Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، صفحه ۶۶۶-۶۵۵ (۱۳۹۵)

تأثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Hyoscyamus niger* L.

میترا پارسا[1*] و امینه زینالی[2]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، گروه فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیک: mitraprs@yahoo.com

۲- مربی، گروه فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

تروپان آلکالوئیدهایی مانند آتروپین و اسکوپولامین به‌دلیل اثر آنتی‌کولینرژیک، کاربردهای وسیعی در درمان بیماری‌هایی مانند آسم و تشنج دارند. در این تحقیق، اثرات الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه مویین گیاه *Hyoscyamus niger* L. انجام شد. ریشه‌ها، تحت تأثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار و هر یک در تیمارهای زمانی ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ساعت کشت شدند. در نهایت میزان تروپان آلکالوئیدها با استفاده از HPLC سنجش و مقایسه شدند. همچنین سرعت رشد ریشه‌ها نیز در این تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقدار آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت، به‌ترتیب در غلظت ۱ میلی‌مولار و تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت و ۲ میلی‌مولار الیسیتور سالیسیلیک اسید و پس از گذشت ۹۶ ساعت مشاهده شد. مقدار اسکوپولامین در این غلظت نسبت به شاهد بیش از ۱۳ برابر افزایش (۶۴۹/۵۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) نشان داد. در ریشه‌های مویین، بیشترین مقدار آتروپین در غلظت ۲ میلی‌مولار و پس از گذشت ۹۶ ساعت و بالاترین مقدار اسکوپولامین در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌مولار و در مدت زمان ۱۶۸ ساعت مشاهده شد. به‌طور کلی، نسبت آتروپین به اسکوپولامین در ریشه‌های مویین بیشتر بود، در حالی‌که در ریشه‌های حاصل از کشت بافت نسبت اسکوپولامین به آتروپین بیشتر بود. همچنین رشد ریشه‌ها در هر دو الیسیتور با افزایش غلظت، کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: *Hyoscyamus niger* L.، الیسیتور، سالیسیلیک اسید، ریشه مویین، کشت بافت.

مقدمه

تروپان آلکالوئیدها، ازجمله آتروپین و اسکوپولامین، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که اثر قوی آنتی‌کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک داشته و به عنوان رفع اسپاسم، تسکین‌دهنده درد و اتساع مردمک چشم بکار برده می‌شوند (Palazón *et al.*, 2008؛ Bruce, 2008). تعدادی از گیاهان خانواده سیب‌زمینی ازجمله جنس‌های *Atropa*، *Hyoscyamus*، *Duboisia*، *Datura*، *Brugmansia* و *Scopolia* به‌دلیل داشتن آلکالوئیدهای تروپانی دارای خاصیت دارویی هستند (Grynkiewicz & Gadzikowska, 2008; 2002).

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه *Hyoscyamus niger* گیاهی علفی بوده که در نواحی مختلف پراکنش داشته (Khatamsaz, 1998) و به لحاظ داشتن این متابولیت‌ها، از دیرباز در طب سنتی مورد توجه بوده است. بنابراین، محققان سعی در افزایش تولید این متابولیت‌های ثانویه باارزش در مقیاس تجاری دارند.

آتروپین و اسکوپولامین به‌طور عمده در سلول‌های ریشه جوان سنتز و به بخش‌های هوایی منتقل می‌شوند و در نتیجه ریشه‌ها قادر به تجمع متابولیت‌ها در حجم بالا نیستند. همچنین کشت ریشه نیاز به یک منبع فیتوهورمونی خارجی داشته و رشد کندی هم دارند که این امر منجر به سنتز بسیار کم متابولیت‌های ثانویه می‌شود. در بسیاری از موارد، مقدار این تروپان آلکالوئیدها برای تجاری‌سازی بسیار پایین می‌باشد، از این‌رو امروزه از روش‌های جایگزین مانند هیبریداسیون بین گونه‌ای، سنتز شیمیایی و کشت سلولی استفاده می‌شود. در میان این روش‌ها، تولید ریشه‌های مویین می‌تواند راه مناسبی باشد (Kai *et al.*, 2012). سیستم ریشه مویین در شرایط کشت بدون هورمون بسیار پایدار بوده و تولید بالایی در مقایسه با گیاهان مادری دارد. رشد سریع، کاهش زمان، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیفی از ترکیب‌های شیمیایی در ریشه‌های مویین ازجمله مزایایی است که آنها را به منبعی مهم و دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل کرده است (Biondi *et al.*, 2000). اما در بیشتر مواقع، تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش، نیاز به محرک‌های زیستی و غیرزیستی برای تولید آنهاست.

الیسیتورها علاوه‌بر پاسخ‌های دفاعی، توانایی القای تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند تروپان آلکالوئیدها را به عهده دارند (Kai *et al.*, 2012). الیسیتورها، مواد شیمیایی و یا فاکتورهای زیستی از منابع مختلف هستند که می‌توانند موجب تغییرات فیزیولوژیکی ارگانیسم زنده هدف شوند. مولکول‌های علامت‌رسان مانند سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید تنظیم‌کننده‌های درونی رشد گیاه هستند که نقش‌های کلیدی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفاء می‌کنند. این ترکیب‌ها بر روی رسپتورهای غشاء گیاه اثر متقابل گذاشته و موجب مکانیسم ناشناخته‌ای می‌شود. مکانیسم حاصل باعث فعال‌سازی ژن‌های خاصی شده، در نتیجه آن بسیاری از ترکیب‌های دفاعی مانند پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها و پروتئین‌های وابسته به میکروب‌ها سنتز می‌شود (Kang *et al.*, 2004). از این‌رو از آنها می‌توان به‌عنوان روشی برای رسیدن به تولید تجاری استفاده کرد.

در این تحقیق، اثر تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین و همچنین شاخص رشد، به‌طور جداگانه در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه‌های مویین مقایسه و ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه قطعات جداکشت

بذرهای گیاه *H. niger* L. به‌دلیل داشتن پوسته کنگره‌ای نیاز به از بین بردن آلودگی‌های قارچی و باکتریایی دارند. برای حذف این آلودگی‌ها، ابتدا بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۶٪ ضدعفونی و پس از آن در محلول هیپوکلریت سدیم حاوی ۱٪ (v/v) کلر فعال به همراه دو قطره توئین ۸۰ به مدت ۵ دقیقه خیس شدند. سپس ۴ مرتبه شستشو با آب‌مقطر استریل به فواصل زمانی ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه انجام شد. برای تسریع در جوانه‌زنی نیز بذرها پس از تیمار با اسید جیبرلیک ۲۰۰ ppm به مدت ۴۸ ساعت (Akramian *et al.*, 2008) در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) فاقد هورمون، کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به مدت ۲ هفته نگهداری شدند (Parsa *et al.*, 2011a,b).

تولید ریشه‌های انبوه از گیاه ***H. niger* L.**

تولید ریشه از طریق کشت بافت

برای تهیه ریشه از طریق کشت بافت، ریشه‌های نوپدید از بذرهای جوانه‌زده در مرحله قبل که به‌طول ۱۰-۵ میلی‌متر بودند، جدا و برای رشد و افزایش بیشتر در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

کشت مایع B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی ۱ میکرومولار در لیتر هورمون IBA کشت و بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (Ebrahimzadeh *et al.*, 2003 ؛Parsa *et al.*, 2011a,b).

القای ریشه مویین

برای تهیه ریشه‌های مویین (Hairy root) از سویه اگروباکتریوم رایزوژنز A4 استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا برگ‌هایی که دارای رگبرگ‌های واضح‌تری بودند از دمبرگ جدا و به قطعات کوچک ۲ سانتی‌متری برش داده شدند. سپس با استفاده از سوزن استریل آغشته به باکتری بر سطح زیرین قطعات برگی و بر روی رگبرگ‌ها زخم ایجاد شد. آنگاه قطعات برگی آلوده، بر روی محیط کشت جامد B5 فاقد هورمون و آنتی‌بیوتیک به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. پس از آن، به محیط کشت جامد B5 حاوی ۴۰۰mg/l سفوتاکسیم سدیم واکشت شدند. در نهایت برای رشد سریعتر، ریشه‌های مویین با طول ۴ سانتی‌متر از قطعه برگی جدا و به محیط کشت مایع B5 حاوی ۴۰۰mg/l سفوتاکسیم سدیم منتقل شدند. در هر مرحله از واکشت میزان سفوتاکسیم کاهش و کشت نهایی فاقد این ترکیب بود (Parsa *et al.*, 2011b).

برای تأیید تراریخته بودن ریشه‌های مویین از روش مولکولی استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا DNA از بافت گیاهی از روش Cai و همکاران (۱۹۹۷) با کمی تغییرات استخراج و پس از آن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rolB* و *rolC* و طبق برنامه (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای واسرشتگی اولیه، ۴۰ چرخه شامل: دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل شدن مرحله نهایی۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه) انجام شد (Parsa *et al.*, 2011b).

تعیین شاخص رشد

برای هر یک از غلظت‌های الیسیتورها در تیمارهای زمانی مختلف (۰، ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت)، شاخص رشد به روش زیر محاسبه شد:

$$\text{شاخص رشد} = \frac{\text{وزن خشک ریشه‌های تحت تیمار(گرم)}}{\text{وزن خشک ریشه‌های اولیه (گرم)}}$$

تیمار الیسیتور

هر یک از ریشه‌های مویین و ریشه‌های معمولی به‌طور جداگانه در محیط کشت B_5 حاوی سالیسیلیک اسید با ۵ غلظت مختلف (۰، ۰/۱، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار) و در ۳ تیمار زمانی ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت و هر یک با ۳ تکرار کشت شدند.

استخراج تروپان آلکالوئیدها از ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه‌های مویین گیاه بنگدانه

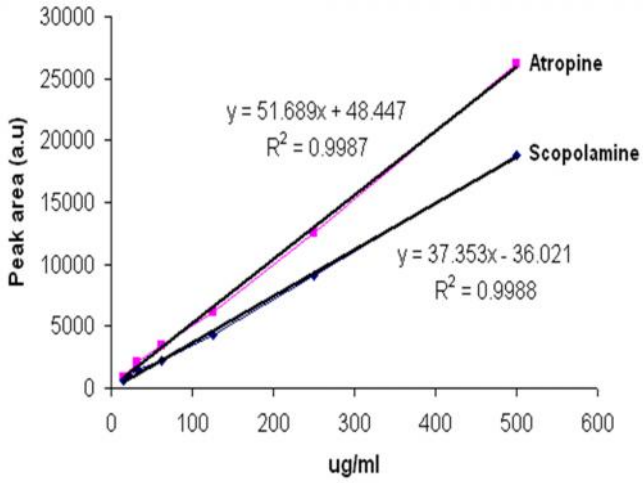
برای استخراج آلکالوئیدها از روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) استفاده شد. بدین‌منظور، ۲۰۰ میلی‌گرم ماده گیاهی خشک پودر شده با کلروفرم: متانول: هیدروکسید آمونیوم ۲۸٪ به‌ترتیب با نسبت‌های ۱۵:۱۵:۱ و به‌مدت ۱ ساعت در معرض اولتراسونیک (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۴۲ کیلوهرتز) قرار گرفت. پس از عبور عصاره از کاغذ صافی، فاز کلروفرمی به کمک دستگاه تبخیرکننده دوار خشک شد. در مرحله بعد، مخلوط ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۵ مولار به عصاره اضافه شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئید تا pH=۱۰–۱۱ و با استفاده از هیدروکسید آمونیوم ۲۸٪، بر روی یخ تنظیم شد. آلکالوئیدها یک‌بار با ۲ میلی‌لیتر کلروفرم و دوبار با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. ماده نهایی پس از اضافه کردن سولفات‌سدیم، آبگیری و صاف شد. در نهایت برای آنالیز HPLC، نمونه در ۲–۱ میلی‌لیتر متانول حل شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش آلکالوئید به روش HPLC

برای شناسایی کیفی تروپان آلکالوئیدها از روش Roos (Roos & Lau-Cam, 1986) با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. دستگاه HPLC مورد استفاده از نوع LKB سوئد بوده و از ستون C18 Eurospher (۲۵۰cm×۴/۶mm×۵µm) و نرم‌افزار chromgate، پمپ مدل K-1001، شیر تزریق با لوپ ۲۰ میکرولیتر مدل D-14163 و آشکارساز PDA مدل K-2800 استفاده گردید. سرعت جریان حلال ۱ml/min و فاز متحرک آمونیوم استات ۰/۱٪ + آب بود. طول موج دستگاه روی λ=۲۱۵nm تنظیم شد. میزان دو آلکالوئید آتروپین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی براساس سطح زیر منحنی بدست آمده (شکل ۱) با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه شد. منحنی استاندارد نیز براساس سطح زیر منحنی دو ترکیب استاندارد، آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و طیف آنها توسط دستگاه و با طول موج ۲۱۵ نانومتر ترسیم شد.



	Peak area at 215 nm	
ug/ml	Scopolamine	Atropin
500	18817.8	26148.8
250	9047.16	12572.1
125	4359.03	6093.41
62.5	2264.45	3465.56
31.25	1483.54	2061.99
15.625	581.37	830.05

شکل ۱- منحنی کالیبراسیون دو استاندارد آتروپین و اسکوپولامین

نتایج

بررسی اثر سالیسلیک اسید بر شاخص رشد و تولید تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین

ریشه‌های حاصل از کشت بافت

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، میزان رشد ریشه‌های حاصل از کشت بافت (شکل ۲) کاهش می‌یابد (شکل 4A). رشد ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد ۵۰٪ کاهش نشان داد. تیمار با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید تأثیر منفی بر روی شاخص رشد نشان نداد.

شکل‌های 4B و 4C تولید میزان آتروپین و اسکوپولامین را پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در دوره‌های زمانی مختلف نشان می‌دهند. بیشترین مقدار آتروپین در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت (۸۰/۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) مشاهده شد (شکل 4B). در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش تدریجی در میزان آتروپین را در تمام دوره‌های زمانی نشان داد. میزان اسکوپولامین در تمام غلظت‌ها و پس از گذشت ۹۶ ساعت افزایش نشان داد. بالاترین مقدار اسکوپولامین در غلظت ۲ میلی‌مولار و پس

www.SID.ir

Archive of SID

از گذشت ۹۶ ساعت حدود ۱۳/۲ برابر افزایش (۶۴۹/۵۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد. پس از گذشت یک هفته مقدار اسکوپولامین در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مولار کاهش یافت (شکل 4C).

ریشه‌های مویین

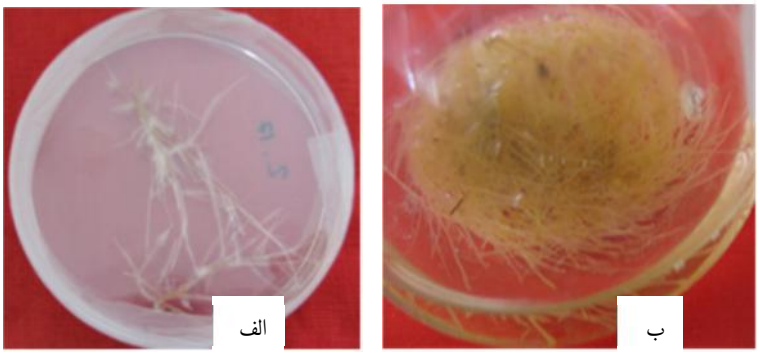
نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، میزان رشد ریشه‌های مویین (شکل ۳) کاهش یافت (شکل 5A). رشد ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد ۵۵/۵٪ کاهش نشان داد.

شکل‌های 5B و 5C میزان تغییرات آتروپین و اسکوپولامین را در ۴ غلظت مختلف سالیسیلیک اسید در دوره‌های زمانی مختلف نشان می‌دهند. بیشترین مقدار آتروپین در غلظت ۲ میلی‌مولار پس از گذشت ۹۶ ساعت برابر با ۱۴۰/۲میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه (حدود ۲/۵ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد (شکل 5B).

بیشترین مقدار آلکالوئید تروپانی اسکوپولامین در تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت و در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد که طبق اطلاعات بدست‌آمده از HPLC، برابر ۷۵/۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه (حدود ۲/۶ برابر نسبت به شاهد) می‌باشد (شکل 5C).

شکل ۲– گیاهچه و کلون ریشه بنگ‌دانه

(تشکیل کلون ریشه در محیط کشت مایع B5 همراه با ۱ میکرومولار IBA)



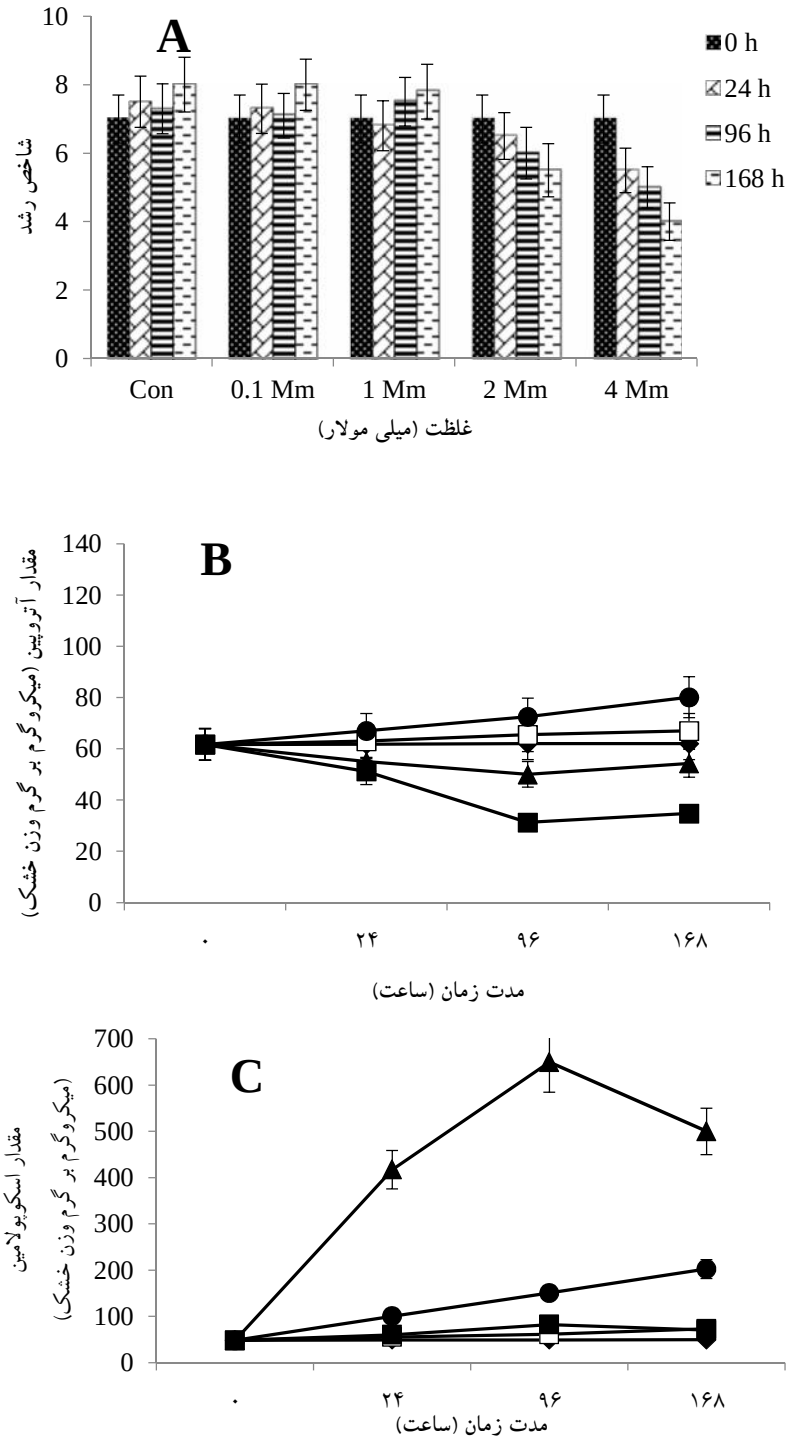
شکل ۳– القاء و رشد ریشه مویین از قطعات برگی گیاه *Hyoscyamus niger* با استفاده از اگروباکتریوم A4

الف: تکثیر ریشه‌های مویین جدا شده از قطعه برگی در محیط کشت جامد B5

ب: تکثیر ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع B5 پس از گذشت ۲۰ روز

www.SID.ir

Archive of SID

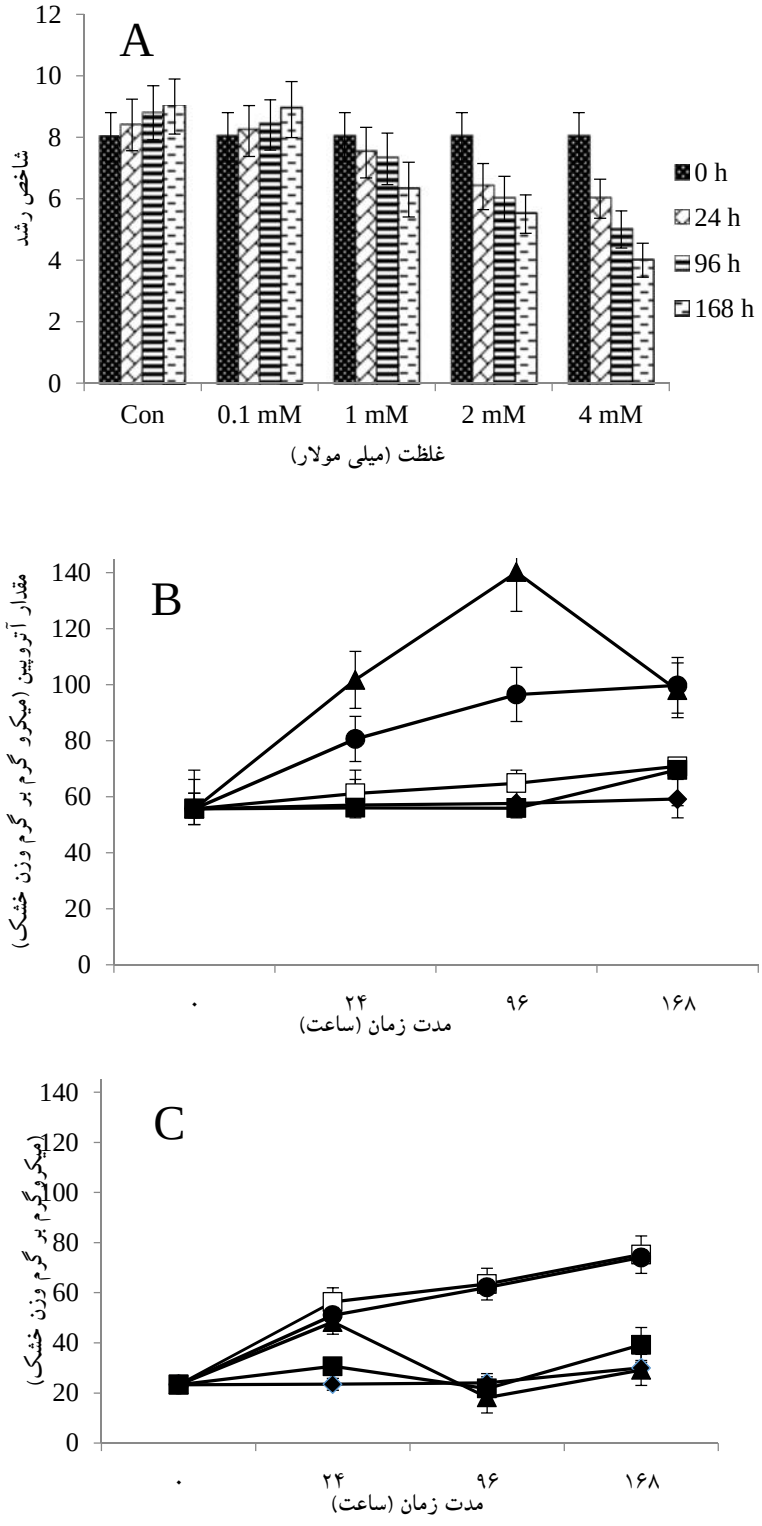


شکل ۴- اثرات سالیسیلیک اسید بر شاخص رشد ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه ***H. niger*** (**A**)، میزان آتروپین (**B**) و اسکوپولامین (**C**)

شاهد (◆)، ۰/۱ میلی‌مولار (□)، ۱ میلی‌مولار (●)، ۲ میلی‌مولار (▲)، ۴ میلی‌مولار (■)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- اثرات سالیسیلیک اسید بر شاخص رشد ریشه‌های مویین *H. niger* (A)، میزان آتروپین (B) و اسکوپولامین (C)

شاهد (◆)، ۰/۱ میلی‌مولار (□)، ۱ میلی‌مولار (●)، ۲ میلی‌مولار (▲)، ۴ میلی‌مولار (■)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش، اثر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین و همچنین شاخص رشد در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) مورد بررسی قرار گرفت.

عکس‌العمل بافت ریشه به الیسیته شدن به‌دلیل عملکرد الیسیتورها به‌عنوان مولکول‌های علامت‌رسان می‌باشد. این الیسیتورها مانند سالیسیلیک اسید (SA)، سیگنال‌های کلیدی درونی هستند که در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان نقش دارند. علاوه‌بر این می‌توان به فعالیت آن برای تولید پروتئین‌های وابسته به پاتوژن در گیاهان حتی در غیاب پاتوژن اشاره کرد. این الیسیتورها برای فعال کردن متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند و این فعالیت را با اثر بر روی فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهند (Ajungla *et al.*, 2009). بنابراین یکی از راهبردهای مفید در راستای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده از الیسیتورهای زنده و غیرزنده است.

تأثیر سالیسیلیک اسید یا هر الیسیتور دیگر در گیاهان به فاکتورهایی مانند غلظت و ویژگی الیسیتور، طول مدت تیماردهی و مرحله رشدی گیاه بستگی دارد. همچنین گزارش‌های بسیاری در ارتباط با غلظت تروپان آلکالوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه ارائه شده است و همگی نشان می‌دهد که غلظت بهینه ترکیب‌های سیگنالی بر اساس نوع گونه‌ها متفاوت است (Namdeo, 2007). این عوامل، فاکتور بسیار مهم در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند. بنابراین برای بدست آوردن حداکثر مقدار تروپان آلکالوئیدها، نیاز به بهینه کردن این فاکتورها می‌باشد. همان‌طور که نتایج این پژوهش نشان داد، در ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *H. niger*، بیشترین مقدار آتروپین و اسکوپولامین به‌ترتیب در غلظت ۱ میلی‌مولار و گذشت زمانی ۱۶۸ ساعت و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و پس از گذشت ۹۶ ساعت مشاهده شد. در ریشه‌های مویین نیز بیشترین مقدار تروپان آلکالوئید آتروپین در غلظت ۲ میلی‌مولار و ۹۶ ساعت تیماردهی و مقدار اسکوپولامین در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت مشاهده شد. نتایج بدست‌آمده از بررسی‌های Kai و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که تولید تروپان آلکالوئیدها بجز انیسودین در گیاه *Anisodus acutangulus* در محیط حاوی سالیسیلیک اسید کاهش می‌یابد که با نتایج ارائه شده در کشت ریشه‌های گیاه *Atropa belladonna* و یا در گیاه کتان سازگار است. اما این الیسیتور تولید متابولیت‌های ثانویه مانند هیوسین را در گونه‌های دیگر گیاهان سولاناسه افزایش داد. Zayed و Wink (۲۰۰۴) بیان کردند که مقدار هیوسیامین تحت تأثیر متیل جاسمونات در گیاه *Brugmansia suaveolens* ۲۵٪ افزایش یافت، در حالی‌که در حضور سالیسیلیک اسید کاهش یافته و مقدار آلکالوئیدها تنها در غلظت ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، افزایش نشان داده‌است. نتایج بدست‌آمده از بررسی‌های Zabetakis و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که غلظت ۰/۱ میکرومولار متیل جاسمونات برای کشت ریشه گیاه *Datura stramonium* منجر به تولید بالای ۱۰۰٪ هیوسیامین نسبت به شاهد شده است. Kang و همکاران (۲۰۰۴)، در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات بیشترین میزان هیوسیامین و هیوسین را در ریشه‌های گیاه *Scopolia parviflorato* بدست آوردند. بسیاری دیگر از متابولیت‌های ثانویه ازجمله تولید شیکونین در *Lithospermum erythorhizon* (Mizukami *et al.*, 1993)، توکسیدها در *Taxus* (Wang *et al.*, 2001)، رزمارینیک اسید در گیاه *Salvia officinalis* (Yan *et al.*, 2006) و همچنین داده‌های حاصل از این پروژه نتایج مختلفی در شرایط زمانی و غلظت الیسیتورها نشان دادند. Ahmadian Chashmi و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید، افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها را در ریشه‌های مویین گیاه *Atropa belladonna* سبب شد؛ به‌نحوی که بیشترین مقدار آتروپین و اسکوپولامین به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ میلی‌مولار و ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج این پژوهش نشان داد که پس از تأثیر الیسیتورها در بیشتر موارد مقدار آتروپین نسبت به اسکوپولامین در ریشه‌های مویین بیشتر است اما مقدار اسکوپولامین نسبت به آتروپین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت بیشتر از ریشه‌های مویین می‌باشد. Kamada و همکاران (۱۹۸۶) به این نتیجه دست یافتند که مقدار تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و هیوسین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت کمتر از ریشه‌های مویین است. نتایج تحقیق Zolala و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در مقدار آتروپین و اسکوپولامین از ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های حاصل از کشت بافت وجود ندارد. Bulgakov و همکاران (۲۰۰۲)، کالوس‌های گیاه *Rubia cordifolia* که با ژن‌های *rolB* و *rolC* تراریخته شده بودند را تحت تأثیر الیسیتورهای مختلف و ازجمله متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید قرار داده و به این نتیجه دست یافتند که در کالوس‌های ترانسفورم و غیرترانسفورم، مقدار ماده مؤثره آنتراکوینون افزایش می‌یابد. Ahmadian Chashmi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که محتوای آلکالوئیدی اندام‌های مختلف گیاهان قابل قیاس با محتوای آلکالوئیدی ریشه‌های مویین تحت تأثیر سالیسیلیک اسید نیست.

در این پژوهش نیز کاهش میزان رشد و در بیشتر موارد کاهش در مقدار تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در غلظت‌های بالای الیسیتور سالیسیلیک اسید مشاهده شد. بازدارندگی در رشد ریشه می‌تواند ناشی از اثر مستقیم سالیسیلیک اسید و یا در پاسخ کلی به استرس‌های بیرونی باشد. همان‌طور که در نتایج پژوهش مشاهده شد در غلظت‌های پایین الیسیتور تفاوت معنی‌داری در میزان رشد مشاهده نشد. بنابراین این الیسیتور برخلاف پاسخ سمّی، به‌عنوان یک مولکول سیگنالی عمل کرده است. سالیسیلیک اسید می‌تواند متابولیسم اولیه را کاهش و متابولیسم ثانویه را افزایش بدهد. رابطه معکوس بین تولید زیتوده و تولید متابولیت ثانویه ممکن است در نتیجه الیسیته کردن و شروع سنتز متابولیت ثانویه باشد. اما می‌توان بیان کرد که در غلظت بالای این ترکیب، در نتیجه استرس‌های شدید، بافت ریشه دچار تنش شده و از طریق آسیب به غشاء سلول و یا لیز شدن سلولی منجر به کاهش و یا عدم رشد و همچنین کاهش متابولیسم می‌شود. Ghanati و همکاران (۲۰۱۰) علت کاهش میزان رشد ریشه در تیمار با الیسیتور را تنش ریشه و آسیب به آن و در نتیجه کاهش متابولیسم بیان کردند. Kai و همکاران (۲۰۱۲) نیز به این نتیجه دست یافتند که اضافه کردن الیسیتورها می‌تواند موجب اثرات منفی بر روی رشد ریشه‌های مویین مانند عدم رشد ریشه و قهوه‌ای شدن آن شود. آنان دلیل این تأثیر منفی را تجمع تروپان آلکالوئیدها در محیط کشت معرفی کرده و بیان کردند که این عامل می‌تواند موجب صدمه زدن به ریشه مویین شود. نتایج تحقیق Zolala و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که رابطه معکوس بین میزان رشد و مقدار تروپان آلکالوئید وجود دارد. ریشه‌هایی که با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید تیمار شده بودند، کاهش رشد زیست‌توده ریشه‌های گیاه *Oxalis tuberosa* مشاهده شد. نتایج بدست‌آمده از بررسی‌های Kang و همکاران (۲۰۰۴) بر روی رشد ریشه‌های جانبی گیاه *Scopolia parviflorato* نشان داد که سالیسیلیک اسید بر رشد ریشه‌ها تأثیر منفی نداشته اما در محیط حاوی متیل جاسمونات بعکس بوده‌است. آنان گزارش کردند که سالیسیلیک اسید تأثیر منفی بر روی رشد ریشه‌ها نداشته است و دلیل آن را کوتاه بودن مدت زمان تأثیر الیسیتور بر روی ریشه و همزمانی تأثیر الیسیتور با فاز فعال رشدی عنوان کردند. Ahmadian Chashmi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که SA کاهش معنی‌داری را در رشد ریشه‌ها نشان داده‌است. آنان دلیل این امر را تأثیر متفاوت غلظت‌های مختلف SA بر رشد ریشه‌های مویین تراریخت دانستند که می‌تواند به علت نقش آنها در مسیر علامت‌رسانی سلولی باشد، زیرا سالیسیلیک اسید در غلظت پایین برای علامت‌رسانی سلول سودمند بوده و در غلظت بالا موجب اختلال در رشد می‌شود. Wielanek و Urbanek (۲۰۰۶) در بخشی از تحقیقات خود تأثیر سالیسیلیک اسید را بر افزایش مقدار گلوکوترپائولین مورد تأیید قرار دادند.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در محیط کشت حاوی الیسیتور سالیسیلیک اسید در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه‌های مویین افزایش نشان دادند؛ به‌طوری که بیشترین مقدار آتروپین در ریشه‌های مویین و در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۱۴۰/۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و بیشترین مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و در غلظت ۲ میلی‌مولار جاسمونیک اسید (۶۴۹/۵۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد. بنابراین، الیسیتور سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌عنوان تیماری مناسب برای سیستم‌های کشت ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت بوده و برای استخراج آلکالوئیدهای مورد نظر از آنها استفاده گردد. به‌طور کلی، در ریشه‌های مویین نسبت آتروپین به اسکوپولامین بیشتر بود، در حالی‌که در ریشه‌های حاصل از کشت بافت نسبت اسکوپولامین به آتروپین بیشتر بود. همچنین با توجه به اطلاعات بدست‌آمده، سالیسیلیک اسید می‌تواند تیمار مناسبی برای افزایش تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر حسن مداح‌عارفی (مؤسسه تحقیقات کشور) برای اهدای بذرهای گیاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H., 2010. Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. Iranian Journal of Plant Biology, 1(3): 63-76.
- Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B. and Nikam, T.D., 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.
- Akramian, M., Fakhr Tabatabaei, S.M. and Mirmasoumi, M., 2008. Virulence of Different Strains of Agrobacterium rhizogenes on Genetic Transformation of Four Hyoscyamus Species. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 3: 759-763.
- Biondi, S., Fornalé, S., Oksman-Caldentey, K.M., Eeva, M., Agostani, S. and Bagni, N., 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. Plant Cell Reports, 19: 691-697.
- Bruce, N., 2008. Alkaloids: 332-350. In: Rehm, H.J., Reed, G. and Bruce N.C., (Eds.). Biotechnology Set. Wiley, Cambridge, UK.
- Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P. and Khodakovskaya, M.V., 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. Journal of Biotechnology, 97: 213-221.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Horloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Lankhorst, R.M.K., Salentijn, E.M.J., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, V., Grundler, F.M.W. and Jung, C., 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. Science, 275: 832-834.
- Ebrahimzadeh, H., Teimoori, A. and Lohrasbi, T., 2003. Hyoscyamin 6-β-hydroxylase gene isolation from *in vitro* cultured roots of *Hyoscyamus niger* L. and *Hyoscyamus tenuicaulis.* Daru, 11: 34-37.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
- Ghanati, F., Bakhtiarian, S. and Abdolmaleki, P., 2010. Effect of methyl jasmonate on second metabolites in (*Calendula officinalis* L.). Modares Biological Sciences and Technology, 1(1): 21-31.
- Grynkiewicz, G. and Gadzikowska, M., 2008. Tropane alkaloids as edicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. Pharmacological Reports, 60: 439-463.
- Grynkiewicz, M. and Gadzikowska, G., 2002. Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. Acta Polonine pharmaceuica, 59(2): 149-160.
- Kai, G., Yang, Sh., Zhang, Y., Luo, X., Fu, X., Zhang, A. and Xiao, J., 2012. Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. Molecular Biology Reports, 39: 1721-1729.

www.SID.ir

Archive of SID

of Plant Physiology, Yazd, Iran, 28-29 April.
- Roos, R.W. and Lau-Cam, C., 1986. General reversed-phase HPLC method for the separation of drugs using triethyamine as a competing base. Journal of Chromatography, 370: 403-418.
- Wang, C., Wu, J. and Mei, X., 2001. Enhanced taxol production and release in Taxus chinensis cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. Biotechnology Progress, 17(1): 89-94.
- Wielanek, M. and Urbanek, H., 2006. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of Tropaeolum majus L. by combining elicitation and precursor feeding. Plant Cell of Tissue Organism, 86: 177-186.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Yong, J., 2006. Elicitor-induced Rosmarinic Acid Accumulation and Secondary Metabolism Enzyme Activities in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots. Plant Science, 170: 853-858.
- Zabetakis, I., Edwardsb, R. and O'Hagana, D., 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. Phytochemistry, 50: 53-56
- Zayed, R. and Winka, M.Z., 2004. Induction of tropane alkaloid formation in ransformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences, 59: 863-867.
- Zolala, J., Farsi, M., Gordan, H. R. and Mahmoodnia, M., 2007. Producing a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Agricultural Sciences of Technology, 9: 327-339.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports, 5: 239-242.
- Kang, S.M., Jung, H.Y. and Kang Y.M., 2004. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science, 166(3): 745-751.
- Khatamsaz, M., 1998. Flora of Iran (Solanaceae No. 24). Research Institute of Forests and Rangeland Press, Tehran, 116p.
- Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B.E., 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 12: 706-709.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1(1): 69-79.
- Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M.H., 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules, 13(8): 1722-1742.
- Parsa, M., Garoosi, G.A. and Haddad, R., 2011a. Effect of jasmonate and methyl jasmonate elicitors on quantity and quality of total RNA extraction in *Hyoscyamus niger*. The 2nd of National Conference of Plant Physiology, Yazd, Iran, 28-29 April.
- Parsa, M., Zeinali, A. and Yousefzadi, M., 2011b. Induction of hairy roots with two strains of Agrobacterium rhizogenes (A4 and LBA9402) in *Hyoscyamus niger*. The 2nd of National Conference

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and *in vitro* roots cultures of *Hyoscyamus niger* L.

M. Parsa[1*] and A. Zeinali[2]

1*- Corresponding author, Department of Plant Physiology and genetic, Applied Science Institute, Jahad-e- Daneshgahi (ACECR), Shahid Beheshti University of Tehran, Iran, E-mail: mitraprs@yahoo.com

2- Department of Plant Physiology and genetic, Applied Science Institute, Jahad-e-Daneshgahi (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

April: June 2015 Revised: August 2015 Accepted: September 2015

Abstract

Tropane alkaloids such as atropine and scopolamine have wide application in the treatment of diseases such as asthma and antispasmodic due to anticholinergic agents. In the present study, the effects of salicylic acid (SA) on the production of two alkaloids, atropine and scopolamine ,were studied in hairy root and *in vitro* grown root cultures of *Hyoscyamus niger* L. The roots were cultured in liquid B5 medium containing different concentrations of SA (0, 0. 1, 1, 2 and 4 mM) in various exposure times (24, 96 and 168 hours). Eventually, root growth index, and atropine and scopolamine content were assayed after 30 days. In *in vitro* grown roots, treatment with 1mM SA resulted in the highest production of atropine after 168 hours, while the highest amount of scopolamine (649.53 µg/g D. W) was obtained in 2mM SA (after 96 hours), showing more than 13-fold increase compared to the control. In hairy root cultures, the most significant contents of atropine were observed in the medium containing 2mM SA after 96 h. Moreover, the highest content of scopolamine was achieved in medium treated with 0.1 mM SA after 96 hours. In general, atropine content in hairy roots was considerably higher than that of *in vitro* grown roots. In contrast, scopolamine content in *in vitro* grown roots was significantly more than that of hairy roots. Moreover, the rate of root growth declined as a result of increasing of elicitor concentration in the medium.

Keywords: *Hyoscyamus niger* L., elicitor, salicylic acid, hairy root, *in vitro*.

www.SID.ir