بررسی اثر ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها و چندین پارامتر بیوشیمیایی گیاه تاتوره (*Datura stramonium*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای

پریسا فتحی رضایی[1*] و المیرا راکعی[2]

[1] **مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی**

[2] **مراغه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، دانشکده کشاورزی،گروه بیوتکنولوژی کشاورزی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۲

چکیده

گیاه تاتوره بعنوان یک گیاه دارویی مهم، غنی از تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین بوده و پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید این ترکیبات با ارزش در دنیا در حال انجام می‌باشد. در این پژوهش اثر الیسیتور غیرزیستی ساکارز (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم در لیتر) بر میزان وزن تر، تولید تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین، پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو کاتالاز و گایاکول پراکسیداز تاتوره بررسی شد. میزان هیوسیامین و اسکوپولامین بوسیله روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و غلظت پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. براساس نتایج، بیشترین میزان وزن تر (۰/۸۲ گرم)، تولید هیوسیامین (۵ میلی گرم در گرم وزن تر)، اسکوپولامین (۲۰ میلی گرم در گرم وزن تر) و فعالیت کاتالاز (۰/۵ واحد در میلی گرم پروتئین) در بخش ریشه گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز ۴۵ گرم در لیتر اندازه‌گیری شد اما بیشترین میزان پروتئین (۰/۲۴میلی گرم در گرم وزن تر) در بخش هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر مشاهده شد. بعلاوه، بیشینه فعالیت گایاکول پراکسیداز (۱/۵۲ واحد در میلی گرم پروتئین) تعیین شد. در مجموع، ساکارز با غلظت ۴۵ گرم در لیتر می‌تواند محرک خوبی برای افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین با ارزش دارویی بالا در گیاه تاتوره باشد و به احتمال ساکارز علاوه بر تأمین نیاز انرژی و منبع کربنی موجب تحریک مسیر سیگنالی سنتز تروپان آلکالوئیدها شده است.

واژه های کلیدی: اسکوپولامین، تاتوره، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، هیوسیامین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۲۱۱۵۹۴، پست الکترونیکی: parisafathirezaei@gmail.com

مقدمه

تعداد کمی از جنس‌های گیاهی متعلق به تیرهٔ سیب‌زمینی (*Solanaceae*) از جمله جنس تاتوره (*Datura*) قادر به تولید تروپان آلکالوئیدهایی مانند هیوسیامین و اسکوپولامین هستند. تروپان آلکالوئیدها به طور گسترده در صنایع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند، از جمله اثرات دارویی مهم آنها عمل به عنوان آنتاگونیست‌های رقابتی استیل کولین می‌باشد. بنابراین، با توجه به نیاز روزافزون جامعه پزشکی به این نوع از آلکالوئیدها، به ویژه ترکیب دارویی ارزشمند اسکوپولامین، افزایش میزان آنها در گیاهان دارویی تولید کننده ضرورت دارد (۱۶، ۲۱ و ۲۵).

تاتوره گیاهی علفی، دو لپه، یکساله به ارتفاع ۲۰ تا ۱۵۰ سانتیمتر، از تیره سیب زمینی (سولاناسه) است. برگ‌های تاتوره منبع مهمی از تروپان آلکالوئیدها هستند و در طب سنتی در کنار بذرها بیشترین قسمت مورد استفاده این گیاه را تشکیل می‌دهند. از تروپان آلکالوئیدهای مهم در تاتوره میتوان به هیوسیامین و اسکوپولامین اشاره کرد. در این

Archive of SID

www.SID.ir

گیاه، در ساقه‌ها بیشترین اسکوپولامین و در ریشه‌ها بیشتر هیوسیامین یافت می‌شود (۱۶). برگ‌های تاتوره منبع مهمی از تروپان آلکالوئیدهای: آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین هستند که برخلاف سمیت زیاد، بدلیل کاربردهای دارویی قابل توجه دارای اهمیت اقتصادی بالایی می‌باشند. این آلکالوئیدها دارای اثرات پاراسمپاتولایتیک و آنتی موسکارینیک می‌باشند که فعالیت سیستم پاراسمپاتیک را مهار می‌کنند. اسکوپولامین (هیوسین) در تخفیف اسپاسم‌های عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش کاربرد دارد (۲۲). این دو آلکالوئید عمدتاً در سلول‌های جوان ریشه سنتز شده و به بخش‌های هوایی گیاه انتقال می‌یابند. استفاده از گیاهان دارویی در ایران و سایر نقاط دنیا بسیار رایج می‌باشد. امروزه روند تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق زیست-فناوری افزایش یافته است و کشت سلول و اندام گیاهی جایگزینی مناسب برای استخراج کامل مواد گیاهی است. الیسیتور ممکن است هنگامی که به یک سیستم سلول زنده در غلظت‌های کم اعمال می‌شود، بیوسنتز ترکیبات خاص را آغاز و یا افزایش دهد (۱۰).

سنتز شیمیایی آلکالوئیدها غالباً گران بوده و منابع طبیعی تنها منبع اقتصادی برای تولید انبوه این ترکیبات می‌باشند. گونه‌های متنوعی از تاتوره برای تولید تروپان آلکالوئیدها کشت می‌شوند. دلایل استفاده از کشت بافت گیاهی به عنوان جایگزین کشت مزرعه عبارتند از کوتاه شدن دوره رشد، حذف نیاز به علف‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها، حفظ شرایط رشد ثابت و میزان تولید (۱۵).

گیاهان و سلول‌های گیاهی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به فاکتورهای میکروبی، شیمیایی و فیزیکی به عنوان الیسیتور (محرک) نشان می‌دهند. تحریک کردن فرایندی است که موجب القاء یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه به وسیله گیاهان برای حفظ بقاء، مقاومت و رقابت می‌شود (۱۷). آلکالوئیدها متابولیت‌های ضروری برای تکمیل چرخه زندگی گیاه نیستند. غالباً فرض بر این است که متابولیت‌های ثانویه به عنوان مولکول‌های سیگنالی یا دفاع شیمیایی در مقابل شرایط تنش عمل می‌کنند. هم‌چنین فرض بر این است که متابولسیم ثانویه ممکن است به عنوان یک بخش کلی از توانایی گیاه برای تغییر فرایندهای متابولیک برای بقاء و رشد در شرایط سخت مثلاً حضور مقادیر زیاد فلزات باشد (۲۳).

از سوی دیگر، کاربرد انواع مختلف الیسیتورها که در تنظیم بیان ژن‌های متعلق به آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، می‌تواند به عنوان راهکار مؤثری در افزایش تولید این دسته از ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد (۶). قندهایی مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز علاوه بر نقش‌های معمول بعنوان منبع کربنی و انرژی، بعنوان مولکول‌های سیگنالی در گیاهان شناخته شده‌اند (۱۴).

گیاهان برای حفاظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو از سیستم‌های پاکسازی کننده رادیکال‌های آزاد شامل آنزیم-های آنتی اکسیداتیو مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز و هم چنین ترکیبات غیرآنزیمی مانند کارتنوئیدها استفاده می‌نمایند. بنابراین هر تیماری که به کاهش میزان گونه‌های واکنشگر اکسیژن کمک نماید در بهبود وضعیت گیاه می‌تواند مؤثر باشد. این شبکه برای کنترل تولید مازاد گونه‌های واکنشگر اکسیژن در طی تنش و هم‌چنین در حفظ سطح مناسب و صحیح گونه‌های واکنشگر اکسیژن برای رشد و پیام‌رسانی مهم می‌باشد (۱۰).

بر همین اساس در این بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه تاتوره با اعمال تیمار ساکارز بعنوان منبع کربنی و مطالعهٔ اثر الیسیتور ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها و پروتئین تام و سینتیک آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در گیاه تاتوره انجام شد. لازم به ذکر است با مرور منابع تا کنون گزارشی مبنی

Archive of SID

www.SID.ir

بر اثر ساکارز بر رشد و میزان تروپان آلکالوئیدهای گیاه تاتوره در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) نیم برابر وجود ندارد.

مواد و روشها

کشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و اعمال تیمارها: بذرهای گیاه تاتوره پس از جمع‌آوری از استان آذربایجان-شرقی و ضدعفونی سطحی با Triton x100 و محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ و الکل اتیلیک ۷۰٪ به‌ترتیب به مدت ۲۰ و ۱۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل، در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) (۱۳) با غلظت نیم برابر حاوی ساکارز با غلظت‌های مختلف (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم در لیتر) به تعداد ۱۰-۷ عدد کشت شدند. پس از گذشت تقریباً یک ماه هفته، اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های تاتوره پس از برداشت و توزین جهت بررسی-های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج تروپان آلکالوئیدها از گیاهچه های تاتوره: برای استخراج تروپان آلکالوئیدها از گیاهچه‌های تاتوره از روش کامادا و همکاران با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۱). مراحل استخراج به صورت خلاصه از این قرار است: یک گرم از بافت تر اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها به طور جداگانه در نیتروژن مایع سائیده، حلال استخراج (۱۰ میلی لیتر حلال به ازاء ۱۰۰ میلی گرم نمونه) حاوی کلروفرم، متانول و هیدروکسید آمونیوم ۲۵٪ (۱۵: ۵: ۱) به نمونه‌ها اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شدند. پس از انکوباسیون در دمای اتاق بمدت یک ساعت، محلول صاف و با ۱ میلی لیتر کلروفرم دو مرتبه شستشو داده شد و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شد. در ادامه ۵ میلی لیتر کلروفرم و ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک یک نرمال بر روی باقیمانده افزوده و کاملاً هم زده شد. فاز کلروفرمی حذف و pH فاز حاوی اسید سولفوریک با استفاده از هیدروکسید آمونیوم ۲۸ درصد بر روی یخ به ۱۰ رسانده شد. برای استخراج آلکالوئیدها ۳ میلی لیتر کلروفرم به محلول اضافه شد. محلول حاصل پس از افزودن سولفات سدیم بدون آب صاف و باقیمانده با یک میلی لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول حاصل در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک و در ۲-۱ میلی لیتر متانول حل شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی حاصل پس از صاف کردن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق شد.

سنجش تروپان آلکالوئیدها توسط HPLC: سنجش محتوای تروپان آلکالوئید (هیوسیامین و اسکوپولامین) نمونه‌ها به روش HPLC و توسط ستون C_{18} در طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک ایزوکراتیک، حاوی آب و استونیتریل (۲۵: ۷۵) انجام شد. در هر سنجش، ۲۰ میکرولیتر عصاره به دستگاه تزریق شد. به منظور سنجش کمی، دو ترکیب استاندارد هیوسیامین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید در سه غلظت (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به دستگاه تزریق و بر اساس سطح زیر منحنی نسبت به غلظت، منحنی استاندارد رسم گردید. سپس محتوای دو آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس زمان بازداری به دست آمده از ترکیبات استاندارد و سطح زیر منحنی پیک‌های مربوط به هر نمونه، با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه شد (۴ و ۱۱).

استخراج پروتئین از گیاهچه‌های تاتوره: مقدار نیم گرم از بافت تر گیاهی در هاون چینی با افزودن ۵۰ میلی گرم پلی وینیل پیرولیدن (Polyvinylpyrrolidone) و ۱/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم (pH=7) ساییده و با دور rpm ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی در ویال‌های کوچکتر تقسیم و ویال‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد به منظور انجام مطالعات بعدی نگهداری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش پروتئین محلول کل: میزان پروتئین محلول کل در این بررسی به روش بردفورد (۱۹۷۶) تعیین شد (۶). به این ترتیب که میزان ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده در قسمت قبل با ۷۵۰ میکرو لیتر معرف بردفورد (1X) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin) بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

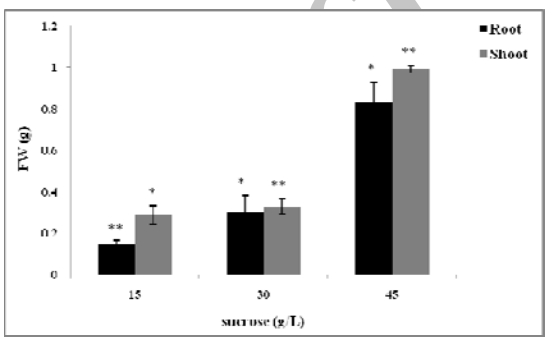
سنجش آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC: 1.11.1.6) به روش ابی اندازه‌گیری شد (۲). به این ترتیب که ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰میلی مولار (PH=7) آب مقطر استریل و پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (PH=7) (۷۵۰ میکرولیتر) مخلوط شدند. سینتیک آنزیم کاتالاز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. از مخلوط بدون عصاره آنزیمی بعنوان بلانک استفاده شد.

سنجش گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POX, EC: 1.11.1.7) به روش چانس و مهلی اندازه‌گیری شد (۷). مخلوط واکنش شامل محلول‌های بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (PH=7)، گایاکول ده میلی مولار محلول در آب دوبار تقطیر، پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (PH=7)، آب دوبار تقطیر استریل و عصاره آنزیمی است. سینتیک آنزیم گایاکول پراکسیداز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. از مخلوط بدون عصاره آنزیمی بعنوان بلانک استفاده شد.

آنالیز آماری: به منظور مقایسه نتایج به‌دست آمده و تعیین اهمیت تفاوت‌های مشاهده شده در آزمایشات از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۹) استفاده شد. رسم نمودارها به وسیله Microsoft Excel انجام گرفت. جهت تفسیر نتایج و تعیین تفاوت‌های بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد. نتایج آزمایش‌ها به صورت Mean±S.D. ارائه و نتایج آنالیزهای آماری با مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر محرک ساکارز بر رشد گیاهچه‌های تاتوره: یک ماه پس از اعمال تیمارهای ساکارز با غلظت‌های مختلف (۴۵ و ۳۰، ۱۵ گرم در لیتر) نمونه‌های ریشه و اندام هوایی بطور جداگانه توزین شد که اثر اعمال الیسیتور بر رشد گیاهچه-ها در شکل شماره ۱ آمده است. در تیمار ساکارز ۴۵ گرم در لیتر میزان وزن تر اندام هوایی و ریشه افزایش معنی‌دار به ترتیب ۵/۷ و ۳/۵ برابر در مقایسه با غلظت ۱۵ گرم در لیتر مشاهده شد. تیمار ساکارز ۳۰ گرم در لیتر موجب افزایش دو برابری میزان وزن تر بخش هوایی نسبت به تیمار ۱۵ گرم در لیتر شد. در حالیکه میزان وزن تر ریشه و اندام هوایی در تیمار ساکارز ۱۵ گرم در لیتر از همه تیمارها کمتر بود.



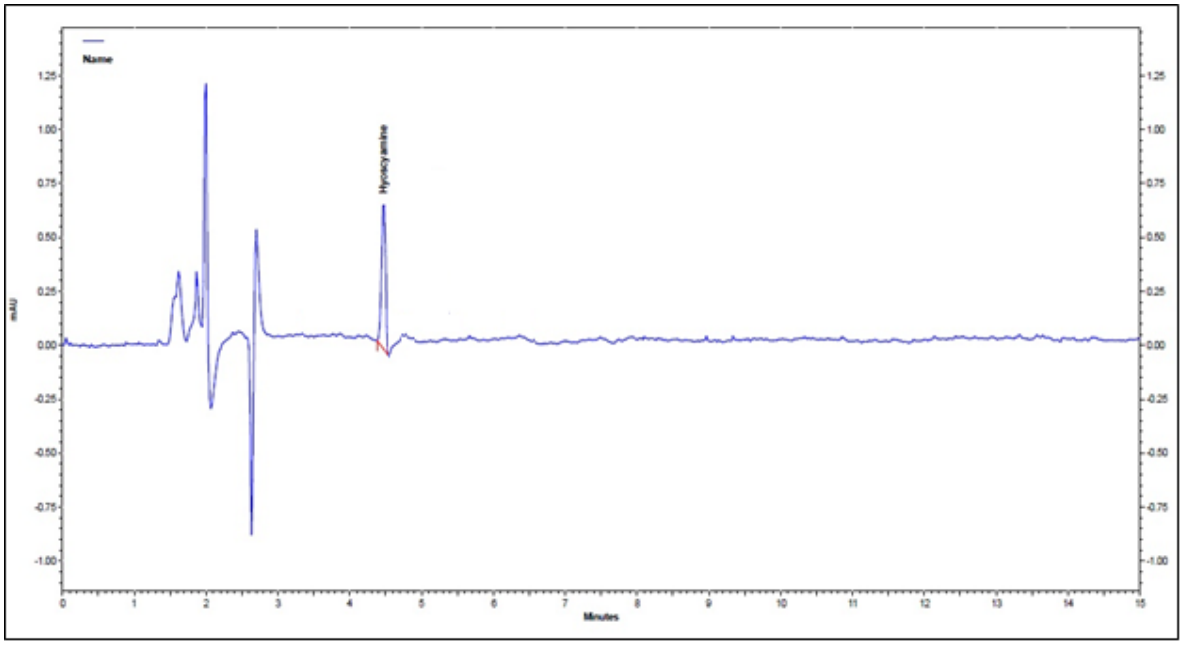
شکل ۱- اثر ساکارز بر رشد گیاهچه‌های تاتوره. وزن تر (FW) بخش ریشه و هوایی گیاهچه‌ها. داده‌های نمایش داده‌شده میانگین S.D.± داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * $p< ۰/۰۱$ و ** $p< ۰/۰۰۱$ است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

Archive of SID

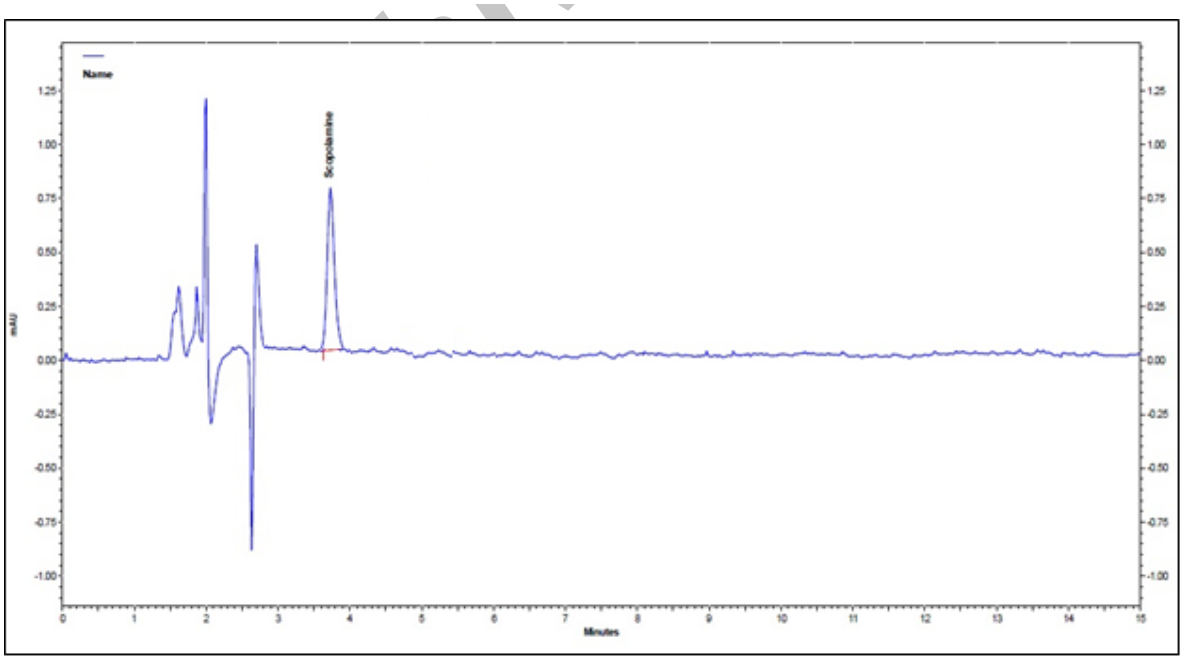
www.SID.ir

تأثیر محرک ساکارز بر میزان تروپان آلکالوئیدها در گیاهچه‌های تاتوره: میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در بافت‌های مختلف یکماه بعد از تیمار با ساکارز اندازه‌گیری شد. در شکل ۲ کروماتوگرام مربوط به استاندارد اسکوپولامین (الف)، هیوسیامین (ب)، ریشه تیمار شده با ساکارز ۱۵ گرم در لیتر (ج) و ریشه تیمار شده با ساکارز ۴۵ گرم در لیتر (د) آمده است.

الف

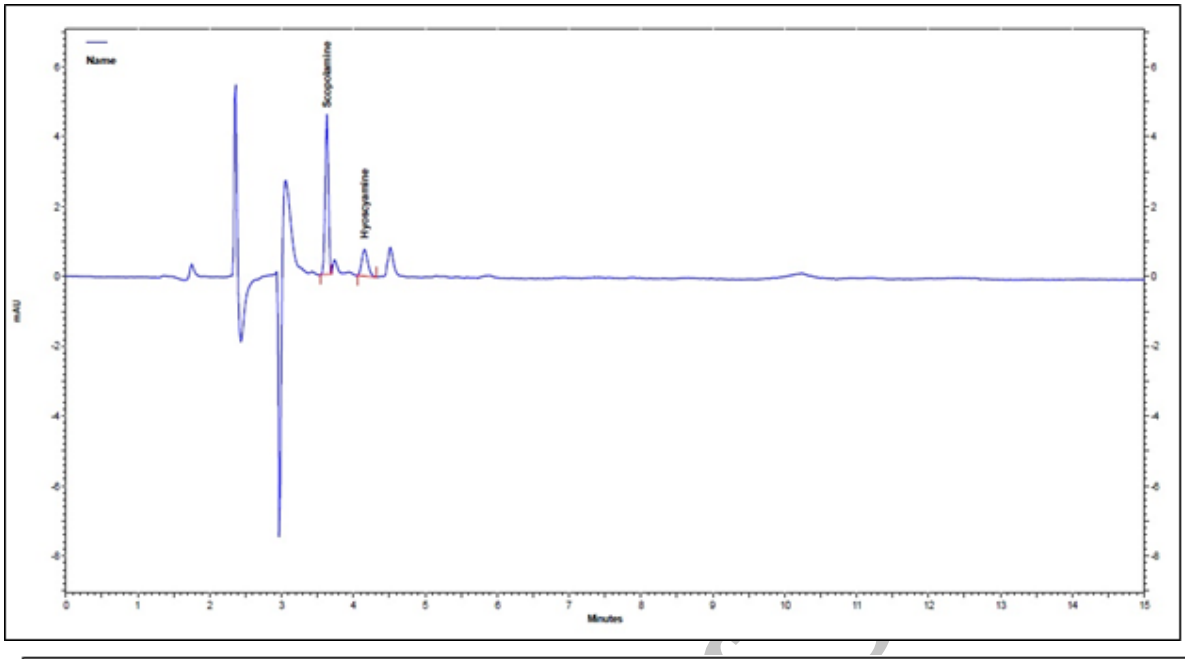


ب

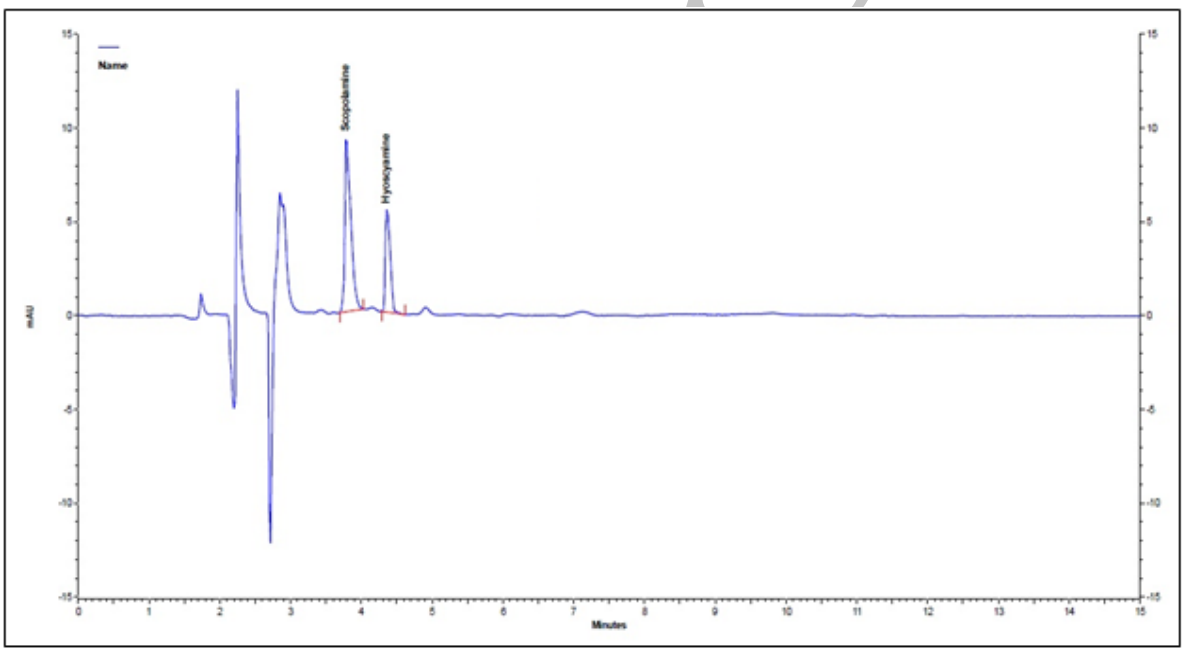


www.SID.ir

ج



د

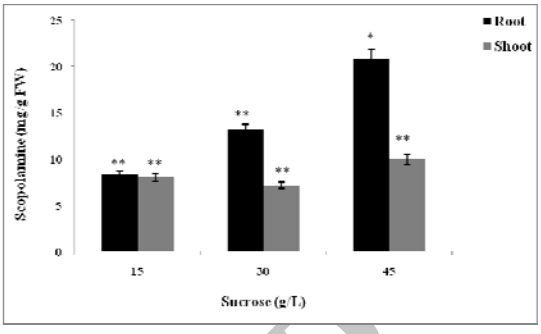


شکل ۲- کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز HPLC. الف) استاندارد اسکوپولامین، ب) استاندارد هیوسیامین، ج) ریشه تیمار شده با ساکارز ۱۵ گرم در لیتر و د) ریشه تیمار شده با ساکارز ۴۵ گرم در لیتر.

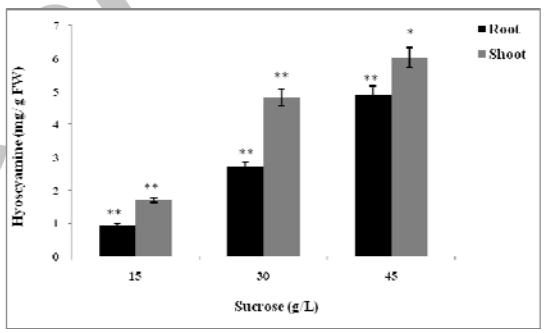
میزان اسکوپولامین در بخش ریشه گیاهچه‌های تاتوره با افزایش غلظت ساکارز بطور معنی‌داری افزایش یافت و در غلظت ۴۵ گرم در لیتر به حدود ۲/۵ برابر غلظت ۱۵ گرم در لیتر رسید. در مقابل میزان اسکوپولامین بخش هوایی گیاهچه‌ها افزایش حدود ۱/۲ برابر تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز نشان داد (شکل شماره ۳). با افزایش غلظت ساکارز محتوای تروپان آلکالوئید هیوسیامین در بخش هوایی و ریشه گیاهچه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت که در غلظت ۴۵ گرم در لیتر افزایش ۵ و ۳/۵ برابری به

www.SID.ir

ترتیب در بخش ریشه و اندام هوایی نسبت به غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد (شکل شماره ۴).

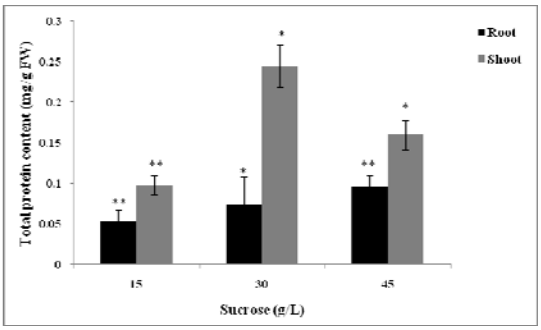


شکل ۳- اثر ساکارز بر میزان اسکوپولامین بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره. داده‌های نمایش داده‌شده میانگین ±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * ۰/۰۱ >p و ** ۰/۰۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.



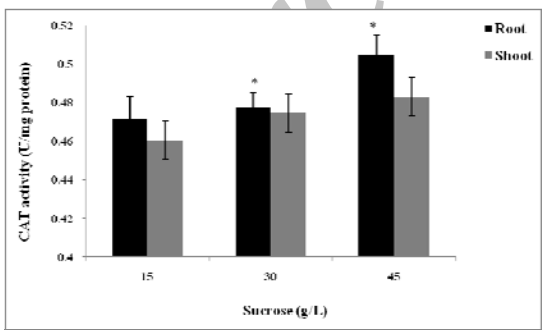
شکل ۴- اثر ساکارز بر میزان هیوسیامین بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره. داده‌های نمایش داده‌شده میانگین ±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * ۰/۰۱ >p و ** ۰/۰۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

تأثیر ساکارز بر میزان پروتئین تام در گیاهچه‌های تاتوره: محتوای پروتئین تام در بخش هوایی گیاهان در معرض ساکارز ۳۰ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری ۲/۵ برابری نسبت به ساکارز ۱۵ گرم در لیتر نشان داد. غلظت ساکارز ۴۵ گرم در لیتر در بخش هوایی گیاهان تیمار شده موجب افزایش ۱/۸ برابری پروتئین نسبت به غلظت ۱۵ گرم در لیتر گردید. بیشترین میزان پروتئین در اندام هوایی گیاهچه-های تیمار شده با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر اندازه‌گیری شد (شکل شماره ۵).



شکل ۵- اثر ساکارز بر میزان پروتئین کل بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره. داده‌های نمایش داده‌شده میانگین ±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * ۰/۰۱ >p و ** ۰/۰۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

تأثیر ساکارز بر سینتیک آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های تاتوره: با توجه به نتایج بررسی سینتیک آنزیم کاتالاز (شکل شماره ۶) غلظت ساکارز ۴۵ گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار ۲۰ درصدی میزان فعالیت این آنزیم در بخش ریشه گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان در معرض ساکارز ۱۵ گرم در لیتر گردید.

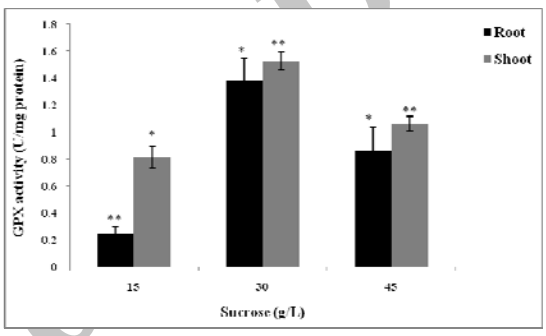


شکل ۶- اثر ساکارز بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره. داده‌های نمایش داده‌شده میانگین ±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با *۰/۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر ساکارز بر سینتیک آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهچه‌های تاتوره: بر اساس شواهد بدست آمده از آنالیز سینتیک آنزیم گایاکول پراکسیداز (شکل شماره ۷)، میزان فعالیت آنزیم در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی گیاهان تیمار شده با غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به ترتیب به ۵/۵ و ۱/۸ برابر غلظت ۱۵ گرم در لیتر افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی غلظت ۴۵ گرم در لیتر ساکارز نسبت به غلظت ۱۵ گرم در لیتر به ترتیب افزایش حدود ۳/۵ و ۱/۲ برابری نشان داد.



شکل ۷- اثر ساکارز بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره. داده‌های نمایش داده-شده میانگین ±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * ۰/۰۱ >p و ** ۰/۰۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

بحث

ساکارز مهم‌ترین منبع کربنی تولیدکننده انرژی در کشت گیاهان در سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای به ویژه برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. ساکارز بهترین منبع کربن، در برابر گرما ناپایدار بوده و قسمت عمده آن بعد اتوکلاو به فروکتوز و گلوکز تجزیه شده و تنها قسمتی که تجزیه نشده جذب ریشه گیاه شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر تأمین انرژی و اسکلت کربنی در تنظیم فشار اسمزی محیط کشت نیز نقش دارد (۲۵).

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف ساکارز (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم در لیتر) بر میزان رشد ریشه و نیز غلظت هیوسیامین و اسکوپولامین مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج، بیشترین میزان رشد ریشه و محتوای تروپان آلکالوئیدها در غلظت ۴۵ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد.

وکیلی و همکاران (۱۳۹۰) میزان افزایش ساخت تروپان آلکالوئیدها و بیان ژن H6H در گیاهچه‌های شابیزک را در اثر تیمارهای کربوهیدراتی (سوربیتول، مانیتول و ساکارز) مورد مطالعه قرار داده‌اند. تیمار با این کربوهیدرات‌ها رشد گیاهچه‌ها را کاهش داد، ولی موجب افزایش محتوای کلروفیل، هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاهچه‌ها شد (۱). در مطالعه‌ای روته و همکاران (۲۰۰۳) اثر ساکارز با غلظت ۵ درصد را بر تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های گیاه شابیزک با بیان بالای ژن PMT مورد بررسی قرار دادند که ریشه-های تیمار شده با ساکارز ۵ درصد، افزایش میزان کالیستژین را نشان دادند، در حالی که ریشه‌های دارای بیان بالای PMT تحت تأثیر قرار نگرفتند (۱۹). در بررسی اثر الیسیتوری سوربیتول بر رشد ریشه‌ها و تولید تروپان آلکالوئیدها در گیاه بذرالبنج، افزودن سوربیتول هیچگونه اثری بر رشد ریشه‌ها و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین نداشت (۹). در بررسی اثر القایی ساکارز، پرولین و کلرید سدیم بر میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین گیاه بذرالبنج، پرولین موجب افزایش هیوسیامین شده ولی سایر تیمارها بر میزان تولید این ترکیب اثر معنی‌داری نداشتند. همچنین، هر سه الیسیتور موجب افزایش قابل توجه اسکوپولامین نسبت به کالوس‌های شاهد شدند (۳). افزایش میزان ساکارز (۱-۵ درصد) در محیط کشت B5 کامل و ۱/۲در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد موجب افزایش ۸ برابری محتوای هیوسیامین ریشه‌های تغییرشکل یافته تاتوره (رده سلولی DS1) شد. در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و ساکارز تا ۵ درصد میزان هیوسیامین بیشتر از دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد بود. بیشترین میزان تولید هیوسیامین بوسیله رده سلولی DS1 در محیط کشت کامل B5 با ۵٪ ساکارز در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده شد. تحت این شرایط میزان تشکیل هیوسیامین تا ۷/۴ میلی گرم در لیتر در روز کشت توده‌ای بدست آمد. میزان رها شدن هیوسیامین به محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد (۱۴ درصد) بالاتر از دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد (۴ درصد) بود (۸). در مطالعه اثر محرکی منابع کربن (ساکارز) و نیتروژن (نیترات و آمونیوم) بر میزان رشد سلول‌ها و تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون گیاه تاتوره، نسبت کربن به نیتروژن محیط کشت، شاخص مهمی در میزان رشد و تولید تروپان آلکالوئیدها بود. افزودن منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت تا اندازه‌ای که نسبت کربن به نیتروژن تا حد ۷۰ برسد موجب مهار تولید تروپان آلکالوئیدها شده و افزایش نسبت به مقادیر بالاتر از ۱۰۰ موجب افزایش صد درصدی میزان تولید تروپان آلکالوئیدها نسبت به گروه شاهد شد (۵). در این بررسی نیز، افزایش میزان منبع کربن محیط کشت جامد به مقدار ۴۵ گرم در لیتر موجب افزایش میزان رشد و غلظت تروپان آلکالوئیدها شد که احتمالاً در ارتباط با تغییرات نسبت کربن به نیتروژن محیط و اثر القایی آن می‌باشد. احتمالاً ساکارز در زمان فاز سکون از مراحل سینتیک رشد گیاه تاتوره (یعنی حدوداً روز سی‌اُم) به طور کامل به مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده خود یعنی گلوکز و فروکتوز شکسته شده است. این موضوع در تحقیق انجام شده توسط پاولف و همکاران تأیید شده است (۱۹). نتایج حاصل از بررسی اثر کربوهیدرات‌های سوربیتول، مانیتول و ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها در گیاه شابیزک بیانگر اثر القایی کربوهیدرات‌های ذکر شده در افزایش میزان هیوسیامین و اسکوپولامین بود. معمولاً در محیط-های مصنوعی کشت گیاهان ساکارز به عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد بهینه گیاه به کار می‌رود در حالی که مانیتول و سوربیتول برای افزایش پتانسیل اسمزی استفاده می‌شوند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که کربوهیدرات-ها علاوه بر نقش مولکول‌های علامتی یا سیگنال، در سوخت و ساز آلکالوئیدها نقش دارند (۱). نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر در زمینه تأثیر افزایش‌دهنده ساکارز در تولید تروپان آلکالوئیدها در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های تاتوره مشابه یافته‌های وکیلی و همکاران (۱۳۹۰) است که نشان دادند کربوهیدرات‌ها سبب افزایش تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه شابیزک می‌شوند. از طرفی تنش اسمزی اعمال شده توسط ساکارز احتمالاً سبب افزایش سنتز پوترسین می‌شود که یکی از پیش‌سازهای مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها است. کربوهیدرات‌ها نه تنها به عنوان منابع کربن مورد نیاز برای رشد، بلکه با تأثیر بر سیستم‌های حساس به میزان کربوهیدرات، سبب تغییر در بیان برخی ژن‌ها می‌شوند (۱). در مطالعه اثر محیط‌های کشت مختلف MS، B5 و WP با غلظت‌های کامل و نیم برابر بر میزان رشد ریشه‌های مویین گیاه تاتوره نتایج حاصله نشان داد که رشد ریشه تحت تأثیر محیط کشت قرار نگرفت و بیشینه رشد ریشه‌ها در محیط کشت B5 نیم برابر مشاهده شد. از سوی دیگر، محیط کشت اثر معنی-داری بر میزان تولید آلکالوئیدها داشت. در تمامی محیط-های کشت استفاده شده، هیوسیامین آلکالوئید غالب بود. آنها همچنین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز (۳ تا ۸ درصد) در محیط کشت B5 را بر رشد ریشه‌های مویین و میزان تولید تروپان آلکالوئیدهای گیاه تاتوره به مدت ۴ هفته مورد مطالعه قرار دادند که رشد ریشه در محیط حاوی ساکارز ۵ درصد بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. همچنین محیط کشت حاوی ۳ درصد ساکارز، کمترین رشد ریشه را داشت. با این حال میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در هیچیک از غلظت‌های ساکارز استفاده شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (۱۴). در بررسی‌های انجام شده طی تحقیق حاضر، محیط کشت MS با غلظت‌های کامل و نیم برابر جهت کشت گیاه تاتوره مورد استفاده قرار گرفت و بهترین محیط از نظر ریشه‌زایی، محیط کشت MS بدون هورمون با غلظت نیم برابر بدست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

تولید هایپرسین‌ها در دانه‌رست‌های *H. adenotrichum* را تا غلظت ۴۵ گرم در لیترساکارز افزایش و در غلظت‌های بالاتر روند کاهشی داشت. هم چنین گزارش شده است ساکارز با غلظت ۳۰-۱۰ گرم در لیتر تولید هایپرسین و هایپرفورین را در بخش هوایی H. perforatum افزایش داد (۲۰).

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اغلب به عنوان نشانگر در بررسی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی استفاده می‌شوند و میزان فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش سطح تنش افزایش می‌یابد. بنابراین فعالیت آنزیم‌های انتی اکسیدان و سنتز متابولیت ثانوی همیشه مرتبط است. در گیاه *Euphorbia pekinensis*/فزایش فعالیت کاتالاز و سنتز آب اکسیژنه بعد از تیمار الیسیتور در بافت‌های کشت شده گزارش شده است (۱۲).

الیستورهای مختلف بسته به نوع، غلظت و نوع گیاه پاسخ-های متفاوتی را ایجاد می‌نمایند. شایان ذکر است که در مطالعه حاضر ساکارز موجب افزایش میزان پروتئین، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تولید تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین در گیاه تاتوره شده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت ساکارز با غلظت ۴۵ گرم در لیتر محرک خوبی برای افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین با ارزش دارویی بالا در گیاه تاتوره می‌باشد. هم چنین با افزایش غلظت ساکارز میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و گایاکول پراکسیداز افزایش یافت. به احتمال ساکارز علاوه بر تأمین نیاز انرژی و منبع کربنی موجب تحریک مسیر سیگنالی سنتز تروپان آلکالوئیدها شده است. مطالعات بیشتر در زمینه بررسی مکانیسم (های) عمل اثر ساکارز بر مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱- وکیلی، ب.، کریمی، ف.، شریفی، م.، بهمنش، م.، ۲۰۱۱. افزایش ساخت تروپان آلکالوئیدها و بیان ژن h6h در گیاهچه های شایزک توسط کربوهیدرات‌ها. علوم و فناوری زیستی مدرس، دورهٔ ۲، شمارهٔ ۱، ۱۸-۵.

2- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in enzymology, 105: 121-126.

3- Aljibouri, A. M. J., Al-samarraei, K. W., Abd, A. S., Mageed, D. M., Ali, A.-J. A., 2012. Alkaloids Production from Callus of *Hyoscyamus niger* L. in Vitro. Journal of Life Sciences, 6(8): 874.

4- Bahmanzadegan, A., Sefidkon, F., Sonboli, A., 2009. Determination of hyoscyamine and scopolamine in four Hyoscyamus species from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8(1): 65-70.

5- Ballica, R., Ryu, D. D., Powell, R. L., Owen, D., 1992. Rheological properties of plant cell suspensions. Biotechnology progress, 8(5): 413-420.

6- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.

7- Chance, B., Maehly, A., 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in enzymology, 2: 764-775.

8- Hilton, M., Rhodes, M., 1993. Factors affecting the growth and hyoscyamine production during batch culture of transformed roots of Datura stramonium. Planta medica, 59(04): 340-344.

9- Hong, M. L. K., Bhatt, A., Ping, N. S., 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): 7341-7351.

10- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., Saeed, M., 2012. Current approaches toward production of secondary

Archive of SID

www.SID.ir

plant metabolites. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 4(1): 10-20.

11- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant cell reports, 5(4): 239-242.

12- Maqsood, M., Mujib, A., 2017. Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in Catharanthus roseus. Revista Brasileira de Farmacognosia,

13- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.

14- Nussbaumer, P., Kapétanidis, I., Christen, P., 1998. Hairy roots of *Datura candida* × *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. Plant cell reports, 17(5): 405-409.

15- Oksman-Caldentey, K.-M., Hiltunen, R., 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field crops research, 45(1-3): 57-69.

16- Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L., Mirjalili, M. H., 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules, 13(8): 1722-1742.

17- Patel, H., Krishnamurthy, R., 2013. Elicitors in plant tissue culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2(2): 60-65.

18- Rao, S. R., Ravishankar, G., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 20(2): 101-153.

19- Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T., Dräger, B., 2003. Alkaloids in plants and root cultures of Atropa belladonna overexpressing putrescine N□methyltransferase. Journal of Experimental Botany, 54(390): 2065-2070.

20- Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., Franklin, G., 2017. Elicitation as a tool to improve the profiles of high□value secondary metabolites and pharmacological properties of Hypericum perforatum. Journal of Pharmacy and Pharmacology, **(): **-**.

21- Ullrich, S.F., Hagels, H., Kayser, O., 2017. Scopolamine: a journey from the field to clinics. Phytochemistry Reviews, 16(2): 333-53.

22- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A., 2005. Comparative study of responses in four Datura species to a zinc stress. Chemosphere, 59(7): 1005-1013.

23- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A., 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. Chemosphere, 72(5): 763-771.

24- Wang, J., Li, J. L., Li, J., Li, J. X., Liu, S. J., Huang, L. Q., Gao1, W. Y., 2017. Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. Chinese Herbal Medicines, 9(2): 115-125.

25- Ziegler, J., Facchini, P. J., 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 735-769.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of sucrose effect on tropane alkaloid production and several biochemical parameters of *Datura stramonium* under *in vitro* culture condition

Fathi Rezaei P.[1] and Rakee E.[2]

Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Agricultural Biotechnology Dept., Islamic Azad University – Maragheh Branch, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Datura stramonium as a well-known medicinal plant is rich in tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine and currently the vast majority of the studies have been focused on optimization of production conditions of these valuable materials in the world. In this research, the effect of sucrose (15, 30 and 45 g/L) as an abiotic elicitor was investigated on fresh weight (FW), hyoscyamine and scopolamine production, protein content, activity of catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) of *D. stramonium*. The amount of hyoscumine and scopolamine were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometery method was applied for studying of total protrin content and activity of CAT and GPX. According to the results, the highest amount of fresh weight (0.82 g), production of hyoscyamine (5 mg/g FW), scopolamine (20 mg/g FW) and CAT activity (0.5 U/mg protein) were recorded on the root of 45 g/L-treated plantlets but the highest amount of protein (0.24 mg/g FW) was observed on shoot of 30 g/L ones. In addition, the maximum GPX activity was determined on root of plantlests treated with 30 g/L sucrose (1.52 U/mg protein). In conclude, the concentration of 45 g/L of sucrose can be a good elicitor to increase production of hyoscyamine and scopolamine with high medicinal value in *D. stramonium* which probably due to the fact that sucrose does not only act as a carbon and energy source but also induces signaling pathway of tropane alkaloids synthesis.

Key words: Catalase, *D. stramonium*, Guaiacol peroxidase, Hyoscyamine, Scopolamine

Archive of SID

www.SID.ir