مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تاثیر محرک متیل‌جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین تراریخت گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*)

مریم خردمند پروچ[1]، فرج‌الله شهریاری احمدی[2*]، نسرین مشتاقی[3]

[1]کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران.
[2]استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران.
[3]دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۱

چکیده

آلکالوییدهای پاراسمپاتیک آتروپین و اسکوپولامین در شابیزک (*Atropa belladonna*) تجمع می‌یابند و اهمیت زیادی در صنعت داروسازی دارند. در این تحقیق، با استفاده از نژاد A4 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین تراریخت در گیاه شابیزک تولید گردید. اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر میزان تولید آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخت به مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. سپس مقادیر دو آلکالویید تروپان، یعنی آتروپین و اسکوپولامین به وسیله‌ی روش HPLC اندازه‌گیری شد. مقدار آلکالوییدهای تروپان به طور معنی‌داری در ریشه‌های مویین افزایش یافت. نتایج نشان داد که مقدار آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخت به ترتیب از ۰/۱۲ به ۱/۷۱۵ و ۰/۰۱۹۵ به ۰/۴۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک رسید. متیل‌جاسمونات به طور چشمگیری هر دو آلکالویید تروپان، آتروپین و اسکوپولامین را افزایش داد. مقدار آلکالوییدهای تروپان در غلظت ۳۰۰ میکرومولار از متیل‌جاسمونات در مقایسه با غلظت ۱۵۰ میکرومولار و نمونه‌ی شاهد افزایش یافت. در نتیجه پیشنهاد می‌شود که ریشه‌های مویین می‌توانند به جای گیاهان به منظور مطالعات بیشتر و تولید آلکالوییدهای تروپان در ابعاد اقتصادی و تجاری استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: *آتروپین، اسکوپولامین، آگروباکتریوم، شابیزک، متیل‌جاسمونات.*

* نویسنده مسئول: فرج‌الله شهریاری احمدی تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۷۲۵ Email: shahriari@um.ac.ir

مقدمه

آلکالوییدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین به عنوان ترکیبات آنتی‌کلینرژیک (بازدارنده عملکرد استیل‌کولین) روی سیستم اعصاب پاراسمپاتیک عمل می‌کنند که منحصرا بوسیله‌ی خانواده سولاناسه نظیر *Atropa sp*، *Hyocyamus sp*، *Dubiosia sp*، *Datura sp* و *Scopolia sp* تولید می‌شوند (Mi Kang *et al.*, 2004). اسکوپولامین یکی از آلکالوئیدهای اولیه تخلیص شده از منابع گیاهی است که توسط آلبرت لادنبورگ (Albert Ladenburg) در سال ۱۸۸۰ توصیف شد و همچنین یکی از با ارزش‌ترین آلکالوئیدهای تروپانی است که تقاضای جهانی آن ۱۰ برابر بیشتر از مجموع هیوسیامین (پیش ساز آن) و آتروپین (داروی نیمه سنتتیک) می‌باشد (Moyano *et al.*, 2003). گیاه شابیزک (*Atropa belladona*) متعلق به خانواده سولاناسه است ویکی از منابع اصلی تولید آلکالوئیدهای تروپانی محسوب می‌شود. جنس آتروپا حاوی ۴ گونه‌ی *Atropa acuminate Royle*، *Atropa belladonna L.*، *Atropa baetica Wilk* و *Atropa pallidiflora Schönb-Tem* است که درمنطقه‌ی مدیترانه، جنوب اروپا و آسیا پراکنده هستند (Maqbool *et al.*, 2014). ریشه‌های مویین القا شده به وسیله‌ی آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) یک روش کارآمد جهت تولید ریشه‌های تراریخت فراهم می‌کند که تولید و ذخیره‌سازی متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌های نوترکیب و همچنین مطالعات مربوط به بیان و فعال‌سازی پروموتور و ژن را امکانپذیر می‌نماید (Harfi *et al.*, 2015)، علاوه بر آن مهمترین مزیت ریشه‌های مویین در توانایی آن‌ها برای تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با گیاه مادری است. بسیاری از متابولیت-های ثانویه‌ی با ارزش در شرایط طبیعی در ریشه تولید می‌شوند و اغلب در ارتباط با تمایز ریشه هستند. در برخی موارد ممکن است متابولیت‌های ثانویه فقط در بخش‌های هوایی یک گیاه تولید و تجمع یابند اما با القای ریشه‌های مویین و بررسی آن‌ها مشخص شده است که قادر به تولید و تجمع آن متابولیت‌ها هستند به عنوان مثال آرتیمیزین فقط در بخش‌های هوایی گیاه *Artemisia annua* تولید و تجمع می‌یابد در چندین بررسی مشخص شده است که ریشه‌های مویین القاء شده در این گیاه قادر به تولید آرتیمیزین هستند (Kim *et al.*, 2001). همچنین این ریشه‌ها حاوی آنزیم‌های متنوعی بوده که انواعی از فرآیندهایی نظیر گلوکوزیلاسیون و احیا را با استفاده از مواد موجود در محیط کشت به عنوان سوبسترا انجام می‌دهند. از این ویژگی برای تولید وسیع و پایدار مواد دارویی گرانقیمت با افزودن ترکیباتی با قیمت پایین‌تر به محیط کشت استفاده شده که موجب صرفه‌جویی در هزینه‌ی تولید دارو شده است (Banerjee *et al.*, 2012). در پژوهشی Norouzi *et al* (2016) گزارش کردند که مقدار تولید متابولیت ثانویه‌ی رزمارینک‌اسید در کشت ریشه‌های مویین مریم گلی اصفهانی

(*Salvia reuterana*) برابر ۵۲/۲ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک بود. همچنان که محتوای آتروپین در ریشه‌های مویین تیمار شده گیاه *Datura metal* با نانوذرات نقره ۱/۱۴۷، ۱/۱۱۷ و ۲/۴۲ برابر در مقایسه با نمونه‌های شاهد (۰/۱۱۶ ٪، ۰/۱۱۹٪ و ۰/۱۰۷٪) به ترتیب بعد از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار افزایش یافت (Shakeran *et al*., 2015). مشخص شده است که با اضافه کردن اسید جاسمونیک و مشتقات آن مانند متیل‌جاسمونات به کشت سلول‌های گیاهی و یا گیاهان کامل موجب تحریک تولید مقدار زیادی از متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Kuzma *et al*., 2009). مقدار ماده‌ی ضد التهابی asiaticoside (اسیاتیکوساید) در تیمار با ۰/۱ میلی‌مولار محرک متیل جاسمونات در محیط کشت ریشه‌های مویین گیاه *Centella asiatica* (L.) به مدت سه هفته به مقدار زیادی (۷/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) افزایش یافت. همچنین بیان ژن *CabAS* (β-amyrin synthase) در ریشه‌های مویین پس از ۱۲ ساعت تیمار با متیل‌جاسمونات به طور معنی‌داری متفاوت از نمونه‌ی شاهد بود (Kim *et al*., 2007). در این تحقیق، ریشه‌های مویین تراریخت از ریزنمونه-های برگ گیاه دارویی شابیزک (*Atropa belladonna*) با استفاده از نژاد A4 آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) تولید شد و در بخش دیگر این تحقیق سعی شده است اثر غلظت‌های مختلف محرک متیل‌جاسمونات بر میزان تولید آلکالوییدهای تروپانی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

بذور گیاه شابیزک از سازمان جنگل ها و مراتع تهران تهیه شد. جهت رفع خواب بذر از اسید جیبرلیک[۱] (ساخت شرکت کانادایی Merck) با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. برای ضدعفونی بذور از الکل ۷۰ درصد (شرکت Merck) و هیپوکلریت سدیم[۲] (ساخت شرکت ایرانی پاکسان) یک درصد به ترتیب به مدت یک دقیقه و بیست دقیقه استفاده شد و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور ضد عفونی شده در محیط کشت آب-آگار کشت شده و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵درجه‌ی سانتیگراد برای جوانه زنی نگهداری شدند. بذور بعد از حدود چهار روز جوانه زده و به محیط کشت MS[۳] بدون هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (شرکت Merck) و ۸ گرم در لیتر آگار (شرکت Merck) با pH حدود ۵/۷ انتقال یافته و بعد از آن گیاهچه‌های استریل ۳ هفته‌ای بدست آمد. باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز نژاد A4 که از آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید در محیط کشت مایع LB[۴] کشت شده و بر روی شیکر (ساخت شرکت انگلیسی Stuart) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت.

[۱] Gibberellic acid

[۲] Sodium hypochlorite

[۳] Murash& Skoog (1962)

[۴] Luria Bertini

در مرحله‌ی بعدی به منظور تلقیح، محیط کشت باکتری به فالکون‌های استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (ساخت شرکت آلمانی Sigma) شد. نهایتاً محلول رویی بیرون ریخته شده و به آن محیط کشت مایع MS استریل اضافه شده و بلافاصله ورتکس (ساخت شرکت ایرانی MX-cell) گردید. سوسپانسیون باکتری با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری به رگبرگ برگ‌های استریل تزریق شد. سپس برگ‌های تلقیح شده به محیط کشت جامد B5 انتقال داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت هم کشتی انجام شد. سپس ریز نمونه‌ها با آب مقطر استریل حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (ساخت شرکت داروسازی جابرابن حیان) شستشو داده شدند و دوباره به محیط کشت جامد B5 حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم انتقال یافتند. ریشه-های مویین پس از ظهور (حدود ۳ هفته بعد) مدتی در محیط کشت جامد باقی ماندند تا به حد کافی از رشد برسند (حدود ۲ الی ۳ سانتی‌متر). سپس هر کلون ریشه مویین از محل رویش روی برگ جدا شده و به محیط کشت مایع B5 $\frac{1}{2}$ با سه تکرار منتقل شدند. ارلن‌ها بر روی شیکر (ساخت شرکت آلمانی Memmert) با ۹۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. برای تایید انتقال ناحیه‌ی T-DNAی آگروباکتریوم رایزوژنز به ریشه‌های مویین، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر یکی از ژن‌های موجود در این ناحیه یعنی ژن rolB استفاده شد. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی که برای تکثیر قطعه‌ی ۷۷۹ جفت بازی ژن rolB استفاده شد شامل آغازگر رفت با توالی 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCC ACGA-3' و آغازگر برگشتی با توالی 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTG CAGC-3' بود. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به این صورت انجام شد که، واسرشت اولیه‌ی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و سنتز رشته‌ی جدید در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه-ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Sedira *et al.*, 2001). پس از یک ماه که ریشه‌های مویین به حداکثر رشد خود رسیدند، جهت اعمال تیمار محرک متیل‌جاسمونات (شرکت Merck) استفاده شدند. از مقادیر هم وزن از ریشه‌های مویین (۲ گرم) در محیط کشت مایع B5 $\frac{1}{2}$ بدون هورمون در ۳ سطح ۰، ۱۵۰و ۳۰۰ میکرو مولار جهت اعمال محرک متیل‌جاسمونات استفاده شدند. سپس روی شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از اعمال محرک، ریشه‌ها جمع آوری شده و توسط آب مقطر شستشو داده شدند و پس از انجماد خشک[5] به منظور استخراج

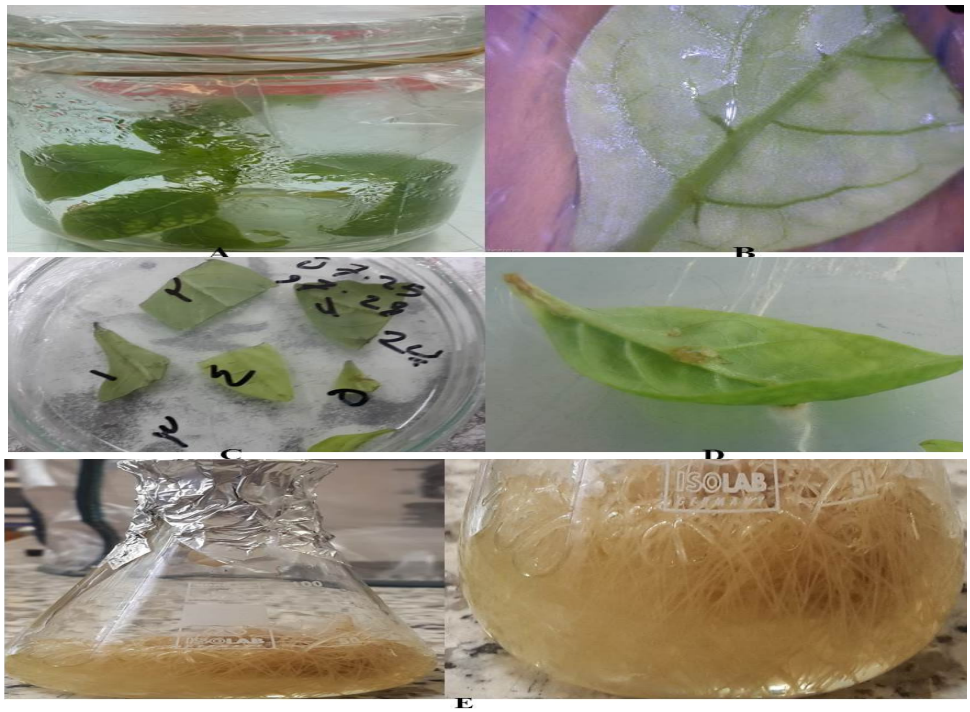
[5] Freezdry

آلکالوئید در فریزر منفی ۸۰ (ساخت شرکت کره-ای IIshin) نگهداری شدند. جهت استخراج آلکالوئید از ریشه‌های مویین گیاه شابیزک ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر ریشه‌ی مویین با ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ (شرکت Merck) درصد سائیده شده و به مدت ۱۵ ساعت در شرایط رفلاکس (تقطیر برگشتی) قرار گرفتند. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی (واتمن ۱) فیلتر شده و توسط دستگاه Rotary evaporate (شرکت ژاپنی National) خشک شد. به بقایای عصاره خشک شده، ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط حاصل از مقادیر مساوی اسید سولفوریک (شرکت Merck) پنج درصد (v/v) و دی اتیل اتر (شرکت Merck) اضافه شد. فاز آبی جمع آوری شده و pH آن به وسیله سود (شرکت Merck) ۱۰ نرمال تا حدود ۱۰ بالا برده شد. به مخلوط حاصل ۶۰ میلی‌لیتر کلروفرم (شرکت Merck) در ۳ مرحله اضافه شد و فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئیدها توسط دستگاه Rotary evaporate خشک شد و باقیمانده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل شد و جهت HPLC استفاده گردید. (Ahmadian Chashmi *et al*., 2010). برای جداسازی و اندازه‌گیری میزان آلکالوئیدهای تروپان از دستگاه HPLC به مدل Waters، در پژوهشکده‌ی گیاهان دارویی کرج شامل ستون Teknokroma-C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۰/۴۶ سانتی‌متر، پمپ WATERS-600E، سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه، فاز متحرک بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار(pH= 3) استونیتریل (۲۰-۵۰) استفاده شد. در این آزمایش برای مقایسه‌ی میزان آتروپین و اسکوپولامین در ریشه-های نرمال و تراریخت آزمون T با دو تکرار در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و همچنین به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف محرک متیل‌جاسمونات آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تکرار انجام شد. برای محاسبات آماری از نرم افزار JMP نسخه‌ی ۸ استفاده شد و مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید. رسم نمودار نیز از طریق نرم‌افزار Excel 2010 صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از گذشت دو هفته از هم کشتی همانطور که در شکل ۱ (D)، نشان داده شده علایم اولیه کالوس و ریشه‌ی مویین از محل صدمه دیده ظاهر و کلون‌های ریشه‌ی مویین به فاصله ۲ تا ۴ روز ظاهر شدند. در بررسی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین از واکنش PCR استفاده شد و محصول PCR حاصل از تکثیر این ژن‌ها بر روی ژل آگارز (شرکت Merck)، اندازه قطعه‌ی مورد انتظار (شکل۲) برای ژن rolB یعنی ۷۷۹ جفت بازی را نشان دادند. مقایسه‌ی مقدار تولید آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های طبیعی نشان داد که تفاوت معنی داری از نظر تولید ماده‌ی آتروپین و اسکوپولامین وجود دارد. در جداول ۱و ۲ مقدار آتروپین و اسکوپولامین به ترتیب در ریشه‌های طبیعی برابر با ۰/۱۲ و ۰/۰۱۹۵ میلی‌گرم در

۱۰۰میلی‌گرم وزن خشک بود که این مقدار در ریشه‌های مویین تراریخت به ترتیب به ۱/۷۱۵ و ۰/۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰میلی‌گرم وزن خشک رسید.

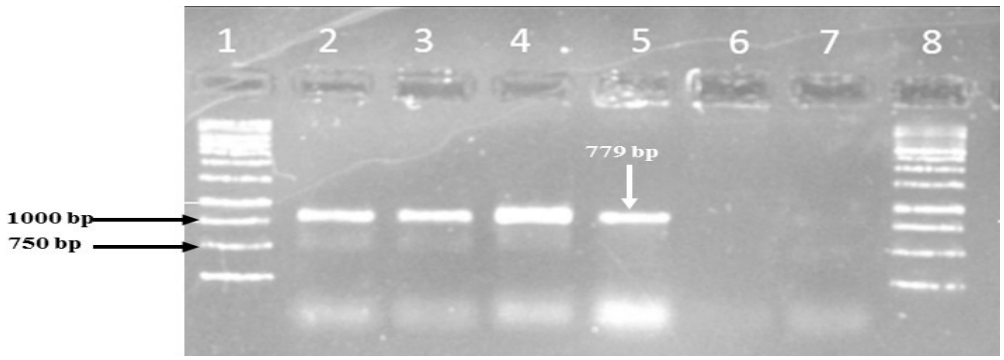


شکل ۱- A) گیاهچه‌ی این‌ویترو، B) ریز نمونه برگ، C) ریز نمونه‌های تلقیح شده، D) ظهور ریشه‌ی مویین، E) استقرار ریشه‌های مویین در محیط مایع.

Figure 1- A) Invitro plantlets, B) Leaf Explant, C) Inoculated explants, D) Emergencing of hairy roots E) Establishment of hairy roots in liquid medium.

بررسی تولید آلکالوییدهای تروپان در ریشه-های مویین گیاه شابیزک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۱۵۰و ۳۰۰ میکرومولار) نشان داد که تولید آتروپین و اسکوپولامین در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌ی شاهد به طور چشمگیری افزایش یافت. به طوری که در حضور ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، مقدار آتروپین این ریشه‌ها به ترتیب به ۴/۳۹ و ۵/۴۵۵ میلی‌گرم در ۱۰۰میلی‌گرم وزن خشک رسید که نسبت به نمونه‌ی شاهد که مقدار آتروپین آن برابر ۱/۷۱۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک بود حدود ۱/۵ و ۲/۱ افزایش یافت. همچنین میزان تولید اسکوپولامین در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌ی شاهد افزایش یافت به طوری که در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار به ۰/۲۶ و ۰/۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک رسید که نسبت به نمونه‌ی شاهد که ۰/۱۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن

خشک بود به ترتیب حدود ۱/۱۶ و ۱/۷۵ افزایش
داشت.



شکل ۲- نتایج PCR ژن rolB آگروباکتریوم رایزوژنز، (۱و۸) سایز مارکر kb ۱، (۲) باند DNA تکثیر شده‌ی آگروباکتریوم رایزوژنز (کنترل مثبت)، (۳، ۴و ۵) باند DNA تکثیر شده از ریشه‌های مویین، (۶) ریشه طبیعی و (۷) آب (کنترل منفی).

Figure 2- PCR analysis of rolB gene of *A. rhizogenes* , (1, 8) 1 kb DNA Ladder, (2) Amplified band in A. rhizogenes , (positive control), (3, 4, 5) Amplified band from the DNA of hairy roots, (6) Normal root and (7) Water (Negative control).

جدول۱- مقایسه‌ی میزان آتروپین در ریشه‌های طبیعی و تراریخت.

Table 1- Comparison of Atropin contents in normal roots and transformed hairy roots ($P \leq 0.05$).

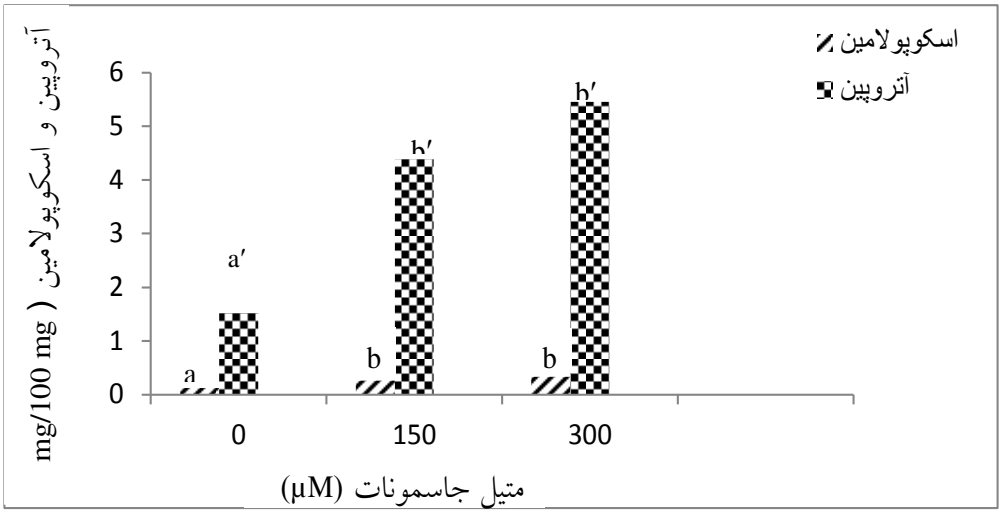
Prob > |t|	خطای استاندارد Standard Error	مقدارآلکالوئید (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک) Alkaloid content (mg/100mg of dry weight)	نوع ریشه Kind of root
0.0100*	0.025	1.715	آتروپین ریشه‌های تراریخت Atropin in transformed hairy roots
	0.025	0.12	آتروپین در ریشه‌های طبیعی Atropin in normal roots

جدول ۲- مقایسه میزان اسکوپولامین در ریشه‌های نرمال و تراریخت .

Table 2- Comparison of Scopolamine contents in normal roots and transformed hairy roots ($P \leq 0.05$).

Prob > |t|	خطای استاندارد Standard Error	مقدارآلکالوئید (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک) Alkaloid content (mg/100mg of dry weight)	نوع ریشه Kind of root
0.0147*	0.0095	0.43	اسکوپولامین ریشه‌های تراریخت Scopolamine in transformed roots
	0.0095	0.0195	اسکوپولامین ریشه‌های طبیعی Scopolamine in normal roots

اگرچه میزان آلکالوییدهای تروپانی در غلظت ۳۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات نسبت به غلظت ۱۵۰ میکرومولار افزایش می‌یابد اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (شکل۳). ریشه‌های مویین حاصل از گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*) با رشد سریع و تولید قابل اطمینان آلکالوییدهای تروپان همراه است و شهرت آن‌ها به خاطر تولید بالای متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Bensaddek *et al.*, 2000) در تحقیق حاضر نیز آلکالوییدهای تروپانی تولیدی توسط ریشه‌های مویین بیشتر از ریشه‌های طبیعی گیاه شابیزک است همچنین افزودن محرک‌ها به محیط کشت سلول‌های گیاهی از روش‌های رایج برای بالا بردن متابولیسم ثانویه می‌باشد. اسید جاسمونیک و مشتق فرار آن یعنی متیل-جاسمونات که جمعاً با هم جاسمونات‌ها خوانده می‌شوند از هورمون‌های تنش گیاهی هستند که به عنوان تنظیم کنندهای پاسخ دفاعی عمل می‌کنند. القاء انباشتگی متابولیت ثانویه یک پاسخ تنشی مهمی است که وابسته به جاسمونات‌ها به عنوان علامت تنظیمی است (Memelink *et al.*, 2011). در تحقیقی که بر روی تولید اسیدرزمارینک در کشت ریشه‌ی مویین گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) انجام شده است، مقدار این ماده‌ی آنتی اکسیدان در ریشه‌های مویین تراریخت ۳ برابر ریشه‌های غیر تراریخت گزارش شده است (Bais *et al.*, 2002). برجسته‌ترین مثال افزایش متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین تراریخت گیاه *Vitis amurensis* گزارش شد که منجر به افزایش ۱۰۰برابری تولید ماده‌ی ضدسرطان رسوراترول (resveratrol) شد (Kiselev *et al.*, 2007). القای ریشه‌ی مویین در گیاه *Hyoscyamus muticus* موجب تولید کلونی کالوس‌زا باقابلیت تولید اسکوپولامین بالا (۲/۷۲ میلی‌گرم برگرم) شد، به نحوی که این میزان برای ریشه‌های مویین این گیاه چشم‌گیر بود (Zolala, 2002). در تحقیقی که بر روی تولید سولاسودین در کشت ریشه‌ی مویین گیاه *Solanum trilobatum* L انجام شد. مشاهده شد که مقدار این آلکالویید در ریشه‌های مویین تراریخت به ۳/۳ برابر ریشه‌های غیر تراریخت رسید. همچنین با اضافه کردن ۴ میکرومولار محرک متیل-جاسمونات به مدت دو هفته به محیط کشت تولید این ماده نسبت به نمونه شاهد و ریشه‌های غیرتراریخت به ترتیب به ۱/۹ و ۶/۵ برابر افزایش یافت (Shilpha *et al.*, 2015). در بررسی که به منظور مقایسه‌ی تأثیر محرک‌های متیل‌جاسمونات، عصاره‌ی مخمر و الیگوگالاکتورونیدها برانباشتگی آلکالوئیدهای لیتورین، هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین گیاه *Datura stramonium* انجام شد، نتیجه گرفتند که در حضور محرک متیل‌جاسمونات بیش از عصاره مخمر و الیگوگالاکتورونید (متیل‌جاسمونات>عصاره مخمر>الیگوگالاکتورونید) تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین این گیاه افزایش می-یابد (Zabetaki et al., 1999).



شکل۳- مقایسه میانگین میزان آتروپین و اسکوپولامین بعد از تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی-دار بین میانگین‌هاست. (حروف a و b برای اسکوپولامین و حروف a′، b′ برای آتروپین).

Figure 3- The mean comparison of Atropine and Scopolamine contents after treating by different concentrations of methyjasmonate. Different letters show significant differences between the means (P ≤ 0.01). (a and b letters for Scopolamine and a′ and b′ for Atropine).

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به آتروپین.

Table 3- Variance analysis for Atropin.

منابع تغییرات SOV	درجه‌آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares
غلظت concentration	2	7.425**
خطا Error	3	0.2337
کل Total	5	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪. Significant difference at 1% level respectively.

جدول ۴- تجزیه‌ی واریانس برای اسکوپولامین

Table 4- Variance analysis for Scopolamine.

منابع تغییرات SOV	درجه‌آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
غلظت concentration	2	0.0229**
خطا Error	3	0.0002
کل Total	5	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪. Significant difference at 1% level respectively.

در پژوهشی Mehrabani *et al.* (2013) اثرغلظت‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر کشت کالوس گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahi) به منظور افزایش فنول کل مورد بررسی قرار دادند. بیشترین میزان فنول مربوط به تیمار ۱۰ میکرو-مولار متیل‌جاسمونات، برابر ۰/۸۱ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بود.محتوی تروپینون، تروپین و سودوتروپین در گیاه *Datura stramonium* در تیمار با 10^{-7} و 10^{-6} مولار متیل جاسمونات افزایش یافت(Deng,2005) . بیشترین مقدار اسکوپولامین (بیش از ۱۰۰٪ در مقایسه با نمونه شاهد) بعد از ۴۸ ساعت و هیوسیامین (بیش از ۷۰۰٪) بعد از ۱۲ ساعت در تیمار با غلظت دو میلی‌مولار متیل‌جاسمونات در کشت ریشه‌های نابجای گیاه *Scopolia parviflora* بدست آمد. غلظت یک میلی‌مولار متیل-جاسمونات نیز محتوای اسکوپولامین و هیوسیامین افزایش داد اما مقدار آن کمتر از غلظت دو میلی‌مولار بود (Mi Kang *et al.*, 2004). در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Salvia miltiorrhiza* مقدار رزمارینیک اسید و لیتوسپرمیک اسید در تیمار با ۰/۱ میلی‌مولار محرک متیل‌جاسمونات به طور چشم‌گیری به ترتیب تقریبا از ۳/۲۵ به ۶/۰۲ درصد ۲/۹۲ و ۱۹/۳ درصد وزن خشک افزایش یافت (Xiao *et al.*, 2009) تولید آرتیمیزین (Artemisinin) در ریشه‌های مویین *Artemisia annua* L در تیمار با ۰/۲ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مخمر به ترتیب ۱/۵ و ۰/۲ میکروگرم در میلی‌گرم وزن خشک افزایش یافت (Putalun *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر نیز در ریشه‌های مویین گیاه شابیزک تولید آتروپین و اسکوپولامین در حضور متیل جاسمونات بیشتر از تیمار شاهد است. با توجه به اینکه مقدار تولید آلکالوییدهای تروپانی در ریشه‌های مویین تراریخت نسبت به ریشه‌های طبیعی اختلاف معنی‌داری داشت و همچنین کاربرد محرک متیل-جاسمونات در این زمینه موثر بوده است می‌توان نتیجه گرفت که تولید ریشه‌های مویین به همراه کاربرد محرک‌ها برای تولید متابولیت‌های با ارزش از جمله آلکالوییدهای تروپانی در ابعاد وسیع قابل توجه می باشد.

منابع

Ahmadian Chashami N, Sharifi M, Karimi F, Rahnama H (2010). Differential Production of Tropane Alkaloids in Hairy Roots and in vitro Cultured Two Accessions of Atropa belladonna L. under Nitrate Treatments. Plant Biology 2: 67-73.

Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco J.M (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of Ocimum basilicum. Plant Physiology and Biochemistry 40: 983-995.

Banerjee S, Singh S, Rahman LU (2012). Biotransformation studies using hairy root cultures — A review. Biotechnology Advances 30: 461-468.

Bensaddek L, Gillet F, Edmundo J, Saucedo N, Fliniaux MA (2001). The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of Atropa belladonna hairy roots. Journal of Biotechnology 85: 35-40.

Deng F (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (Datura stramonium L.). Pesticide Biochemistry and Physiology 82: 16-26.

Harfi B, Khelifi-Slaoui M, Bekhouche M, Benyammi R, Hefferon K, Makhzoum A, Khelifi L (2015). Hyoscyamine production in hairy roots of three Datura species exposed to high-salt medium. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 52:92-98.

Kim OT, Bang KH, Shin YS, Lee MJ, Jung SJ, Hyun DK, Kim YC, Seong NS, Cha SW, Hwang B (2007). Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of Centella asiatica (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. Plant Cell Reproduction 26:1941–1949.

Kim Y, Wyslouzil B, Weathers P (2001) Secondary of hairy metabolism root cultures in bioreactors- A review. In Vitro Cellular and Developmental. Biology-Plant 38: 1–10.

Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, Bulgakov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in Vitis amurensis transformed cells. Biotechnology 128: 681–92.

Kuzma L, Bruchajzer E, Wysokińska H (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in Salvia sclarea hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. Enzyme and Microbial Technology 44: 406-410.

Maqbool F, Singh S, AKaloo Z, Jan M (2014). Medicinal importance of Genus Atropa Royle -A review. Advanced Research 2: 48-54.

Mehrabani B, Nazeri S, Piri Kh (2013). Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 77-88.

Memelink J, Verpoorte R, W. Kijne J (2001). ORCAnization of jasmonateresponsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science 5: 212-218.

Mi Kang S, Young Jonh H, Min Kang Y, Jin Yun D, Dong Bahk J, kyung Yang J, Suk Choi, M (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: 745-751.

Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P, Palazon J, Cusido R M, Pinol M T, Oksman-Caldentey K M (2003). Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of Datura metel and Hyoscyamus muticus. Experimental Botany 54: 203-211.

Norouzi R, Babalar M**,** Mirmasoumi M, Hadian J (2016). Production of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia reuterana.* Journal of Agricultural Biotechnology 1: 126-138.

Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of Artemisia annua L. Biotechnology Letter 29:1143–1146.

Sedira M, Holefors A, Welander M (2001). Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the rolB gene and its influence on rooting. Plant Cell Reports 20: 517-524.

Shilpha J, Satish L, Kavikkuil M, Joe Virgin Largia M, Ramesh M (2015). Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti-oxidant activity in hairy root cultures of Solanum trilobatum L. Industrial Crops and Products 71: 54–64.

Shakeran Z, Keyhanfar M, Asghari G, Ghanadian M (2015). Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of Datura metel. Biology 39: 111-118.

Xiao Y, Gao Sh, Di P, Chen J, Chen W, Zhang L (2009). Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures Physiologia Plantarum 137: 1–9.

Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of Datura stramonium. Phytochemistry 50: 53-56.

Zolala J (2002). Evaluation of growth characteris of hairy root produced by inoculation of Rhizobium from rhizogenes family in Hyoscyamus muticus plant. Msc. Thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

The effect of methyljasmonate elicitor on tropan alkaloid production in hairy roots of *Atropa belladonna*

Kheradmand Prouch M. [1], **Shahriari Ahmadi F.*** [2], **Moshtaghi N.** [3]

[1] MSc of Agricultural Biotechnology, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.
[2] Professor, Biotechnology and plant Breeding Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3] Associate Professor Biotechnology and plant Breeding Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.

Abstract

The parasympatholytic tropane alkaloids, Atropine and Scopolamine, accumulated in *Atropa belladonna*, are of great interest for the pharmaceutical industry. In this research, *Atropa belladonna* transformed hairy roots were produced by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 mediated transformation. Effects of different concentrations of methyl jasmonate (0, 150 and 300 Micro molar) were investigated on production of Atropine and Scopolamine in 24 hours treatment. Then the contents of two tropane alkaloids, Atropine and Scopolamine, were assayed by HPLC method. The tropane alkaloids contents were shown to be significantly increased in transformed hairy roots. Results showed Atropine and Scopolamine content in transformed hairy roots reached respectively from 0.12 to 1.715 and 0.0195 to 0.43 of mg in 100 mg of dry weight. Methyl jasmonate dramatically enhanced both tropane alkaloids, Atropine and Scopolamine. Tropane alkaloids content increased in 300 Mμ concentration of methyl jasmonat in comparison with 150 Mμ concentration and control treatment. In conclusion, it is suggested that, hairy root can be used as a replacement of plants in further studies and for tropane alkaloids production in economical and commercial scales.

Keywords*: Atropin, Scopolamine, Agrobacterium, Atropa belladonna, Methyl jasmonate.*

* Corresponding Author: Shahriari Ahmadi F. Tel: +985138805725 Email: shahriari@um.ac.ir