

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



اثر نوع سویه باکتری، محیط کشت و شرایط نوری بر تولید ریشه موین در گیاه دارویی

همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*)

زهره سهرابی نژاد^{۱*}، حسن مرعشی^۲، نسرین مشتاقی^۳

^۱ دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

zohreh.sohrabinezhad@stu.um.ac.ir

^۲ دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

گیاه دارویی همیشه‌بهار *Calendula officinalis* متعلق به خانواده *Asteraceae* می‌باشد. همیشه‌بهار برای درمان تب، ضایعات پوستی و درمان سرطان به کار می‌رود. این گیاه حاوی ترکیبات دارویی مهمی مانند فلاونوئید و ساپونین است. از آنجا که مقادیر این مواد دارویی در شرایط طبیعی گیاه و کشت مزروعی آن پاسخگوی نیاز جهانی نیست، روی آوردن به تکنیک کشت بافت، خصوصاً تولید ریشه‌های موین، یکی از موثرترین راه‌های بدست آوردن این مواد می‌باشد. در تولید ریشه‌های موین عواملی همچون نوع محیط کشت پایه و سویه باکتری تلقیح شده و شرایط نوری ریزنمونه‌ها در میزان درصد ظهور ریشه‌های موین موثر هستند. بدین منظور آزمایشی برای انتخاب بهترین سویه باکتری انجام شد. در این تحقیق ریزنمونه‌های برگ گیاهچه استریل با ۴ سویه آگروباکتریوم رایزوزنز به نامهای A4 و ۱۵۸۳۴ و MSU و 2656 تلقیح شدند. نتایج حاصله نشان داد که اثر نوع سویه باکتری بر درصد تولید ریشه موین در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود به طوری که بیشترین (43/4 درصد) و کمترین (13/69 درصد) درصد تولید ریشه‌های موین به ترتیب در سویه‌های MSU و 2656 حاصل شد. همچنین استفاده از محیط همکشتی متفاوت نیز بر میزان تولید ریشه‌های موین، تأثیر معنی‌دار داشته است ($P < 0.05$). از آنجا که میانگین تولید ریشه موین در محیط کشت $1/2B5$ 35/84 درصد و در محیط کشت $1/2MS$ 25/67 درصد بود، چنین به نظر می‌رسد که محیط کشت $1/2B5$ نسبت به $1/2MS$ برای تولید ریشه موین، محیط مناسب‌تری است. شرایط نور و تاریکی اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



واژه‌های کلیدی: همیشه بهار، ریشه مویین، آگروباکتریوم، محیط کشت پایه، شرایط نوری

مقدمه

گیاه همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* در درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها و در ترکیب با داروهای هموپاتیک استفاده شده‌است (زیتزل و همکاران، ۱۹۷۷). خواص دارویی فراوانی شامل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضد ویروسی برای این گیاه گزارش شده‌است (پرتی و همکاران، ۲۰۰۶؛ کسیرام و همکاران، ۲۰۰۰). به فعالیت سایتوتوکسیک و کاهش تومور نیز در این گیاه اشاره شده‌است (بوآکادمایتر و همکاران، ۱۹۸۸). مطالعات فیتوشیمیایی چهار گروه عمده از ترکیبات را در همیشه‌بهار گزارش کرده‌اند که عبارتند از: فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها، روغنهای فرار و تریترین‌ها. مورد آخر با ترکیبات زیادی از آن که جداسازی شده‌اند، گروه اصلی به نظر می‌رسند. این ترکیبات شامل الکل‌های پنتاسیکلیک، گلیکوزیدها (ساپونین‌ها) و استرول‌ها است. وجود خاصیت ضدالتهابی در عصاره همیشه‌بهار به خاطر وجود تری‌تریپنوئیدها است (زاکیل و همکاران، ۲۰۰۵).

Calendula officinalis شامل مقادیر قابل توجهی از ساپونین‌های *Olealanane* است که بر اساس ساختار پیش ماده مربوطه دارای دو فرم گلیکوزید و گلوکورونید هستند. اولئالونیک اسید و مشتقات آن دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی نظیر خواص ضد التهاب، ضد حساسیت، ضد زخم، ایمنی، سایتوتوکسیک، ضد تومور، ضد درد، ضد موتازن، آنتی‌هیپاتوتوکسیک، ضد دیابت، همولیتیک، ضد ویروس، و ضد باکتری هستند (زاکیل و همکاران، ۲۰۰۵).

از آنجا که مقادیر این مواد دارویی در شرایط طبیعی گیاه و کشت مزروعی آن پاسخگوی نیاز جهانی نیست، روی آوردن به تکنیک کشت بافت، خصوصا تولید ریشه‌های مویین، یکی از موثرترین راه‌های بدست آوردن این مواد می‌باشد. رشد سریع، توانایی بیوسنتتیک بیشتر جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و ثبات ژنتیکی از خواص قابل توجه ریشه‌های مویین تراریخت ژنتیکی توسط آگروباکتریوم رایزوتنز است. مزیت بزرگ کشت ریشه‌های مویین، این است که اغلب نسبت به گیاهان مربوطه، توان بیشتری در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. ریشه‌های مویین همچنین منبع ارزشمندی برای ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی می‌باشند.

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



این ریشه ها می توانند بیش از یک متابولیت تولید نمایند و بنابراین ثابت شده که از نظر تولید تجاری، اقتصادی هستند. کشت ریشه مویین، به عنوان روشی کارآمد در جهت تولید متابولیت های ثانویه با ارزش شناخته شده است. تا کنون القای ریشه مویین با هدف تولید متابولیت های ثانویه در شرایط این ویترو در بیش از ۵۰ گونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. لاین های ریشه مویین می توانند یک منبع امیدوار کننده برای تولید پایدار متابولیت های ثانویه باشند. کشت های ریشه مویین، متابولیت های ثانویه را در درازمدت، بدون از دست دادن ثبات ژنتیکی تولید می نمایند (گیری و ناراسو، ۲۰۰۰). ریشه های مویین به عنوان یک راهکار جدید بیوتکنولوژی می تواند برای تولید و یا افزایش ترکیبات مهم دارویی بسیار موثر واقع شود و از این طریق می توان به مقدار زیادی در وقت، هزینه و انرژی برای تولید این ترکیبات صرفه جویی نمود، مشروط به اینکه شرایط برای تولید این ریشه ها و رشد آنها بهینه شود. در این تحقیق تاثیر سوبه های مختلف آگروباکتریوم، شرایط نور و تاریکی و محیط کشت های متفاوت بر میزان تولید ریشه مویین بررسی شده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و باکتری: بذور همیشه بهار از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. باکتری مورد استفاده در این آزمایش *Agrobacterium rhizogenes* شامل سوبه های A_4 ، 2656، 15834 و MSU بودند. باکتری ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین جهت از بین بردن باکتری های دیگر کشت شده و بر روی شیکر قرار گرفت تا کشت تازه ای از باکتری بدست آید.

تولید گیاهچه استریل و تهیه ریزنمونه: بذور همیشه بهار ضد عفونی سطحی شدند، بدین ترتیب که ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد تیمار شده و در نهایت ۵ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذور در محیط کشت حاوی آب و آگار برای جوانه زدن، قرار گرفتند. سپس جوانه ها برای تولید گیاهچه استریل به محیط کشت MS منتقل شدند. بعد از ۶ هفته برگ های گیاه جدا شده و به عنوان ریزنمونه جهت القای ریشه های مویین استفاده شدند.

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



آماده سازی سوسپانسیون باکتری: در این تحقیق از کشت مایع باکتری با OD معادل $0/8$ استفاده شد. 15 میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری با دور 4000 به مدت 7 دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس رسوب باکتری در ده میلی لیتر محیط کشت MS مایع حل شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها جهت تولید ریشه موپین: ریزنمونه‌های برگ گیاه برای تلقیح به وسیله نوک سوزن آغشته به سوسپانسیون باکتری زخمی شدند. سپس ریزنمونه‌ها در داخل پتری‌دیش‌های استریل حاوی دو نوع محیط کشت پایه MS و $B5$ قرار گرفتند. پس از سه روز به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت 500 میلی گرم در لیتر انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها تا زمان ظهور ریشه در محل زخم، در اتاق رشد در شرایط نوری متفاوت (روشنایی و تاریکی) نگهداری شدند. این آزمایش در قالب آزمایش فکتوریل با استفاده از طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار $Jump$ آنالیز شدند. داده‌های درصدی ابتدا به کمک روش $Arcsin$ تبدیل گردیدند و سپس آنالیزهای آماری انجام گرفت.

نتایج و بحث

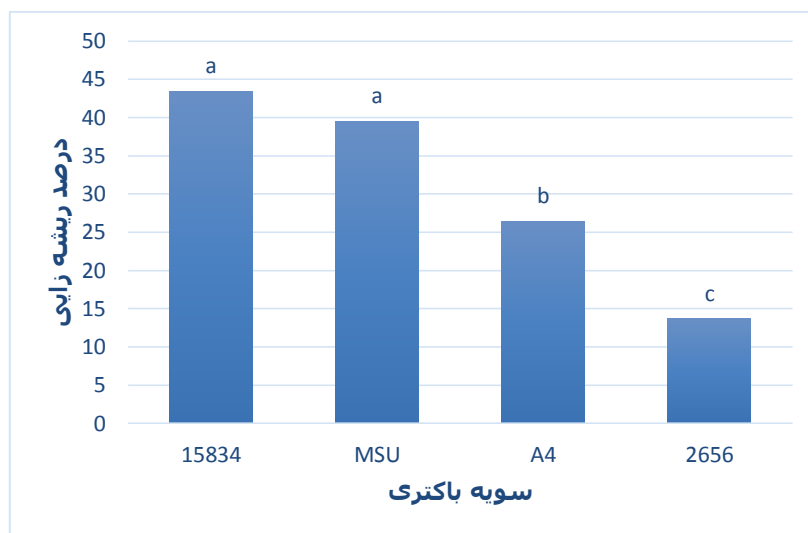
در این تحقیق تاثیر چهار سویه $A4$ ، 15834 ، 2656 و MSU ، شرایط نور و تاریکی و دو محیط کشت MS و $B5$ بر میزان ریشه‌زایی در گیاه همیشه‌بهار مورد بررسی قرار گرفت. اثر سویه‌های مختلف باکتری، نوع محیط کشت پایه و برهمکنش سویه باکتری و نور، معنی‌دار هستند. اثر فاکتور نور، برهمکنش سویه باکتری و محیط، برهمکنش محیط و شرایط نوری، و اثرات متقابل سه‌گانه‌ی شرایط نوری، نوع محیط کشت و سویه باکتری، اختلاف معنی‌داری از خود نشان ندادند.

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک

پایگاه اطلاع رسانی رویدادهای علمی کشور
ALL CONFERENCES IR



شکل (۱) اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر تولید ریشه مویین

همانطور که در شکل یک مشاهده می‌شود، سویه *MSU* و *15834*، به ترتیب با $43/4$ و $39/4$ درصد بالاترین و سویه *2656* با $13/69$ درصد کمترین میزان تولید ریشه مویین را داشتند. حساسیت گونه‌های گیاهی به سویه‌های آگروباکتریوم بسیار متفاوت است. ممکن است یک گونه گیاهی که به یک سویه باکتری حساس نباشد به سویه دیگر واکنش نشان دهد. در تحقیق آقای چاندران و پوتی؛ ۲۰۰۷ نیز نتایج مشابهی دیده می‌شود. در این تحقیق سویه‌های مختلف آگروباکتریوم توانایی ریشه‌زایی متفاوتی از خود نشان دادند. آنها تاثیر چهار سویه مختلف آگروباکتریوم با نام‌های *15834*، *A4*، *WC* و *WR* بر درصد تولید ریشه مویین در ۵ گیاه میزبان بررسی کردند. *15834* و *A4* بیشترین کارایی را در تولید ریشه مویین داشتند و در کل سویه *15834* بالاترین کارایی را داشت. میزان تولید ریشه مویین با شش سویه *15834*، *K599*، *LBA 9402*، *9365* و *2340* در گیاه *Artemisia annua* نیز مورد بررسی قرار گرفته‌است. میزان تراریختگی در این گیاه با سویه‌های *15834* و *A4* به ترتیب ۸۰ و ۷۵ درصد گزارش شده و بالاترین میزان تراریختگی متعلق به سویه *LBA 9402* و به میزان ۱۰۰ درصد بوده‌است (گیری و همکاران، ۲۰۰۱).

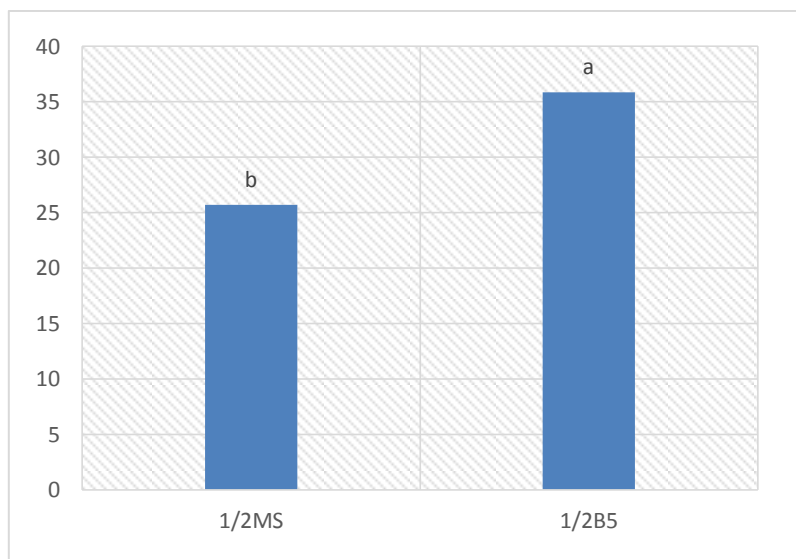
دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز بر اساس نوع اپین به انواع مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. طبق مشاهدات به دست آمده به نظر می‌رسد باکتری‌های دسته آگروپین (برای مثال سویه‌های *TR105*, *A4*, *HRI*, *15834*, *LBA9402*) در ایجاد بیماری‌زایی از قدرت بیشتری نسبت به باکتری‌های گروه مانوپین (برای مثال *TR101*, *TRT*, *8196*) و اکتوپین برخوردارند. این امر احتمالاً به دلیل حضور دو یا چند ناحیه *T-DNA* مجزا در پلاسمید *Ri* این باکتری‌ها می‌باشد که باعث افزایش شانس انتقال *T-DNA* به ژنوم گیاه میزبان و در نتیجه افزایش قدرت بیماری‌زایی این سویه‌ها می‌شود (نزافیرا و سیتوفسکی، ۲۰۰۸).



شکل (۲) اثر محیط کشت بر درصد تولید ریشه مویین

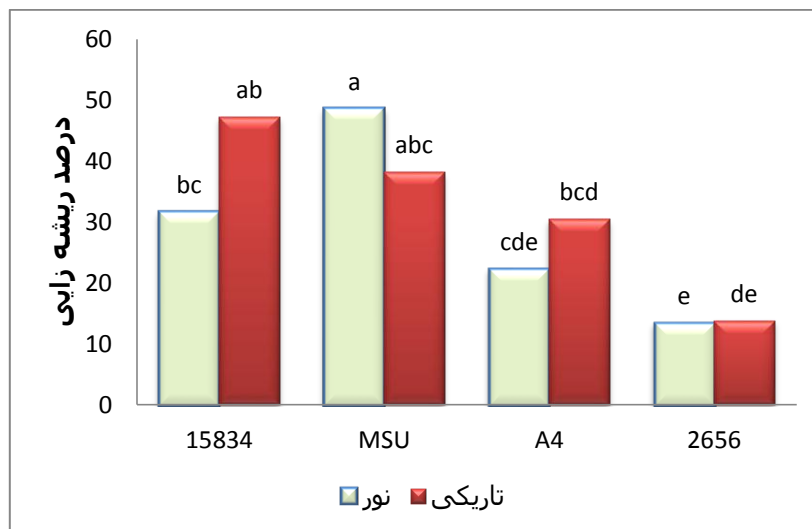
با توجه به شکل دو، دو محیط کشت $1/2B5$ و $1/2MS$ از نظر درصد تولید ریشه مویین، اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند. محیط کشت $1/2B5$ با 35/84 درصد، نسبت به محیط $1/2MS$ با 25/67 درصد، برای بالا بردن میزان تولید ریشه مویین، محیط مناسب‌تری بوده‌است.

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک

پایگاه اطلاع رسانی رویدادهای علمی کشور
All CONFERENCES-IR



شکل (۳) اثر برهمکنش سویه باکتری و شرایط نوری بر تولید ریشه موئین

نمودار اثر متقابل سویه باکتری و شرایط نوری (شکل ۳) نشان می‌دهد بیشترین درصد تولید ریشه مربوط به سویه ۱۵۸۳۴ و در شرایط تاریکی می‌باشد. کمترین درصد نیز مربوط به سویه ۲۶۵۹ و در شرایط تاریکی است. سویه های مختلف آگروباکتریوم در دو شرایط نور و تاریکی اختلاف معنی داری نشان ندادند.

این تحقیق نشان داد که استفاده از سویه *MSU* آگروباکتریوم رایزوزنز برای همکشتی و قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط $B5^{1/2}$ و در شرایط نوری، بالاترین درصد تولید ریشه موئین در گیاه همیشه‌بهار را داشته است.

منابع

- 1- Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie* 1988; 43: 220-1.
- 2- Giri, A. and Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18: 1-22

دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و

۵ شهریور ۹۴

کشاورزی ارگانیک



- 3- Kasiram K, Sakharkar PR, Patil AT. Antifungal activity of *Calendula officinalis*. *Indian J Pharm Sci* 2000; 6:464–6.
- 4- Szakiel, A., Ruszkowski, D. and Janiszowska, W. 2005. Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews* 4: 151–158.
- 5- Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biol* 2006;44(9): 691–7.
- 6- Chandran RP, Potty VP. 2007 Induction of hairy roots through mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 122-128
- 7- Tzfira, T. and Citovsky V. 2008. *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. Springer. pp150