* and hairy roots**