

تأثیر متیل جاسمونات بر رشد ریشه، خصوصیات بیوشیمیایی و بیان ژن هیوسيامین ۶-بتا-هیدروکسیلاز در ریشه موئین گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

اسدالله نوروزی^۱، بهمن حسینی^{۲*}، مراد جعفری^۳ و منوچهر فرجامی نژاد^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶

چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) سرشار از آلکالوئیدهای تروپانی هیوسيامین و اسکوپولامین می باشد که به طور وسیع در داروسازی مورد استفاده قرار می گیرد. این تحقیق به منظور بررسی اثر غلظت های مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) متیل جاسمونات و مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بر میزان رشد، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، میزان آلکالوئیدهای تروپانی و میزان بیان ژن هیوسيامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (h6h) در ریشه های موئین بذرالبنج مشبک به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. بررسی میزان رشد در نمونه های شاهد و تیمار شده، نشان داد که میزان وزن تر و خشک ریشه های موئین با شیب ملایمی در نمونه های تهیه شده رو به کاهش می باشد. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار با متیل جاسمونات (غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، تأثیرات معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت آنزیم های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوبات پراکسیداز داشت. همچنین مدت زمان تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) متیل جاسمونات به استثناء آنزیم آسکوبات پراکسیداز، تأثیر معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت هر دو آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز نشان داد. نتایج آنالیز GC/MS نشان داد که در تیمار با متیل جاسمونات بیشترین میزان تولید هیوسيامین و اسکوپولامین (۲۱/۹٪ و ۱۳/۹۶٪) به ترتیب در اثر تیمار با غلظت های ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۴۸ و ۲۴ ساعت بدست آمد، که ۱/۶ و ۱/۲۵ برابر بیشتر نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ۱۳/۶۷٪ و ۱۱/۱۳٪) بوده است. سطح بیان ژن هیوسيامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز با روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شد. نتایج نشان داد در تیمار متیل جاسمونات بیشترین میزان بیان ژن h6h (۶ برابر بیشتر نسبت به شاهد) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد. براساس نتایج، چنین استنباط می شود که محرک متیل جاسمونات احتمالاً به دلیل تحریک بیان ژن های مؤثر در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی، در افزایش تولید هیوسيامین و اسکوپولامین مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، اسکوبات پراکسیداز، ریشه موئین، هیوسيامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز، آلکالوئیدهای تروپانی.

مقدمه

بذرالبنج مشبک با نام علمی (*Hyoscyamus reticulatus* L.) گیاهی از راسته Solanales، تیره سیبزمینی، جنس هیوسیاموس و گونه رتیکولاتوس است. در نواحی مختلفی از ایران مانند تهران، آذربایجان و اراک پراکنش آن گزارش شده است. این گیاه سرشار از ترکیب های آلکالوئیدی می باشد. گروهی از آلکالوئیدها، به نام آلکالوئیدهای تروپانی به طور عمده در گیاهان تیره سیبزمینی یافت می شوند (*Dialmaghani et al.*, 2006). تروپان آلکالوئیدهای موجود در این گیاهان دارای خواص ضد اسپاسم، آنتی کولینرژیک (anticholinergic)، آرام بخش و ضد درد می باشد (*Oto et al.*, 2013). بیشترین آلکالوئیدهای آن را هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین تشکیل می دهد. گزارش شده است که آلکالوئید اصلی گیاه بذرالبنج مشبک، هیوسیامین ($C_{17}H_{23}NO_3$) در حدود ۰/۰۳۳٪ تا ۰/۰۵۶٪ وزن خشک و پس از آن اسکوپولامین ($C_{12}H_{21}NO_4$) در حدود ۰/۰۱۱٪ تا ۰/۰۱۵٪ وزن خشک می باشد که میزان این آلکالوئیدها به سن گیاه و شرایط رشدی آن بستگی دارد (*Ionkova*, 2002). اسکوپولامین ارزشمندترین آلکالوئید تروپانی می باشد و تقاضای جهانی آن حدود ۱۰ برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیزه آن (آتروپین) است (*Hashimoto & Yamada*, 1994). هیوسیامین با هیدروکسیلاسیون توسط آنزیم هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (H6H) به ۶-بتا-هیدروکسی هیوسیامین (آنیزودامین) تبدیل و آنیزودامین دوباره توسط فعالیت اپوکسیداسیون آنزیم H6H به اسکوپولامین تبدیل می شود (*Cardillo et al.*, 2008; *Facchini*, 2001). در نهایت اسکوپولامین طی یک واکنش اکسیداسیون احیاء هیدروکسیله شده و به آنیزودین تبدیل می گردد (*Kai et al.*, 2011). یکی از روش های متداول تولید متابولیت های ثانویه ای که در ریشه ساخته می شوند تلقیح ریزنمونه با *Agrobacterim rhizogene* است (*Teixeira da Silva*,

2006). آگروباکتریوم رایزوزنز یک باکتری گرم منفی و خاکزی است که با انتقال ژن مولد اکسین به گیاه میزبان با تولید مقدار زیاد اکسین IAA نسبت به سایر باکتری های محرک رشد، افزایش رشد و انشعابات ریشه را باعث می شود. جاسمونات ها به عنوان یک خانواده جدید از هورمون های گیاهی نقش مهمی را در تنظیم فرایند رشد و نمو گیاه دارند (*Abdala et al.*, 2003). استفاده از محرک های مختلف باعث ایجاد تغییرات مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغییر بیان ژن ها می گردد. در اغلب مطالعات انجام شده، کاربرد محرک ها باعث کاهش وزن تر و خشک سلولها و ریشه ها می شود. متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در تمشک می شود که شامل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتایون ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و مونو دی هیدروآسکوربات ردوکتاز می باشد (*Ghasemnezhad & Javaherdashti*, 2008). جاسمونات ها در تجمع متابولیت های ثانویه در گیاه فعال می باشند. کاربرد خارجی اسید جاسمونیک سبب تجمع پاکلی تاکسول و تاکسان های مربوطه در تاکسوس (*Taxus*) می شود. در پروانش و سینچونا، تحریک ریشه های موئین با غلظت های مختلف متیل جاسمونات سبب تجمع آلکالوئیدها می گردد (*Creelman et al.*, 1997). از آنجا که هیوسیامین و اسکوپولامین از جمله آلکالوئیدهای اصلی و با ارزش گیاه بذرالبنج مشبک به حساب می آیند و هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (h6h) به عنوان ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی می باشند، این پژوهش با هدف بررسی افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی تحت تأثیر محرک غیرزیستی متیل جاسمونات در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با محرک، در ریشه موئین گیاه بذرالبنج مشبک و آنالیز بیان ژن درگیر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز تحت تأثیر انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این مطالعه در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی و آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام گردید. بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور شکستن خواب فیزیولوژیکی از تیمار اسید جیبرلیک استفاده گردید. ضدعفونی سطحی با استفاده از اتانول ۷۰٪، هیپوکلرید سدیم ۱۰٪ و سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. کشت بذرها در داخل شیشه‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS تکمیل شده با ۳٪ ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۷٪ آگار انجام گردید. بذرها کشت شده در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القای ریشه موئین از ریزنمونه کوتیلدون

تک کلون‌های سویه A7 آگروباکتریوم رایوژنز داخل فالكون‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ری‌فامپسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. کوتیلدون دو هفته‌ای به مدت ۳ دقیقه درون سوسپانسیون باکتری ($OD_{600\text{ nm}} = 0.5$) غوطه‌ور شد. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد منتقل و به مدت ۴۸ ساعت، داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲ روز باکتری‌ها حذف و به محیط کشت MS جامد حاوی سفوتاکسم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردید. برای افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هریک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسم منتقل شدند. در هر بار عمل واکشت، میزان غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط کشت کاهش یافت و در نهایت به‌طور کامل حذف گردید. برای تأیید ادغام ژن roIB به داخل ژنوم ریشه‌های موئین، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) ژن roIB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن

شامل آغازگر رفت F5 -

,ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3

آغازگر برگشت 5 R-

(TTAGGCTTCTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC-3

استفاده گردید (Habibi et al., 2015).

تهیه ریشه‌های موئین توسط محرک متیل جاسمونات

پس از انتخاب لاین L45 به‌عنوان لاین ریشه موئین پر رشد، ۲ گرم از ریشه‌های موئین ۱۰ روزه داخل هریک از ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (Duchefa-Netherlands) (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار)، در ۳ تکرار منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین از محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف محرک متیل جاسمونات خارج و به محیط کشت MS مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، عمل برداشت ریشه‌های موئین برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنالیز بیوشیمیایی آلکالوئیدها به روش GC-MS و در نهایت میزان بیان ژن دخیل در مسیر تولید آلکالوئیدها (h6h) با استفاده از Semi-Quantitative RT-PCR مطالعه گردید.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک

ریشه‌های موئین برداشت شده از محیط کشت پس از شستشو با آب مقطر استریل و خشک شدن توسط کاغذ صافی استریل برای اندازه‌گیری وزن تر مورد استفاده قرار گرفت. وزن خشک ریشه‌های موئین نیز با استفاده از دستگاه فریز درایر اندازه‌گیری شد.

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

برای تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت

(۱۹۸۶) با اندکی تغییر انجام شد. به منظور جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکویولامین از دستگاه گروماتوگراف گازی (HP, Palo Alto, CA, Hewlett-Packard (USA مدل HP 7890A GC و کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی Hewlett-Packard مدل 5975C، مجهز به ستون موئینه HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، با ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ استفاده گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان ژن با تکنیک RT-PCR نیمه کمی

استخراج RNA از نمونه های ریشه موئین با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. حدود ۴۰۰ نانوگرم از RNA به منظور ساخت cDNA از کیت PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA، ژاپن) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. در پایان، cDNA تولید شده با RNAase تیمار شد و به نسبت ۱:۵۰ با استفاده از آب مقطر استریل رقیق شد و بعد به عنوان الگو برای پژوهش‌های بعدی استفاده شد. در این راستا از تکنیک RT-PCR نیمه کمی برای مطالعه بیان ژن h6h با آغازگر Fh6h (5'-TGGCTACTTTTGTGTCGAACTGG-3') و آغازگر Rh6h (5'-CTTGGGTCTGGGCATGGTG-3') به عنوان ژن اصلی و آغازگر 18SF (5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3') و آغازگر 18SR (5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3') به عنوان ژن کنترل مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR پس از افزودن پنج میکرولیتر بافر بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱٪ قرار گرفت. به منظور آنالیز نتایج RT-PCR از نرم افزار 6.0Pexcavator استفاده شد. این نرم افزار پس از اسکن ژل، شدت باندهای ژن اصلی در هر نمونه را براساس شدت باندهای ژن کنترل داخلی (18s) نمونه مربوطه نرمال سازی کرده و چگالی نسبی تصحیح شده برای هر نمونه را محاسبه می‌کند.

آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با اندازه‌گیری میزان تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، با استفاده از روش Maehly و Chance (۱۹۵۹) انجام گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز (کاهش پراکسید هیدروژن) به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت کاتالاز از ضریب خاموشی (ضریب جذب مولی) ($43/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام گردید. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به صورت افزایش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز از ضریب خاموشی ($26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Chen و Asada (۱۹۸۹) با اندکی تغییر انجام شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (اکسیداسیون آسکوربات) به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی ($2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

استخراج و آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی به روش GC/MS استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران

ژن rol B را در ریشه‌های حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی با سویه A7 آگروباکتریوم رایزوترز نشان داد که هم اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (آگروباکتریوم) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (کنترل منفی)، هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نشد.

تأثیر محرک متیل جاسمونات بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین

نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده و اثر متقابل غلظت تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت تیمار در سطح احتمال ۱٪، تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشت (جدول ۱). در صورتی‌که زمان‌های مختلف تیمار تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین تیمار شده نشان نداد. طبق نتایج بدست آمده، سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار در سطح احتمال ۵٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین تیمار شده داشت. حداکثر وزن تر (۱۳/۲ گرم) و وزن خشک (۰/۶۶ گرم) در تیمار شاهد و حداقل وزن تر (۳/۸۴ گرم) و خشک (۰/۳۶۴ گرم) در غلظت ۲۰۰ میکرومولار، در مدت ۲۴ ساعت تیمار مشاهده شد (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های مربوط به هر پارامتر شامل رشد ریشه‌های موئین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنالیز GC-MC آلکالوئیدهای تروپانی و آنالیز بیان ژن به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید و بعد از اطمینان از توزیع نرمال باقیمانده‌ها، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمایش و نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

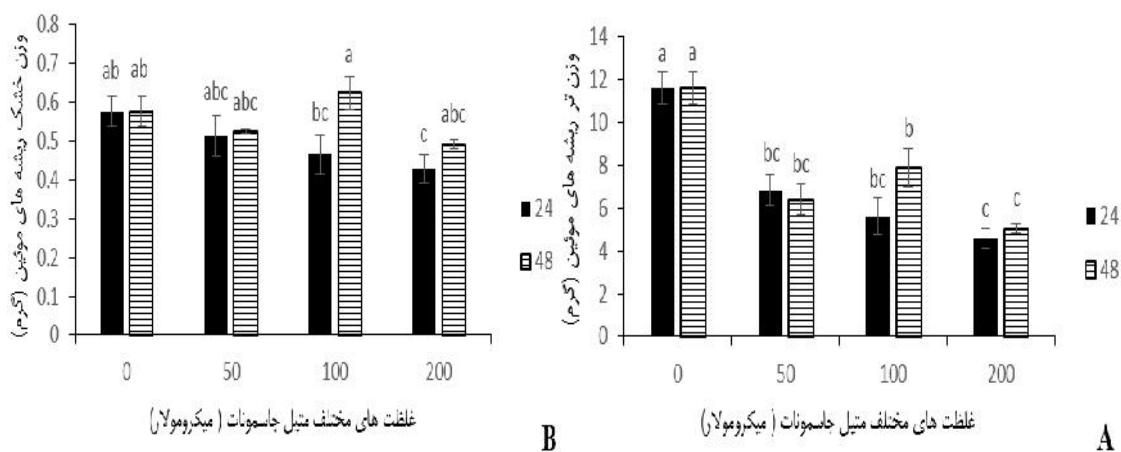
القاء و تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین ریشه‌های موئین از محل زخم ریزنمونه کوتیلدون دو هفته‌ای پس از تلقیح با سویه A7 باکتری آگروباکتریوم تولید شدند. پس از ۴ مرحله واکنش در محیط کشت پایه MS جامد حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ و کاهش غلظت به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مراحل آخر، باکتری‌ها به‌طور کامل حذف شدند. نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه ۷۸۰bp مربوط به

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر وزن تر، وزن خشک

و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

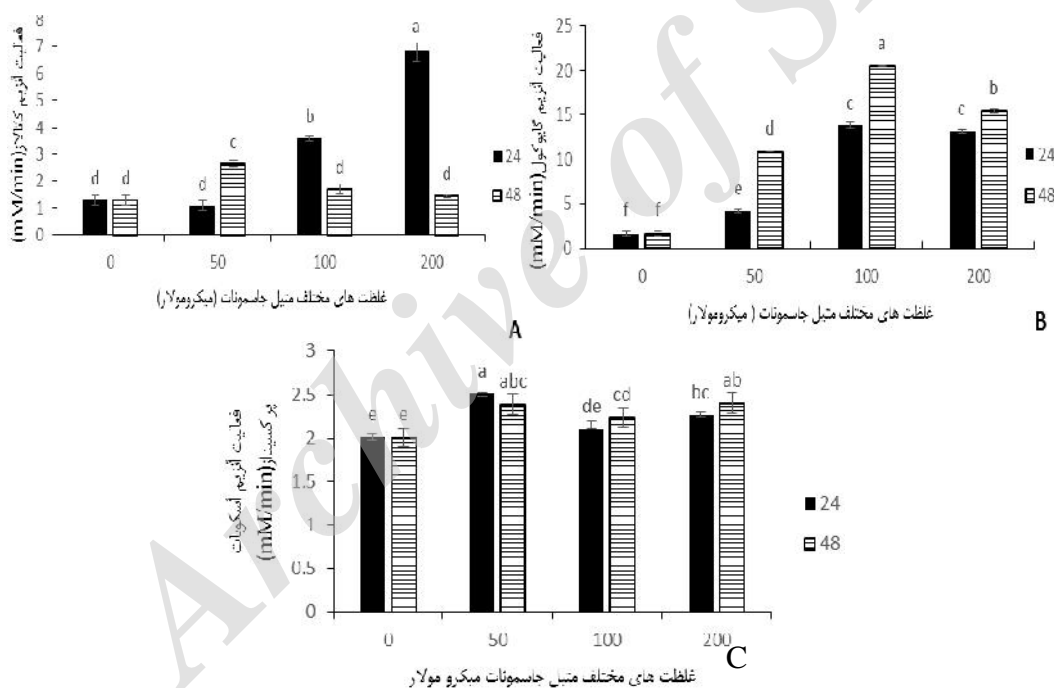
میانگین مربعات			وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	درجه آزادی	منابع تغییرات
فعالیت	فعالیت	فعالیت				
آسکوربات پروکسیداز (mM/min)	کاتالاز (mM/min)	گایاکول پراکسیداز (mM/min)				
۰/۲۱**	۹/۰۲**	۲۹۲/۹۹**	۰/۰۱۴۸*	۵۰/۵۲**	۳	متیل جاسمونات (a)
۰/۰۰۸ ns	۱۱/۹۹**	۹۲/۸۹**	۰/۰۲۰*	۲/۰۱۸ ns	۱	زمان تیمار (b)
۰/۰۲*	۱۳/۲۵**	۱۶/۷۵**	۰/۰۱۲*	۲۲/۸۵**	۳	اثر متقابل (a×b)
۰/۰۰۶	۰/۱۴	۰/۲۴۷	۰/۰۰۵	۲	۱۶	اشتباه آزمایشی
۳/۶۳	۱۵/۱۲	۴/۹	۱۴/۳۰	۱۸/۹۸		ضریب تغییرات (%CV)

ns, * و **: به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر وزن تر (A) و خشک (B) ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های (A): کاتالاز و (B): گایاکول پراکسیداز (C): آسکوربات پراکسیداز ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ آزمون دانکن می‌باشد.

زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار، در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و

تأثیر متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده و اثر متقابل غلظت و

ریشه‌های موئین شاهد (۱۳/۶۷٪) حدود ۱/۶ برابر افزایش داد و حداقل میزان هیوسیامین (۰/۲٪) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۳-۲). همچنین بیشترین میزان اسکوپولامین (۱۳/۹۶) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد که تولید آن ۱/۲۵ برابر نسبت به ریشه‌های موئین شاهد (۱۱/۱۳) افزایش یافت و کمترین میزان اسکوپولامین (۰/۷۹٪) تحت تأثیر تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در زمان ۴۸ ساعت تیمار مشاهده شد (شکل ۳-۱).

تأثیر متیل جاسمونات بر سطح رونوشت ژن **h6h** تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، مدت زمان و اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری ($P < 0/01$) وجود دارد. براساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میزان بیان ژن **h6h** در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد که میزان تولید آن را نسبت به ریشه‌های موئین شاهد تیمار نشده، حدود ۶/۳ برابر افزایش داد و حداقل میزان بیان ژن **h6h** نیز در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در مدت ۲۴ ساعت بدست آمد.

گایاکول پراکسیداز داشت (جدول ۱). بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، به ترتیب در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۲-۱، ۲-۲). در صورتی‌که نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده سطوح غلظت و اثر متقابل غلظت و زمان تیمار به ترتیب در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشت، به گونه‌ای که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۲-۳).

تأثیر متیل جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت، در سطح احتمال ۱٪ به طور معنی‌داری تولید هیوسیامین و اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار داد، در صورتی‌که اثر زمان در میزان تولید اسکوپولامین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد ولی در میزان تولید هیوسیامین تأثیر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

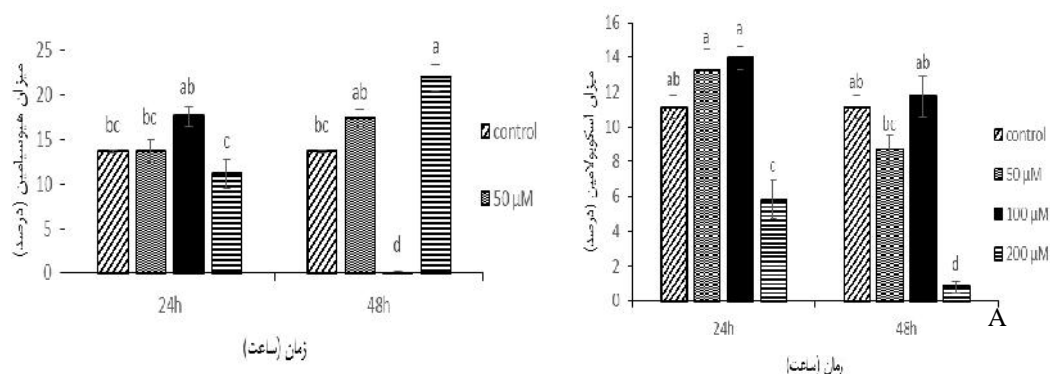
بیشترین میزان هیوسیامین (۲۱/۹۰٪) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد که میزان تولید آن را نسبت به

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی

در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان هیوسیامین (%)	میانگین مربعات
متیل جاسمونات (a)	۳	۶۹/۰۸**	۱۰۹/۴۱**
زمان تیمار (b)	۱	۳/۲۲ ns	۵۲**
اثر متقابل (a×b)	۳	۲۱۴/۰۱**	۸/۰۸*
اشتباه آزمایشی	۱۶	۴/۳۵	۳/۰۶
ضریب تغییرات (CV%)		۱۵/۲۹	۱۸/۲۸

**، * و ns: به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد اسکوپولامین (A) و هیوسيامین (B)

در سطوح مختلف متیل جاسمونات در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت

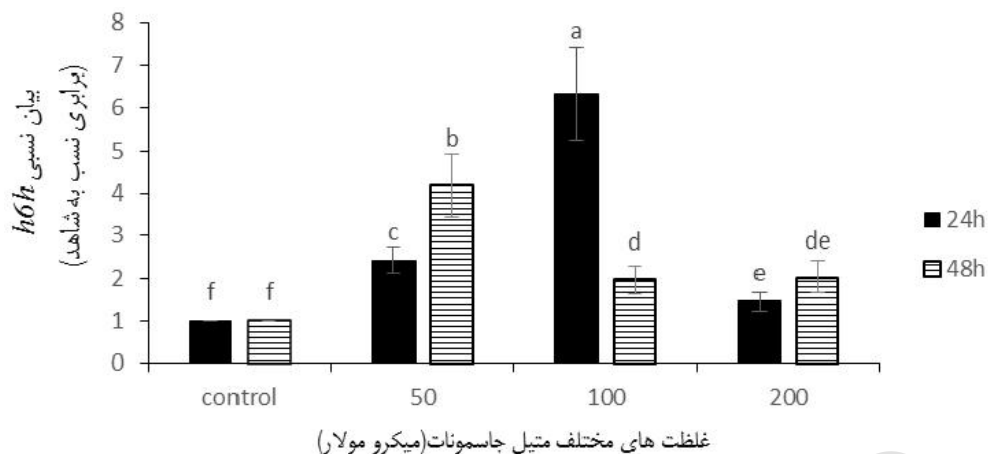
حروف مشترک در هر زمان به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

بیان ژن *h6h* در سطح ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات با افزایش زمان تیمار افزایش داشته است ولی در سطح ۱۰۰ میکرومولار با افزایش زمان، کاهش معنی داری مشاهده شد و با افزایش دو برابری غلظت متیل جاسمونات (۲۰۰ میکرو مولار) بیان ژن کاهش معنی داری نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن *h6h* در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در مدت ۲۴ ساعت مشاهده گردید (شکل ۵).

با توجه به اینکه در نمونه های تیمار شده باند مورد انتظار ۶۲۵bp تکثیر شد. در نمونه کنترل C_1 (NTC) که مربوط به واکنش بدون الگو cDNA می باشد، باندی تکثیر نشد که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR باشد. همچنین در نمونه کنترل C_2 (-RT) که مربوط به واکنش بدون آنزیم می باشد نیز هیچ گونه باندی مشاهده نشد که این عمل نشان دهنده عدم آلودگی نمونه های مورد بررسی با DNA ژنومی می باشد (شکل ۴). بنابراین نتایج نشان داد که



شکل ۴- آنالیز RT-PCR بر میزان بیان ژن *h6h* تحت تأثیر غلظت (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) متیل جاسمونات در ریشه های موئین بذرالبنج مشبک؛ (M) 1kb DNA Ladder، NTC و -RT کنترل منفی، C2R1، C1R2، C1R1، C2R2، C3R1، C3R2، C2R2 نمونه های تیمار شده در غلظت (C) و زمان های (T) مختلف متیل جاسمونات، 18s کنترل داخلی



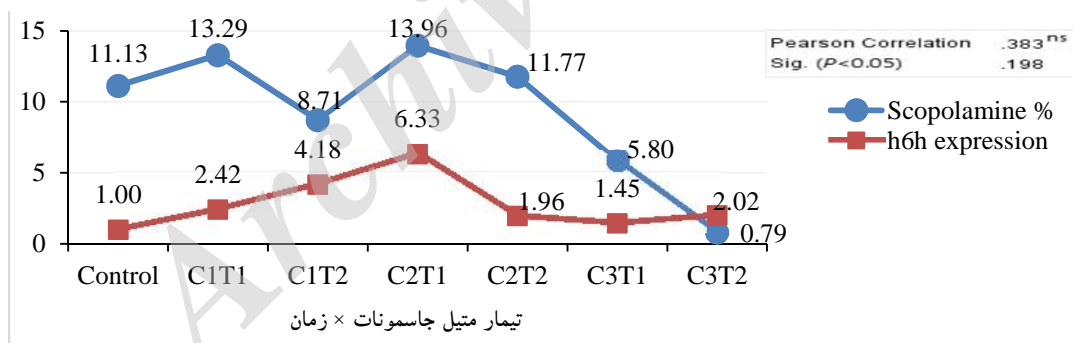
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت و مدت زمان تیمار متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن h6h

در ریشه‌های موئین بذراالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ندارد ($P < 0.05$)، اما الگوی تجمع اسکوپولامین تحت تأثیر متیل جاسمونات (به استثنای غلظت ۵۰ میکرومولار در مدت ۴۸ ساعت) روند تقریباً مشابه با روند بیان ژن نشان داد (شکل ۶).

ارتباط تجمع اسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن h6h تحت تیمار متیل جاسمونات آنالیز همبستگی تجمع اسکوپولامین با میزان بیان ژن h6h تحت تأثیر متیل جاسمونات نشان داد اگرچه بین تجمع اسکوپولامین و میزان بیان ژن h6h ارتباط معنی‌داری وجود



شکل ۶- ارتباط میزان تجمع اسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن h6h تحت تیمار متیل جاسمونات (C1=50μM, C2=100μM, C3=200μM)

طی دو زمان مختلف (T1=12h, T2=48h)

ضریب همبستگی پیرسون بین دو متغیر توسط نرم‌افزار SPSS v. 21 محاسبه شده است.

ns، غیر معنی‌دار بودن ضریب همبستگی بین دو متغیر در سطح احتمال ۵٪ را نشان می‌دهد.

می‌یابد. گزارش شده که اختصاص کرین بیشتر در ساختار مواد آلی مؤثر در تنظیم اسمزی، همانند پرولین می‌تواند باعث کاهش رشد شود (Javanmardy et al., 2010). از

بحث

نتایج اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌ها نشان داد که با افزایش غلظت محرک، میزان تولید ریشه موئین کاهش

به گونه‌ای که حداکثر درصد هیوسیامین در غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت بعد تیمار با متیل جاسمونات مشاهده گردید که این امر احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های اورنیتین دکربوکسیلاز و آرژینین دکربوکسیلاز که موجب افزایش ترکیب‌های ابتدای مسیر مانند پوتریسین و متیل پوترسین و به دنبال آن افزایش ترکیب‌های ادامه مسیر به ویژه هیوسیامین و اسکوپولامین باشد (Biondi et al., 2000). در مورد میزان درصد اسکوپولامین مشاهده شد که بیشترین میزان اسکوپولامین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار و زمان ۲۴ ساعت می‌باشد. برخلاف هیوسیامین، درصد اسکوپولامین در بیشتر غلظت‌های متیل جاسمونات در زمان‌های ۲۴ ساعت بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد که یکی از دلایل مهم آن می‌تواند به فعالیت بالای آنزیم H6H در زمان‌های پایین‌تر تیمار با محرک متیل جاسمونات مربوط باشد (Kai et al., 2012). علاوه بر این، محرک متیل جاسمونات به دلیل تحریک مسیر فنیل‌آلانین که یکی از شاخه‌های جانبی در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشد، می‌تواند باعث تولید فنیل لاکتات و تروپان در این مسیر شده و تولید آلکالوئیدهای تروپانی به ویژه اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار دهد (Zabetakis et al., 1999). نتایج مشابهی توسط متیل جاسمونات در تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه موئن *Scopolia parviflora* گزارش شده است که منجر به افزایش عملکرد آلکالوئیدهای تروپانی به ویژه تولید اسکوپولامین شده است (Kang et al., 2004). در گیاه بذرالبنج (*H. niger*) نیز همین محرک موجب افزایش میزان اسکوپولامین و موجب تحریک فعالیت ژن‌های تولیدکننده اسکوپولامین مثل h6h شده است (Zhang et al., 2007). البته بیان بالای ژن h6h نسبت به دیگر ژن‌های درگیر در مسیر تولید اسکوپولامین در گیاه *Atropa baetica* تحت تأثیر محرک متیل جاسمونات تنها دلیل قاطع بر افزایش عملکرد بالای اسکوپولامین نمی‌باشد. احتمالاً به دلیل افزایش عوامل

دیگر دلایل کاهش رشد ریشه‌های موئن پس از تیمار با متیل جاسمونات، افزایش بیان ژن pmt در متابولیسم پلی‌آمین و قرار گرفتن پوتریسین به عنوان سوبسترای ژن pmt می‌باشد (Sato et al., 2001). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Zhao و همکاران (۲۰۱۰) در کشت سلولی *Salvia miltiorrhiza* و Hong و همکاران (۲۰۱۲) در کشت ریشه‌های بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) مطابقت دارد. کاهش فعالیت آنزیم گایاکول در طی ۱۲ ساعت اولیه نسبت به ۴۸ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات ممکن است به دلیل تولید ROS باشد که در سیگنال‌دهی دفاعی نقش بسزایی دارد. البته تأخیر در افزایش فعالیت گایاکول احتمالاً به دلیل بازگشت این آنزیم به متابولیسم طبیعی خود می‌باشد (Soares et al., 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش نیز احتمالاً به علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن می‌باشد که با نتایج تحقیقات در گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) مطابقت دارد (Ghorbanpur et al., 2015). همچنین در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، تیمار متیل جاسمونات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز را افزایش داد (Jung, 2004). از آنجا که H_2O_2 سوبسترای کاتالاز می‌باشد، می‌توان فرض کرد که بخشی از افزایش فعالیت کاتالاز به دلیل تولید H_2O_2 در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و یا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز است. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در زمان دوم بیشتر به دلیل تجمع بیش از حد H_2O_2 بوده و خود یک راهکار مناسب برای جلوگیری از هضم کامل کاتالاز می‌باشد (Chamnonpol et al., 1998). نتایج حاصل از این پژوهش در مورد آنزیم آسکوبات پراکسیداز با نتایج گیاه آرابیدوپسیس مطابقت دارد (Jung, 2004). نتایج این پژوهش نشان داد با وجود اینکه زمان تیمار متیل جاسمونات تأثیر محسوسی در میزان تولید آلکالوئید هیوسیامین ندارد ولی اثر غلظت در میزان هیوسیامین تأثیر معنی‌داری نشان داد،

- Hyoscyamus muticus* L. root cultures. Plant Cell Reports, 19(7): 691-697.
- Cardillo, A.B., Talou, J.R. and Giulietti, A.M., 2008. Expression of *Brugmansia candida* hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst. Microbial Cell Factories, 7: 17.
 - Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Geri, C. and Cremonini, R., 2011. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. Journal of Nanoparticle Research, 13(6): 2443-2449.
 - Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H.J.R., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W., 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 5818-5823.
 - Chen, G.X. and Asada, K., 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant and Cell Physiology, 30(7): 987-998.
 - Creelman, R.A. and Mullet, J.E., 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. The Plant Cell, 9(7): 1211-1223.
 - Djalaghani, K., Kharvari-Nejad, R., Fahimi, H. and Hekmat-shoar, H., 2006. Extraction and determination of tropan alkaloids, hyoscyamine and scopolamine, from different parts of *Hyoscyamus pusillus* L. in different stages of plant growth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 22(1): 1-10.
 - Facchini, P.J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Biology, 52(1): 29-66.
 - Ghasemnezhad, M. and Javaherdashti, M., 2008. Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality and postharvest life of raspberry fruit. Caspian Journal of Environmental Sciences, 6(1): 73-78.
 - Ghorbanpour, M., Hatami M. and Hatami, M., 2015. Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. Acta Agriculturae Slovenica, 105(1): 23-32.
 - Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in
- مختلفی همانند فعال‌سازی مسیر مختلف و یا اثر متقابل بین مسیر پیام‌رسان‌های مختلف و یا فعال‌سازی مستقیم ژن باشد (Li et al., 2004). کاهش میزان بیان ژن در غلظت‌های بالاتر، احتمالاً به علت اثر سمیت متیل جاسمونات و اختلال در تنظیم بالادستی ژن‌های درگیر در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Castiglione et al., 2011). تجمع آنزیم H6H در اثر افزایش بیان ژن h6h موجب راه‌اندازی آخرین مرحله مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی می‌شود. متیل جاسمونات نقش مهمی در فرایند انتقال پیام سلولی داشته و منجر به تنظیم ژن‌های دفاعی در گیاه می‌شود (Gundlach et al., 1992). بنابراین به نظر می‌رسد متیل جاسمونات به‌عنوان یک ترکیب علامت‌رسان کلیدی در فرایند تحریک بیان ژن h6h و در نهایت تولید آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه اسکوپولامین دخیل باشد. نتایج نشان داد که فعالیت بالای ژن h6h یک اثر مثبتی در تولید آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه اسکوپولامین دارد. دلیل احتمالی عدم همبستگی بالا بین میزان تولید اسکوپولامین و میزان بیان ژن مربوطه در غلظت ۵۰ میکرومولار در مدت ۴۸ ساعت، امکان تغییر در میزان بیان ژن‌های دیگر درگیر در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی است. از سوی دیگر با توجه به عدم افزایش قابل توجه اسکوپولامین در مقایسه با استیل‌سالیسیلیک اسید، به نظر می‌رسد متیل جاسمونات عامل مؤثری در تنظیم بالادستی متابولیت مورد نظر نباشد (Castiglione et al., 2011).

منابع مورد استفاده

- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G. and Alemano, S., 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. Plant Growth Regulation, 40(1), 21-27.
- Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K.M., Eeva, M., Agostani, S. and Bagni, N., 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in

- Physiologia Plantarum, 115(4): 571-576.
- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. and Choi, M.S., 2004. Effects 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.
 - Li, J., Brader, G. and Palva, E.T., 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. The Plant Cell, 16(2): 319-331.
 - Maehly, A.C. and Chance, B., 1959. The assay catalase and peroxidase: 357-425. In: Gilck, D., (Ed.). Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publishers, New York, 470p.
 - Oto, A., Sethi, I., Karczmar, G., McNichols, R., Ivancevic, M.K., Stadler, W.M., Watson, S. and Eggener, S., 2013. MR imaging-guided focal laser ablation for prostate cancer: phase I trial. Radiology, 267(3): 932-940.
 - Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K.I., Choi, K.B., Morishige, T., Fujimoto, H. and Yamada, Y., 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(1): 367-372.
 - Soares, A.M.D.S., Souza, T.F.D., Jacinto, T., and Machado, O.L.T., 2010. Effect of methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. Brazilian Journal of Plant Physiology, 22(3): 151-158.
 - Teixeira da Silva, J.A., 2006. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Global Science Books, Ltd: London, 646p.
 - Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smith, B.N., 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 121(5): 453-461.
 - Zabetakis, I., Edwards, R. and O'Hagan, D., 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. Phytochemistry, 50(1): 53-56.
 - Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W. and Tang, K., 2007. Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. Planta, 225(4): 887-896.
 - elicitor-induced plant cell cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(6): 2389-2393.
 - Habibi, P., Piri, K., Deljo, A., Moghadam, Y.A. and Ghiasvand, T., 2015. Increasing Scopolamine content in Hairy Roots of *Atropa belladonna* using Bioreactor. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58(2): 166-174.
 - Hashimoto, T. and Yamada, Y., 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. Annual Review of Plant Biology, 45(1): 257-285.
 - Hong, M.L.K., Bhatt, A.R.V.I.N.D., Ping, N. and Keng, C.L., 2012. Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Romanian Biotechnological Letters, 17(3): 7340-7350.
 - Ionkova, I., 2002. In vitro culture and the production of secondary metabolites in *Hyoscyamus reticulatus* L.: 75-94. In: Nagata, T. and Ebizuka, Y., (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry (Vol. 51): Medicinal and Aromatic Plants XII. Springer, 348p.
 - Javanmardy, S.H., Fotot, R. and Saba, J., 2010. The relationship between of soluble carbohydrates and proline with osmotic adjustment and the role of osmotic adjustment under drought stress in wheat yield. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Sciences, 53: 65-72.
 - Jung, S., 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Journal of Plant physiology and Biochemistry, 42: 231-255.
 - Kai, G., Liu, Y., Wang, X., Yang, S., Fu, X., Luo, X. and Liao, P., 2011. Functional identification of hyoscyamine 6 -hydroxylase from *Anisodus acutangulus* and overproduction of scopolamine in genetically-engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 33(7): 1361-1365.
 - Kai, G., Yang, S., 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(2): 1721-1729.
 - 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(4): 239-242.
 - Kang, H.M. and Saltveit, M.E., 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid.

Effects of methyl jasmonate on root growth, biochemical characteristics and *h6h* gene expression in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots

A. Norozi¹, B. Hosseini^{2*}, M. Jafari³ and M. Farjaminezhad⁴

1- M.Sc. Student, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticulture sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir

3- Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

4- Medicinal Plants Research Center, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Received: June 2017

Revised: November 2017

Accepted: December 2017

Abstract

Henabne (*Hyoscyamus reticulatus* L.) is a rich source of tropane alkaloids including hyoscyamine (Hyos) and scopolamine (SCP), widely used in pharmaceutical field. The aim of the present study was to assess the effect of different concentrations (0, 50, 100 and 200 μ M) of methyl jasmonate (MeJA) at two different times of exposure (24 and 48 h) on growth, antioxidant enzymes activity, tropane alkaloids content, and the expression level of hyoscyamine-6-beta-hydroxylase (*h6h*) gene in *H. reticulatus* hairy root cultures. The results showed that MeJA at high concentration (200 μ M) led to the decline of fresh and dry weight of hairy roots. Catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) activities were significantly increased by MeJA, especially at 200 μ M in elicited hairy roots. As well, CAT and GPX activities, but not of APX, were also affected by exposure time of MeJA. According to the GC/MS analysis, the highest percentage of SCP (13.96%) and Hyos (21.9%) were respectively obtained when hairy roots were exposed to MeJA at concentrations of 100 and 200 μ M for 48 and 24 h, which were, respectively, 1.6- and 1.25-fold higher than those in the control roots. According to the results of semi-quantitative RT-PCR analysis, the highest expression of *h6h* gene (6-fold higher than in the control) was obtained after 24 h exposure to 100 μ M MeJA. These results indicate that MeJA, due to stimulation of the expression of key genes involved in the biosynthetic pathway of tropane alkaloids, could be used as an effective elicitor for increased production of Hyos and SCP.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, ascorbate peroxidase, hairy root, hyoscyamine-6-beta-hydroxylase, tropane alkaloids.