

بهینه سازی تاثیر غلظت محیط کشت، ساکارز و pH بر تولید ریشه های موین گیاه شاییزک (*Atropa belladonna* L.) با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) در شرایط درون شیشه ای^۱

Optimization of the Effect of Culture Medium and Sucrose Concentration and pH on the Production of Hairy Roots of *Atropa belladonna* L. Using the Response Surface Methodology (RSM) Under *In Vitro* Condition

بهنام کارجو، محمد فتاحی^{۲*}

چکیده

بهینه سازی محیط کشت تولید ریشه های موین از نظر ترکیب ها و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت جهت رشد و بهینه سازی زیست توده ضروری است. بزرگترین مزیت ریشه های موین این است که در مقایسه با گیاه مادری، اغلب توان بالایی در تولید متابولیت های ثانویه دارند. در این پژوهش، ریشه های موین تراریخته در گیاه شاییزک به واسطه مایه کوبی با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه A7 تولید شدند. تایید مولکولی ریشه های موین به وسیله PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* انجام گرفت. با استفاده از کدبندی های روش سطح پاسخ (RSM) اثر سه غلظت محیط کشت پایه مایع (MS، ۱/۲ MS و ۱/۴ MS) با غلظت های مختلف ساکارز (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم بر لیتر) و سه سطح pH (۵/۵، ۵/۸ و ۶/۱) بر رشد ریشه های موین بررسی شد. وزن تر و خشک ریشه های موین بعد از گذشت ۴ هفته اندازه گیری شد. نتایج حاصل از روش سطح پاسخ نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک ریشه های موین در محیط کشت با غلظت ۰/۵۶ (۱/۲MS) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به دست آمد. در شرایط بهینه ارزش مطلوبیت هر سه فاکتور محیط کشت، ساکارز و pH، ۰/۹۹۰ و وزن تر و خشک به ترتیب ۸/۵۸ و ۳۱۷/۰ گرم بود. بر اساس نتایج GC/MS میزان آلکالوئید آتروپین در ریشه های موین رشد یافته در مناسب ترین محیط کشت حدود ۶/۸۸ درصد بود.

واژه های کلیدی: آتروپین، آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه موین، روش سطح پاسخ، محیط کشت.

مقدمه

گیاه شاییزک^۳ یکی از گیاهان دارویی تیره سیب زمینی^۴ است که دارای تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین می باشد (۲). تروپان آلکالوئیدها، از جمله آتروپین و اسکوپولامین، متابولیت های ثانویه ای هستند که اثر قوی آنتی کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک داشته و به عنوان رفع اسپاسم، تسکین دهنده درد و اتساع مردمک چشم بکار برده می شوند (۲۲). بررسی ها نشان داده است که میزان متابولیت های ثانویه موجود در گیاهان کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه طبیعی است و حتی یاخته های گیاهان کشت بافت شده، متابولیت هایی تولید می کنند که در گیاه اولیه تولید نمی شود (۱۲). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین تولید متابولیت های

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (mo.fattahi@urmia.ac.ir).

۴- Solanaceae

۳- *Atropa belladonna* L.

دارویی با استفاده از گیاهان وحشی اقتصادی نبوده و بهتر است که برای تولید سریع و انبوه آنها از فنون کشت یاخته و بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود (۱۴). کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط *in vitro* از طریق کشت سوسپانسیون یاخته‌ای و کشت اندام است (۲۰، ۳۱).

از آنجایی که ریشه محل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها است، دست‌ورزی گیاهان دارای این ترکیب‌ها با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز^۱ در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۴). امروزه، کشت ریشه‌های موئین، به دلیل رشد سریع، ثبات ژنتیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی، نداشتن زمین‌گرایی، سهولت نگهداری و قابلیت رشد در محیط‌های کشت فاقد هورمون و قابلیت تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، منبع مناسب و ارزشمندی برای تولید ترکیب‌های شیمیایی گیاهی، متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع و آنتی بادی‌های مونوکلونال است (۲۴). یکی از روش‌های مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم کشت بافت و تراریخته نمودن گونه‌های گیاهی، استفاده از سیستم ناقل آگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد (۲۱). این باکتری جزو باکتری‌های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه‌ای و گاهی گیاهان تک‌لپه‌ای را آلوده می‌کند (۳۶) و منجر به تشکیل ریشه‌های موئین می‌شود. یاخته‌های ریشه‌های موئین حامل قطعه‌ی T-DNA پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته‌ای خود می‌باشند (۱۰). استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز و کشت ریشه موئین به علت رشد سریع، کاهش زمان، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیب‌های شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (۱، ۹). یکی از بزرگترین محدودیت‌های استفاده از ریشه‌های موئین برای تولید متابولیت‌های ثانویه، بازده کم تولید است. این مشکل را می‌توان با انتخاب لاین‌های ریشه موئین مناسب با راندمان بالای رشد و یا با بهینه کردن شرایط محیط کشت حل نمود (۳۴).

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهایی که پاسخ مورد نظر به واسطه تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به کار می‌رود. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و برهمکنش متغیرها، قابل برآورد هستند. در روش سطح پاسخ، سطح مورد نظر تحت تاثیر متغیرهای بسیاری قرار دارد و هدف، بهینه کردن پاسخ آنالیز است (۱۷). ابراهیمی و همکاران در یک پژوهش بهینه‌سازی کشت ریشه‌های موئین گیاه گل میمونی بیابانی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که MS بهترین محیط کشت برای افزایش زیست توده ریشه‌های موئین است (۵). در پژوهشی دیگر اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و pH محیط کشت در کشت ریشه‌های موئین گیاه پنیر باد^۲ بررسی شد و نتایج نشان داد که در محیط کشت با pH ۵/۸ و ساکارز ۳ درصد بالاترین تجمع بیوماس به دست آمد (۲۶). در مطالعه‌ای تاثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های موئین گونه‌ای از گندم سیاه^۳، مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین بیوماس و وزن تر و خشک ریشه‌های موئین در محیط کشت MS ۱/۲ به دست آمد (۱۳). بهینه کردن عوامل شیمیایی با توجه به میزان و نوع قند، سطح نیترات، سطح فسفات، تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع تیمار با پیش ماده‌ها صورت می‌گیرد. همچنین عوامل کمی مانند pH، دما، اکسیژن، هوادهی، تکان خوردن در این امر مؤثر می‌باشند (۶). با توجه به منابع علمی قابل دسترس، تاکنون بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه موئین در گیاه شابیزک انجام نشده است. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه موئین که بتواند امکان کشت در مقیاس وسیع در یک سیستم بیوراکتور و تولید صنعتی متابولیت‌های مهم آن را فراهم کند، بسیار با اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، برای اولین بار بهینه‌سازی سیستم کشت ریشه موئین گیاه شابیزک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها

بذرهای گیاه شابیزک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور تسریع جوانه زنی و شکست خواب، بذرهای ابتدا به مدت ۱ ماه در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و سپس با اسید سولفوریک ۵۰ درصد به مدت ۲ دقیقه تیمار شدند.

بدور تیمار شده، در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضد عفونی شدند و پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شدند. ریزنمونه ها پس از یک هفته برای تلقیح با باکتری آماده شدند.

آماده سازی باکتری و تلقیح ریزنمونه ها

به منظور القاء ریشه های موئین در شابیزک از سویه A7 آگروباکتریوم رایزوزنز به روش تزریقی استفاده شد. به منظور آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح، باکتری در محیط کشت LB جامد حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک ریفامپیسین^۱ کشت و به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. در روش تزریقی، ریزنمونه های کوتیلیدونی یک هفته ای تهیه و با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به باکتری در LB جامد در بخش پشتی ریزنمونه های کوتیلیدونی زخم هایی ایجاد شد. سپس ریزنمونه های تلقیح شده روی محیط کشت MS حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس به منظور حذف باکتری، ریزنمونه ها با آب مقطر استریل حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و در نهایت روی محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. هر هفته یکبار واکشت ریزنمونه ها انجام گرفت و در هر دوره واکشت، غلظت سفوتاکسیم به نصف کاهش داده می شد تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید. پس از حذف کامل ریزنمونه و آنتی بیوتیک، ریشه های موئین بدون آلودگی باکتریایی و با سرعت زیاد در محیط کشت MS جامد عاری از هورمون تکثیر یافتند.

تایید مولکولی ریشه های موئین

برای تایید مولکولی، استخراج DNA از ریشه های موئین احتمالی به دست آمده در محیط جامد و ریشه حاصل از ریزنمونه تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) به روش CTAB (۱۶) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و همچنین روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. جهت تایید وضعیت تراپیکتی ریشه های موئین احتمالی، از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* استفاده شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCAGCA-3' (آغازگر مستقیم) و

5'-TTAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). برنامه PCR شامل یک چرخه واسرشت سازی^۲

اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال^۳ آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، توسعه رشته های DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Cycloer Veriti® 60-Well Thermal (Carestream Health) Gel Logic 212 Pro^۴ انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه ژل داک مدل ۴ (Carestream Health) مورد مشاهده و عکس برداری قرار گرفتند.

بررسی رشد ریشه های موئین در محیط کشت های مختلف همراه با غلظت های مختلف ساکارز و pH های مختلف

پس از رشد مناسب ریشه ها در محیط کشت جامد و تایید مولکولی آنها به وسیله PCR، بهترین لاین از نظر میزان رشدی (انشعابات بیشتر در محیط جامد) انتخاب و برای انجام آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از کدهای روش سطح پاسخ (RSM) اثر سه نوع محیط کشت MS، MS ۱/۲ و MS ۱/۴ و سه غلظت ساکارز ۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم بر لیتر و ۳ سطح pH ۵/۵، ۵/۸ و ۶/۱ روی میزان تولید ریشه موئین بررسی شد. در این آزمایش فاکتورهای X₁، X₂ و X₃ به ترتیب شامل محیط کشت، ساکارز و pH است که برای هر یک از این فاکتورها یک حد بهینه (۰)، یک حد بیشینه (+۱) و یک حد کمینه (-۱) تعریف شده است (جدول ۱). روش سطح پاسخ برای آزمایش های سه مولفه ای شامل ۱۵ نمونه آزمایشی (ارلن مایر) بود. بر اساس کد بندی های روش سطح پاسخ، حدود ۱ گرم از ریشه های موئین رشد یافته در محیط MS جامد، وزن گردیده و در ارلن های

۲۵۰ میلی لیتری حاوی توری مخصوص شامل ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، کشت شدند و در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ rpm تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. هر هفته یک بار نیز عمل واکشت صورت می گرفت. پس از گذشت ۴ هفته، با استفاده از ترازوی دیجیتال حساس، وزن تر و خشک ریشه ها اندازه گیری شد.

جدول ۱- سطوح فاکتورهای X_1 ، X_2 و X_3 و نحوه کدبندی برای روش سطح پاسخ.

Table 1. Components level of X_1 , X_2 and X_3 and their coding for response surface methodology.

مقدار Value	فاکتورها Factor	محیط کشت (X_1) Culture medium	ساکارز (X_2) $g\ l^{-1}$ Sucrose	pH(X_3)
کمینه (-1) Minimum		¼ MS	15	5.5
بهینه (0) Optimum		½ MS	30	5.8
بیشینه (+1) Maximum		MS	45	6.1

استخراج آلكالوئید آتروپین

استخراج آلكالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۵) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه های مویین خشک، پودر شده و داخل ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شدند. سپس، کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵ درصد، به نسبت ۱۵:۵:۱ به نمونه های گیاهی اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۴۰ درجه سلسیوس التراسونیک^۱ شدند. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد، پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی لیتر کلروفرم، برای تبخیر فاز کلروفرمی از دستگاه روتاری اوپراتور^۲ (تبخیر کننده دوار) استفاده گردید. به عصاره باقی مانده و خشک شده ته بالن، ۵ میلی لیتر کلروفرم و ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال اضافه شد و محلول حاصل به طور کامل به هم زده شد. در مرحله بعد، با ریختن مخلوط به دست آمده داخل قیف دکانتور دو فاز تشکیل شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلكالوئیدها به یک بشر منتقل شد و pH آن روی یخ و به وسیله آمونیاک ۲۵ درصد تا ۱۰ تنظیم گردید. محلول قلیایی حاصل، به داخل قیف دکانتور ریخته شد و آلكالوئیدها یک مرتبه توسط ۲ میلی لیتر و دو مرتبه توسط ۱ میلی لیتر کلروفرم استخراج شدند. فاز کلروفرمی به دست آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک به منظور حذف آب موجود، از صافی عبور داده شده و کاغذ صافی توسط ۱ الی ۲ میلی لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول صاف شده به وسیله روتاری اوپراتور در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر و ماده جامد به دست آمده (آلكالوئید کل) در ۲-۱ میلی لیتر متانول خالص حل شد. در نهایت محلول به دست آمده جهت انجام آنالیز زیست شیمیایی داخل ویال های کوچک ریخته شد.

واکاوی آماری

آزمایش در قالب طرح روش سطح پاسخ (RSM) و با ۳ تکرار انجام گردید و برای تجزیه و تحلیل داده ها و رسم نمودار از نرم افزار STATISTICA نسخه ۷ استفاده گردید.

نتایج

مشاهدات حاصل از طراحی آزمایش براساس روش سطح پاسخ (RSM) برای سه فاکتور محیط کشت (X_1)، ساکارز (X_2) و pH (X_3) در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- طراحی آزمایش نوع محیط کشت و نتایج حاصل از روش سطح پاسخ در ریشه های موبین گیاه شابیزک.
Table 2. Culture medium type experimental design and response surface methodology results in hairy roots of *Atropa Belladonna* L.

ردیف (Row)	فاکتورها (Factors)			مشاهدات (Observations)	
	X ₁ محیط کشت (Culture medium)	X ₂ ساکارز (Sucrose)	X ₃ pH	وزن تر (گرم) Fresh weight (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)
1	0	0	0	8.59	0.321
2	0	0	0	8.45	0.311
3	0	0	0	8.34	0.308
4	0	-1	-1	3.63	0.142
5	0	-1	1	4.90	0.181
6	0	1	1	6.24	0.275
7	1	0	1	4.23	0.162
8	1	1	0	2.84	0.109
9	-1	0	1	5.15	0.192
10	-1	1	0	5.82	0.239
11	-1	0	-1	5.63	0.227
12	0	1	-1	7.13	0.285
13	1	0	-1	4.55	0.168
14	1	-1	0	3.94	0.149
15	-1	-1	0	3.43	0.136

برازش مدل پاسخ سطح در رشد ریشه های موبین

نتایج تجزیه واریانس و اشتباه آزمایشی برای مدل های RSM در جدول ۳ نشان داد که مدل های پیش بینی شده برای دو پاسخ سطحی به طور معنی داری دقیق هستند ($P < 0.01$). R^2 و R^2 تصحیح شده ($R^2 - adj$) نشانگر برازش مناسب مدل های RSM هستند. یک برازش مناسب با R^2 و P مقدار بالا، نشانگر این است که تغییرات در نمونه ها فقط به دلیل فاکتورهای انتخاب شده مدل و خطای خالص می باشد (۲۷). ضرایب برای پیش بینی مدل های وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) در جدول ۳ خلاصه شده است. عدد F به دست آمده از ضرایب پاسخ ها (متغیرهای وابسته) نشان داد که اغلب ضرایب خطی، ضرایب درجه دوم و ضرایب مربوط به برهمکنش در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. هرچه F به دست آمده برای یک متغیر بالا باشد سهم آن متغیر در معنی دار شدن بیشتر است.

بررسی تاثیر ترکیبی نوع محیط کشت، pH و ساکارز روی وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) ریشه های موبین بر

اساس روش پاسخ سطحی (RSM)

نمودار سه بعدی برای وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) بر اساس متغیرهای X_1 - X_3 در اشکال زیر نشان داده شده است. شکل نمودار طبیعت و میزان برهمکنش بین متغیرها را نشان می دهد (۲۵). بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با بهینه نقطه برهمکنش دو فاکتور است. بر اساس برهمکنش X_1 (محیط کشت) و X_2 (ساکارز) که در شکل (۱ و ۴) نشان داده شده است. بیشترین وزن تر و خشک ریشه موبین در مقدار بهینه محیط کشت ($MS \pm 0.56$) و ساکارز (۳۰-۳۵ گرم بر لیتر) حاصل شده است به طوری که با افزایش غلظت محیط کشت و ساکارز تا حد بهینه میزان رشد ریشه های موبین نیز افزایش یافت و با افزایش غلظت محیط کشت (بیشتر از ۰/۵۶) و ساکارز (بیشتر از محدوده ۳۰-۳۵ گرم بر لیتر) به صورت توأم رشد ریشه ها شروع به کاهش نمود. به نظر می رسد که ریشه های موبین این گیاه به غلظت های بالای نمک و ساکارز حساس بوده زیرا مشاهدات تجربی نشان داد که در غلظت بالای محیط کشت (مانند MS) و ساکارز، ریشه ها قهوه ای رنگ شده و دچار بافت مردگی می شدند (شکل ۷-الف). تاثیر برهمکنش X_1 (محیط کشت) و X_3 (pH) بر وزن تر و خشک ریشه های موبین نشان داد که بهترین رشد و بیشترین وزن تر و خشک ریشه های موبین در محیط کشت $MS \pm 0.56$ و با غلظت pH ۵/۵-۷/۸ مشاهده شده است. مشاهدات تجربی نشان داد که رشد ریشه های موبین در غلظت پایین محیط کشت و pH کمتر و بیشتر از این حدود کاهش می یافت (شکل ۵ و ۲). هم چنین بر اساس اثر برهمکنش X_2 (ساکارز) و X_3 (pH) بر وزن تر و خشک ریشه های موبین نشان داد

که با افزایش ساکارز تا محدوده ۳۵-۳۰ گرم بر لیتر و pH ۵/۵-۷/۸ وزن تر و خشک ریشه‌های موئین افزایش و بعد از آن کاهش یافته است به طوری که غلظت‌های بالای ساکارز باعث کاهش رشد ریشه‌های موئین و تغییر در ریخت‌زایی ریشه‌ها گردید همچنین میزان رشد ریشه‌های موئین در غلظت‌های پایین pH و ساکارز نیز بسیار کند بود (شکل ۳ و ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت، ساکارز و pH بر رشد ریشه‌های موئین شابی‌ک بر اساس مدل RSM
Table 3. Analysis of variance the effect of culture medium, sucrose, and pH on the growth of hairy roots *Atropa Belladonna* based on the RSM model.

منابع (Source)	درجه آزادی (Degrees of freedom)	وزن تر (گرم) (Fresh weight (gr))	وزن خشک (گرم) (Dry weight (gr))
		مقدار F (F-value)	مقدار P (P-value)
		مجموع مربعات (sum of squares)	مقدار F (F-value)
X_1 : محیط کشت	1	2.49761	0.014043
X_2 : ساکارز	1	19.10830	0.000154
X_3 : pH	1	2.78300	0.011381
X_1X_2	1	13.80697	0.000333
X_1X_3	1	0.02212	0.742078
X_2X_3	1	4.08047	0.005217
X_1X_1	1	3.94579	0.005598
X_2X_2	1	0.00032	0.968319
X_3X_3	1	1.16640	0.052759
اشتباه آزمایشی (Experimental error)	5	0.91369	
مجموع مربعات کل (Total sum of squares)	14	49.91977	
R-Square-Adjusted R^2		0.9817-0.94875	0.96075-0.8901

بر این اساس مدل‌های برازش شده بر حسب داده‌های آزمایشی برای هر یک از پاسخ‌ها را می‌توان به صورت زیر نوشت:

$$Y_{FW} = 1/56531 - 1/11750 X_1 + 1/21026 X_2 - 0/10789 X_3 - 1/93342 X_1 X_2 - 0/17337 X_1 X_3 - 1/0800 X_2 X_3 - 5 X_1^2 / 24812 - 3 X_2^2 / 86750 - 2 X_3^2 / 10250$$

$$Y_{DW} = 0/315464 - 0/5150 X_1 + 0/61421 X_2 - 0/01632 X_3 - 0/81474 X_1 X_2 + 0/08211 X_1 X_3 - 0/2450 X_2 X_3 - 0 X_1^2 / 192844 - 0 X_2^2 / 121583 - 0 X_3^2 / 063583$$

که Y پاسخ‌های پیش‌بینی شده و X_1 ، X_2 و X_3 به ترتیب محیط کشت، ساکارز و pH می‌باشد.

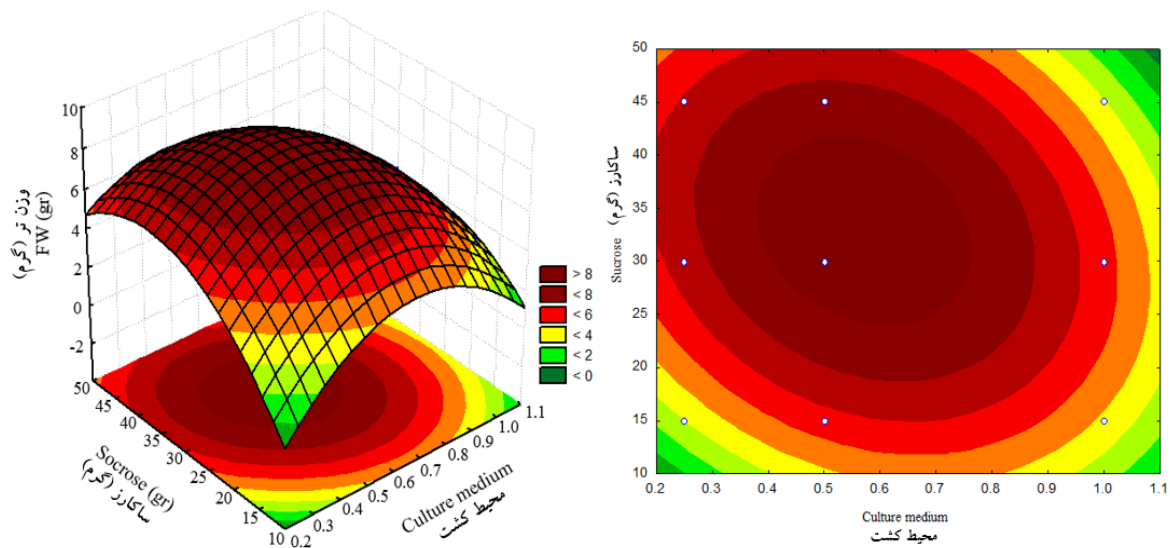


Fig. 1. The interaction of culture medium and sucrose on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۱- برهمکنش محیط کشت و ساکارز بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین.

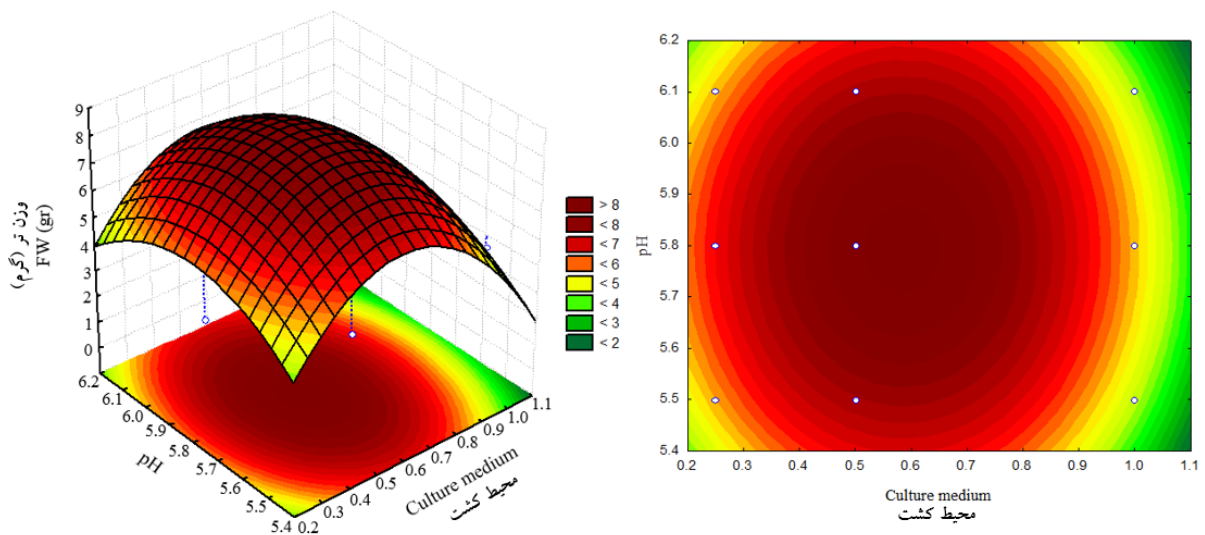


Fig. 2. The interaction of culture medium and pH on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۲- برهمکنش محیط کشت و pH بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین.

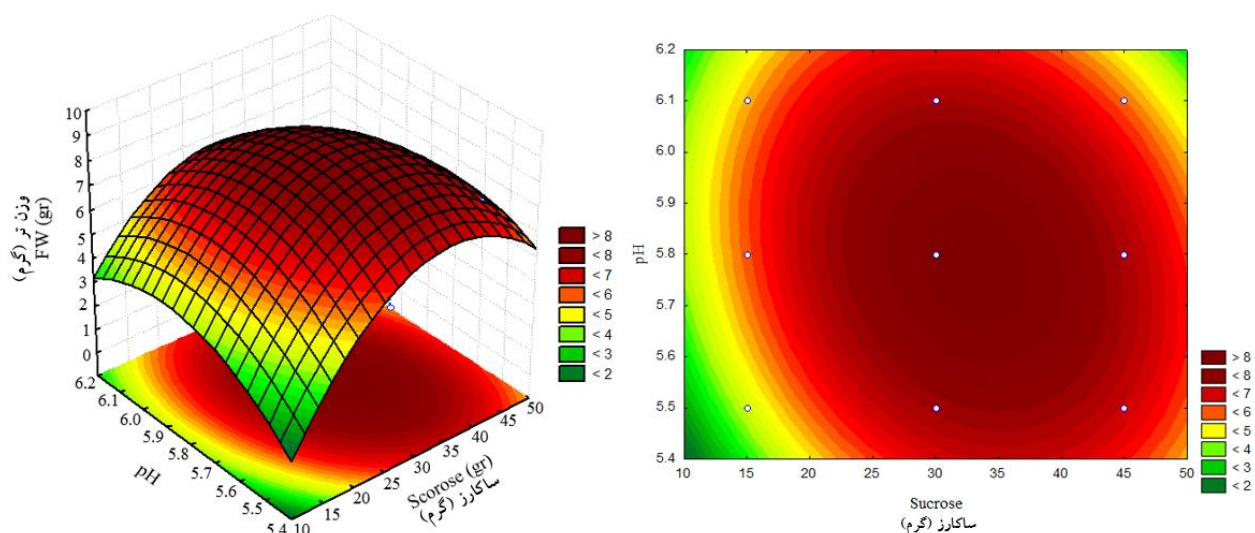


Fig. 3. The interaction of sucrose and pH on the fresh weight of hairy roots.

شکل ۳- برهمکنش ساکارز و pH بر میزان وزن تر ریشه‌های موپین.

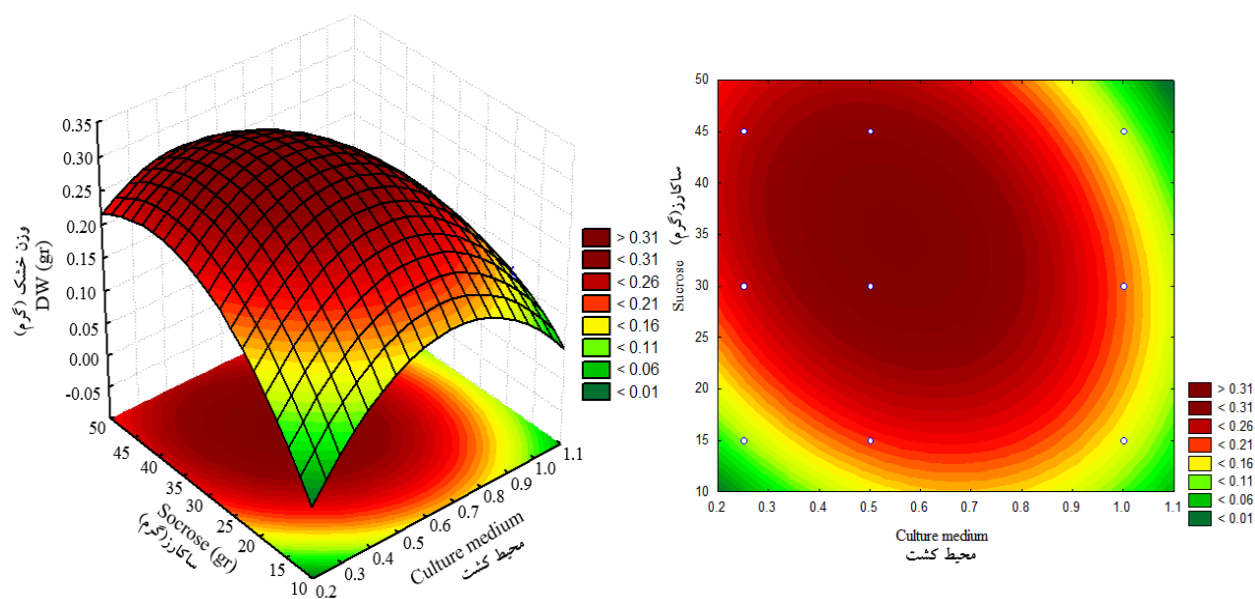


Fig. 4. The interaction of culture medium and sucrose on the dry weight of hairy roots.

شکل ۴- برهمکنش محیط کشت و ساکارز بر میزان وزن خشک ریشه‌های موپین.

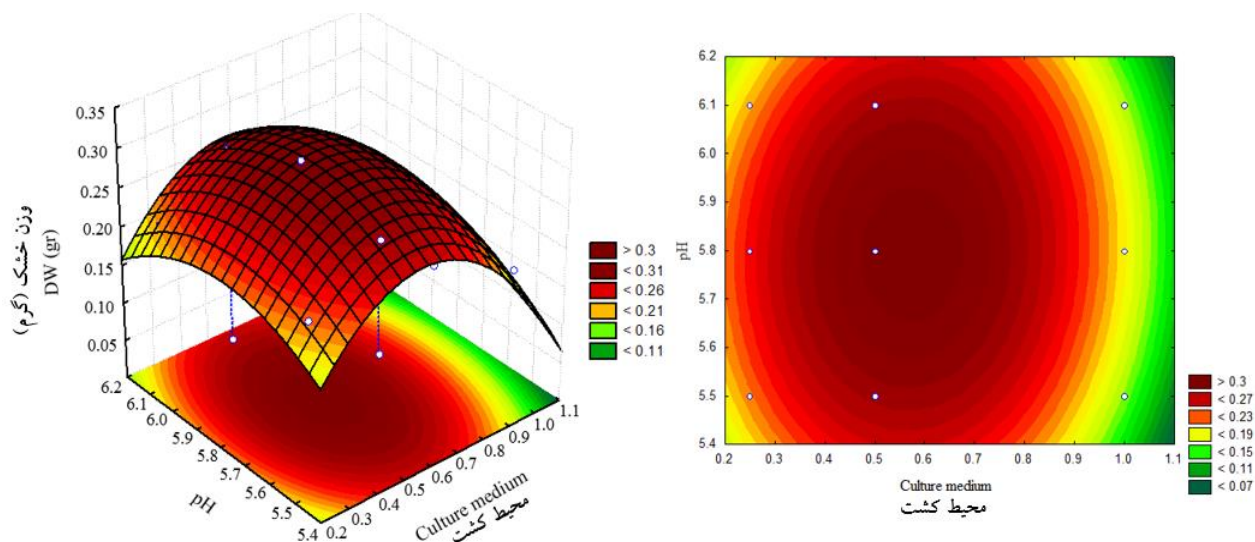


Fig. 5. The interaction of culture medium and pH on the dry weight of hairy roots.

شکل ۵- برهمکنش محیط کشت و pH بر میزان وزن خشک ریشه‌های موپین.

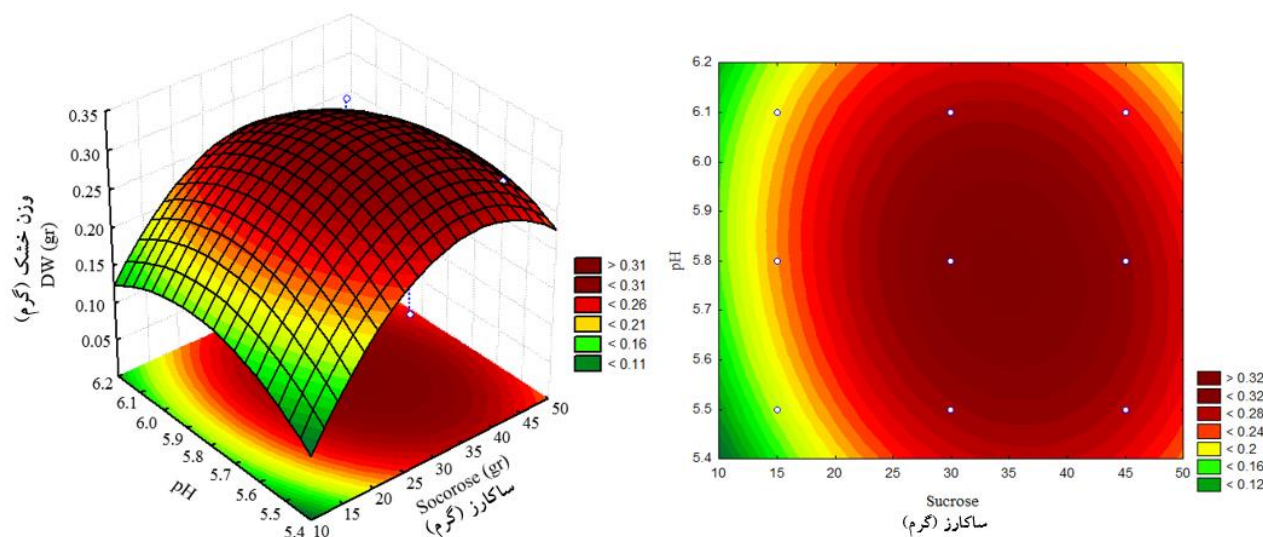


Fig. 6. The interaction of sucrose and pH on the dry weight of hairy roots.

شکل ۶- برهمکنش ساکارز و pH بر میزان وزن خشک ریشه‌های موپین.

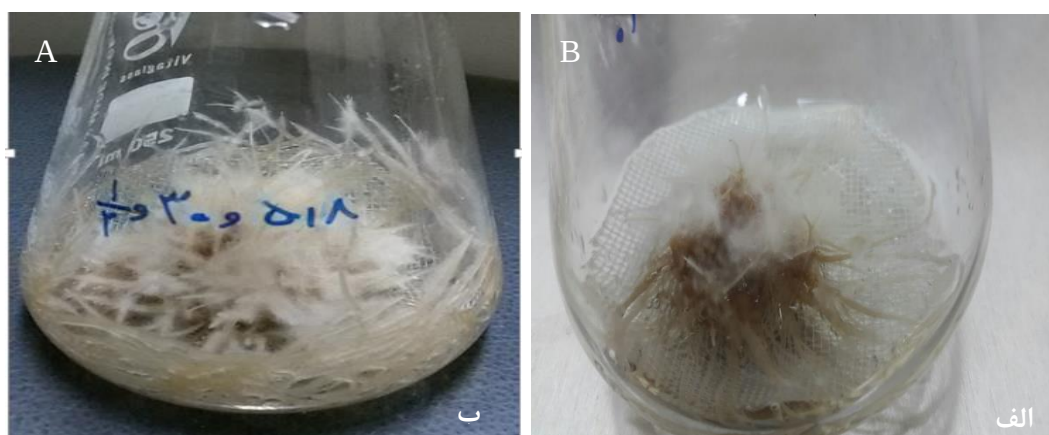


Fig. 7. A) The hairy roots grown in 1/2MS culture medium with 30 g l⁻¹sucrose and pH 5.8 B) The hairy roots grown in MS culture medium with 45 g l⁻¹sucrose and pH 5.8

شکل ۷- الف) ریشه موپین رشد یافته در محیط کشت MS با ۴۵ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ ب) ریشه موپین رشد یافته در محیط کشت ۱/۲ MS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸

بهینه‌سازی محیط کشت به صورت همزمان برای مقادیر با ارزش (وزن تر و خشک) در ریشه‌های موئین شابیزک

شکل ۸ مقدار بهینه محیط کشت را برای ارزیابی همزمان دو پاسخ وزن تر (FW) و وزن خشک (DW) را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، بهترین حالت ممکن برای ارزیابی همزمان دو پاسخ (وزن تر و خشک) در غلظت ۰/۵۶ محیط کشت ($1/2MS \approx$) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به دست آمد. در شرایط بهینه ارزش مطلوبیت ۰/۹۹۰ بود که در این شرایط وزن تر و خشک به ترتیب ۸/۵۸ و ۰/۳۱۷ گرم بود. بنابراین براساس نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از روش سطح پاسخ، محیط کشت ۱/۲ MS همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به عنوان بهترین ترکیب محیط کشت انتخاب گردید.

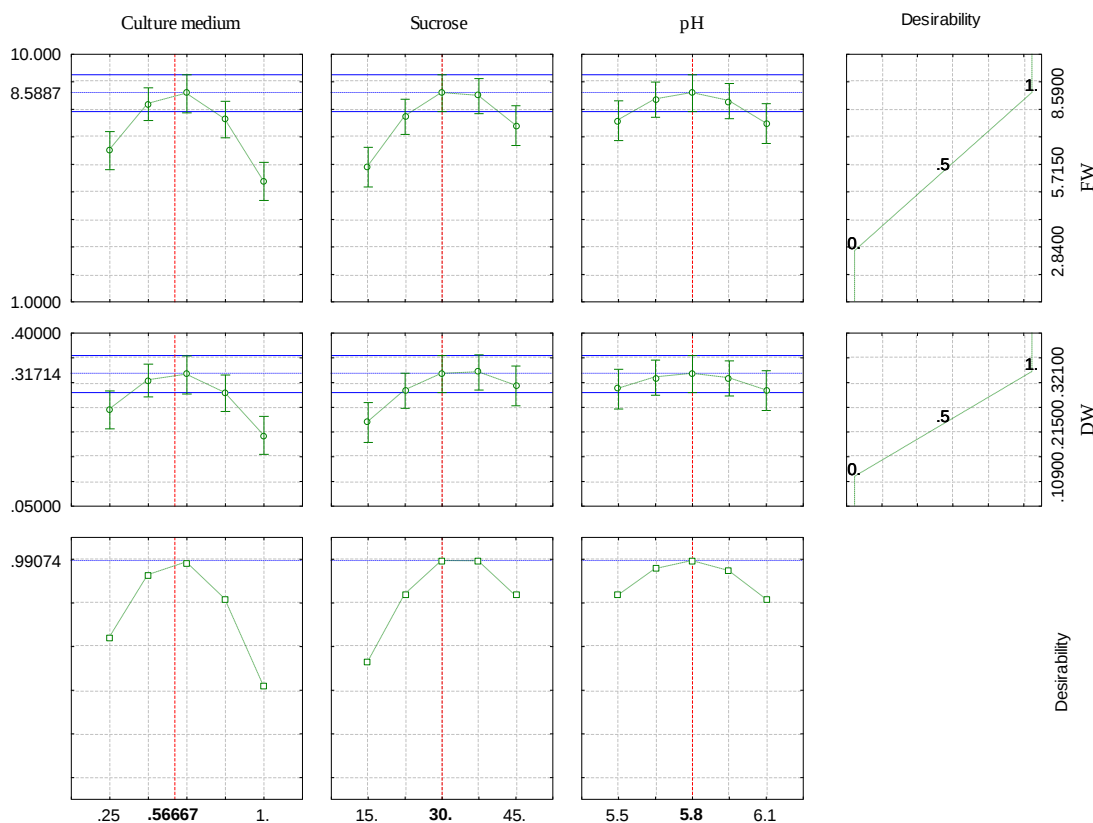


Fig. 8. Culture Medium Optimization for amounts with values (FW and DW) in hairy roots *Atropa Belladonna* L. شکل ۸ - بهینه‌سازی محیط کشت برای مقادیر با ارزش (وزن تر و خشک) در ریشه‌های موئین شابیزک.

تایید تراریختی ریشه‌های موئین

به منظور تایید ملکولی ریشه‌های موئین تولید شده، یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد. وجود باند ۷۸۰ نوکلئوتیدی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان دهنده حضور ژن *rolB* و در نتیجه نشان دهنده این است که ریشه‌های تولید شده در اثر انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم رایزوزنز به وجود آمده‌اند (شکل ۹).

تعیین میزان تولید آتروپین در محیط کشت بهینه سازی شده توسط دستگاه GC/MS

نتایج حاصل از دستگاه GC/MS نشان داد که میزان تولید آتروپین در بهترین ترکیب محیط کشت ($1/2MS$) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸، ۶/۸۸ درصد بود. کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC/MS نمونه‌های ریشه موئین رشد یافته در محیط کشت مذکور در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

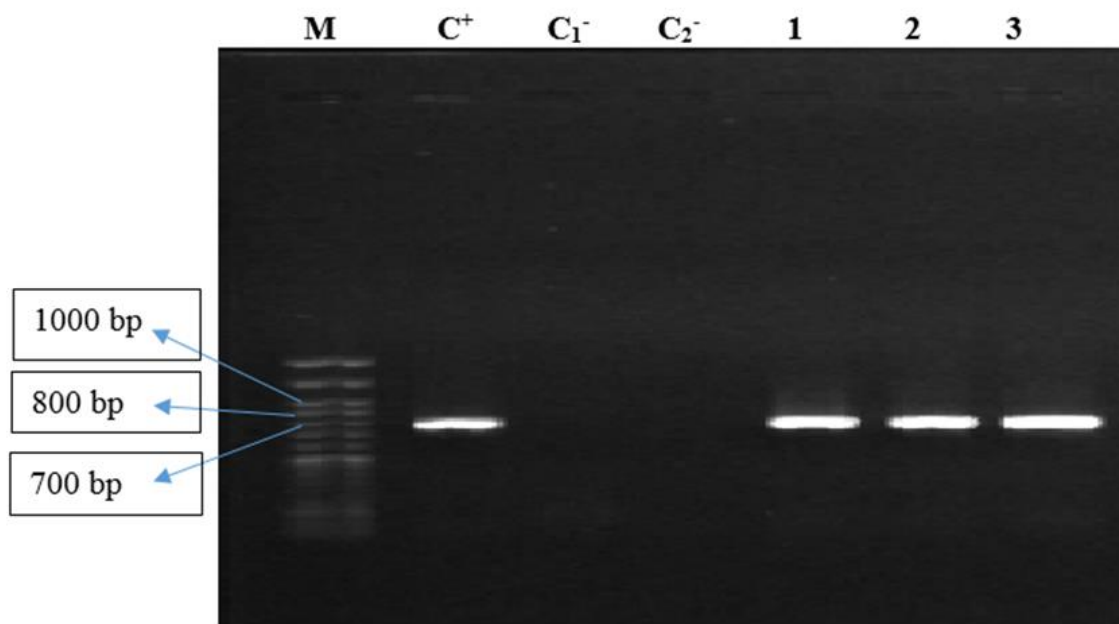


Fig.9. polymerase chain reaction analysis confirm the *rol B* gene in transgenic hairy roots of *Atropa Belladonna*. M: DNA marker 1kb (Fermentase), C⁺: *Agrobacterium rhizogenes* A7 strains as a positive control, C₁⁻: Non transgenic control roots as The first negative control, C₂⁻: PCR reaction without DNA pattern as the second negative control, Lines 1 to 3: hairy roots leaf explants One-week induced by *Agrobacterium rhizogenes* A7 strain.

شکل ۹ - آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز جهت تایید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های مویین تراریخته شابیزک. M: DNA مارکر 1kb (Fermentase)، C⁺: اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A7 به عنوان کنترل مثبت، C₁⁻: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی اول، C₂⁻: واکنش PCR بدون الگوی DNA به عنوان کنترل منفی دوم، لاین ۱ تا ۳: ریشه‌های مویین القا شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای توسط سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز.

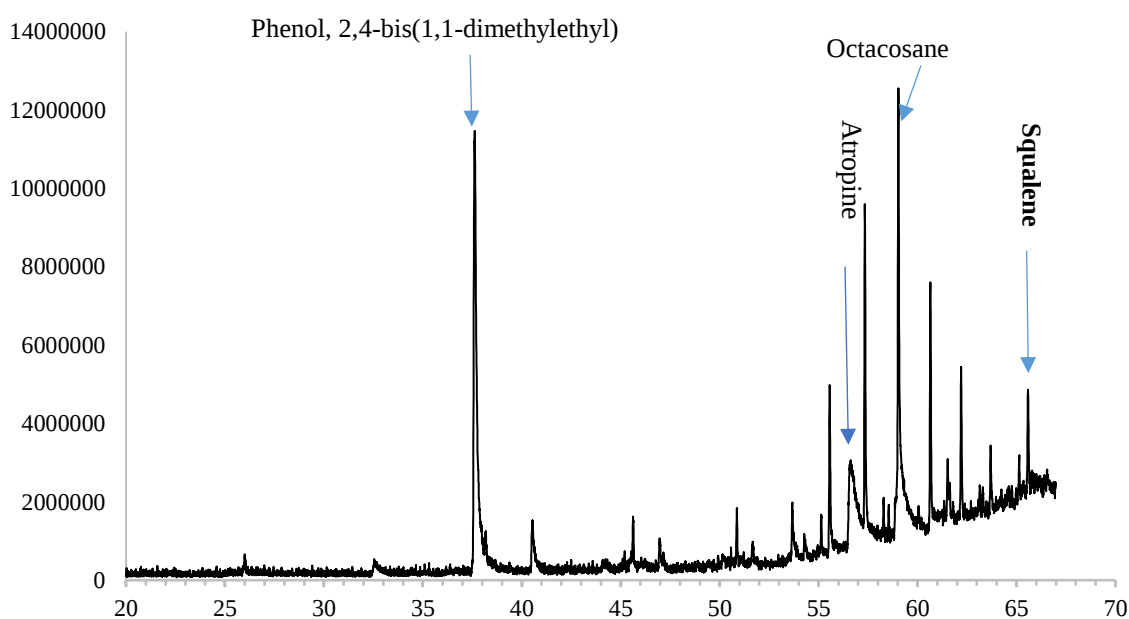


Fig. 10. Chromatogram hairy roots grown in the best culture medium.

شکل ۱۰ - کروماتوگرام ریشه‌های مویین رشد یافته در بهترین محیط کشت.

بحث

تغییر مقادیر مواد مغذی محیط کشت، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد ریشه‌های موپین دارد و غلظت و نوع مواد تشکیل دهنده محیط کشت در میزان رشد ریشه موپین تاثیر بسزایی دارد. بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت به منظور رشد مطلوب و افزایش تجمع متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موپین دارای اهمیت بسیار زیاد است (۳، ۲۶). نتایج این پژوهش نشان داد که ریشه‌های موپین در محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ به خوبی رشد کرده و دارای بیشترین زیست توده هستند. مناسب بودن محیط کشت MS ۱/۲ برای رشد و توسعه ریشه‌های موپین در بسیاری از گیاهان دارویی به اثبات رسیده است (۲۳ و ۳۲). مشابه با نتایج پژوهش حاضر، در پژوهشی طی تاثیر سه نوع محیط کشت مختلف (MS مایع، MS ۱/۲ مایع و MS جامد) بر رشد ریشه‌های موپین در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)، بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌های موپین در محیط کشت MS ۱/۲ مایع به دست آمد (۸). با توجه به متفاوت بودن نوع و میزان عناصر ماکرو و میکرو در فرمولاسیون محیط کشت‌های مختلف، محیط کشت‌ها تفاوت اساسی با یکدیگر داشته و در نتیجه بر پاسخ‌های درون شیشه‌ای ریزنمونه تاثیرات اساسی دارند (۲۹). به عنوان مثال در محیط کشت MS و MS ۱/۲ غلظت نیتروژن متفاوت بوده به طوری که در محیط کشت MS غلظت بالای نیتروژن می‌تواند عامل محدود کننده رشد ریشه‌های موپین باشد در واقع افزایش نیتروژن تا یک حد بهینه اکسین درونی را افزایش داده اما افزایش بیشتر نیتروژن از طریق کاهش اکسین درونی باعث کاهش رشد ریشه می‌شود (۳۵). کمبود رشد ریشه در محیط کشت MS ۱/۴ می‌تواند به دلیل کمبود عناصر معدنی از جمله نیتروژن، فسفر، پتاسیم و روی باشد. همچنین تفاوت در پاسخ رشدی ریشه‌های موپین گیاهان مختلف به نوع محیط کشت را می‌توان به نوع ژنوتیپ گیاهی و تفاوت در نیازهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاه و همچنین نوع سویه باکتری مورد استفاده نسبت داد (۱۹). قندها علاوه بر منبع کربن و انرژی، در کشت ریشه‌های موپین همانند هورمون‌ها به عنوان ایجاد سیگنال در تولید و رشد متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کنند (۳۳). ساکارز یک منبع مهم کربن جهت کشت یاخته گیاهی و سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۲۸). در پژوهشی، Lourenço و همکاران (۱۸) تاثیر ساکارز در تجمع زیست توده^۱ ریشه‌های موپین را بررسی و گزارش نمودند که غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه‌های موپین تاثیر گذار است و غلظت‌های ۳۵-۳۰ گرم بر لیتر ساکارز موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه‌های موپین گردید و با افزایش غلظت ساکارز رشد ریشه‌ها به تدریج شروع به کاهش نمود که با نتیجه‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. مطابق نظر Hamill و همکاران (۱۱) کاهش رشد و تغییر مورفولوژی و کالوسی شدن ریشه‌ها در غلظت‌های بالای ساکارز احتمالاً ناشی از تنش اسمزی است. همچنین وقتی که میزان pH در محیط کشت پایین است سطح آلومینیم و هیدروژن برای سیستم ریشه موپین سمیت ایجاد می‌کند و اگر pH محیط کشت بالا باشد در این صورت ممکن است عناصر کم مصرف به شکل غیرقابل جذب در اختیار ریشه موپین قرار گیرد (۳۰). ژن *rol B* نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های موپین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن، ریشه موپین تولید نخواهد شد (۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان روشی مناسب در مدل‌سازی و بهینه‌سازی محیط کشت ریشه‌های موپین گیاه شابی‌زک مطرح گردد.

نتیجه‌گیری

امروزه، بهره‌گیری از کشت ریشه‌های موپین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیب‌های ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. در گام نخست یافتن مناسب‌ترین محیط کشت جهت افزایش زیست توده ریشه‌های موپین و در گام بعدی استفاده از عوامل محرک در محیط کشت بهینه‌سازی شده، می‌تواند موثرترین روش در تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه باشد. بنابراین در پژوهش حاضر، غلظت ۰/۵۶ محیط کشت (MS ۱/۲) همراه با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و pH ۵/۸ در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها به عنوان بهترین محیط کشت برای رشد ریشه‌های موپین گیاه شابی‌زک معرفی می‌گردد.

References

1. Banerjee, S., Singh, S. and Rahman, L.U. 2012. Biotransformation studies using hairy root cultures-a review. *Biotechnol. Adv.* 30(3): 461-468.

منابع

2. Çaksen, H., Odabaş, D., Akbayram, S., Cesur, Y., Arslan, Ş., Üner, A. and Öner, A.F. 2003. Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: an analysis of 49 children. *Hum. Exp. Toxicol.* 22(12): 665-668.
3. Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M.C., Sobolev, V.S. and Medina-Bolivar, F. 2010. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiol. Biochem.* 48(5): 310-318.
4. Dechaux, C. and Boitel-Conti, M. 2005. A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 47(1): 101-107.
5. Ebrahimi, R., Jafari, M., Ghadimzadeh, M. and Abdollahi Mandoulakani B. 2015. Optimization of induction and culture conditions of transgenic hairy roots in the medicinal plant *Scrophularia deserti*. *J. Agr. Biotech.* 4: 1-20 (in Persian).
6. Ehsanpour, A. and Amini, F. 2003. *Plant Cell and Tissue Culture*. Jahad Daneshgahy of IUT, Iran, 184p.
7. El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J. and Ahmad, M. 2017. Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2: 10-17.
8. Fathi, R., Mohebodini, M. and Chamani, E. 2018. Optimization of Hairy Root Induction and Biomass Production of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Hort. Sci.* 32(3), 393-405 (in Persian).
9. Giri, A. and Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy root: recent trends and application. *Biotechnol. Adv.* 18: 1-22.
10. Häkkinen, S.T. and Oksman-Caldentey, K.M. 2018. Progress and prospects of hairy root research. *Hairy roots: an effective tool of plant biotechnology*. Springer Sci. Rev. pp.3-19.
11. Hamill, J. D., Parr, A. J., Rhodes, M. J., Robins, R. J. and Walton, N. J. 1987. New routes to plant secondary products. *Biotechnol.* 5(8): 800-804.
12. Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H. 2009. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. *J. Med. Plants Stud.* 8(29):1-190 (in Persian).
13. Huang, X., Yao, J., Zhao, Y., Xie, D., Jiang, X. and Xu, Z. 2016. Efficient rutin and quercetin biosynthesis through flavonoids-related gene expression in *Fagopyrum tataricum* Gaertn. hairy root cultures with UV-B irradiation. *Front. Plant Sci.* 7:63.
14. Ionkova, I. 2007. Biotechnological approaches for the production of lignans. *Pharmacogn Rev.* 1(1): 57-68.
15. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 5(4): 239-242.
16. Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T. and Abidin, M. Z. 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(3): 175.
17. Li, J. W., Ding, S. D. and Ding, X. L. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. jinsixiaozao. *J. Food Eng.* 80(1): 176-183.
18. Lourenço, P. M., de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A. and Domingos, A. 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* 31(3): 242-249.
19. Mehrotra, S., Kumar Kukreja, A., Singh Khanuja, S. P. and Nath Mishra, B. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.* 11(2): 69-75.
20. Mulabagal, V. and Tsay, H. S. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2(1): 29-48.
21. Nigutová, K., Kusari, S., Sezgin, S., Petijová, L., Henzelyová, J., Bálintová, M. and Čellárová, E. 2019. Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured *Hypericum* species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. *J. Pharm. Pharmacol.* 71(1): 46-57.
22. Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M. H. 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Mol.* 13(8): 1722-1742.
23. Park, S.U., Li, X., Eom, S.H., Lee, C.Y. and Lee, S.Y. 2010. E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. *Arch. Biol. Sci.* 62:649-652.
24. Pawar, P. K. and Maheshwari, V. L. 2004. Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae.
25. Prakash, O., Talat, M., Hasan, S. H. and Pandey, R. K. 2008. Factorial design for the optimization of enzymatic detection of cadmium in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. *Bioresour. Technol.* 99(16):7565-7572.
26. Praveen, N. and Murthy, H.N. 2012. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. *Ind. Crops Prod.* 35: 241– 243.

27. Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I. and Raso, J. 2011. Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. Food Chem. 126(3): 1482-1487.
28. Shinde, A. N., Malpathak, N. and Fulzele, D. P. 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. J. Nat. Med. 64(3): 346-353.
29. Singh, B. D. 2005. Plant tissue culture. Biotechnology fundamentals and application. New Dehli. Aust. J. Basic Appl. Sci. 14:332-425.
30. Sivakumar, G., Yu, K. W., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Curr. Sci. 89(4): 641-649.
31. Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Trop. J. Pharm. Res. 2: 243-253.
32. Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. and Putalun, W. 2009. Isoflavonoid production in a hairy roots culture of *Pueraria candollei*. Z. Naturforsch. C .64(9-10): 687-691.
33. Wang, Y. and Weathers, P. J. 2007. Sugars proportionately affect artemisinin production. Plant cell reports. 26(7): 1073-1081.
34. Woo, S. S., Song, J. S., Lee, J. Y., In, D. S., Chung, H. J., Liu, J. R. and Choi, D. W. 2004. Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis. Phytochem. 65(20): 2751-2761.
35. Wu, X., 2007. Establishment and chemical analysis of hairy roots of *Eucommia ulmoides*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College. 65pp.
36. Zafar, S., Dilshad, E., Ismail, H., Rizvi, C. B. and Mirza, B. 2019. Rol genes enhance content of artemisinin and other secondary metabolites in Shennong hybrid of *Artemisia annua*. Chin. Herb. Med. 11(2): 209-215.

Optimization of the Effect of Culture Medium and Sucrose Concentration and pH on the Production of Hairy Roots of *Atropa belladonna* L. Using the Response Surface Methodology (RSM) Under *In Vitro* Condition

B. Karjo and M. Fattahi*¹

Optimization of the culture medium of hairy roots in terms of the composition and type of ingredients in the medium is essential for proper growth and optimal biomass production. The greatest advantage of culturing Hairy roots is that they are often capable of producing secondary metabolites compared to the mother plant. In this research, transgenic hairy root induction was established through the mediation of the A7 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Molecular confirmation of hairy roots was done by PCR using *rolB* gene-specific primers. With response surface methodology (RSM) coding, the effect of three types of basal liquid MS media (MS, ½ MS and ¼ MS) with different sucrose concentrations (15, 30, and 45 g l⁻¹) and three pH levels (5.5, 5.8 and 6.1) on the growth of hairy root was investigated. The fresh and dry weight of hairy roots was measured after 4 weeks. The obtained results of response surface methods showed that the highest dry weight of hairy roots in the culture medium with a concentration of 0.56 of MS ($\cong$ 1/2MS), 30 g l⁻¹ of sucrose, and pH of 5.8. In optimum conditions, the utility value was 0.990, and the fresh and dry weight of hairy roots, was 8.58gr and 0.317gr, respectively. According to GC/MS results, the amount of atropine alkaloid in hairy roots grown in optimum culture medium was about 6.88%.

Keywords: Atropine, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, Response Surface Methodology, Culture medium.

1. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran, respectively.

* Corresponding Author, Email: (mo.fattahi@urmia.ac.ir)