مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۶۰-۱۴۹

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

تاثیر غلظت‌های مختلف عناصر غذایی محیط‌کشت بر بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین خرفه

Effect of different concentrations of medium nutrients on optimization of hairy root induction in purslane

Mehdi Mohebodini*, Roghayeh Fathi

مهدی محب‌الدینی*، رقیه فتحی

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohebodini@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۶)

چکیده

القای ریشه‌های مویین به‌وسیله *Agrobacterium rhizogenes* روش موثری برای افزایش ترکیبات دارویی گیاه خرفه است. ریشه‌های مویین علاوه بر میزان رشد زیاد، از پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی برخوردارند. خرفه (*Portulaca oleracea* L.) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند می‌باشد و دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی از جمله دوپامین و نورآدرنالین است. در این پژوهش ریشه‌های مویین خرفه با استفاده از *Arobacterium rhizogenes* سویه‌ی A4 القا شد. همچنین تاثیر غلظت‌های مختلف عناصر غذایی ماکرو محیط‌کشت (۰/۵x، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x برابر غلظت عناصر در محیط‌کشت MS پایه) بر درصد القای ریشه‌های مویین و میزان فنول و فلاونوئید کل در ریشه‌ها بررسی شد. به‌منظور تائید تراریختی ریشه‌های مویین، وجود ژن *rolB* در ریشه‌های مویین، از روش PCR و پرایمرهای ژن *rolB* استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین در غلظت ۰/۵x پتاسیم نیترات (۸۰درصد) مشاهده شد. غلظت ۰/۵x پتاسیم نیترات بیشترین میزان فنول کل (۴/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشت. بیشترین میزان فلاونوئید کل (۱۸/۲ و ۱۷/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به‌ترتیب مربوط غلظت ۰/۵x و ۱x پتاسیم نیترات بود. تائید مولکولی ریشه‌های مویین تراریخته توسط واکنش PCR انجام شد.

واژه‌های کلیدی

پتاسیم نیترات،
ژن *rolB*،
محیط کشت،
هم‌کشتی

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

مقدمه

گیاهان دارویی به‌منظور دفاع در برابر عوامل بیماریزا و شکارچیان، حفاظت از آسیب نور و جذب حشرات گرده‌افشان و غیره منبع طیف وسیعی از متابولیت ثانویه تولید می‌کنند (Ramachandra and Ravishancar, 2002). اغلب متابولیت‌های ثانویه به دلیل ساختار پیچیده و آرایش خاصی که دارند از گیاهان وحشی یا کشت شده استخراج می‌شوند، زیرا تولید شیمیایی آن‌ها خیلی مشکل و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست (Rates, 2001). تولید ترکیبات دارویی از عصاره‌های گیاهان وحشی یا کشت شده با مشکلات گوناگون از جمله کشت دشوار برخی گیاهان، خطر انقراض برای گیاهان در اثر بهره‌برداری بی رویه و مشکلات جغرافیایی و تغییرات آب و هوایی و سایر عوامل همراه است (Verporte *et al.* 2002). استفاده از کشت درون شیشه‌ای برای تقویت تولید این متابولیت‌ها می‌تواند بر این مشکلات غلبه کند. توسعه‌ی کشت بافت‌های گیاهی تغییر ژنتیکی داده شده و کشت ریشه‌های مویین تراریخته به وسیله‌ی *Agrobacterium rhizogene* گام مهمی در استفاده از کشت درون شیشه‌ای در تولید متابولیت ثانویه می‌باشد (Kim *et al.* 2002). چند ویژگی مهم که سیستم کشت ریشه‌های مویین را به راهکاری ارزشمند و مفید برای تولید ترکیبات دارویی تبدیل می‌کند عبارتنداز سرعت رشد زیاد، بازده و پایداری ژنتیک بالا، تولید ترکیبات دارویی در کوتاه‌ترین زمان ممکن و بی‌نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. شیوه عملکرد باکتری خاکزی *A. rhizogenes* به این صورت است که هنگام ورد به سلول گیاهی، از طریق درج قسمتی از ژن‌های خود موسوم به ناحیه T-DNA در ژنوم گیاهی می‌گردد بخش T-DNA شامل ژن‌هایی است که آنزیم‌های سنتز هورمون‌های اکسین و سایتوکینین را رمز می‌کنند (Baskaran and Jayabalan, 2009).

خرفه گیاهی یک‌ساله از تیره‌ی *Portulacaceae* می‌باشد که برگ‌های ضخیم و دایره‌ای شکل و ساقه‌ی گوشتی به رنگ قرمز ارغوانی و همچنین بذرهای سیاه ریز دارد. که ارتفاع این گیاه اغلب به ٤٠ سانتی‌متر می‌رسد و دارای گل‌هایی به رنگ زرد که در انتهای ساقه گیاه تشکیل می‌گردند(شکل ۱-۱). گیاه خرفه در زبان انگلیسی با نام‌های pigweed، hogweed و purslane نیز نامیده می‌شود (Aamirul-Alam *et al.* 2015). ترکیب‌های شیمیایی متفاوتی ازجمله پتاسیم، مس، کلسیم، آهن، فسفر، منگنز، سلنیوم و همچنین مواد لعابی، کربوهیدرات، سازه‌های پروتئینی، آب، آنتی‌اکسیدان، اسدی چرب غیراشباع و قندهایی مانند پکتین در این گیاه وجود دارد. همچنین این گیاه منبع وسیعی از متابولیت‌های ثانویه‌ی مفیدی چون دوپامین، امگا-۳ و انتقال‌دهنده‌های عصبی مانند نورآدرنالین است (Pirian and Piri, 2012). گیاه خرفه می‌تواند نقش قابل‌توجهی در تغییرات ایجادشده در هومئوستازی بدن ایجاد کند. آزمایش‌های فیتوشیمیایی صورت گرفته بر روی عصاره خرفه نشان داده است که این گیاه حاوی ویتامین‌های A و B، گروهی از اسیدهای آلی مانند سیتریک، سینامیک، کافئیک، اگزالیک، سیتریک، مالیک و آلفا لینولئیک اسید و دیگر ترکیباتی چون آلکالوئید کوئرستین، گلیکوزیدهای قلبی آنتراکینونی، فلاوونوئیدها و کومارین می‌باشد (Ahmadi-Moghadam *et al.* 2013). خرفه در کاهش دردهای ناحیه سر و دردهای میگرنی، دردهای گوارشی بخصوص معده، احساس درد و سوزش در مجاری ادراری، بهبود اسهال و افزایش شیر مادران شیرده مؤثر است. خواص درمانی خرفه برای التیام سوختگی، جای نیش حشرات، انواع التهابات، درد گوش، مسائل پوستی از جمله جراحت، خارش و اگزما، زخم معده و آبسه نیز کاربرد دارد. این گیاه همچنین مانع فعالیت باکتری‌ها و قارچ‌ها و دیگر عوامل بیماری‌زا می‌شود و می‌تواند در کاستن ناگهانی تب‌های بالا، از بین بردن یبوست مؤثر باشد (Mahipal *et al.* 2015). نورآدرنالین، دوپامین و امگا-۳ موجوددر کرک‌های ریشه این گیاه، به‌عنوان تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی در زمان شوک استفاده می‌شوند (Ghorbani *et al.* 2015).

با توجه به این که محیط کشت و ویژگی‌ها و ترکیبات موجود در آن برای کشت ریشه‌های مویین اهمیت زیادی دارد و پژوهش‌های زیادی با هدف بهینه‌کردن این فرآیند انجام شده است اما مطالعات زیادی در زمینه‌ی تاثیر ترکیبات محیط‌کشت بر القای ریشه‌های مویین گیاه خرفه انجام نشده است. نتایج پژوهش Ahmadi-Moghadam *et al.* (2013) با هدف بررسی تأثیر

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

سویه‌ی ATCC15834 برالقای ریشه‌های مویین در قطعه‌های ساقه و کوتیلدون خرفه (در ابعاد سه میلی‌متری) حاکی از این بود که کوتیلدون‌ها بالاترین میزان ریشه‌دهی را نشان دادند و ریشه‌های حاصل از آن‌ها بالاترین سطح دوپامین را داشتند. همچنین طی پژوهشی Pirian and Piri (2012) اثر متیل‌جازمونات و سالیسیلیک‌اسید را برای رسیدن به سطح بیشینه‌ی دوپامین در ریشه‌های مویین خرفه بررسی کردند و دریافتند میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جازمونات و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک سطح متابولیت دومین را به بالاترین حد می‌رسانند. میزان القا و رشد ریشه‌های مویین تابعی تحت تاثیر عوامل مختلف از ترکیبات محیط کشت است. در مطالعه‌ای روی زرین گیاه انجام شد، یافته‌ها حاکی از این بود که محیط‌کشت MS فاقد NH_4NO_3، KH_2PO_4، KNO_3 و $CaCl_2$ موجب افزایش راندمان القای ریشه‌های مویین در این گیاه می‌شود (Sharafi *et al.* 2014). به طور ویژه‌تر، وقتی که محیط‌کشت MS فاقد $CaCl_2$ بود، سنتز ریشه‌های مویین را در گیاه *Hevea brasiliensis* افزایش داد (Montoro *et al.* 2000). تأثیر مثبت حذف ترکیبات معدنی از محیط‌کشت به‌منظور افزایش کارایی *A. rhizogenes* در تراریخته‌سازی گیاه *Ginkgo biloba* نیز گزارش شده است (Dupre *et al.* 2000). با توجه به عدم بررسی اثر غلظت عناصر محیط‌کشت در القای ریشه‌های خرفه، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عناصر غذایی ماکرو محیط‌کشت در بهینه‌سازی القا و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه خرفه انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تهیه‌ی گیاهچه‌های استریل، بذرها پس از آبکشی با آب مقطر به داخل هود لامینار برده شد و با هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد. سپس، چند مرحله آبکشی انجام شد. آخرین مرحله ضدعفونی به وسیله‌ی الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و نیم ثانیه انجام شد. در نهایت، پس از چند مرحله آبکشی با آب مقطر، بذرها در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شد. دمای اتاقک رشد روی ۲ ± ۲۵° تنظیم شد. برای تأمین نور مورد نیاز از منبع نوری با روشنایی ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۱۶ ساعت استفاده شد. از ریزنمونه‌های گیاهچه‌کامل جهت تلقیح با باکتری استفاده شد.

به‌منظور القای ریشه‌های مویین، از سویه‌ی A4 و ریزنمونه‌ی گیاهچه‌ی کامل استفاده شد. برای تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری، یک کلونی از این باکتری در ۱۵ میلی لیترمحیط کشت LB (Luria-Bertani) که دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین بود کشت شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور چرخشی در دمای ۲٦ درجه‌ی سانتیگراد و با ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شد. سوسپانسیون حاوی باکتری با استفاده از سرنگ به نقاط مختلف ریزنمونه‌های گیاهی تزریق شد. از کاغذ صافی برای خشک کردن ریزنمونه‌های تلقیح شده جهت جداسازی باکترهای اضافه از روی آن‌ها استفاد کرد. سپس این ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS جامد حاوی نیترات پتاسیم (KNO3)، نیترات آمونیوم (NH4NO3)، پتاسیم فسفات (KH2PO4)، منیزیوم سولفات (MgSO4) و کلسیم کلرید (CaCl2) در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت MS انتقال داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲ ± ۲۵° قرار داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح‌نشده به عنوان شاهد در شرایط مشابه کشت شدند. سپس بعد از اتمام زمان هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها در آب سترون که حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بود شستشو و پس از استفاده از کاغذ صافی جهت خشک کردن به شکل نسبی، به محیط کشت MS جامد انتقال داده شدند. در این محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد بود و همچنین ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به آن اضافه شده بود. درصد القای ریشه‌ها و میانگین تعداد ریشه‌ها و میزان فنول و فلاونوئید کل را چهار هفته پس از ریشه‌زایی اندازه‌گیری شد.

در این پژوهش، برای تشخیص ریشه‌های مویین علاوه بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی ریشه‌ها مانند زمان القا، محل خروج ریشه از ریزنمونه، میزان رشد آن‌ها، از تایید مولکولی نیز با

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rol*B استفاده شد. از روش CTAB (Khan *et al*., 2007) برای استخراج DNA از ریشه‌های مویین ریزنمونه‌های تلقیح یافته و همچنین ریشه‌های نابجای ریزنمونه‌های تلقیح‌نیافته به عنوان شاهد استفاده شد. پلاسمید سویه A4 نیز به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. از ترموسایکلر ساخت Qantarus برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B که از سایت NCBI گرفته شده بود استفاده شد. توالی آغازگرها به این شکل بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر غیرمستقیم). برنامه RCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ °C مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. واکنش زنجیرهای پلیمراز برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۰/۸ میکرولیتر منیزیم کلرید (mM ۵۰)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، ۰/۲ میکرولیتر DNA پلیمراز تک، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۱ mM) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل انجام شد. سپس محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد از هم جدا شد و در دستگاه ژل داک مدل ATP SN: G089301، عکس‌برداری شد.

روش Sonald and Laima (2001) و Heimler et al. (2009) به‌ترتیب برای اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل ریشه‌ها استفاده شد. برای این منظور ابتدا مقدار ۲ گرم از بافت ریشه‌های مویین در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و فرمیک اسید به نسبت ۹۹:۱ سائیده شد و میزان فنول و فلاونوئید در عصاره‌ی حاصل محاسبه شد. بعد از ترکیب ۵۰۰ میکرولیتر عصاره پلی‌فنلی و ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، میزان ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ برابر رقیق‌شده و ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. پس از افزودن ۳ میلی لیتر آب سترون به محلول و نگهداری آن مدت ۹۰ دقیقه در تاریک، میزان جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای سنجش فنول کل از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. برای سنجش فلاونوئید کل، ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره پلی فنلی، ۷۵ میکرولیتر سدیم نیترات ۵ درصد، ۷۵ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم هیدروکساید ۱مولار با هم مخلوط شدند. در نهایت با اضافه‌کردن آب دو بار تقطیرشده حجم نهایی محلول به ۲/۵ میلی‌لیتر رسید. میزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد و از منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه مقدار فلاونوئید کل استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدقبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام و مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن محاسبه و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

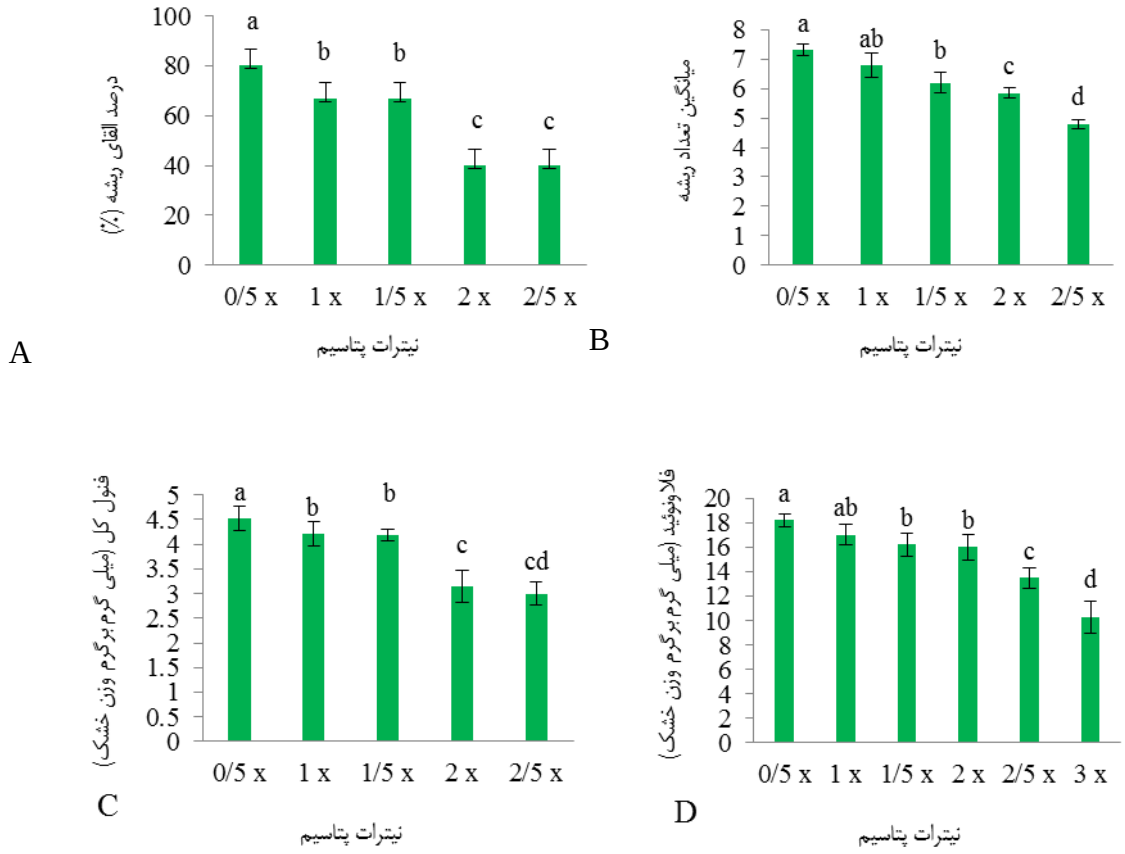
نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف نیترات پتاسیم بر القای ریشه‌های مویین

اولین ریشه‌های مویین پس از گذشت ۷ روز در ریزنمونه‌ها مشاهده شد. ریزنمونه‌های تراریخته برخلاف ریزنمونه‌های غیر تراریخته ریشه‌های طویل با انشعابات زیاد تولید کردند در حالی که ریزنمونه‌های غیر تراریخته درصد ریشه‌دهی پایین داشته وریشه‌ها با تاخیر ظاهر شدند. شکل ۱ تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات بر میزان القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول و فلاونوئید کل را نشان می‌دهد. محیط کشت حاوی ۰/۵x پتاسیم نیترات دارای بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۸۰ درصد) و میزان فنول کل (٤/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود (شکل ۱ A و C). علاوه‌براین، محیط کشت حاوی ۰/۵x و ۱x پتاسیم نیترات بیشترین میانگین تعداد ریشه (۷/۳ و ٦/۸) و فلاونوئید کل (۱۸/۲ و ۱۷/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشت (شکل ۱ B وD). احتمالاً استفاده از غلظت پایین پتاسیم نیترات (۰/۵x) موجب افزایش توانایی باکتری در درج و بیان ژن‌های خود در سلول‌های محل زخم گیاه و در نتیجه منجر به افزایش تراریختگی توسط باکتری شده است، با افزایش

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

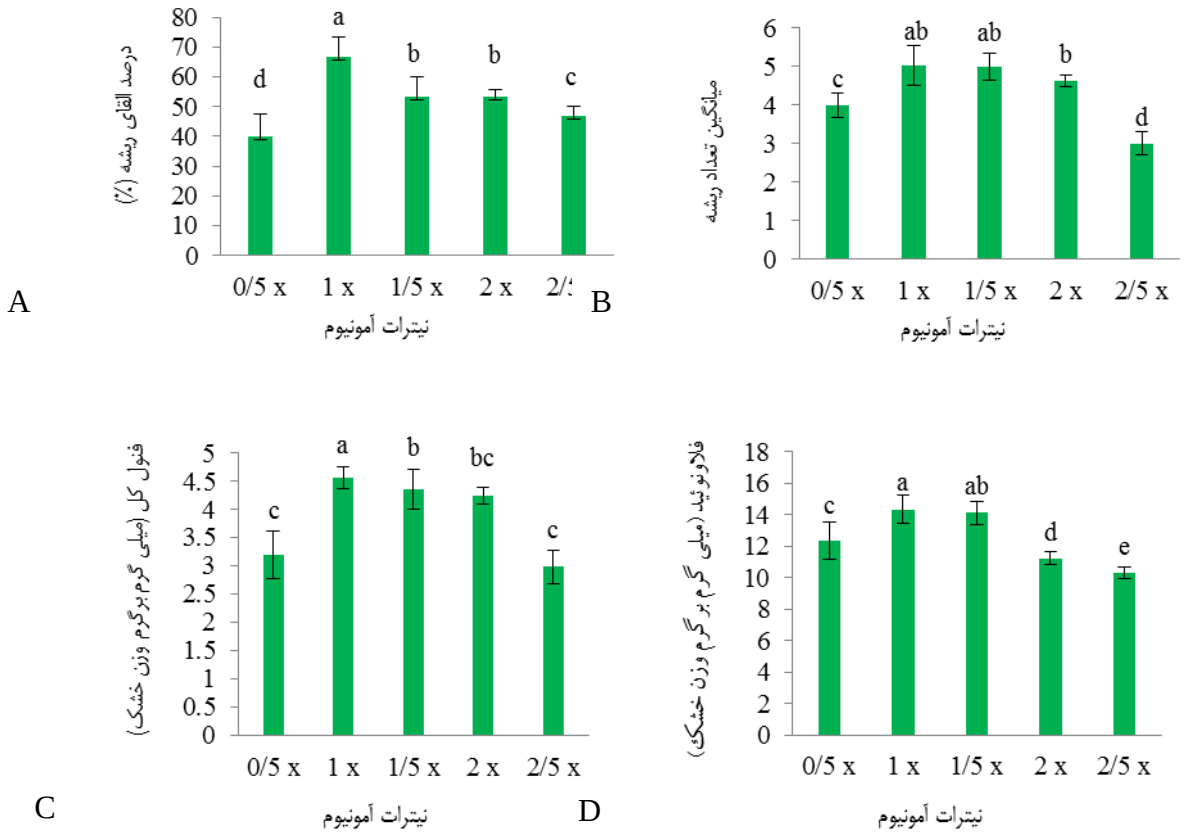
میزان پتاسیم نیترات درصد القای ریشه‌های مویین کاهش یافت. می‌توان نتیجه گرفت که یک اثر مهارکنندگی بر القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین گیاه توسط نیترات پتاسیم وجود دارد (Young-Am *et al.* 2000). گیاهان برای رشد بهینه به نیتروژن نیاز دارند. این عنصر در طبیعت به دو شکل آمونیوم و نیترات یافت می‌شود که گیاه تنها از نیترات می‌تواند استفاده کند. جذب آن از طریق سلول‌های ریشه گیاه است و بر فرآیندهای مختلف مربوط به رشد گیاه تأثیر می‌گذارد (Shanjani, 2003). در این پژوهش کاهش میزان نیترات پتاسیم در محیط کشت باعث افزایش القای ریشه‌های مویین گردید که با نتایج پژوهش Shirin et al. (2015) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش نمودند که بیشترین میانگین تعداد شاخساره در گیاه آکاسیا (*Saraca asoca*) در محیط کشت حاوی عناصر ماکرو به غلظت یک چهارم میزان آن در محیط کشت MS پایه قابل مشاهده است. همچنین Tabone *et al.* (1986) بیشترین تولید شاخه در سطوح پایین نیتروژن را در گیاه *Prosopis alba* گزارش دادند. همچنین Fathi *et al.* (2019) گزارش کردند که در محیط کشت فقیر از نظر نیتروژن، بعضی از سویه‌های *A. rhizogenes* از جمله A4 جهت مهندسی ژنتیک این گیاه کاسنی عملکرد مطلوب‌تری دارند و در محیط‌های فقیر از نظر محتوای فسفری، سویه‌هایی مانند ATCC15834 بهترین عملکرد تراریخته‌سازی گیاه داشت. این تفاوت در عملکرد را می‌توان به تفاوت‌های ساختاری و عملکردی هر یک از سویه‌ها نسبت داد.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم بر صفات ریشه‌های مویین

Fig 1. The effects of different concentration of KNO_3 on hairy root characteristics

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر صفات ریشه‌های مویین

Fig 2. The effects of different concentration of NH_4NO_3 on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف نیترات آمونیوم بر القای ریشه‌های مویین

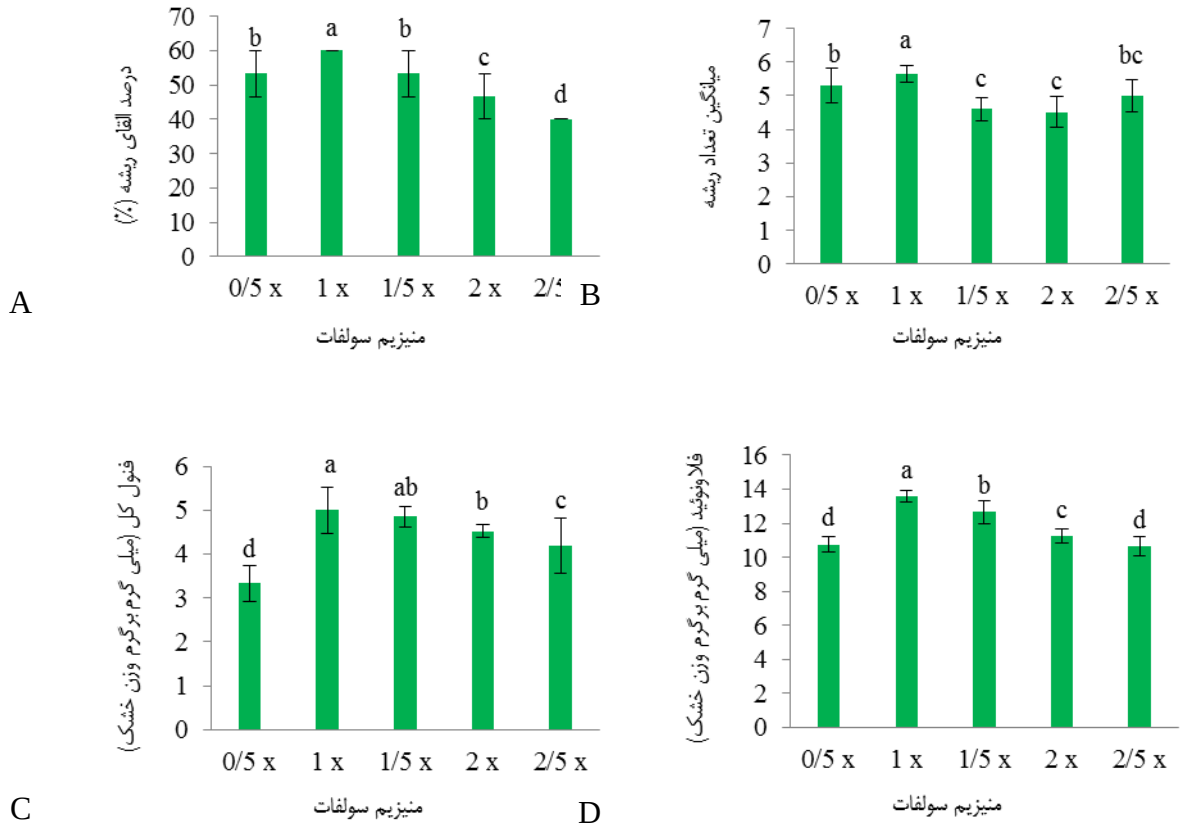
غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت) تأثیر مستقیم بر القای ریشه‌های مویین داشت. محیط کشت حاوی ۱x نیترات آمونیوم دارای بیشترین میزان القای ریشه‌های مویین (٦٦/٦٦ درصد) و فنول (٤/٥٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. بیشترین میانگین تعداد ریشه (٥/٠٣ و ٥ عدد) بود و میزان فلاونوئید کل (١٤/٣٢ و ١٤/١٢ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار محیط کش ت حاوی نیترات آمونیوم ۱x و ۱/۵x مشاهده شد (شکل ۲ A، B، C و D). از دیگر منابع نیتروژن مورد نیاز گیاهان برای رشد، نیترات آمونیوم است که نقش مثبت آن در بهبود سنتز پلی‌آمین‌ها (Chen *et al.* 2011)، متابولیت‌های ثانویه و مواد آنتی‌اکسیدانی قابل توجه است (Shehata *et al.* 2014). همچنین اثبات شده است که سطوح بالای آمونیوم در اندام زایی و زنده‌مانی بافت‌های گیاهی نقش دارد (Alturki *et al.* 2010). Fan *et al.* (1998) گزارش کردند که سنتز شیکمیک‌اسید در اثر افزایش کاربرد آمونیوم افزایش یافت. اما نتایج متناقض دیگری در ارتباط با پژوهش ما هم گزارش شده است، به‌عنوان تأثیر مثبت غلظت‌های پایین نیترات آمونیوم در افزایش تولید جنسینوزید در گیاه جینسنگ گزارش شده است (Zhong and Wang, 1998).

تأثیر سطوح مختلف منیزیم سولفات بر القای ریشه‌های مویین

تأثیر سطوح مختلف منیزیم سولفات محیط کشت بر میزان القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول کل و فلاونوئید کل در شکل ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین درصد القای ریشه‌های مویین (٦٠ درصد)، میانگین تعداد ریشه (٥/٦٥ عدد)، میزان فنول (٥ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و میزان فلاونوئید (١٣/٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار حاوی ۱x منیزیم سولفات دیده شد (شکل ۳ A،B،C و D). می‌توان نتیجه گرفت که برای بهینه‌سازی القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۱x منیزیم سولفات مناسب است. تا به حال پژوهش‌های اندکی در مورد اثر غلظت‌های مختلف این نمک بر سطح القای ریشه‌های مویین و

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

رشد ریشه‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. (Hank *et al.* (2003 روی سطح تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین گیاه شابیزک پژوهشی انجام دادند و گزارش کردند که بالاترین سطح اسکوپولامین و هیوسیامین به ترتیب در ۱۰۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم منیزیم سولفات مشاهده شد و افزایش سطح آن با افزایش وزن تر ریشه‌ها رابطه مستقیمی داشت. همچنین نتایج پژوهشی مرتبط روی گیاه سرخارگل نشان دادند در غلظت ۱۶۰۰ میلی‌گرم منیزیم سولفات بالاترین تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه به دست آمد Abdoli *et al.* (2013). در مطالعه‌ای روی تنباکوی هندی، بیشترین میزان متابولیت لوبلین و بیوماس به ترتیب در محیط کشت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کلرید (۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و حاوی یک گرم در لیتر منیزیم سولفات دیده شد.آن‌ها در نهایت محیط کشت B5 پایه به‌همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم سولفات را بهترین ترکیب برای تولید لوبلین معرفی کردند (Balvanyos et al. 2003).



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر صفات ریشه‌های مویین

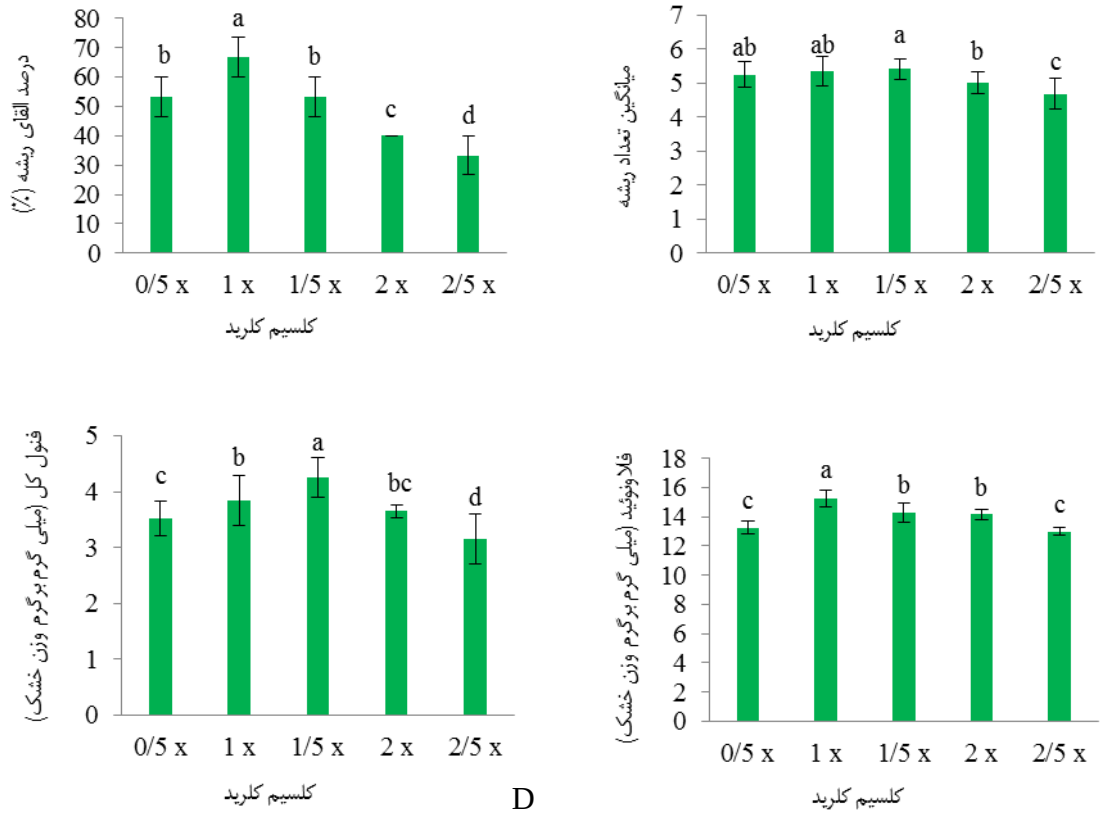
Fig 3. The effects of different concentration of $MgSO_4$ on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف کلسیم کلرید بر القای ریشه‌های مویین

تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید در محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین خرفه نشان داد که غلظت ۱x بیشترین تأثیر را در افزایش درصد القای ریشه‌های مویین (٦٦/٦٦) و فلاونوئید کل (۱۵/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریشه) داشت (شکل A٤ و D). بیشترین میانگین تعداد ریشه (۵/٤۲ عدد) و فنول کل (٤/٢٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریشه) در تیمار ۱/۵x مشاهده شد (شکل B٤ و C). سه تیمار با غلظت پایین‌تر کلسیم کلرید (۰/۵x، ۱x و ۱/۵x) دارای میزان القای ریشه‌های مویین و میانگین تعداد ریشه بیشتری نسبت به غلظت‌های بالای کلسیم کلرید (۲x و ۲/۵x) بودند که این امر می‌تواند نشان‌دهنده اثرات منفی (سمیت) غلظت‌های بالای این نمک و احتمالاً یون‌های کلر باشد. میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت حاوی سطوح بالای کلسیم کلرید نیز کم بود؛ احتمالاً افزایش آنزیم پراکسیداز در اثر

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

افزایش غلظت کلسیم کلرید در محیط کشت در گیاه موجب تجزیه‌ی متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Ajungla *et al.* 2009)، نتایج مشابهی نیز توسط Abdoli *et al.* (2013) در رشد ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل مشاهده شد. هم‌چنین گزارش شده است که مقادیر بالای کلسیم کلرید در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای موجب کاهش رشد و زرد شدن بافت گیاه پروانش گردیده است (Siddiqui and Mujib, 2012). نتیجه مشابه‌ی نیز با کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کلرید در محیط کشت گیاه *Brugmansia candida* گزارش شده است (Pitta Alvarez *et al.* 2000).



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر صفات ریشه‌های مویین

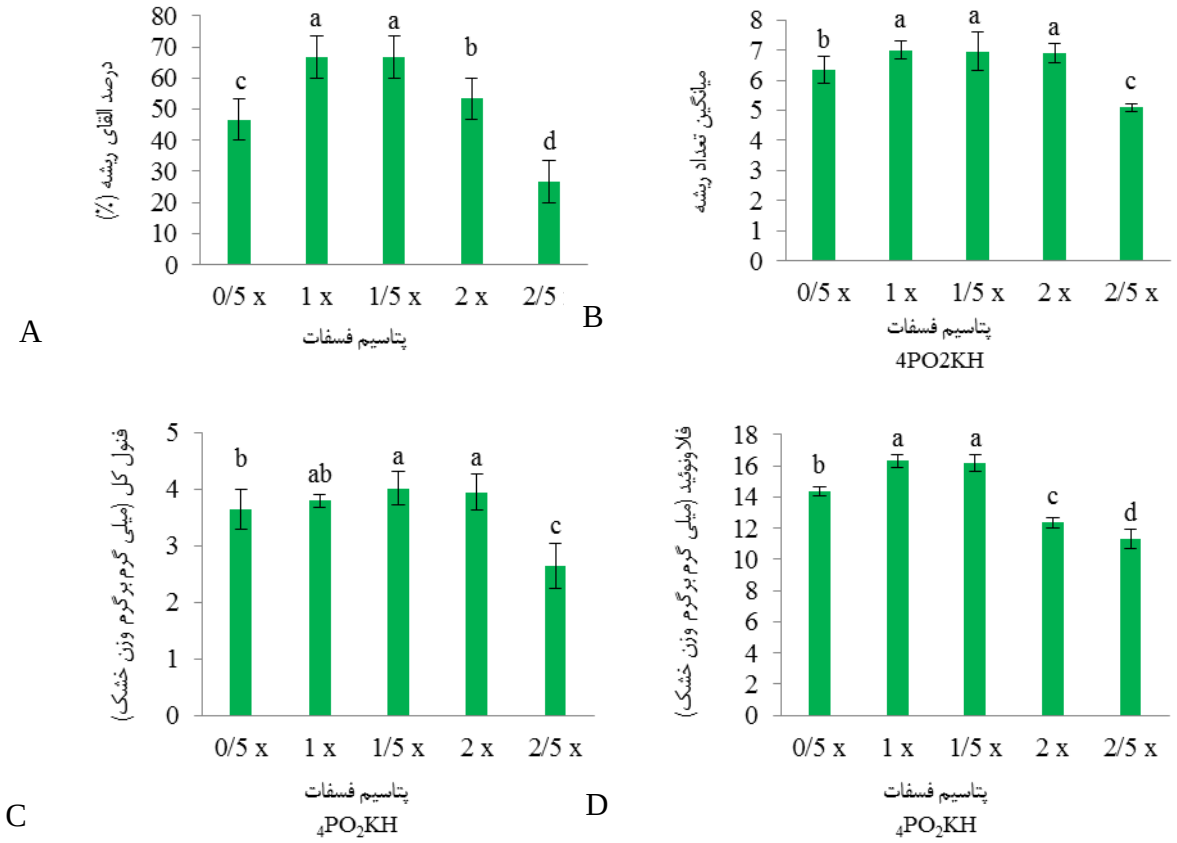
Fig 4. The effects of different concentration of $CaCl_2$ on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف پتاسیم فسفات بر القای ریشه‌های مویین

بیش‌ترین میزان القای ریشه‌های مویین (٦٦/٦٦ درصد) در محیط کشت حاوی ۰/۵x و ۱x پتاسیم فسفات مشاهده شد، بیشترین میانگین تعداد ریشه (۷ عدد)، میزان فلاونوئید کل (١٦/٣٢ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱x پتاسیم فسفات مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان فنول کل (٤/٠٢ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱/۵x پتاسیم فسفات مشاهده شد. کمترین درصد القای ریشه‌های مویین (٢٦/٦٦)، میانگین تعداد ریشه (۵/۱ عدد)، میزان فنول کل و فلاونوئید (به ترتیب ٢/٦٥ و ١١/٣ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نیز در محیط کشت حاوی ۲/۵x پتاسیم فسفات مشاهده شد (شکل ۵ A، B، C و D)، این امر نیز نشان‌دهنده ایجاد سمیت فسفات همانند سایر عناصر در کاربرد با غلظت بالا می‌باشد. فسفر دارای نقش مؤثری در بسیاری از فرآیندی گیاهی از جمله فتوسنتز، ذخیره‌ی انرژی و تقسیم سلول‌های گیاهی می‌باشد (Azadi *et al.* 2010). در پژوهشی گزارش شده است که کاهش میزان فسفات از محیط کشت موجب افزایش توانایی *A. rhizogenes* در اتصال به گیاه میزبان و انتقال ناحیه‌ی موسوم به T-DNA از باکتری به ژنوم گیاه می‌شود (Danhorn *et al.* 2004). همچنین Khahrizi *et al.* (2017) نیز گزارش کردند افزایش

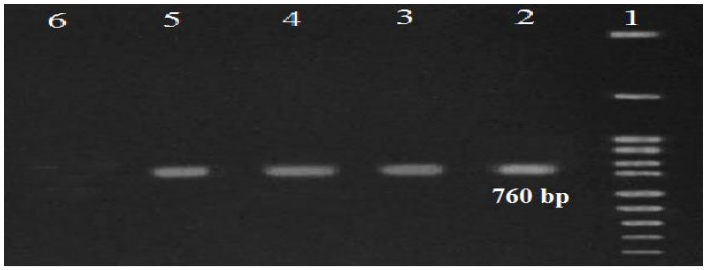
[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

ربادیوزید در گیاه استویا می‌تواند به علت کاربرد سطوح بالای پتاسیم فسفات در محیط کشت این گیاه باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای ژن *rol*B برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین استفاده شد. با توجه به این که می‌باشد، تکثیر قطعه‌ای توالی تکثیرشونده با آغازگر با طول ۷۶۰ bp دراین گیاهان تراریخت حضور حداقل یک نسخه از ژن را در آن‌ها تأیید می‌کند. قطعه مورد نظر در باکتری به‌عنوان کنترل مثبت تکثیر شد، اما ریشه‌ی شاهد به‌عنوان کنترل منفی تکثیری نشد. همچنین عدم وجود آلودگی سطحی *A. rhizogenes* در سطح ریشه‌ها به دلیل تکثیر نشدن پرایمر *vir*D مشاهده شد (شکل ٦).



شکل ٥- تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم فسفات بر صفات ریشه‌های مویین

Fig 5. The effects of different concentration of KH2PO4 on hairy root characteristics



شکل ٦- تکثیر قطعه‌ی DNA به اندازه‌ی ۷٦۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B بر روی DNA ریشه‌های مویین.: 1: نشانگر اندازه‌ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، 2: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* به‌عنوان شاهد مثبت، 3-5: ریشه‌های مویین، 6: ریشه‌های شاهد حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی

Fig 6. PCR amplified DNA fragments (760 bp) using specific primers for *rol*B gene of *A. rhizogenes* on hairy root DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2: *A. rhizogenes* plasmid as positive control 3-5: hairy roots, 6: Adventitious root raised form non-transformed explant as negative control.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

نتیجه‌گیری

از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که بیش‌ترین درصد القای ریشه‌های مویین در غلظت ۰/۵x پتاسیم نیترات مشاهده شد (۸۰ درصد) که می‌توان دلیل آن را اثر بازدارندگی این عناصر در انتقال و درج ژنوم *A. rhizogenes* دانست و کاهش مقدار پتاسیم نیترات در محیط‌کشت منجر به افزایش تراریختگی توسط باکتری شد. در مورد سایر نمک‌ها نیز غلظت ۱x بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین را نشان داد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که القای ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه در خرفه تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت قرار دارد. بیش‌ترین میزان فنول کل در هر تیمار، در غلظت ۰/۵x پتاسیم نیترات، ۱x نیترات آمونیوم، ۱x منیزیم سولفات، ۱/۵x کلسیم کلرید و ۱/۵x پتاسیم فسفات مشاهده شد. همچنین غلظت‌های ۰/۵x پتاسیم نیترات، ۱x نیترات آمونیوم، ۱x منیزیم سولفات، ۱x کلسیم کلرید و ۱x پتاسیم فسفات بیشترین میزان فلاونوئید را نشان دادند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان نمود که سیستم کشت ریشه‌های مویین یک رهیافت مفید و کارآمد برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی گیاهان در سطح وسیع می‌باشد و استفاده از آن‌ها در صنایع داروسازی و سلامت باید مورد توجه بیش‌تری قرار گیرد.

منابع

Aamirul-Alam M, Juridimi A, Rafii A. 2014. Genetic improvement of porslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects. Molecular biology reports 41: 7395-7411.

Abdoli M, Moieni A, Naghdi Badi H. 2013. Influence of KNO_3, $CaCl_2$ and $MgSO_4$ concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Journal of Medicinal Plants 12: 75-84.

Ahmadi-Moghadam Y, Piri K, Bahramnejad B, Habibi P. 2013. Methyl jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (Purslan). BEPLS 2: 89–94.

Ajungla L, Patil P, Barmukh R, Nikam T. 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of Datura metel L. Indian Journal of Biotechnology 8: 317-322.

Al-Turki S, Shahba MA, Stushnoff C. 2010. Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (Phoenix dactylifera L.) fruits as affected by cultivar and location. Journal of Food, Agriculture and Environment 8: 253-260.

Azadi P, Chin DP, Kuroda K. 2010. Macro elements in inoculation and co-culture medium strongly affect the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation in Lilium. J. Plant Cell Tissue Organ Cult 101(2): 201-209.

Balvanyos I, Szoke E, Kursinszki L, 2003. Effect of macroelements on the growth and lobeline production of Lobelia inflata L. hairy root cultures. Acta Horticult 597: 245-251.

Baskaran P, Jayabalan N. 2009. Psoraleh production in hairy roots and adventitious roots culture of *Psoralea coryfolia*. Biotechnol Lett 31: 1037-1077.

Chen L, Liu QQ, Gai JY, Zhu YL. 2011. Effects of nitrogen forms on the growth and polyamine contents in developing seeds of vegetable soybean. Journal of Plant Nutrition 34: 504-521.

Danhorn T, Hentzer M, Givskov M. 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR–PhoB regulatory system. J. Bacteriol 186: 4492-4501.

Dupre P, Lacoux Y, Neutelings G. 2000. Genetic transformation of Ginkgo biloba by *Agrobacterium tumefaciens*. Physiol Plant 108: 413–419.

Fan Y, Wang Y, Tan R, Zhang Z. 1998. Seasonal and sexual variety of Ginkgo flavonol glycosides in the leaves of *Ginkgo biloba* L. Journal of Traditional Chinese Medicine 23: 267-269.

Fathi R, Mohebodini M, Chamani E. 2019. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. Industrial Crops and Products 128: 572-580.

Ghorbani M, Ghorbani M, Omidi S, Hashemi M. 2015. Response surface modelling of noradrenaline production in hairy root culture of purslane (*Portulaca oleracea* L.). Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology 3(6): 349-443.

Hank H, Laszlo I, Balvanyos I, Toth E. 2003. Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. Acta Horticulturae 597: 271-274.

Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A. 2009. Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. Food Chemistry 114: 765–770.

Henzelyova J, Cellarova E. 2018. Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived *Hypericum tomentosum* regenerants. Acta Physiologiae Plantarum 40(5): 82.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

Kahrizi D, Ghari S, Ghaheri M. 2017. Effect of KH2PO4 on gene expression, morphological and biochemical characteristics of Stevia rebaudiana Bertoni under in vitro conditions. Cellular and Molecular Biology 63: 107-111.

Khan S, Irfan QM, Kamaluddin AT, Abdin MZ. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. Afr J Biotechnol 6: 175-178.

Kim Y, Wysolouzil B, Weathers PJ. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures bioreactore. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38: 1-10.

Mahipal SSH, kanan N, manokari M. 2015. Propagation of *purtulacae oleracea* L. in liquid medium: implications of plant growth regulators in culture. Journal of microbiology and biotechnology and food sciences 4(4): 332 -335.

Montoro P, Teinseree N, Rattana W. 2000. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Rep 19: 851–855.

Pirian LK, Piri K. 2012. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots. *Portulaca oleracea*, International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(1): 213-218.

Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM, 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology 26: 252-258.

Ramachandra RS, Ravishancar GA. 2002. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv 20: 101-153.

Rates SMK. 2001. Plant as sources of drugs. Toxicon 39: 603-613.

Shanjani PS. 2003. Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. International Journal of Agriculture and Biology 5: 419-422.

Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, Sharafi AA. 2014. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. Physiology and Molecular Biology of Plants 20(2): 257-262.

Shehata WF, Aldaej MI, Alturki SM, Ghazzawy HS. 2014. Effect of ammonium nitrate on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. Biotechnology 13: 116-125.

Shirin F, Parihar NS, Shah SN. 2015. Effect of nutrient media and KNO_3 on in vitro plant regeneration in *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. American Journal of Plant Sciences 6: 3282.

Siddiqui ZH, Mujib A. 2012. Accumulation of vincristine in calcium chloride elicitated *Catharanthus roseus* cultures. The Natural Products Journal 2: 307-315.

Sonald SF, Laima SK. 2001. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*, Plant Agriculture 1: 1-5.

Tabone T, Felker P, Bingham R. 1986. Techniques in the shoot multiplication of the *leguminous* tree *Prosopis alba* clone B2V50. Forest Ecology and Management 16: 191-200.

Verpoorte R, Memelin J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants, Curr Opin Biotechnol 13: 181–187.

Young-Am C, Yu HS, Song JS, Chun HK, Park SU. 2000. Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. Biotechnology letters 22(19): 1527-1530.

Zhong JJ, Wang SJ. 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of Panax quinquefolium. Process Biochemistry 33: 671-675.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Effect of different concentrations of medium nutrients on optimization of hairy root induction in purslane

Mehdi Mohebodini*, Roghayeh Fathi

Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding Author, Email: mohebodini@uma.ac.ir

Abstract

Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* is a reliable method to increase *P. oleracea* medicinal compounds. The hairy roots in addition to high growth rates are genetically and biochemically stable. Purslane (*Portulaca oleracea* L.) is one of the valuable medicinal plants and has important secondary metabolites such as dopamine and noradrenaline. In this study, hairy roots of Purslane were produced by using *Agrobacterium rhizogenes* strain A_4 and different concentrations of macro elements (0.5x, 1x, 1.5x, 2x and 2.5x concentrations of MS base medium) were investigated. For confirming hairy roots transformation, the presence of the *rolB* gene in the hairy roots was performed by PCR and using *rolB* gene's specific primers. The results show that maximum hairy root induction was observed by using 0.5x KNO_3 (80 percentage). The highest phenolic content was obtained by using 0.5x KNO_3 (4.52 mg/g DW) and also maximum flavonoid content, (18.2 and 17.02 mg/g DW respectively) was belonged to 0.5x and 1x KNO_3. Molecular confirmation of transgenic hairy roots was done with PCR reaction.

Keywords: Co-culture, KNO_3, *Rol*B gene, Medium.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.7.2]