

آنالیز بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی کافئیک اسید ریشه های موین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژنز

فرح فراهانی^۱، معصومه انصاری بیدار^۱، محسن زرگر^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

نویسنده مسئول: فرح فراهانی

ایمیل: botany412@gmail.com, farahfarahani2000@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲۷۷۸۱۷۱

چکیده

هدف: خرفه (*Portulaca oleracea* L.) در طب سنتی بسیاری از کشورها استفاده می شود. ریشه خرفه حاوی ترکیبات ثانویه مفید و به مقدار بسیار کم هستند. هدف تحقیق حاضر کاربرد یکی از روشهای زیست فناوری، به منظور افزایش تولید ترکیبات موثر دارویی با تولید ریشه های موین می باشد.

مواد و روشها: دانه های خرفه ضدعفونی شده کشت شدند، محور زیر لپه دانه رستها را با آگروباکتریوم ریزوژنز (جدایه های A4 و A15) تلقیح کردند. آزمایش های PCR (Polymerase Chain Reaction) برای تایید انتقال ژن انجام شدند. محور زیر لپه گیاهان تلقیح شده و شاهد (تلقیح نشده با باکتری) را بر روی محیط کشت (MS (Murashig & Skoog, 1962 جامد کشت دادند. وجود کافئیک اسید حاصل از گیاهان تراریخته و کنترل با آنالیزهای HPLC (High Performance Liquid Chromatography) و فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: آزمایش های PCR حضور ژن *rolB* از جدایه های A4 و A15 را در خرفه تراریخته نسبت به کنترل (فاقد ژن *rol*) نشان دادند. با تشکیل کالوس، ریشه موین القا شدند. وجود ریشه های موین خرفه تراریخته در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بودند. آنالیز HPLC وجود مقدار بیشتر کافئیک اسید در خرفه تراریخته را نسبت به شاهد تایید کردند، که ۳۴ درصد بالاتر بودند، فعالیت آنتی اکسیدانی خرفه تراریخته با جدایه A4 ۸۶/۷۳۷ بودند که درصد بازدارندگی در غلظت پایین انجام شده است.

نتیجه گیری: ریشه های موین خرفه تراریخته می توانند برای افزایش بازده تولید آلکالوئیدهای کافئیک اسید در صنایع داروسازی قابل استفاده باشند.

کلمات کلیدی: انتقال ژن، خرفه، ریشه موین، آنتی اکسیدان، تراریخته

کلمات مخفف: HPLC: High Performance Liquid Chromatography; PCR: Poly Chain Reaction;

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Analysis of biochemical (HPLC) and anti-oxidative of Caffeic Acid in hairy root of Purslane (*Portulaca oleracea*) Transformed using *Agrobacterium rhizogenes*

Farah Farahani ^{1*}, Masoumeh Ansari Bidar ¹, Mohsen Zargar ¹

1 Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

***Corresponding Author:** Farah Farahani, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Phone number : +989122778171

Email: farahfarahani2000@yahoo.com. Botany412@gmail.com

Running Title : Analysis of Biochemical and anti-oxidative hairy root of Purslane

Abstract

Purpose: *Portulaca oleracea* L. used as a folk medicine in many countries. Roots contain natural compositions, but they are very low. The goal of project is using one of methods biotechnology, for increasing of medicinal metabolites by hairy root production.

Material and Methods: Seeds of *P. oleracea* were disinfected. Hypocotyl of seedlings were inoculated by *A. rhizogenes* (strains A15 and A4). PCR analysis was carried out to confirm the presence of the *rolB* gene in the genome of putative transformants. Hairy roots cultivated in MS (Murashige & Skoog, 1962) medium of free regulators were harvested and used for determination of caffeic acid content by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and antioxidant capacity were evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method.

Results: PCR analysis showed *rolB* gene presence in A4 and A15 transformed putative purslane, but no presence in control (non-transformed purslane). Callus formed then hairy roots induced. The production of hairy roots was significant in $P < 0.05$. The amount of Caffeic Acid was 34% higher in line A4 and line A15 hairy roots than control and confirmed by HPLC analyze. Antioxidant activity was in line A4 hairy roots 86.737%, then showed inhibition present at very low concentration.

Conclusion: Transgenic purslane hairy roots can be used to increase the production efficiency of caffeic acid alkaloids in the pharmaceutical industry.

Keywords : Gene Transformation, Purslane, Hairy root, Antioxidant, Transformed

Abbreviation: HPLC: High Performance Liquid Chromatography; PCR: Poly Chain Reaction; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۱-مقدمه

گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی موثر بعنوان گیاهان دارویی شناخته می شوند. ترکیبات طبیعی گیاهان از بخش های مختلف شاخه، برگها، گلها، ریشه ها، میوه ها و دانه ها حاصل می شوند، همچنین آنها از زمان های بسیار قدیم توسط انسان ها بعنوان دارو مورد استفاده قرار می گرفتند (۱). تاثیر مفید دارویی ترکیبات طبیعی گیاهان عموماً بدلیل تولید ترکیبات ثانویه موجود در گیاهان هستند. کشت درشیشه (*In vitro*) سلول ها و بافتهای گیاهی به منظور تولید متابولیت های ثانویه مختلف معمولاً بدلیل مقدار بازده کم و ناپایداری های ژنتیکی با موفقیت پایین همراه است. در سال های اخیر، محققان بسیاری به فرآیند تلقیح باکتری گرم منفی خاک "آگروباکتریوم ریزوژنز" برای تولید ریشه های موین توجه کرده اند. آگروباکتریوم بعنوان یک ناقل طبیعی برای انتقال ژن عمل می کند که موجب تولید ریشه های موین در گیاهان تراریخته می شود (۲). ریشه های موین حاصل از انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم ریزوژنز بدلیل رشد سریع، ترکیبات بیوشیمیایی پایدار و تولید متابولیت های ثانویه نسبتاً زیاد بطور گسترده برای تولید ترکیبات مفید گیاهی استفاده می شوند (۳،۴،۵).

خرغه (*Portulaca oleracea*) در فهرست گیاهان دارویی سازمان بهداشت جهانی (WHO) بعنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی است و بنام اکسیر جهانی شناخته شده است (۶). خرغه با پراکندگی و فراوانی بسیار فراوان، در طب سنتی بسیاری از کشورها کاربرد دارد. اخیراً، بسیاری از مطالعات فارماکولوژیکی نشان دادند، که گیاه دارویی خرغه کاهنده دردهای معده و کبد، ادرارآور و عصاره برگ آن در درمان درد کلیه مفید است (۷)، همچنین عامل ضددرد و ضدسرفه و نیز در کنترل قند خون بیماران دیابتی کاربرد دارد (۸). در بسیاری از نواحی دنیا شامل کشورهای شرق آسیا بعنوان سبزی خوراکی استفاده می شود (۹). خواص زیستی دیگر ضد التهاب، انبساط ماهیچه و کنترل تب (۱۰)، ممانعت از حمله های قلبی و بهبود سیستم ایمنی انسان را بعهدہ دارد. خرغه غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ است (۱۱). علاوه بر این، از مهمترین ترکیبات شیمیایی گیاه خرغه اسیدهای فنولیک و گلیکوزیدهای فلاون، مانند هسپیریدین (HP) و کافئیک اسید (CA) (۱۲)، فرولیک اسید و کوماریک اسید (*p-CA*) (۱۳) گزارش شده است. همچنین از ترکیبات فعال زیستی مفید در سلامت با تاثیر آنتی اکسیدانی، فرولیک اسید و کافئیک اسید (۱۴)، فعالیت ضدسرطانی، هسپیریدین (۱۵) و *p*-کوماریک اسید با بازدارندگی رشد باکتری ها (۱۶) هستند. بنابراین، اجزا متشکله فعال زیستی بعنوان مواد ترکیبات شیمیایی مارکر (معرف) در تشخیص عصاره خرغه می توانند قابل استفاده باشند. اخیراً، تحقیقات *In vivo* بر فرماکوکینتیک هسپیریدین (۱۷)، فرولیک اسید (۱۸) و کوماریک اسید (۱۹) به ترتیب با آنالیزهای HPLC، LC/MS و LC/MS/MS متمرکز شده است.

محققان در نیجریه بر روی عصاره آبی اندامهای هوایی خرغه مطالعه کردند و وجود استروئیدها، پروتئین و آلکالوئیدها را گزارش نمودند (۲۰). محقق دیگری در اتیوپی خواص آنتی اکسیدانی عصاره خرغه را در موش های نر بررسی کردند (۲۱) (Dkhil et al. 2011).

ترکیبات آنتی اکسیدانی اکسیداسیون چربی ها را مهار یا به تاخیر می اندازند و یا در سایر مولکول ها از تشکیل و ازدیاد واکنشهای زنجیره ای اکسیداسیون ممانعت می کنند (۲۲). از طرفی کاربرد آنتی اکسیدان های سنتتیک هیدروکسی تولوئن بوتیل (BHT (Butylated Hydroxy Toluene و هیدروکسی آنوسیل بوتیل (BHA (Butylated Hydroxyl Anisole در مواد غذایی بدلیل اثرات سمیت آنها در برخی گونه ها و پتانسیل سرطان زایی احتمالی ممنوع شده است، در سالهای اخیر تحقیقات بر روی آنتی اکسیدان های طبیعی و امن با منشا گیاهی شدت افزایش یافته است (۲۳). گیاهان معطر و دارویی به دلیل متابولیت های ثانویه اصلی خود منبع آنتی اکسیدان های طبیعی هستند.

آنها می توانند با اهدای هیدروژن به رادیکال های بسیار واکنش پذیر به عنوان آنتی اکسیدان عمل کنند و در نتیجه از تشکیل بیشتر رادیکال ها جلوگیری کنند. پتانسیل آنتی اکسیدانی آنها به تعداد و آرایش گروه های هیدروکسیل و میزان ترکیب ساختار بستگی دارد (۲۴). گیاه خرفه دارای ترکیبات طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی است، مقدار ترکیبات زیستی فعال در ریشه های آن بسیار کم و قابل استحصال نمی باشد. امروزه تلاش وافری برای کاربرد روشهای زیست فناوری به منظور دستیابی به ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدان وجود دارد. از اینرو تحقیق حاضر یکی از روشهای زیست فناوری برای افزایش مقدار متابولیت های ثانویه با خواص آنتی اکسیدانی گیاه خرفه را مورد بررسی قرار داده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد گیاهی

بذرهای گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) از شهرستان محلات تهیه شدند. بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در ظروف حاوی اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند، اتانول درون ظرفها تخلیه شده و سپس بذرها به ظرف حاوی محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد تحت شرایط استریل منتقل و به آرامی به مدت ۲۰ دقیقه به هم زده شدند. در نهایت سه بار با آب مقطر ضدعفونی شستشو داده شدند. دانه های ضدعفونی شده را به محیط کشت جامد (۲۵) MS (Murashige and Skoog 1962) منتقل کردند (۲۶).

۲-۲- کشت جدایه های باکتری

جدایه های A15 و A4، باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز از کلکسیون کشت باکتری ها (PTCC)، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران (IROST)، در کرج تهیه شدند.

باکتری ها روی محیط کشت Luria-Bertani (LB) حاوی عصاره مخمر (۵ گرم بر لیتر)، تریپتوفان (۱۰ گرم بر لیتر)، کلرید سدیم (۱۰ گرم بر لیتر) و آگار (۱۵ گرم بر لیتر) کشت شدند و pH محیط کشت عدد ۷ تنظیم گردید. کلنی های دو جدایه مورد نظر باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط LB مکمل با ریفامپیسین (۵۰ میلی گرم، در ۱۰ میلی لیتر) اضافه شدند و ظروف کشت بر روی شیکر (۱۱۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند تا میزان تراکم آنها در طول موج نوری ۶۰۰ نانومتر (۰/۶) باشد (۲۷).

۲-۳- تولید و بقا ریشه های موین خرفه

ده روز پس از استقرار گیاهچه های گیاه پریش در محیط کشت جامد (MS (Murashige and Skoog 1962) (۲۵)، دانه رست های درشیشه (*In vitro*) رشد کردند، بخش محور زیرپیه آنها جدا شده و به قطعات ۱۰ میلی متری بریده شدند. قطعات حاصل بعنوان ریزنمونه بر روی محیط کشت جامد MS فاقد هورمون به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند (شکل های ۱ الف، اب). ریزنمونه های (سالم و یا زخمی شده) با فرو بردن در محلول سوسپانسیون جدایه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز به مدت ۳۰ دقیقه آلوده شدند. پس از ۲ روز هم کشتی ریزنمونه ها و جدایه های باکتری در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد، آنها را به محیط کشت MS جامد حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۳۰۰ میلی گرم بر لیتر، ضد عفونی شده با فیلتر) به منظور حذف جدایه های باکتری از ریزنمونه ها منتقل کردند. نمونه های شاهد دارای ریزنمونه های مشابه با نمونه های تیمار، اما فقدان هم کشتی با سویه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز را داشتند. ریزنمونه های تیمار شده بر روی محیط کشت MS جامد حاوی سفوتاکسیم در اتاق رشد (شرایط بهینه دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی) به منظور تولید ریشه های موین نگهداری شدند.

پس از ۷ روز هم کشتی ریزنمونه ها با جدایه های باکتری، ابتدا کالوس (توده های سلولی) تشکیل شدند. کالوس ها بر روی محیط کشت MS جامد با شرایط بهینه کشت شدند و ریشه های موین به طول ۵-۴ سانتی متر پس از ۲۰ روز قابل مشاهده بودند، پس از ۶ بار واگشت (به مدت ۳ ماه)، ریشه های موین طویل شده قطع گردیدند و به محیط کشت MS جامد (فاقد هورمون) و بدون سفوتاکسیم منتقل گردیدند، این روش ۳-۴ بار تکرار شده تا زمانی که جدایه های باکتری در اطراف ریزنمونه ها مشاهده نشدند (۲۶).

۲-۴- آنالیز PCR (Poly Chain Reaction) ریشه های موین

ریشه های موین برای حضور ژن *rolB* مورد آزمایش قرار گرفتند، در آنالیز PCR از DNA ژنومی و پرایمر RolB780 (پرایمر فروروار 5'- GTTCTCGCGAGAAGATGCA-3' و پرایمر معکوس 5'- CAGTTTCGCATCTTGACAG-3') استفاده کردند، که قطعه ۷۸۰bp از ژن *rol* تکثیر شدند (پرایمرها از شرکت پیشگام و مارکر لدر از شرکت فرمنتاس تهیه شدند). شرایط آزمایش های PCR با مقدار ۲ نانوگرم DNA گیاهی (با حجم ۲ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر Taq، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز (۵ واحد/ میکرولیتر Taq)، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱ میلی مولار)، ۱۱/۱ میکرولیتر آب استریل دیونیزه و کل محلول مذکور ۲ میکرولیتر، بهینه شده است. برنامه انجام آزمایش های PCR با دستگاه ترموسایکلر (۳۵ سیکل)، برنامه دمای هر سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه)، ۵۸ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) انجام شده است (۲۸، ۲۹).

DNA پلاسمید جدایه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز با روش تجزیه آلكالینی (قلیایی) استخراج شد، این نمونه DNA پلاسمید بعنوان شاهد مثبت و DNA ریشه های خرفه غیرتراریخته بعنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند (۳۰).

۲-۵- ژل الکتروفورز DNA تکثیر شده

محصول تکثیرشده بوسیله الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد در بافر تریس استیک برومیک اسید (1X) جدا شده بودند و با رنگ آمیزی برموفنل بلو و گزینن سیانول اتیدیوم بروماید تشخیص داده شدند و با استفاده از لامپ های نور ماورا بنفش قابل رویت بودند (۳۱).

۲-۶- استخراج کافیک اسید و آنالیز HPLC

ریشه های خرفه تراریخته و ریشه های موین حاصل از خرفه تراریخته با جدایه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در دمای اتاق (۲۴ درجه سانتی گراد) خشک و با آسیاب پودر شدند، ۱۰۰ میلی گرم پودر حاصل را با ۵ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک (۰/۱ مولار) به مدت ۹۰ دقیقه مخلوط کردند. عصاره حاصل با فیلتر کاغذی (قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر) صاف شد و برای آنالیز HPLC آماده گردید (۳۲) (Chen et al. 2003). آنالیز HPLC با دستگاه Knauer (ساخت برلین، آلمان) مجهز به ستون C18 (۲۵ سانتی متر $\times$ ۴/۶ سانتی متر) و شناساگر اشعه ماورا بنفش انجام شده است. فاز متحرک ستون محلول فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۰۲ مولار (۹۵ درصد)، استونیتریل (۵ درصد) و شرایط pH ۳ و طول موج شناسایی ۲۸۰ نانومتر بودند و حجم تزریق هر بار ۲۰ میکرولیتر بود.

۲-۷- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کافیک اسید با روش کوکیک انجام شده است (۳۳). ۴ میلی لیتر محلول عصاره ریشه های موین خرفه تراریخته در غلظت های مختلف (۱۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) را با ۱ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۵۰۰ میکرومولار) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مخلوط کردند. مخلوط حاصل کاملاً همزده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت گذاشته شد. با دستگاه طیف سنجی (Shimadzu series UV1700) میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شده و از متانول بعنوان محلول بلانک استفاده گردید. جذب نوری پایین تر محلول نشان دهنده سرعت حذف بالاتر رادیکال های آزاد است. فعالیت آنتی اکسیدانی (برحسب درصد) طبق فرمول زیر محاسبه می شود:

ظرفیت حذف DPPH (%) = $100 \times (\text{جذب نوری محلول بلانک} - \text{جذب نوری نمونه} / \text{جذب نوری محلول بلانک})$

$$\text{DPPH scavenging capacity (\%)} = 100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}})$$

محلول بلانک: متانول، نمونه: عصاره ریشه موین خرفه تراریخته

همه آزمایش ها سه بار تکرار شدند.

آنالیز آماری داده های حاصل از نتایج آزمایش ها برای تعیین میانگین و انحراف معیار و آزمون دانکن با نرم افزار SPSS

(نسخه ۲۱) انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱. القا ریشه های موین

ریشه های موین از ریزنمونه محور زیرلپه خرفه (*P. oleracea*) تلقیح شده با جدایه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز تقریباً پس از ۱۰-۶ روز قابل مشاهده بودند (شکل ۱). یافته های تحقیق حاضر نشان دادند، بالاترین میزان تراریخته در نمونه محور زیرلپه خرفه ۹۳٪ مشاهده شد که با جدایه A15 باکتری تلقیح شده که از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ معنادار بودند. میزان نمونه خرفه تراریخته با جدایه A4 باکتری تلقیح شده ۶۷٪ مشاهده شد.

آنالیز PCR حضور ژن را در ژنوم گیاه خرفه تراریخته تایید می کند (شکل ۲). قطعه ۷۰۰ bp ژن مورد نظر بر روی ژل الکتروفورز نمونه گیاه خرفه تراریخته مشابه نمونه شاهد مثبت (پلاسمید باکتری) مشاهده شد، به طوری که این قطعه در خرفه غیرتراریخته (نمونه شاهد منفی) رویت نشد.

۳-۲. ارزیابی کافئیک اسید تولید شده

یکی از مهمترین کاربردهای ریشه مویین، تولید یا ارتقا تولید متابولیت های ثانویه نسبت به ریشه های معمولی است. ریشه های مویین کشت شده در محیط کشت MS فاقد هورمون جمع آوری گردید و برای تعیین مقدار کافئیک اسید با دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفتند. همانطوری که در شکل ۳ مشاهده شد، قله منحنی مربوط به متابولیت ثانویه کافئیک اسید در دقیقه ۳/۷۳۳ نسبت به استاندارد رویت گردید (جدول ۱).

نتایج مقدار کافئیک اسید گیاهان خرفه تراریخته با جدایه های A4 و A15 نسبت به گیاه شاهد (غیرتراریخته) تفاوت معنادار در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان دادند (شکل های ۵-۳). قله های زمان بازداری گیاهان خرفه غیرتراریخته و تراریخته تلخیص شده با جدایه های A4 و A15 بین ۳ تا ۴ دقیقه و به ترتیب ۳/۸۱۷ دقیقه، ۳/۸ دقیقه و ۳/۸۷۳ دقیقه بودند (شکل ۳).

مقدار کافئیک اسید ریشه خرفه غیرتراریخته ۶۴/۰۲۳ درصد بود. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده شد، مقدار کافئیک اسید تولید شده در ریشه های مویین خرفه تراریخته با جدایه های A4 و A15 تفاوت معناداری نسبت به گیاه شاهد داشتند و مقدار آنها به ترتیب ۹۱/۱۲۳ درصد و ۹۲/۷۱۶ درصد بودند که تقریباً ۳۴ درصد بیشتر از گیاه شاهد است (شکل ۴). بنابراین با تکنیک تولید ریشه های مویین، مقدار کافئیک اسید در خرفه تراریخته نسبت به شاهد بطور قابل توجهی افزایش یافته است، مقادیر میانگین در آنالیزهای آماری آزمون دانکن با سطح احتمال ۰/۰۵ تایید شده است.

عموماً سطح آکالوئیدها در ریشه های مویین تراریخت بطور معنی دار افزوده شده که در زمینه صنایع دارویی، شیمیایی و تجاری کاربرد دارد.

۳-۳. فعالیت حذف رادیکال ها با واکنش DPPH

ترکیب DPPH یک ماده آلی بسیار پایدار با رنگ بنفش تیره است که دامنه طول موجهای ۵۲۸-۵۱۵ را جذب می کند. یک پروتون از هر مولکول دهنده، عمدتاً ترکیبات فنلی را دریافت می کند و رنگ آن کم رنگتر و تقریباً زرد می شود (۳۴). بطوری که غلظت متابولیت های ثانویه یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات آکالوئیدی افزایش یافته است، همچنین فعالیت حذف رادیکال ها توسط ترکیب DPPH بیشتر شده و می توان بعنوان فعالیت آنتی اکسیدانی شناخته شود (۳۵). فعالیت حذف رادیکال ها توسط کافئیک اسید در نمونه های شاهد و تیمارها (عصاره ریشه غیرتراریخته و ریشه های مویین تراریخته با جدایه های A4 و A5) با تغییر رنگ نشان داده شده است (شکل ۵). همان طوری که مقدار کافئیک اسید افزایش یافته، یک ارتقا منظم در فعالیت حذف رادیکال توسط آن مشاهده شده است. ویژگی آنتی اکسیدانی کافئیک اسید با فعالیت حذف رادیکال آزاد با تعیین DPPH ارزیابی شد و نتایج بصورت درصد بازدارندگی نشان داده شده است (جدول ۱). در کلیه نمونه ها دامنه درصد بازدارندگی از ۴۸/۹۲ درصد تا ۸۶/۷۳ درصد بدست آمد. بیشینه فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد بازدارندگی، ۸۶/۷۳۷ درصد) در ریشه مویین خرفه تراریخته با جدایه A4 باکتری مشاهده گردید (جدول ۲). طبق گروه بندی دانکن نمونه های شاهد و تیمارها در یک گروه قرار دارند و در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار نبودند.

مقادیر درصد بازدارندگی ریشه غیرتراریخته و ریشه های موین تراریخته با تلقیح جدایه های A4 و A15 به ترتیب ۴۸/۹۲۷ درصد، ۷۵/۴۳ درصد و ۸۶/۷۳۷ درصد بودند. نتایج نشان دادند فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه موین تراریخته با تلقیح جدایه A4 باکتری در مقایسه با سایر ریشه ها، مقادیر خیلی کم داشت.

ارزیابی DPPH در جدول ۲ نشان داد، گیاه خرفه می تواند بعنوان یک حذف کننده رادیکال های آزاد تا حد معینی عمل کند. از طرفی، هر گونه کارایی حذف کنندگی رادیکال آزاد بر حسب نوع حلال مورد استفاده و گیاهان مورد مطالعه متفاوت بود. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی ریشه موین خرفه تراریخته تلقیح با سویه A4 مشاهده گردید. این مسئله باید بدلیل حضور آنتی اکسیدان های با قطبیت بیشتر و توانایی استخراج آنها با حلال های قطبی بیشتر در ریشه موین خرفه تراریخته تلقیح با سویه A4 باشند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه های موین تراریخته تلقیح شده با دو سویه تقریباً با نتایج برخی محققان در گیاه خرفه نسبتاً نزدیک هستند (۳۶).

۴. بحث

نتایج تحقیق حاضر وجود بیش از ۶۰ درصد انتقال ژن و تولید خرفه تراریخته را از ریزنمونه محور زیرپله را نشان دادند. Lievre و همکارانش (۲۰۰۵) بیشترین درصد تراریخته را از ریزنمونه محور زیرپله گیاه *Ruta graveolens* گزارش کردند (۳۷). Shakeran و همکارانش (۲۰۱۴) میزان ریزنمونه های گیاه تراریخته *Datura metel* تلقیح شده با جدایه A4 باکتری را ۵۵٪ گزارش کردند (۳۸). انواع جدایه های باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در میزان توانایی آلودگی ریزنمونه ها تفاوت های بارزی را نشان می دهند (۳۹). جدایه های باکتری، نوع ریزنمونه و مولکول های پیام رسان می توانند در میزان تولید ریشه های موین گیاه تراریخته موثر باشند (۴۰) (Tao et al. 2006). ریشه های موین در گیاهان بویژه تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژنز تولید انشعابات فرعی می کنند که فاکتور اساسی در افزایش کارایی بیوماس آنها هست (۴۱). Lievre و همکارانش (۲۰۰۵) وجود این قطعه را بر روی ژل الکتروفورز ژنوم گیاه *Ruta graveolens* نمایش دادند (۳۷، ۲۸).

انتقال ژن های متنوع با جدایه های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز القا شده که با ناقل پلاسمید این باکتری ها انجام شده است (۴۲). بنابراین، بیان متنوع ژن های T-DNA در ریشه های موین، ادغام ژن های T-DNA در جایگاه متفاوت DNA ژنومی ریزنمونه ها و تعداد کپی های متعدد ادغام شده T-DNA ژنوم ها دلیلی بر تنوع اختصاصی در تشکیل ریشه های موین هستند (۴۳).

مقدار کافئیک اسید در نمونه های تراریخته تحقیق حاضر بیش از ۹۰ درصد گزارش شدند، Cheng و همکارانش (۲۰۱۱) میانگین مقدار کافئیک اسید در گیاه خرفه را با دستگاه HPLC، 0.79 ± 0.09 گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر نزدیک است (۴۴).

تفاوت مقدار تولید متابولیت های ثانویه در سویه های مختلف باکتری بدلیل تفاوت در تعداد کپی های گذاشته شده در ژنوم گیاه و الگوهای بیان ژن T-DNA تفاوت در ریشه های موین تراریخته با جدایه های باکتری گزارش شده است (۴۵). احتمالاً تفاوت دیگر به نوع روش تزریق T-DNA به درون ژنوم گیاه مربوط می باشد (۴۶). افزایش بیوماس ریشه های موین می تواند بدلیل تاثیر ژن بر تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش پتانسیل بیوسنتز متابولیت های ثانویه باشد (۴۶).

نتایج درصد بازدارندگی و حذف رادیکال های آزاد نمونه های خرفه تراریخته در محدوده ۴۰ تا ۸۰ درصد بودند که مطالعات گذشته پیش بینی کردند عمدتاً حلال قطبی برای استخراج آنتی اکسیدان ها استفاده شده است، بطوری که عموماً می توان فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر را در گیاهانی که با متانول استخراج شده مشاهده کرد (۴۷).

بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در واریته PG2 خرفه گزارش شده است. به طوری که، تنوع فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان متفاوت خرفه و سیستم های حلال مختلف بر روی نوع و ساختار ترکیبات کافئیک اسید تاثیر داشت (۳۶). گزارشات متعددی وجود دارد که فعالیت آنتی اکسیدانی از تعداد و آرایش گروه هیدروکسیل، همچنین گلیکوزیلاسیون تاثیر می پذیرد (۵۰، ۴۸، ۴۹).

۵. نتیجه گیری

ریشه های موین خرفه تراریخته با بهترین جدایه های A4 و A15 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز القا شدند، اینها با بالاترین سرعت رشد، پایداری ژنتیکی و انشعابات جانبی خوب مشخص گردیدند. ریشه های موین خرفه می توانند برای افزایش بازده تولید آلکالوئیدهای کافئیک اسید در صنایع داروسازی قابل استفاده باشند. عصاره خرفه فعالیت آنتی اکسیدانی قوی داشت، بنابراین این عصاره را می توان بعنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی با قابلیت دسترسی راحت استفاده کرد.

قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم برای حمایت از پروژه تشکر می نمایم، همچنین از خانم دکتر حمیده افقی (گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، IROST) برای در اختیار گذاشتن سویه های باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز قدردانی می کنم.

منابع

1. Gordon MC, David JN. Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharmaceutical Biology*. 2001;39:8-17.
2. Binns AN. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends in Plant Science*. 2002;7:231-233.
3. Shanks JV, Morgan J. Plant Hairy Root Culture. *Current Opinion Biotechnology*. 1999;10:151-155.
4. Zolala J, Farsi M, Gordan HR, Mahmoodnia M. Producing a High Scopolamine Hairy Root Clone in *Hyoscyamus muticus* through Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal Agriculture Science Technology*. 2007;9:327-339.
5. Shirazi Z, Piri KH, Mirzaie Asl A, Hasanloo T. Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin Production by Hairy Root Culture of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Medicine Plants Research*. 2012;31:4640-4646.

6. Demirhan E, Ozbek B. Drying Kinetics and Effective Moisture Diffusivity of Purslane Undergoing Microwave Heat Treatment. *Korean Journal Chemical Engineering*. 2010;27: 1377-1383.
7. Sharifi-Mood B, Shafaghat M, Metanat M, Saeidi S, Rad NS. The Inhibitory Effect of Ajowan Essential Oil on Bacterial Growth. *International Journal Infection*. 2014;1(2):21-30.
8. Shin JK, Kim GN, Jang HD. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. *Journal Medicine Food*. 2007;10(1):32–40.
9. Londonkar R, Nayaka HB. Phytochemical and Antimicrobial Activities of *Portulaca Oleracea* L. *Journal Pharmacy Research*. 2011;4(10):15-23.
10. Shirmohammadi E, Saeidi S, Mohasseli T, Boogar AR. Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles Produced by *Satureja hortensis* Extract on Isolated *Bacillus cereus* from Soil of Sistan Plain. *International Journal Infection*. 2014;1(3):25-32.
11. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biology Research*. 2004;37(2):263–77.
12. Yang Z, Xu Y, Jie G, He P, Tu Y. Study on the antioxidant activity of tea flowers (*Camellia sinensis*). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007;16:148-152.
13. Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y, Du L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry*. 2005;66(21):2595-2601.
14. Maurya DK, Devasagayam TP. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxyl cinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chemical Toxicology*. 2010;48:3369-3373.
15. Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phototherapy Research*. 2010;24(1):15-19.
16. Aziz N, Farag S, Mousa L, Abo-Zaid M. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 1998;93(374):43-54.
17. Jin MJ, Kim U, Kim IS, Kim Y, Kim DH, Han SB, Kwon OS, Yoo HH. Effects of gut microflora on pharmacokinetics of hesperidin: a study on non-antibiotic and pseudo-germ-free rats. *Journal Toxicology Environmental Health A*. 2010;73(21-22):1441-1450.
18. Zhang T, Yang X, Zhang P, Zhu M, He Z, Bi K. Determination of ferulic acid in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to a pharmacokinetic study. *Analytical Letter*. 2009; 42(14):2157-2169.
19. Uang YS, Hsu KYA. Dose dependent pharmacokinetic study on caffeic acid in rabbits after intravenous administration. *Biopharmaceutics. Drug Disposition*. 1997;18(8):727- 736, 1997.
20. Okafor A, Ezejindu N. Phytochemical Studies on *Portulaca oleracea* L. *Plant*. 2014;3(1):132-136.
21. Dkhil MA, Abdel Moniem AE, Al-Quraishy S, Saleh RA. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal Medicine Plant Research*. 2011;5:1589–63.

22. Inan O, Ozcan MM, Juhaimi FYA. Antioxidant Effect of Mint, Laurel and Myrtle Leaves Essential Oils on Pomegranate Kernel, Poppy, Grape and Linseed Oils. *Journal Clean Product*. 2012; 27:151-154.
23. Spigno G, Faveri DMD. Antioxidants from Grape Stalks and Marc: Influence of Extraction Procedure on Yield, Purity and Antioxidant Power of the Extracts. *Journal Food Engineering*. 2007;78:793-801.
24. Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts from Myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) Leaf, Stem and Flower. *Food Chemical Toxicology*. 2010;48:1362-1370.
25. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 1962;15:473-497.
26. Zargar M, Farahani F, Nabavi T. Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under in vitro conditions. *Biotechnology Journal*. 2010;4(21):2199-2203.
27. Habibi S, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Mirmasoumi M. Comparison of hairy root induction by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in *Astragalus compactus*. *Journal of Plant Researches* (Iranian Journal of Biology). 2014;27(5):804-810.
28. Rahnema H, Hasanloo T, Shams MR, Sepehrifar R. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iran Journal Biotechnology*. 2008;6:113- 118.
29. Eskandari-Samet A, Piri K, Kayhanfar M, Hasanloo T. Enhancement of tropane alkaloid production among several clones and explants types of hairy root of *Atropa belladonna* L. *Journal Medicine Plant Production*. 2012;1:35-42.
30. Pirian K, Piri KH, Ghiyasvand T. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 2012;3(3): 642-649.
31. Ahmadi Moghadam Y, Piri Kh, Bahramnejad B, Ghiasvand T. Dopamine Production in Hairy Root Cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) Using *Agrobacterium rhizogenes*, *Journal Agriculture Science Technology*. 2014;16:409-420.
32. Chen J, Shi YP, Liu JY. Determination of Noradrenalin and Dopamine in Chinese Herbal Extracts from *Portulaca oleracea* L. by High-performance Liquid Chromatography. *Journal Chromatogram Analytic*. 2003;127-132.
33. Kukic J, Popovic V, Petrovic S, Muneagi P, Ciric A, Stojkovic D, Sokovic M. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Cynera cardunculus* Extracts. *Food Chemical*. 2008;107:867-868.
34. Sultana A, Rahman K. *Portulaca oleracea* Linn: A Global panacea with ethnomedicinal and pharmacological potential. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;5(2):33-39.
35. Mohdaly A, Smetanska I, Ramadana M, Sarhan M, Mahmoud A. Antioxidant Potential of Sesame (*Sesamum indicum*) Cake Extract in Stabilization of Sunflower and Soybean Oils. *Industrial Crops Production*. 2011;34:952-959.

- 36.Lim YY, Quah EPL. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. Food Chemical. 2007;103:734-740.
- 37.Lievrea K, Hehna A, LeMinh Trana T, Gravota A, Thomassetb B, Bourgauda F, Gontiera E. Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. Plant Science. 2005;168:883–888.
- 38.Shakeran Z, Keyhanfar M, Asghari GR. Hairy Roots Formation in Four Solanaceae Species by Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Medicinal Plants and By-products. 2014;2:155-160.
- 39.Królicka A, Staniszewska I, Bielawski K, Maliński E, Szafranek J, Łojkowska E. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science. 2001;160:259-264.
- 40.Tao J, Li L. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. South Africa Journal Botany. 2006;72:211-216.
- 41.Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S. Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. Plant cell Report. 2005;24:25-35.
- 42.Nguyen C, Bourgaud F, Forlot P, Guckert A. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. Plant Cell Report. 1992;11:424-427.
- 43.Akramian M, Tabatabaei SMF, Mirmasoumi M. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. Amer-Euras Journal Agriculture Environ Science. 2008; 3:759-763.
- 44.Cheng L, Cheng Z, Liu H, Zhang H, Zhang W, Du Y, Wang Y, Li H, Ying X, Kang T. Liquid chromatographic (LC) determination of four bioactive compounds in the *Portulaca oleracea* L. Journal of Medicinal Plants Research. 2011;5(31):6876-6880.
45. Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advanced. 2000;18:1-22.
- 46.Bandyopadhyay M, Jha S, Tepfer D. Changes in morphological phenotypes and with anolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. Plant Cell Report. 2007;26:599–609.
- 47.Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Mini-review: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemi-Bio Interact. 2006;160:1-40.
- 48.Cai YZ, Luo Q. Sun M, & Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Science. 2007;74:2157-2184.
- 49.Zin ZM, Hamid AA, Osman A., Saari N. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Food Chemical. 2006;94:169-178.
- 50.Qing CM, Fan L, Lei Y, Bouchez D, Tourneur C, Yan L, Robaglia C. Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Molecular Breeding. 2000;6:67-72.

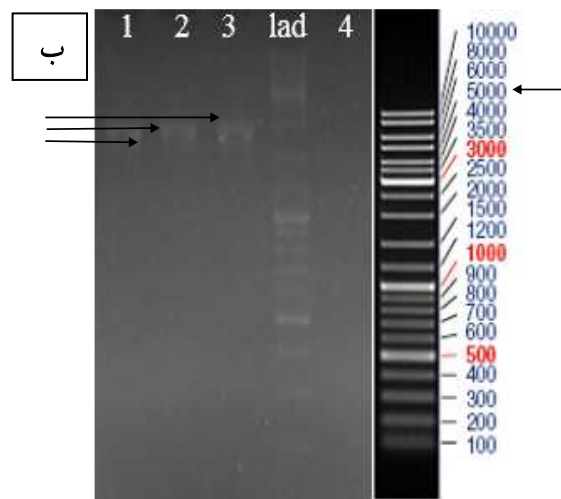
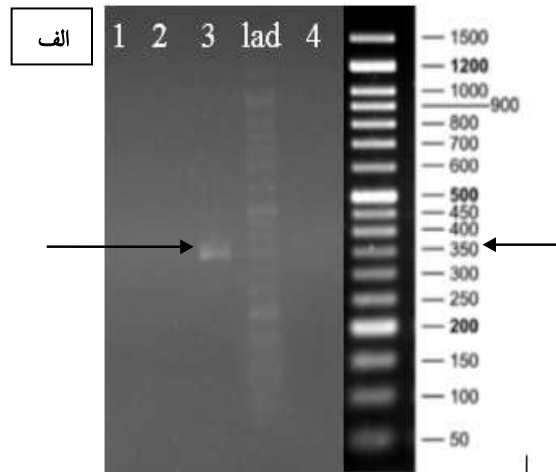
شکل ۱: ریشه های موئین القا شده از ریزنمونه محور زیرلپه خرفه (*Portulaca oleracea*). الف) تلقیح با جدایه A4 باکتری ب) تلقیح با جدایه A15 باکتری



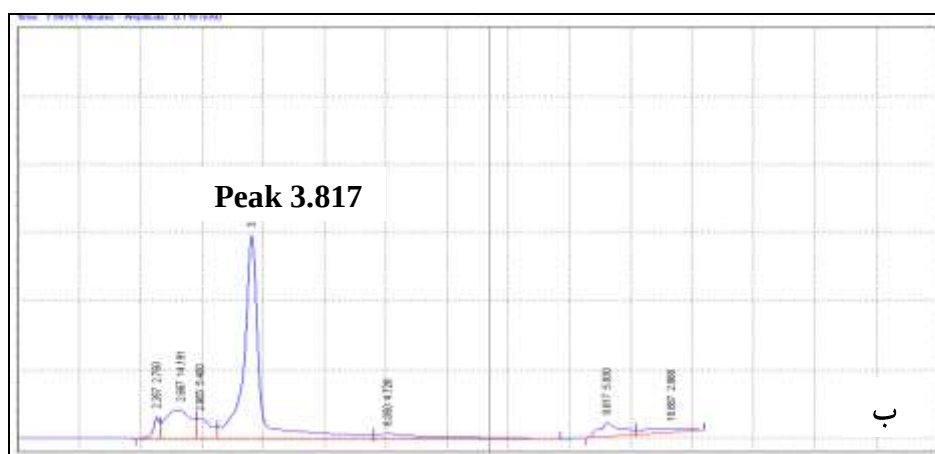
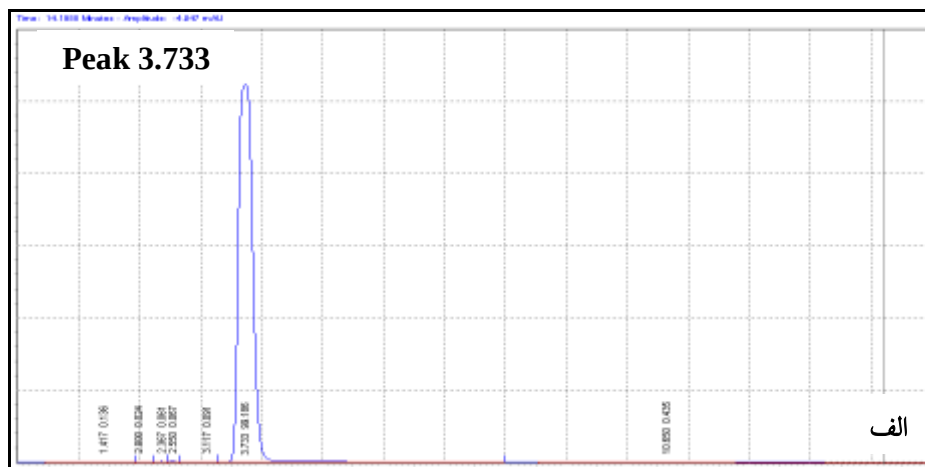
شکل ۲. تکثیر قطعه ۷۰۰ bp DNA ژن *rol* با واکنش PCR در ریشه های موین،

(A) پرایمر VirD338 (B) پرایمر RolB780

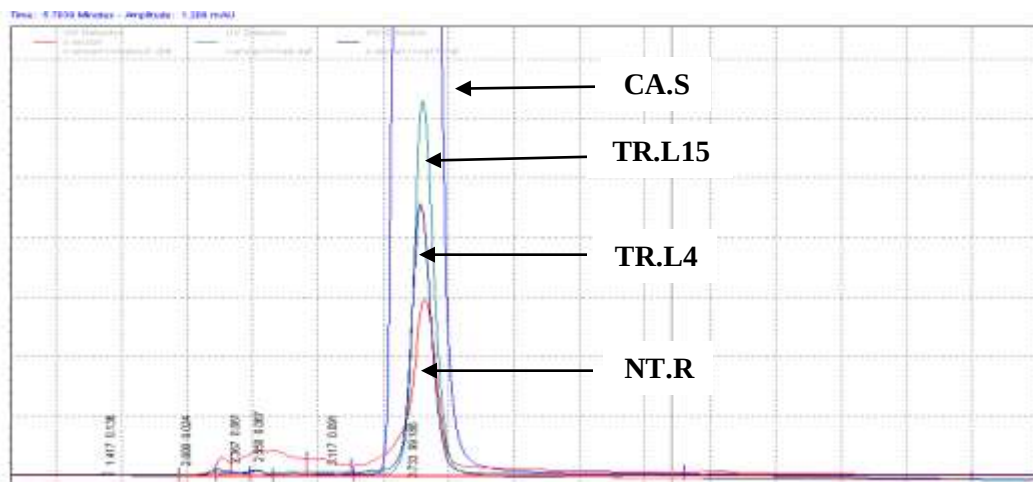
Lad : وزن مولکولی مارکر (لدر ۵۰ bp)، DNA : Lane1 ریشه موین تراریخته با جدایه A4، DNA : Lane2 ریشه موین تراریخته با جدایه A15، DNA : Lane3 باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز (شاهد مثبت)، DNA : Lane4 ریشه غیرتراریخته (شاهد منفی)



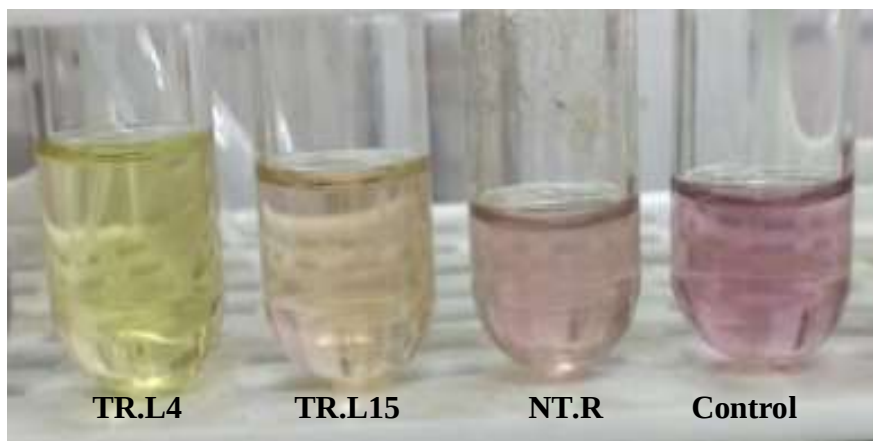
شکل ۳: گروماتوگرام با دستگاه HPLC ، طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تشخیص کافئیک اسید. الف) کافئیک اسید استاندارد ب) کافئیک اسید موجود در ریشه غیرتراریخته ج) کافئیک اسید موجود در ریشه موین تراریخته با جدایه A4 د) کافئیک اسید موجود در ریشه موین تراریخته با جدایه A15



شکل ۴: گروماتوگرام مقایسه ای با دستگاه HPLC ، طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تشخیص کافئیک اسید مورد مطالعه. کافئیک اسید استاندارد (CA.S)، کافئیک اسید موجود در ریشه غیرتراریخته (NT.R)، کافئیک اسید موجود در ریشه موین تراریخته با جدایه A4 (NT.R4)، کافئیک اسید موجود در ریشه موین تراریخته با جدایه A15 (NT.R15)



شکل ۵: مقایسه تغییرات رنگ پذیری ترکیبات متابولیت ها براساس فعالیت آنتی اکسیدانی در خرفه، محلول DPPH (شاهد)، عصاره ریشه غیرتراریخته (NT.R)، عصاره ریشه موپین تراریخته با جدایه A15 باکتری (TR.L15)، عصاره ریشه موپین تراریخته با جدایه A4 (TR.L4)



جدول ۱: دامنه زمان بازداری (برحسب دقیقه) و دامنه سطح زیر منحنی کافئیک اسید خرفه با دستگاه HPLC ، نمونه های استاندارد، ریشه های غیرتراریخته خرفه، ریشه های موین تراریخته خرفه با جدایه های A4 و A15

نمونه	دامنه زمان بازداری (دقیقه)	قله زمان بازداری (دقیقه)	دامنه سطح زیر منحنی (%)	قله سطح زیر منحنی (%)
کافئیک اسید استاندارد	۱/۴۱۷-۱۰/۶۵	۳/۷۳۳	۰/۱۳۶-۰/۴۳۵	۹۹/۱۸۶
کافئیک اسید در ریشه غیرتراریخته	۲/۲۶۷-۱۰/۶۶۷	۳/۸۱۷	۲/۷۵-۲/۹۶۸	۶۴/۰۳۳
کافئیک اسید در ریشه موین	۲/۲۳۳-۱۰/۷	۳/۷۸۳	۱/۸۵۵-۰/۱۵۲	۹۲/۷۱۶
تراریخته با جدایه A15				
کافئیک اسید در ریشه موین	۱/۴۳۳-۱۰/۹	۳/۸۰	۰/۱۲۸-۰/۰۶۴	۹۱/۱۲۳
تراریخته با جدایه A4				

جدول ۲: میانگین درصد بازدارندگی (فعالیت آنتی اکسیدانی) ریشه غیرتراریخته، ریشه مویین تراریخته با جدایه A15 باکتری و ریشه مویین تراریخته با جدایه A4 باکتری در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*)

نمونه	میانگین درصد بازدارندگی $\pm$ انحراف معیار
ریشه غیرتراریخته	$48/927 \pm 0/312$ a
ریشه مویین تراریخته با جدایه A15	$75/43 \pm 0/0707$ a
ریشه مویین تراریخته با جدایه A4	$86/737 \pm 0/2183$ a

