Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):391-399

Datura Tissue Culture Optimization by Yeast Extract to Elevate Tropane Alkaloids Conten

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Fathi Rezaei P.*[1] *PhD,*
Rakee E.[2] *MSc*

How to cite this article
Fathi Rezaei P, Rakee E. Datura Tissue Culture Optimization by Yeast Extract to Elevate Tropane Alkaloids Conten. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):391-399.

[1]Biology Department, Sciences Faculty, University of Maragheh, Maragheh, Iran
[2]Agricultural Biotechnology Department, Agricultural Faculty, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

Correspondence
Address: Biology Department, Science Faculty, University of Maragheh, Prof. Ghannadi Boulevard, Mother Square, Amir Kabir Highway, Maragheh, Iran. Postal Code: 5518183111
Phone: +98 (41) 37273060
Fax: +98 (41) 37273066
parisafathirezaei@gmail.com

Article History
Received: May 3, 2017
Accepted: October 7, 2017
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Datura (Datura stramonium) is known as a rich source of tropane alkaloids, including scopolamine and hyoscyamine as parasympatholytics that competitively antagonize acetylcholine. Production of secondary metabolites often occurs in plants against the various elicitors or signal molecules. In this study, the effect of yeast extract as a biotic elicitor on tropane alkaloid production was evaluated. Surface-sterilized Datura seeds were cultured on 1/2 MS medium supplemented with different concentrations of yeast extract (0, 1.5, and 3g/L). One month after germination, alkaloid yield of Datura plantlets was measured by the use of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Also, total protein content and antioxidative enzymes activity were determined by spectrophotometry method. According to the results, the fresh weight of root and shoot parts of Datura plantlets at 1.5g/L yeast extract was increased about 2 and 4 times, respectively. Yeast extract (1.5g/L) caused to 1.7 times increase of hyoscyamine amount of root and shoot parts and 2.5 folds scopolamine of Datura plantlets. Moreover, on yeast extract (1.5g/L)-treated plantlets, total protein content, and activity of catalase and guaiacol peroxidase were almost the same as the control group. Altogether, yeast extract (1.5g/L) can be used as a good candidate for enhancement production of tropane alkaloids especially hyoscyamine and scopolamine with high medicinal value.

Keywords Antioxidant Enzyme; Scopolamine; Total Protein; Hyoscyamine

CITATION LINKS

[1] Comparative study of responses in four Datura species to a zinc ... [2] Application of metabolic engineering to the production of ... [3] Study on the expansion of concrete ... [4] Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in ... [5] Alkaloid biosynthesis: metabolism and ... [6] Engineering tropane biosynthetic pathway in Hyoscyamus niger hairy ... [7] Elicitation of plants. Biotechnol Biotechnol ... [8] Influence of salicylic acid on alkaloid production by root cultures of Stemona curtisii ... [9] Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root ... [10] Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and ... [11] Plant cell elicitation for production of secondary metabolites ... [12] Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in ... [13] Plantlet regeneration of Datura innoxia by IAA and BA ... [14] Alkaloid production by hairy root cultures in Atropa ... [15] Determination of Hyoscyamine and scopolamine in four Hyoscyamus species ... [16] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the ... [17] Catalase in ... [18] [136] Assay of catalases and ... [19] An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of ... [20] Hairy roots of Datura candida× D. aurea: effect of culture medium composition on growth ... [21] Enhancement of diepoxin ζ production by yeast extract and its fractions in liquid culture of Berkleasmium-like endophytic fungus ... [22] The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of Brugmansia ... [23] Detection of elicitation effect on Hyoscyamus niger L. root cultures for the root growth and production of tropane ... [24] Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Salvia miltiorrhiza hairy ... [25] Defensive and secondary metabolism in Astragalus chrysochlorus cell cultures, in response to yeast extract ... [26] Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed ... [27] Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of Gymnema ... [28] Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of Silybum ... [29] Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in Cassia ... [30] Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بهینه‌سازی کشت بافت گیاه تاتوره به‌وسیله عصاره مخمر با هدف افزایش میزان تولید تروپان‌آلکالوئیدها

پریسا فتحی‌رضایی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران
المیرا راکعی MSc
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

چکیده
گیاه تاتوره (*Datura stramonium*) منبع غنی از تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین به‌عنوان آنتاگونیست رقابتی استیل‌کولین است. تجمع متابولیت‌های ثانوی معمولاً در پاسخ به الیسیتورهای مختلف و مولکول‌های سیگنالی اتفاق می‌افتد. در این پژوهش اثر عصاره مخمر به‌عنوان الیسیتور زیستی بر تولید تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای گیاه تاتوره پس از ضدعفونی سطحی در محیط کشت جامد MS نیم‌برابر حاوی عصاره مخمر در غلظت‌های (صفر، ۱/۵ و ۳گرم در لیتر) کشت داده شد. یک ماه پس از جوانه‌زنی، تولید تروپان‌آلکالوئیدهای گیاهچه‌های تاتوره با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو کاتالاز و پراکسیداز به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. با توجه به نتایج، میزان وزن تر ریشه و بخش هوایی گیاهچه‌های تاتوره در غلظت ۱/۵گرم در لیتر عصاره مخمر به‌ترتیب حدود ۲ و ٤ برابر افزایش نشان داد. عصاره مخمر با غلظت ۱/۵گرم در لیتر، موجب افزایش حدود ۱/۷ برابری هیوسیامین در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی و ۲/۵ برابری اسکوپولامین ریشه گیاهچه‌های تاتوره شد. علاوه بر این میزان پروتئین کل و فعالیت کاتالازی و گایاکول‌پراکسیدازی گیاهان تیمارشده با عصاره مخمر غلظت ۱/۵گرم در لیتر تقریباً مشابه گیاهان شاهد بود. در مجموع، عصاره مخمر با غلظت ۱/۵گرم در لیتر می‌تواند به‌عنوان کاندیدای خوبی در گیاه *تاتوره استرامونیوم* برای افزایش میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین با ارزش دارویی بالا باشد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، اسکوپولامین، پروتئین کل، هیوسیامین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۱۵
*نویسنده مسئول: parisafathirezaei@gmail.com

مقدمه

گیاه *تاتوره استرامونیوم* (*Datura stramonium*) گیاهی یک‌ساله و علفی متعلق به خانواده سیب‌زمینی است که در نواحی گرمسیری کره زمین پراکنش دارد. گونه‌های متنوعی از تاتوره برای تولید متابولیت‌های ثانوی کشت می‌شوند. برگ‌های تاتوره منبع مهمی از تروپان آلکالوئیدهای آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین هستند که علی‌رغم سمیت زیاد، اهمیت اقتصادی بالا به‌دلیل کاربردهای دارویی دارند. این آلکالوئیدها دارای اثرات پاراسمپاتولایتیک و آنتی‌موسکارینیک هستند که فعالیت سیستم پاراسمپاتیک را مهار می‌کنند. از برخی از آنها مانند آتروپین در ایست قلبی و برادیکاردی سینوسی و قبل از بی‌هوشی به‌منظور کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد استفاده می‌شود. اسکوپولامین (هیوسین) در تخفیف اسپاسم‌های عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش کاربرد دارد. گیاهان به‌عنوان تنها منبع تولید این ترکیبات، مورد توجه صنایع داروسازی هستند[1]. در این گیاه، بیشترین میزان اسکوپولامین در اندام هوایی و بیشترین میزان هیوسیامین در ریشه‌ها یافت می‌شود[2]. این دو آلکالوئید عمدتاً در سلول‌های جوان ریشه سنتز شده و به بخش‌های هوایی گیاه انتقال می‌یابند. هیوسیامین معمولاً آلکالوئید اصلی در بسیاری از گیاهان تیره سیب‌زمینی است در حالی که اسکوپولامین اغلب به مقدار خیلی‌کم تولید می‌شود. اسکوپولامین به‌دلیل فعالیت فیزیولوژیکی بالاتر و اثرات جانبی کمتر در صنایع دارویی ارزش بیشتری نسبت به هیوسیامین دارد. نیاز تجاری ده برابری به اسکوپولامین (به شکل ان‌بوتیل‌بروماید) نسبت به هیوسیامین و آتروپین (مخلوط راسمیک دی و ال‌هیوسیامین) وجود دارد[2, 3]. آلکالوئیدها متابولیت‌های ضروری برای تکمیل چرخه زندگی گیاه نیستند. غالباً فرض بر این است که متابولیت‌های ثانوی به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان یا دفاع شیمیایی در مقابل شرایط تنش عمل می‌کنند. همچنین فرض بر این است که متابولیزم ثانوی ممکن است به‌عنوان یک بخش کلی از توانایی گیاه برای تغییر فرآیندهای متابولیک برای بقا و رشد در شرایط سخت مثلاً حضور مقادیر زیاد فلزات باشد[4].

بنابراین، با توجه به نیاز روزافزون جامعه پزشکی به این نوع از آلکالوئیدها، به‌ویژه ترکیب دارویی ارزشمند اسکوپولامین، افزایش میزان آنها در گیاهان دارویی تولیدکننده ضرورت دارد. امروزه با پیشرفت‌های صورت‌گرفته در زمینه زیست‌فناوری گیاهی و افزایش تمایل به بهره‌برداری از ترکیبات دارویی با منشا گیاهی، روش‌های جدیدی در افزایش میزان تولید داروهای گیاهی به وجود آمده است. طی سال‌های اخیر استفاده از سیستم کشت اندام به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی رو به افزایش است[2, 5, 6].

گیاهان و سلول‌های گیاهی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به عوامل میکروبی، شیمیایی و فیزیکی به‌عنوان الیسیتورها نشان می‌دهند. استفاده از الیسیتورها موجب القا یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانوی به‌وسیله گیاهان برای حفظ بقا، مقاومت و رقابت می‌شود[7]. الیسیتورها ترکیباتی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند[8]. امروزه با پیشرفت فناوری، روش‌های متعددی برای تولید متابولیت‌های ثانوی شامل استفاده از الیسیتورهای زیستی مانند الیسیتورهای قارچی، باکتریایی و مخمر و الیسیتورهای غیرزیستی مانند پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، آنزیم‌های غیرفعال‌شده، نمک‌های فلزات سنگین به وجود آمده است[9, 10]. الیسیتورها ممکن است با فعال‌سازی ژن‌های برخی از آنزیم‌ها درنهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را القا نمایند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانوی شوند. میزان اثر الیسیتور بر تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت بافت به غلظت الیسیتور و مدت‌زمان

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار وابسته است[11]. قبلاً اثبات شده است که افزودن ترکیبات خاص با منشا خارجی به محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. عصاره مخمر به‌عنوان یک الیسیتور مهم غنی از ویتامین‌های خانواده B، حاوی ترکیبات ضروری مانند کیتین، الیگومرهای ان-استیل‌گلوکزآمین، گلیکوپپتیدها و ارگوسترول است که این ترکیبات، پاسخ سیستم ایمنی گیاه را از طریق القای سنتز متابولیت تحریک می‌نمایند. تجمع چندین ترکیب فعال زیستی با ارزش مانند آزادیراچتین، آرتمیزینین و تاشینن‌ها به‌وسیله الیسیتور عصاره مخمر گزارش شده است. مکانیزم تحریک در گیاهان مختلف متنوع است و در اغلب موارد کمپلکس الیسیتور-گیرنده تشکیل شده و پاسخ‌های بیوشیمیایی وسیعی فعال می‌شود. تجمع اسید رزمارینیک در ریشه‌های موئینه مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) بیوسنتز *سولانوم هایناننس* (*Solanum hainanense* Hance)، ایزوفلاوونوئیدها، سیتوکروم P450، آنتوسیانین و اسیدهای فنولیک به‌وسیله عصاره مخمر گزارش شده است[12].

لازم به ذکر است که در مطالعه *آجونگلا* و همکاران میزان اسکوپولامین و هیوسیامین ریشه‌های مشتق از ریزنمونه‌های برگ گیاه *داتورا متل* (*Datura metel* L) در محیط کشت B_5 حاوی اسیدایندول‌استیک و عصاره مخمر (در غلظت‌های ۰/۱ تا یک‌گرم در لیتر) استفاده شده است[10]، اما در تحقیق حاضر بذرهای گیاه *تاتوره استرامونیوم* در محیط کشت MS نیم‌برابر حاوی عصاره مخمر (در غلظت‌های ۱/۵ و ۳گرم در لیتر) کشت شده و میزان اسکوپولامین و هیوسیامین بعد از یک ماه در دو بخش اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شده است.

با توجه به تنوع بالای گیاهان دارویی در کشور، توجه جدی به پژوهش در این زمینه می‌تواند نویدبخش آینده‌ای روشن در ارتباط با تولید ترکیبات دارویی باشد. بهره‌برداری پایدار از توان و ظرفیت منابع طبیعی کشور نیازمند به‌کارگیری روش‌های نوین علمی و سازگار با محیط زیست به‌خصوص در زمینه زیست‌فناوری است. با توجه به بررسی منابع، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر عصاره مخمر بر رشد و میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین گیاهچه‌های *تاتوره استرامونیوم* گزارش نشده است. بر همین اساس، در این تحقیق تلاش شد با به‌کارگیری اصول و روش‌های زیست‌فناوری گیاهی، بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای گیاه تاتوره با اعمال تیمار عصاره مخمر در غلظت‌های مختلف، میزان تولید تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مراحل سترون‌سازی بذرهای تاتوره: بذورر تاتوره از پایه‌های خودروی گیاه در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد. ابتدا بذرها طبق روش *تشکری میان‌رودی* و همکاران با اعمال برخی از تغییرات ضدعفونی سطحی شدند[13]. به‌طور خلاصه بذرها در محلول وایتکس تجاری ۲۰% حاوی تریتون x100 به‌مدت ۲۰دقیقه غوطه‌ور و با آب‌مقطر سه‌بار شستوشو داده شدند. درنهایت بذرها در اتانول ۷۰% به‌مدت ۱۰دقیقه سترون و با آب‌مقطر استریل سه‌بار شسته شدند. درنهایت بذرهای سترون‌شده روی محیط‌های کشت مورد نظر قرار داده شدند.

بررسی اثر محرک عصاره مخمر بر رشد گیاهچه‌های تاتوره: به‌منظور بررسی اثر محرک، بذرهای سترون‌شده در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت موراشیگ و اسگوک (MS) با غلظت نیم‌برابر دارای محرک مخمر (غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۳گرم در لیتر) به تعداد ۱۰-۷ عدد کشت شدند. در مرحله ٤برگی (تقریباً یک ماه بعد از کشت) وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاهان پس از برداشت با استفاده از ترازوی حساس اندازه‌گیری و برای مطالعات بعدی (سنجش میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز) در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد. لازم به ذکر است که پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی با استفاده از محیط کشت MS کامل و MS با غلظت نیم‌برابر بهترین محیط کشت به‌منظور تولید ریشه، محیط کشت MS با غلظت نیم‌برابر به دست آمد و در ادامه این محیط برای اعمال تیمارهای الیسیتوری انتخاب شد.

استخراج تروپان‌آلکالوئیدها از گیاهچه‌های تاتوره: برای استخراج تروپان‌آلکالوئیدها از گیاهچه‌های تاتوره از روش *کامادا* و همکاران با اندکی تغییرات استفاده شد[14]. مراحل کار به‌صورت زیر است: بدین‌منظور یک‌گرم از بافت تر اندام هوایی و ریشه به‌طور جداگانه در نیتروژن مایع سائیده شد. حلال استخراج حاوی کلروفرم، متانول و هیدروکسیدآمونیوم ۲۵% (۱۵: ۵: ۱) به نمونه‌ها اضافه شده و به‌مدت ۳۰دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شدند. پس از یک‌ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، محلول با استفاده از کاغذ صافی صاف و با کلروفرم دو مرتبه شسته شدند و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰°C خشک شد. در ادامه ۵میلی‌لیتر کلروفرم و ۲میلی‌لیتر اسیدسولفوریک یک‌نرمال روی باقی‌مانده اضافه و کاملاً هم‌زده شد. فاز کلروفرمی حذف و pH فاز حاوی اسیدسولفوریک با استفاده از هیدروکسیدآمونیوم ۲۸% روی یخ به ۱۰ رسانده شد. برای استخراج آلکالوئیدها ۳میلی‌لیتر کلروفرم به محلول اضافه شد. محلول حاصل پس از افزودن سولفات‌سدیم بدون آب با استفاده از کاغذ صافی صاف و باقی‌مانده با یک‌میلی‌لیتر کلروفرم شست‌وشو داده شد. محلول حاصل در دمای ۴۰°C خشک و در ۲-۱میلی‌لیتر متانول حل شد. میزان ۲۰میکرولیتر از عصاره متانولی حاصل پس از صاف‌کردن با فیلتر ۰/٤۵میکرومتری به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) تزریق شد.

سنجش تروپان‌آلکالوئیدها توسط HPLC: سنجش محتوای تروپان‌آلکالوئید (هیوسیامین و اسکوپولامین) نمونه‌ها به روش HPLC و توسط ستون C18 در طول موج ۲۱۵نانومتر، سرعت جریان حلال یک‌میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک ایزوکراتیک، حاوی آب و استونیتریل (۲۵: ۷۵) انجام شد. در هر سنجش، ۲۰میکرولیتر عصاره به دستگاه تزریق شد. به‌منظور سنجش کمی، دو ترکیب استاندارد هیوسیامین‌سولفات و اسکوپولامین‌هیدروبروماید در سه غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

(۰/۲، ۰/۵ و یک‌میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به دستگاه تزریق و براساس سطح زیر منحنی نسبت به غلظت، منحنی استاندارد رسم شد. سپس محتوای دو آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی براساس زمان بازداری به‌دست‌آمده از ترکیبات استاندارد و سطح زیر منحنی پیک‌های مربوط به هر نمونه، با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه شد[14, 15].

استخراج پروتئین: ۰/۵گرم از بافت تر نمونه‌های برداشت‌شده با افزودن ۵۰میلی‌گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدن (PVP) و ۱/۵میلی‌لیتر از بافر فسفات‌پتاسیم (با میزان pH برابر با ۷) در هاون چینی سائیده و مخلوط حاصل با دور ۱۱۹۵۲g در دمای ۴°C به‌مدت ۳۰دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، فاز رویی در ویال‌های کوچک‌تر تقسیم و ویال‌ها در فریزر ۸۰°C- به‌منظور انجام مطالعات بعدی (سنجش میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز) نگهداری شدند.

سنجش پروتئین محلول کل: مقدار پروتئین کل در این آزمایش به روش بردفورد اندازه‌گیری شد[16]. به‌منظور اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های گیاهی با استفاده از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (BSA) منحنی استاطزندارد رسم شد. به این ترتیب که میزان ۲۵میکرولیتر از نمونه‌های فوق با ۷۵۰میکرولیتر معرف بردفورد (1X) مخلوط و به‌مدت ۵دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد BSA برحسب (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) محاسبه شد.

سنجش آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC: 1.11.1.6) به روش *ابی* اندازه‌گیری شد[17]. به‌طور خلاصه ۲۰میکرولیتر عصاره پروتئینی با بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر با ۷)، آب‌مقطر استریل و پراکسیدهیدروژن ۷۰میلی مولار در بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر با ۷) مخلوط شدند. فعالیت آنزیم کاتالاز بر مبنای تجزیه پراکسیدهیدروژن و کاهش جذب در طول موج ۲۴۰نانومتر در مدت‌زمان ۱۸۰ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد به کار رفت. فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه شد.

سنجش گایاکول‌پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (POX, EC: 1.11.1.7) به روش *چانس* و *مهلی* اندازه‌گیری شد[18]. مخلوط واکنش مواد شیمیایی شامل محلول‌های بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر با ۷)، گایاکول ده‌میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر، پراکسیدهیدروژن ۷۰میلی‌مولار محلول در فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر با ۷)، آب دوبار تقطیر استریل‌شده، عصاره پروتئینی است. سینتیک آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در طول موج ۴۷۰نانومتر در مدت‌زمان ۱۸۰ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد به کار رفت.

آنالیز آماری: به‌منظور مقایسه نتایج به‌دست‌آمده و تعیین اهمیت تفاوت‌های مشاهده‌شده در آزمایش‌ها، از نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد. رسم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار میکروسافت اکسل ۲۰۱۳ صورت گرفت. به‌منظور تفسیر نتایج و تعیین تفاوت‌های بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. نتایج آزمایش‌ها به‌صورت میانگین آماری ارایه شدند.

یافته‌ها

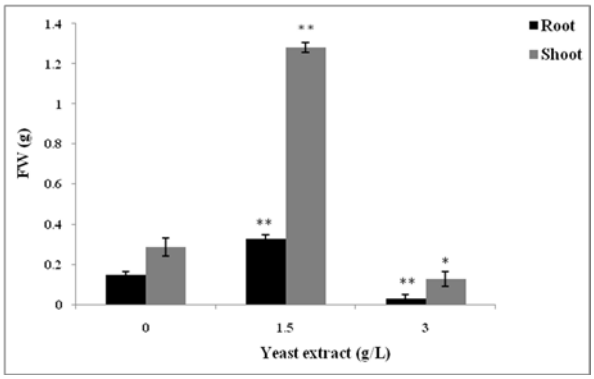
تاثیر عصاره مخمر بر رشد گیاهچه‌های تاتوره: یک ماه پس از اعمال تیمار عصاره مخمر (۳ و ۱/۵، صفر گرم در لیتر) گیاهچه‌های حاصل بررسی و جمع‌آوری شدند (شکل ۱). نمونه‌های ریشه و اندام هوایی به‌طور جداگانه توزین شد که اثر اعمال محرک‌ها بر وزن تر گیاه در نمودار ۱ ذکر شده است. براساس نمودار ۱، تیمار عصاره مخمر با غلظت ۱/۵گرم در لیتر موجب افزایش رشد ریشه و اندام هوایی نسبت به گروه شاهد شد که در مورد اندام هوایی افزایش بسیار زیاد بود، اما میزان وزن تر ریشه و اندام هوایی در گیاهان تیمارشده با ۳گرم در لیتر عصاره مخمر نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد.

شکل ۱) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر رشد گیاهچه‌های تاتوره، گیاهچه‌های تاتوره تیمارشده با عصاره مخمر صفر گرم در لیتر (الف)، ۱/۵گرم در لیتر (ب) و ۳گرم در لیتر (ج) به‌مدت یک ماه

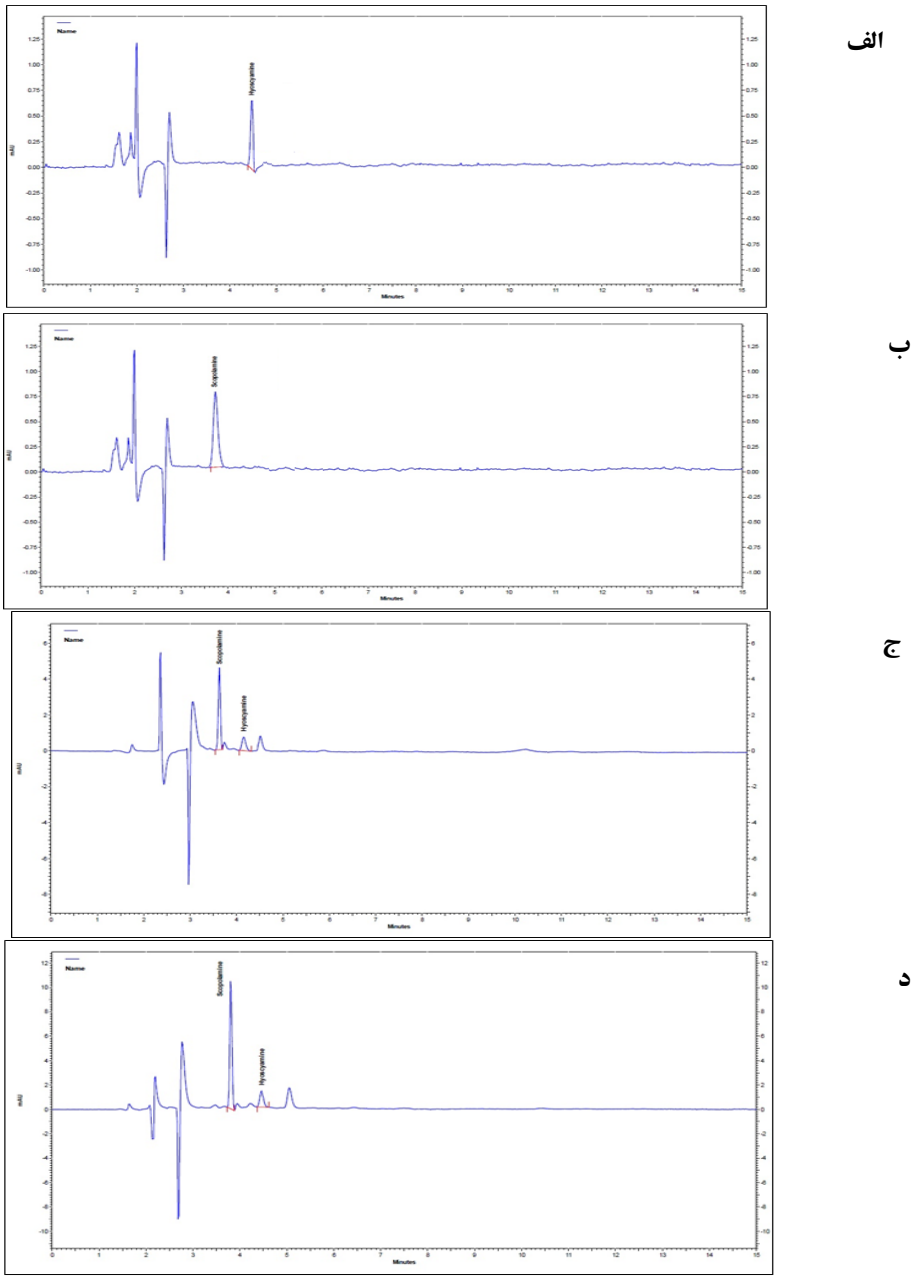
www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر محرک عصاره مخمر بر میزان تروپان‌آلکالوئیدها در گیاهچه‌های تاتوره: میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در بافت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. در نمودار ۲ کروماتوگرام مربوط به استاندارد اسکوپولامین (الف)، هیوسیامین (ب)، ریشه شاهد (ج) و ریشه تیمارشده با عصاره مخمر ۱/۵گرم بر لیتر (د) بیان شده است. براساس نتایج حاصل از HPLC (نمودار ۳) میزان اسکوپولامین در ریشه گیاهان تیمارشده با عصاره مخمر نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی نشان داد، اما میزان اسکوپولامین در بخش هوایی گیاهان در معرض عصاره مخمر نسبت به گروه تیمارنشده تفاوتی مشاهده نشد، اما در غلظت بالای این تیمار محتوای اسکوپولامین در بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌ها نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد.



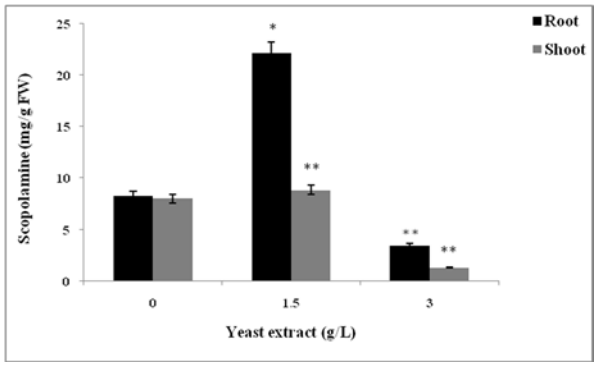
نمودار ۱) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر وزن تر (FW) گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با $p<0/01$* و $p<0/001$** است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی به دست آمده است.



نمودار ۲) کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز HPLC؛ الف) استاندارد اسکوپولامین، ب) استاندارد هیوسیامین، ج) ریشه شاهد و د) ریشه تیمارشده با عصاره مخمر ۱/۵گرم در لیتر

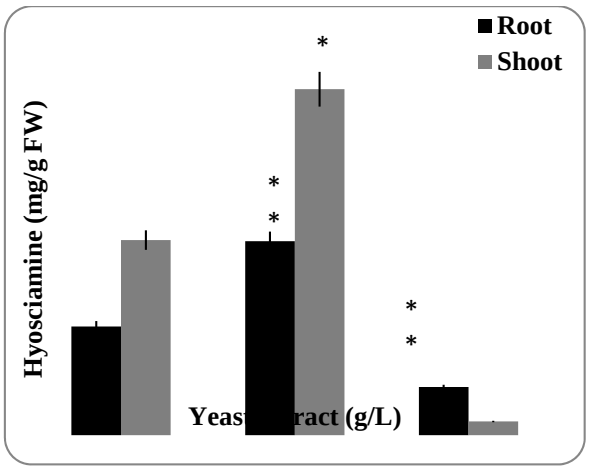
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر میزان تروپان‌آلکالوئید اسکوپولامین بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با *p<۰/۰۱ و **p<۰/۰۰۱ است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی به دست آمده است.

با توجه به نتایج گزارش‌شده در نمودار ٤، میزان هیوسیامین در بخش ریشه و هوایی گیاهان تیمارشده با عصاره مخمر ۱/۵گرم در لیتر نسبت به شاهد افزایش یافت. در مقابل محتوای هیوسیامین در بخش ریشه و هوایی گیاهان در معرض با عصاره مخمر ۳گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش قابل توجهی داشت.

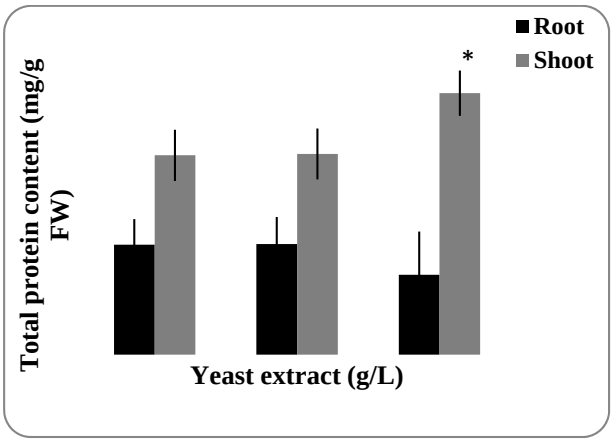


نمودار ۴) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر میزان تروپان‌آلکالوئید هیوسیامین بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار با *p<۰/۰۱ و **p<۰/۰۰۱ است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی به دست آمده است.

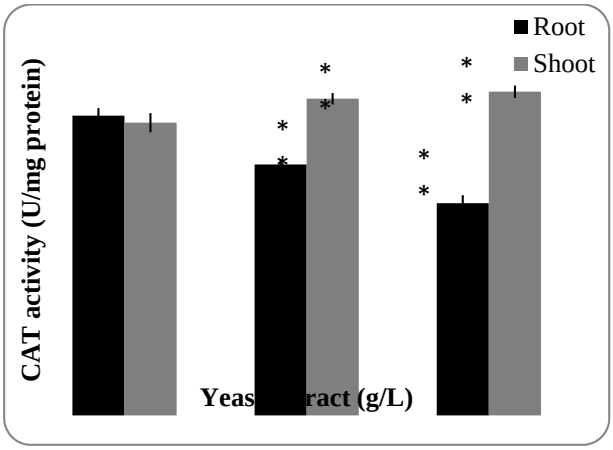
تاثیر عصاره مخمر بر میزان پروتئین تام در گیاهچه‌های تاتوره: براساس نتایج حاصل از نمودار ۵، محتوای پروتئین کل در گیاهان تیمارشده با غلظت ۱/۵گرم در لیتر عصاره مخمر تقریباً مشابه گیاهان تیمارنشده بود. اما میزان پروتئین کل در گیاهان در معرض غلظت ۳گرم در لیتر عصاره مخمر در بخش ریشه کمتر از شاهد بود و در بخش هوایی نسبت به شاهد افزایش نشان داد.

تاثیر عصاره مخمر بر سینتیک آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های تاتوره: از آنجایی که افزودن الیسیتورها موجب تنش در بافت‌های کشت‌شده می‌شوند، بنابراین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز) به‌عنوان شاخص‌های تنش ارزیابی شد. براساس نمودار ٦، آنالیز سینتیک آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های تحت تاثیر عصاره مخمر مشاهده شد که در هر دو غلظت (۱/۵ و ۳گرم در لیتر) فعالیت آنزیم در بخش هوایی نسبت به گروه شاهد افزایش اندکی نشان داد اما در هر دو تیمار میزان فعالیت آنزیم در بخش ریشه نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری داشت.

تاثیر عصاره مخمر بر سینتیک آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در گیاهچه‌های تاتوره: براساس شواهد به‌دست‌آمده از آنالیز سینتیک آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (نمودار ۷)، میزان فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز بخش هوایی گیاهان در معرض عصاره مخمر ۱/۵گرم در لیتر نسبت به گیاهان تیمارنشده کمی افزایش نشان داد اما در بخش ریشه تقریباً مشابه بود. غلظت ۳گرم در لیتر موجب کاهش چشم‌گیر فعالیت آنزیم نسبت به گروه شاهد شد.



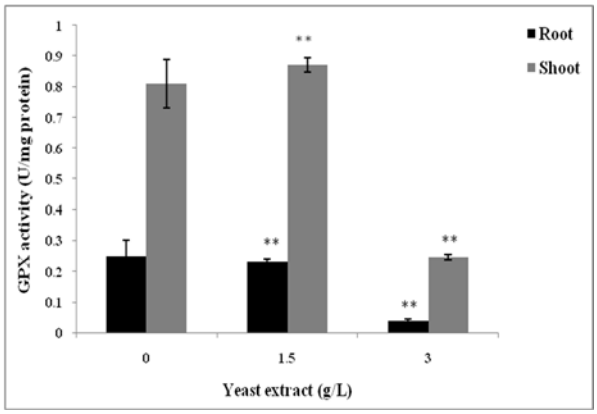
نمودار ۵) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر میزان پروتئین کل بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با *p<۰/۰۱ است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی به دست آمده است.



نمودار ۶) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر سینتیک آنزیم کاتالاز (CAT) بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با **p<۰/۰۰۱ است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی به دست آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۷) اثر الیسیتور عصاره مخمر بر سینتیک آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (GPX) بخش ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تاتوره؛ داده‌های نمایش داده‌شده میانگین آماری داده‌های حاصل از حداقل سه‌بار آزمایش مجزا هستند. نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با **p<۰/۰۰۱ است که با آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی به دست آمده است.

بحث

خانواده سیب‌زمینی یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین خانواده‌های دولپه‌ای‌های حقیقی است. گیاهان شابیزک، بذرالبنج و تاتوره از این خانواده به‌دلیل وجود متابولیت‌های ثانوی دارای خواص دارویی قابل توجه‌ای هستند[19].

تولید تروپان‌آلکالوئیدها در کشت بافت گیاهی وابستگی زیادی به ترکیب محیط کشت دارد. در بررسی اثر محیط‌های مختلف کشت MS، B_5 و WP با غلظت‌های کامل و نیم‌برابر بر میزان رشد ریشه‌های مویین گیاه تاتوره، بیشینه رشد ریشه‌ها در محیط کشت B_5 نیم برابر مشاهده شد. از سوی دیگر، محیط کشت اثر معنی‌داری بر میزان تولید آلکالوئیدها داشت. در تمامی محیط‌های کشت استفاده‌شده، هیوسیامین‌آلکالوئید غالب بود[20]. در بررسی‌های انجام‌شده طی تحقیق حاضر، محیط کشت MS با غلظت‌های کامل و نیم‌برابر و نیز ترکیبات مختلف هورمونی، به‌منظور کشت گیاه تاتوره مورد استفاده قرار گرفت و بهترین محیط از نظر ریشه‌زایی، محیط کشت MS بدون هورمون با غلظت نیم‌برابر به دست آمد.

عصاره مخمر شامل ترکیباتی نظیر کیتین، الیگومرهای ان-استیل‌گلوکزآمین، گلیکولیپیدها، ارگوسترول، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی است اما ترکیب اصلی تحریک‌کننده سنتز آلکالوئیدها هنوز شناسایی نشده است. از یک‌سو باقی‌مانده‌های پپتید و پلی‌ساکارید موجود در عصاره مخمر به‌عنوان مولکول‌های محرک پیشنهاد شده‌اند و از سویی دیگر اثر القایی آن احتمالاً مربوط به کاتیون‌هایی مانند روی، کلسیم و کبالت است. کلسیم به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم پوترسین‌متیل‌ترانسفراز (PMT) بوده و در نتیجه می‌تواند موجب تحریک سنتز تروپان‌آلکالوئیدها شود. با این حال افزایش بیش از اندازه این عنصر می‌تواند اثر مهاری بر تولید تروپان‌آلکالوئیدها داشته باشد، به‌گونه‌ای که مقادیر بالای کلسیم می‌تواند موجب فعال‌شدن آنزیم‌های پراکسیدازی شده و در ادامه تخریب و تجزیه متابولیت‌های ثانوی را در پی داشته باشد[10, 21].

اثر کلسیم‌کلرید با غلظت ۱۰میلی مولار در محیط کشت MS بر تولید تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاه *تاتوره تماشایی* (*Datura innoxia*) مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، پس از اعمال تیمار، میزان رشد گیاهچه‌ها به‌طور معنی‌دار تحت تاثیر قرار نگرفت. میزان تولید تروپان‌آلکالوئیدها طی این تیمار تا ده‌برابر افزایش نشان داد که احتمالاً به‌خاطر فعال‌سازی آنزیم PMT در اثر کلسیم است[22]. بنابراین، در تحقیق حاضر نیز بخشی از افزایش میزان تروپان‌آلکالوئیدها در اثر عصاره مخمر، احتمالاً می‌تواند در اثر افزایش غلظت درون‌سلولی کلسیم و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم PMT باشد.

در مطالعه‌ای *هونگ* و همکاران، اثر محرکی کیتوزان، کازئین، عصاره مخمر و سوربیتول بر رشد ریشه‌ها و تولید تروپان‌آلکالوئیدها در گیاه بذرالبنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که افزودن کیتوزان، رشد ریشه‌ها و تولید زیست‌توده را متوقف نمود، در حالی که اضافه‌کردن کازئین و سوربیتول هیچ‌گونه اثری بر رشد ریشه‌ها و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین نداشت. افزودن عصاره مخمر بر رشد ریشه و تولید هیوسیامین اثر نداشت. اما عصاره مخمر در غلظت ۰/۵ و یک‌گرم در لیتر موجب افزایش تولید اسکوپولامین شد[23].

آجونگلا و همکاران تاثیر عصاره مخمر (در غلظت‌های ۰/۱ تا یک‌گرم در لیتر) در شرایط کشت "*درون‌شیشه‌ای*" گیاهچه‌های *تاتوره تماشائی* در محیط کشت B_5 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۵-۰/۱گرم در لیتر عصاره مخمر، موجب افزایش رشد و میزان تجمع تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین شد. در غلظت ۰/۷۵گرم در لیتر عصاره مخمر، برخلاف اثر مهاری بر رشد، افزایش تجمع تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین (۲/۲برابر) مشاهده شد. همچنین در غلظت یک‌گرم در لیتر عصاره مخمر، رشد و میزان تجمع تروپان‌آلکالوئیدها کاهش یافت[10]. در تحقیق حاضر، گیاه *تاتوره استرامونیوم* در معرض تیمار عصاره مخمر با غلظت‌های ۱/۵ و ۳گرم در لیتر و در محیط کشت MS پایه با غلظت نیم‌برابر قرار گرفت و نتایج حاصله بیانگر افزایش رشد و میزان انباشت تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در تیمار ۱/۵گرم در لیتر بود. با این حال هر دو شاخص ذکرشده در تیمار ۳گرم در لیتر کاهش نشان داد. این نتایج نیز نشان‌دهنده کاربردهای زیست‌فناورانه عصاره مخمر در تولید تروپان‌آلکالوئیدها است.

اثر محرکی نیترات‌نقره، عصاره مخمر و کلسیم‌کلرید را در کشت ریشه‌های مویین گیاه *بروگمانزیا کاندیدا* (*Brugmansia candida*) بر تولید تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین را مورد بررسی قرار دادند. تیمار عصاره مخمر با غلظت ۰/۸گرم در لیتر در محیط کشت B_5 با غلظت نیم‌برابر موجب افزایش زیست‌توده و نیز غلظت تروپان‌آلکالوئیدها پس از ۴۸ساعت شد. همچنین در این تیمار نیز نشت اسکوپولامین بسیار بیشتر از گروه شاهد بود. نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین به‌طور معنی‌داری در

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار عصاره مخمر افزایش نشان داد. کلسیم به‌عنوان پیامبر ثانوی در پاسخ به محرک‌ها مطرح است. در غلظت‌های بالا، این عنصر می‌تواند فشار اسمزی را افزایش داده و در نتیجه به‌عنوان عامل تنش یا محرک غیرزیستی عمل کند[22].

سنتز اسیدرزمارینیک و ترکیبات فنولی در کشت ریشه موئین مریم گلی با اعمال عصاره مخمر و یون نقره تحریک شد[24]. افزایش بیش از ۱۱۳/۳% محتوای فنل کل در سلول‌های گون (*Astragalus chrysochlorus*) تیمارشده با عصاره مخمر نسبت به شاهد گزارش شده است[25]. افزودن عصاره مخمر به سوسپانسیون سلولی *لیتوسپرموم اریتروریزون* (*L. erythrorhizon*) به‌طور سریع و گذرا تجمع اسیدرزمارینیک را افزایش داد[26]. افزودن الیسیتور عصاره مخمر در گیاهان دیگر مانند چای نسمه (*Orthosiphon aristatus*) و حسن یوسف (*Coleus blumei*) تجمع اسید رزمارینیک را القا نمود[12].

در مطالعه اثر عصاره مخمر بر میزان تولید وین‌کریستین و وین‌بلاستین در گیاه پریوش (*C. roseus*) غلظت بهینه ۱/۵گرم در لیتر بیان شده است[12]. غلظت بهینه عصاره مخمر برای تحریک تولید ۵/۲۵ برابری اسیدژیمنمیک در گیمنما (*Gymnema sylvestre*) طی ۲۰ روز پس از کشت ۰/۵گرم در لیتر بود[27]. افزایش سه‌برابری تولید سیلیمارین به‌دنبال تیمار خارمریم (*Silybum marianum*) با عصاره مخمر گزارش شده است[28].

گیاهان برای کاستن از آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال دارای سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی شامل اجزای غیرآنزیمی مانند آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول، کاروتنوئیدها و فلاوونوئیدها و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز، گلوتاتیون‌ردوکتاز و پلی‌فنل‌اکسیداز هستند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز اغلب به‌عنوان نشانگر در بررسی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی استفاده می‌شوند و میزان فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش سطح تنش افزایش می‌یابد[29].

پاسخ گیاهان به پاتوژن‌ها به توانایی شناسایی الیسیتورها و راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی متنوع گیاهی شامل سنتز گونه‌های واکنشگر اکسیژن مولکولی، سنتز فیتوآلکسین‌ها، ترکیبات ثانوی ضدمیکروبی و دیگر عوامل دفاع طبیعی است. در گیاه فرفیون (*Euphorbia pekinensis*) افزایش فعالیت کاتالاز و سنتز آب‌اکسیژنه بعد از تیمار الیسیتور در بافت‌های کشت‌شده گزارش شده است.

افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه زنجبیل انبه‌ای (*Curcuma mangga*) تحت تاثیر عصاره مخمر به تجمع میزان بالای ترکیبات فنولی در بافت‌ها نسبت داده شد. ارتباط میان میزان تجمع ترکیبات فنولی با حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن قبلاً در گونه‌های مختلف زرشک گزارش شده است[30]. الیستورهای مختلف بسته به نوع، غلظت و نوع گیاه پاسخ‌های متفاوتی را ایجاد می‌نمایند. شایان ذکر است که در مطالعه حاضر در غلظت ۱/۵گرم در لیتر عصاره مخمر افزایش قابل توجه در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مشاهده نشد که احتمالاً این غلظت اثر القایی در تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن را نداشته و ممکن است به‌دلیل وجود ترکیباتی نظیر باقی‌مانده‌های پروتئینی و اولیگوساکاریدی و یون کلسیم، موجب تحریک آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز اسکوپولامین و هیوسیامین شده باشد.

امروزه تحقیقات گسترده‌ای در ارتباط با افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی با واسطه الیسیتورهای مختلف و بهینه‌سازی شرایط تولید در حال انجام است. با این حال مطالعات بیشتر به‌منظور شناسایی سازوکار عصاره مخمر در گیاه تاتوره می‌تواند در راستای تولید آلکالوئیدها در مقیاس وسیع برای کاربردهای دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم بررسی بیان ژن آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تروپان‌آلکالوئیدها از جمله پوترسین متیل ترانسفراز (PMT) و هیوسیامین‌بتاهیدروکسیلاز (H6H) است. پیشنهاد می‌شود بیان ژن آنزیم‌های مذکور مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

این بررسی اولین گزارش از تاثیر عصاره مخمر بر میزان تولید اسکوپولامین و هیوسیامین در گیاهچه‌های *تاتوره استرامونیوم* است. براساس نتایج، عصاره مخمر به‌طور قابل توجهی موجب افزایش وابسته به غلظت میزان وزن تر اندام هوایی و بخش ریشه گیاهچه‌ها و تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین شد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه مراغه اعلام می‌دارند.

تاییدیه‌اخلاقی: مقاله حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است. همچنین این مقاله در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است. نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار هستند و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان‌نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده شده ، رعایت کامل امانت انجام شده و مطابق مقررات، به تمامی آنها در فهرست منابع اشاره شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: پریسا فتحی‌رضایی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۷۰%)؛ المیرا راکعی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۳۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر منبع مالی نداشته است.

منابع

1- Vaillant N, Monnet F, Hitmi A, Sallanon H, Coudret A. Comparative study of responses in four Datura species to

www.SID.ir

Archive of SID

1976;72(1-2):248-54.
17- Aebi H. [13] Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
18- Chance B, Maehly AC. [136] Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 1955;2:764-75.
19- The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botani J Linnean Soc. 2009;161(2):105-21.
20- Nussbaumer P, Kapétanidis I, Christen P. Hairy roots of Datura candida× D. aurea: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. Plant cell Rep. 1998;17(5):405-9.
21- Zhao J, Zheng B, Li Y, Shan T, Mou Y, Lu S, et al. Enhancement of diepoxin ζ production by yeast extract and its fractions in liquid culture of Berkleasmium-like endophytic fungus Dzf12 from Dioscorea zingiberensis. Molecules. 2011;16(1):847-56.
22- Pitta–Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of Brugmansia candida. Enzyme Microb Technol. 2000;26(2-4):252-8.
23- Hong MLK, Bhatt A, Ping NS, Keng CL. Detection of elicitation effect on Hyoscyamus niger L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Roman Biotechnol Lett. 2012;17(3):7340-51.
24- Yan Q, Shi M, Ng J, Wu JY. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Salvia miltiorrhiza hairy roots. Plant Sci. 2006;170(4):853-8.
25- Cakir O, Ari S. Defensive and secondary metabolism in Astragalus chrysochlorus cell cultures, in response to yeast extract stressor. J Environ Biol. 2009;30(1):51-5.
26- Ogata A, Tsuruga A, Matsuno M, Mizukami H. Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. Plant Biotechnol. 2004;21(5):393-6.
27- Veerashree V, Anuradha CM, Kumar V. Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of Gymnema sylvestre R. Br. Plant Cell Tissue Org Cult. 2012;108(1):27-35.
28- Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of Silybum marianum (L.) Gaertn. J Biotechnol. 2005;119(1):60-9.
29- Agarwal S, Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in Cassia angustifolia. Biol Plantar. 2004;48(4):555-60.
30- Abraham F, Bhatt A, Keng CL, Indrayanto G, Sulaiman SF. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of Curcuma mangga in vitro plantlets. Afr J Biotechnol. 2011;10(40):7787-95.
a zinc stress. Chemosphere. 2005;59(7):1005-13.
2- Palazón J, Navarro-Ocaña A, Hernandez-Vazquez L, Mirjalili MH. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules. 2008;13(8):1722-42.
3- Hank H, László I, Bálványos I, Tóth E, Kursinszki L, Kovács G, et al. Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. Acta Hort. 2003;597:271-4.
4- Vernay P, Gauthier-Moussard C, Jean L, Bordas F, Faure O, Ledoigt G, et al. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in Datura innoxia. Chemosphere. 2008;72(5):763-71.
5- Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annu Rev Plant Biol. 2008;59:735-69.
6- Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in Hyoscyamus niger hairy root cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(17):6786-91.
7- Angelova Z, Georgiev S, Roos W. Elicitation of plants. Biotechnol Biotechnol Equip. 2006;20(2):72-83.
8- Chotikadachanarong K, Dheeranupattana S, Jatisatienr C, Wangkarn S, Mungkornasawakul P, Pyne SG, et al. Influence of salicylic acid on alkaloid production by root cultures of Stemona curtisii Hook. F. Curr Res
J Biol Sci. 2011;3(4):322-5.
9- Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of Datura stramonium. Phytochemistry. 1999;50(1):53-6.
10- Ajungla L, Patil P, Barmukh R, Nikam T. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of Datura metel L. Indian J Biotechnol. 2009;8:317-22.
11- Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacogn Rev. 2007;1(1):69-79.
12- Maqsood M, Abdul M. Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in Catharanthus roseus. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2017;27(5):549-56.
13- Tashakori H, Karimi F, Taghizadeh M. Plantlet regeneration of Datura innoxia by IAA and BA and improvement of Tropane Alkaloid contents in regenerated plantlets in response to Putrecine treatment. Iran J Biol. 2011;24(3):355-65. [Persian]
14- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K. Alkaloid production by hairy root cultures in Atropa belladonna. Plant Cell Rep. 1986;5(4):239-42.
15- Bahmanzadegan A, Sefidkon F, Sonboli A. Determination of Hyoscyamine and scopolamine in four Hyoscyamus species from Iran. Iran J Pharm Res. 2009;8(1):65-70.
16- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem.

www.SID.ir