تاثیر الیسیتورهای جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Hyoscyamus niger* L.

میترا پارسا* و امینه زینالی

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، گروه فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۴

چکیده

تروپان آلکالوئیدها نقش حیاتی در کنترل بیماری‌هایی مانند شوک سپتیک دارند. در این پژوهش، تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار و در تیمارهای زمانی ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت بر میزان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه مویین بررسی شد. ریشه‌ها در محیط کشت مایع B_5 حاوی ۱ میکرومولار هورمون IBA کشت و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۳۰ روز، شاخص رشد ریشه‌ها و محتوای تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت تحت تیمار با استفاده از HPLC سنجش و مقایسه شدند. بالاترین مقدار آتروپین (۱۸۱/۷۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) و اسکوپولامین (۹۶/۶۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در ریشه‌های مویین تحت تیمار غلظت ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات (پس از ۹۶ ساعت) مشاهده شد، در حالی که بیشترین مقدار این متابولیت‌ها (۶۸/۶۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در تیمار غلظت ۲ میلی‌مولار جاسمونیک اسید پس از ۹۶ ساعت مشاهده شد. در ریشه‌های حاصل از کشت بافت، تیمار غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات (پس از ۹۶ ساعت) موجب تولید بیشترین مقدار آتروپین (۷۵/۷۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) و اسکوپولامین (۷۷/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) شد، در حالی که بیشترین مقدار این متابولیت‌ها در تیمار جاسمونیک اسید در غلظت ۴ میلی مولا ر و پس از گذشت ۲۴ ساعت (۵۵/۱۵ میکروگرم آتروپین بر گرم وزن خشک ریشه) و ۹۶ ساعت (۴۹۹/۳ میکروگرم اسکوپولامین بر گرم وزن خشک ریشه) مشاهده شد. به‌طور کلی، نسبت آتروپین به اسکوپولامین در ریشه‌های مویین بیشتر بود، در حالی‌که در ریشه‌های حاصل از کشت بافت نسبت اسکوپولامین به آتروپین بیشتر بود. همچنین رشد ریشه‌ها در تیمار با الیسیتورهای مورد بررسی با افزایش غلظت، کاهش یافت.

واژه های کلیدی: *Hyoscyamus niger*، الیسیتور، جاسمونیک اسید، متیل جاسمونات، ریشه مویین، کشت بافت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۴۳۱۹۳۳ ، پست الکترونیکی: mitraprs@yahoo.com

مقدمه

گیاهان طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که علاوه بر نقش مهم آنها در واکنش‌های دفاعی گیاهان، تقابل با میکروارگانیسم‌ها و گرده‌افشانی، در صنایع غذایی، دارویی و عطر نیزکاربرد فراوان دارند (۳۹). تروپان آلکالوئیدها از جمله آتروپین واسکوپولامین ترکیبات آلی استخراج شده از گیاهان می‌باشند که در ساختار شیمیایی خود، حلقه تروپان داشته و در گروه متابولیت‌های ثانویه قرار دارند. این ترکیبات در برخی از گیاهان خانواده سیب زمینی از جمله جنس‌های *Atropa, Brugmansia, Datura, Duboisia, Hyoscyamus* و *Scopolia* (۱۸ و ۱۹) و همچنین گونه‌هایی از سایر خانواده‌های گیاهی مانند Proteaceae, Convolvulaceae, Erythroxylaceae و

Rhizophoraceae وجود داشته و به دلیل حضور این آلکالوئیدها، خاصیت دارویی دارند (۱۲ و ۱۴). *Hyoscyamus niger* نیز گیاهی علفی از خانواده سیب زمینی است که پراکنش وسیعی در نیم‌کره شمالی از جمله اروپا، ترکیه، روسیه، قفقاز، آسیای میانه، سیبری، افغانستان، پاکستان، عراق و شمال آفریقا و در ایران در نواحی شمال، شمال غرب، غرب، مرکز، شمال شرق و شرق کشور دارد (۴) و به لحاظ داشتن تروپان آلکالوئیدها از دیرباز در طب سنتی مورد توجه قرار گرفته است. آتروپین و اسکوپولامین از نظر دارویی از تروپان آلکالوئیدهای مهم هستند که به دلیل تاثیر برسیستم اعصاب مرکزی و فعالیت‌های آنتی کلینرژیک در زمینه‌های گوناگون مانند بیماری‌های چشم، قلب، معده، روده مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان داروی مهارکننده اعصاب پاراسمپاتیک کاربرد دارند (۱، ۷، ۱۲ و ۲۸).

در بسیاری از موارد، مقدار تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه گیاهان رشد یافته در طبیعت، برای تجاری سازی بسیار پایین می‌باشد، لذا امروزه از روش‌های جایگزین مانند سنتز شیمیایی، هیبریداسیون بین گونه‌ای، کشت سلولی، کشت ریشه از طریق کشت بافت و کشت ریشه‌های مویین استفاده می‌شود (۲۰). استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در شرایط این ویترو (in vitro) این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام گیرد (۳۲ و ۳۸). کشت ریشه علاوه بر نیاز به یک منبع فیتوهورمونی خارجی، رشد کندی هم دارند که این امر منجر به سنتزکم متابولیت‌های ثانویه می‌شود. اما در این نوع کشت‌ها می‌توان متابولیت‌های ثانویه بیشتری نسبت به ریشه طبیعی گیاه تولید نمود. کشت ریشه مویین به دلیل عدم نیاز به فیتوهورمون‌ها،پایداری، تولید بالا، رشد سریع، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه می‌تواند به عنوان یک منبع مهم و دایمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد (۱۱).

با توجه به اینکه در اغلب موارد، تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی راهکار مناسبی جهت افزایش مقدار این ترکیبات در کشت ریشه از طریق کشت بافت و ریشه مویین است. بررسی‌ها نشان داده است که الیسیتورها علاوه بر پاسخ‌های دفاعی، توانایی القای تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه نظیر تروپان آلکالوئیدها را دارند (۲۴، ۲۷ و ۴۳). جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات مولکول‌های علامت‌رسان و تنظیم‌کننده‌های درونی رشد گیاه هستند که نقش کلیدی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. این ترکیبات با اثر بر گیرنده‌های غشای گیاه و فعال سازی ژن‌های خاص، موجب سنتز بسیاری از ترکیبات دفاعی مانند پلی فنل‌ها، آلکالوئیدها و پروتئین‌های وابسته به میکروب‌های بیماری‌زا می‌شوند (۵، ۲۲ و ۴۱).

در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر شاخص رشد و مقدار تروپان آلکالوئیدهای آتروپین واسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه‌های مویین گیاه *Hyoscyamus niger* مقایسه و ارزیابی گردید.

مواد و روشها

تهیه قطعات جداکشت: بذرهای گیاه *H. niger* L. از اطراف شاهی جان پیرکوه از شهر سیاهکل استان گیلان جمع آوری شدند. بذرها پس از ضدعفونی با اتانول ۹۶٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس محلول هیپوکلریت سدیم (حاوی ۱ ٪v/v کلر فعال) به همراه دو قطره توئین ۸۰ به مدت ۵ دقیقه، با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور تسریع در جوانه‌زنی بذرها با اسید جیبرلیک در غلظت ۲۰۰ppm به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند (۹). بذرهای گیاه جهت جوانه‌زنی در محیط کشت MS (Murashige and Skoog) (۲۶) فاقد هورمون، کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در شرایط تاریکی و به مدت ۲ هفته نگه‌داری شدند (۲ و ۳).

تولید ریشه‌های انبوه از گیاه *H. niger* L. : ریشه‌های نوپدید حاصل از بذرها با طول ۱۰-۵ میلی‌متر، جدا و در محیط کشت مایع B_5 (۱۷) حاوی ۱ میکرومولار هورمون IBA کشت داده شد. کشت‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز نگه‌داری شدند (۲ و ۱۸).

ریشه‌های مویین نیز از تلقیح قطعات برگ با اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 و مطابق روش پارسا و همکاران (۲) حاصل شد. برای تایید تراریخته بودن ریشه‌های مویین، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rolB* و *rolC* انجام شد (۲).

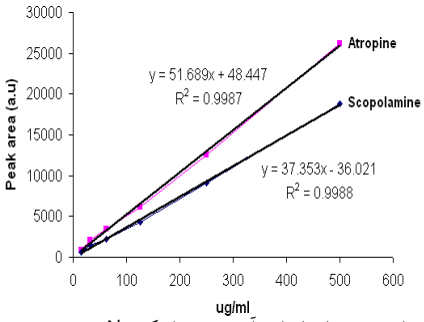
تعیین شاخص رشد ریشه: شاخص رشد برای هر یک از تیمارها در زمان‌های مختلف (۰، ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت)، به روش زیر محاسبه شد:

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

تیمار با الیسیتور: پس از گذشت ۳۰ روز، ۲ گرم از ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت به طور جداگانه به محیط کشت B_5 حاوی الیسیتورهای متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید، هر یک در غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار انتقال داده شدند. ریشه‌ها پس از گذشت ۲۴، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت، جهت تعیین محتوای تروپان آلکالوئیدها برداشت شدند.

سنجش آلکالوئید با استفاده HPLC : برای استخراج عصاره تام آلکالوئیدی از روش کامادا (۱۹۸۶) (۲۱) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر ریشه به همراه ۲۰ میلی لیتر از ترکیب کلروفرم: متانل: هیدروکسید آمونیوم ۲۸٪ به ترتیب با نسبت‌های ۱۵: ۵: ۱ به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۴۲ کیلوهرتز نگه داری شد. پس از جداسازی باقیمانده گیاهی، کلروفرم و دیگر ترکیبات با استفاده از دستگاه روتاری تبخیر شدند. سپس ۵ میلی لیتر کلروفرم و ۲ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۰/۵ مولار اضافه شد و پس از حذف کلروفرم، آلکالوئید بدست آمد. آلکالوئیدها یک‌بار با ۲ میلی لیتر کلروفرم و دوبار با ۱ میلی لیتر کلروفرم استخراج شدند. در نهایت کلروفرم با دستگاه روتاری تبخیر و آلکالوئید باقیمانده در متانل حل شد.

شناسایی و تعیین مقدار تروپان آلکالوئیدها به روش Ross و همکاران (۱۹۸۶) (۳۳) صورت گرفت. از دستگاه HPLC مدل LKB (کشور سوئد) مجهز به آشکارساز PDA (مدل K-2800)، ستون کروماتوگرافیC18 به ابعاد ۲۵۰ cm × ۴/۶ mm با قطر ذرات ۵ میکرومتر، در طول موج ۲۱۵ نانومتر استفاده شد. فاز متحرک آمونیوم استات ۰/۱ ٪ (وزنی- حجمی) و آب، میزان جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. مقدار آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از منحنی‌های استاندارد محاسبه گردید (نمودار ۱). برای رسم منحنی استاندارد از دو ترکیب استاندارد، آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید (شرکت سیگما)، در غلظت‌های۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد.



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

نمودار ۱- منحنی کالیبراسیون دو استاندارد آتروپین و اسکوپولامین

آنالیز آماری: آزمایش بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند. نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج

اثر متیل جاسمونات بر شاخص رشد و تولید تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین:

ریشه‌های حاصل از کشت بافت: بر اساس نتایج پژوهش حاضر، با افزایش غلظت متیل جاسمونات، شاخص رشد ریشه‌های حاصل از کشت بافت به طور معنی‌داری کاهش یافت (نمودار 2A). رشد ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۴ میلی مولار متیل جاسمونات و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد ۵۰٪ کاهش نشان داد. تیمار با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی مولار متیل جاسمونات اثر معنی‌داری بر شاخص رشد نداشت.

مقدار آتروپین و اسکوپولامین پس از تیمار با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در دوره‌های زمانی مختلف در نمودارهای 2B و 2C نشان داده شده است. بیشترین مقدار آتروپین در محیط کشت حاوی ۱ میلی مولار متیل جاسمونات و پس از گذشت ۹۶ ساعت (۷۵/۷۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) مشاهده شد (نمودار 2B). تیمار با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، موجب افزایش محتوای آتروپین در تمام دوره‌های زمانی شد.

در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (پس از گذشت ۹۶ ساعت) مقدار اسکوپولامین افزایش یافت. بیشترین مقدار این متابولیت در غلظت ۰/۱ میلی مولار و پس از گذشت ۹۶ ساعت مشاهده شد (۷۷/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک) که در مقایسه با کنترل، حدود ۳۸٪ بیشتر بود. پس از گذشت یک هفته مقدار اسکوپولامین در تمامی تیمارهای مورد بررسی کاهش یافت، اما بیشترین کاهش در غلظت ۰/۱ میلی مولار مشاهده شد (نمودار 2C).

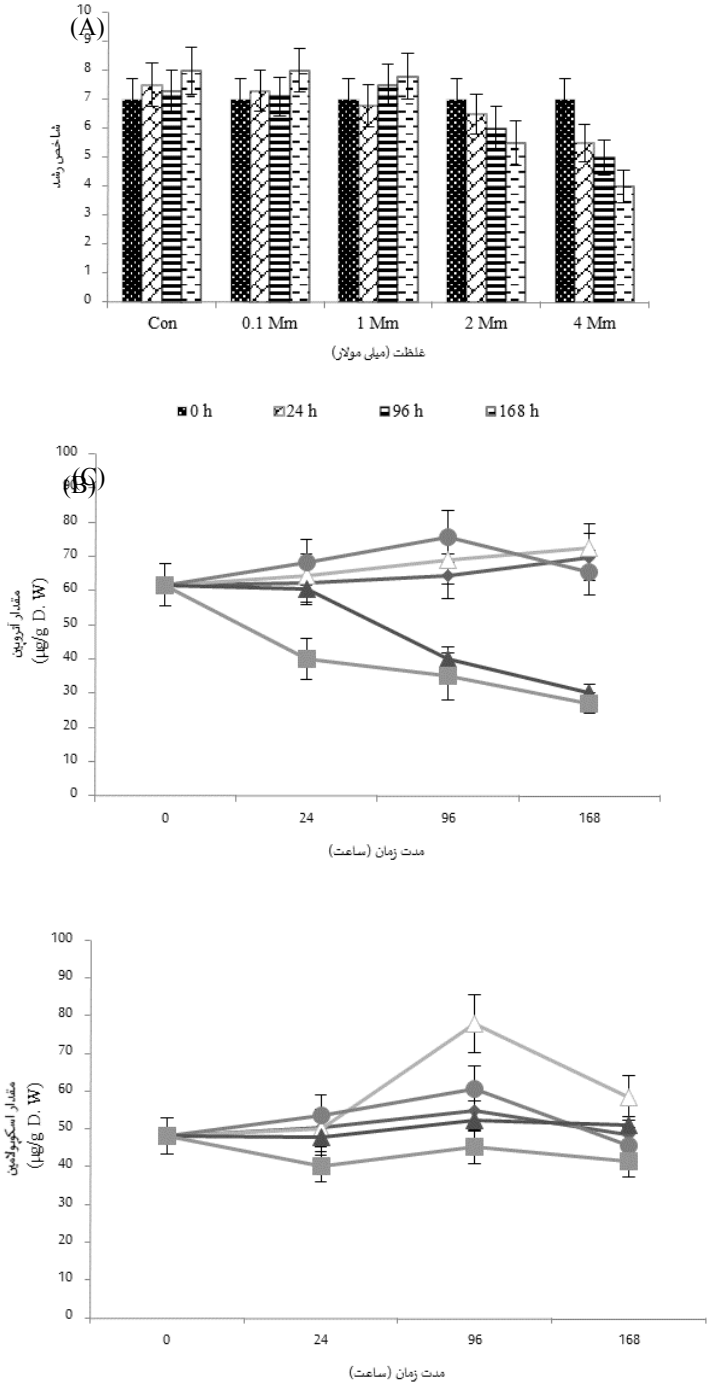
ریشه‌های مویین: نتایج این بررسی نشان دهنده کاهش رشد ریشه‌های مویین با افزایش غلظت متیل جاسمونات در محیط کشت بود (نمودار 3A). شاخص رشد ریشه‌ها در تیمار ۴ میلی مولار متیل جاسمونات، پس از گذشت ۱۶۸ ساعت، نسبت به شاهد ۵۵/۵٪ کاهش نشان داد. کاهش شاخص رشد ریشه‌های مویین در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی مولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد معنی دار نبود.

همان گونه که در نمودارهای 3B و 3C نشان داده شده است، مقدار آتروپین در همه غلظت‌ها تا ۹۶ ساعت افزایش یافت، اما با گذشت یک هفته از مقدار آن کاسته شد. بیشترین مقدار این متابولیت در غلظت ۰/۱ میلی مولار، پس از گذشت ۹۶ ساعت (۱۸۱/۷۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) مشاهده شد که حدود ۲/۶ برابر کنترل بود (نمودار 3B).

با گذشت ۲۴ ساعت، مقدار اسکوپولامین در تمامی تیمارهای مورد مطالعه افزایش یافت، اگرچه با گذشت مدت زمان بیشتر، مقدار این متابولیت در ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط کشت حاوی ۲ و ۴ میلی مولار متیل جاسمونات کاهش یافت. قابل ذکر است که این کاهش در تیمار زمانی ۹۶ ساعت معنی دار بود. ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی مولار به مدت ۹۶ ساعت، بیشترین مقدار اسکوپولامین را تولید کردند (۹۲/۶۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) که ۲/۶ برابر ریشه-های کنترل بود. کاهش چشمگیر محتوای اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تحت تیمار غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات پس از گذشت یک هفته مشهود بود (نمودار 3C).

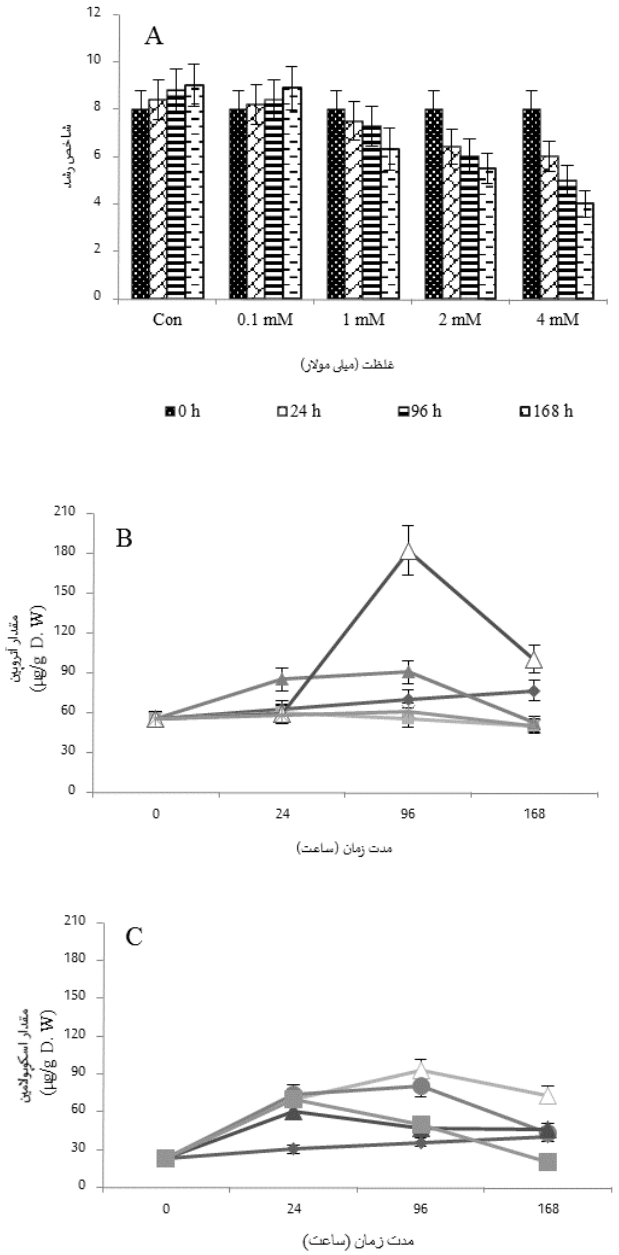
ریشه‌های حاصل از کشت بافت: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت جاسمونیک اسید، میزان رشد ریشه‌های

حاصل از کشت بافت کاهش می‌یابد (نمودار 4A). شاخص رشد ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۴ میلی مولار جاسمونیک اسید و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد ۶۰٪ کمتر بود. در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی مولار متیل جاسمونات کاهش معنی دار شاخص رشد مشاهده نشد.

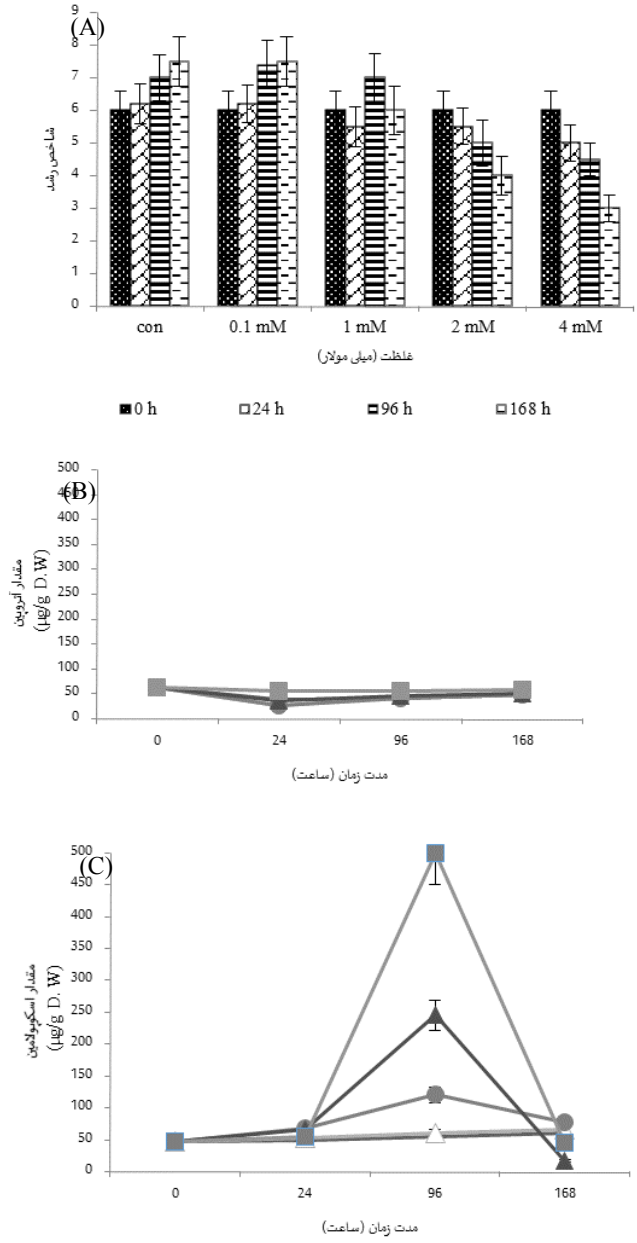


نمودار ۲- اثر متیل جاسمونات بر شاخص رشد (A)، میزان آتروپین (B) و اسکوپولامین (C) در ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *H. niger*؛ شاهد (◆)، ۰/۱ میلی مولار (△)، ۱ میلی مولار (●)، ۲ میلی مولار (▲)، ۴ میلی مولار (■).

بررسی نتایج مقدار آتروپین در تیمارهای مختلف جاسمونیک اسید حاکی از عدم تفاوت معنی دار محتوای این متابولیت در زمان‌های متفاوت نسبت به شاهد بود. به عبارت دیگر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید توانایی افزایش محتوای آتروپین را در ریشه‌های حاصل از کشت بافت را نداشتند (نمودار 4B). بیشترین مقدار آتروپین پس از گذشت ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی ۴ میلی مولار جاسمونیک اسید (۵۵/۱۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) مشاهده شد (نمودار 4B).



نمودار ۳- اثر متیل جاسمونات بر شاخص رشد (A)، میزان آتروپین (B) و اسکوپولامین (C) در ریشه‌های مویین گیاه *H. niger*؛ شاهد (◆)، ۰/۱ میلی مولار (△)، ۱ میلی مولار (●)، ۲ میلی مولار (▲)، ۴ میلی مولار (■).



نمودار ۴- اثر جاسمونیک اسید بر شاخص رشد (A)، میزان آتروپین (B) و اسکوپولامین (C) در ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *H. niger* شاهد (◆)، ۰/۱ میلی مولار (△)، ۱ میلی مولار (●)، ۲ میلی مولار (▲)، ۴ میلی مولار (■).

با افزایش غلظت جاسمونیک اسید طی ۹۶ ساعت، محتوای اسکوپولامین افزایش یافت به طوری که بالاترین مقدار اسکوپولامین (۴۹۹/۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در غلظت ۴ میلی مولار و پس از گذشت ۹۶ ساعت، حدود ۸ برابر افزایش مشاهده شد. آنالیز محتوای اسکوپولامین در ریشه‌ها، بیانگر کاهش قابل ملاحظه مقدار این متابولیت در تمامی تیمارهای جاسمونیک اسید پس از گذشت یک هفته بود (نمودار ۴C) .

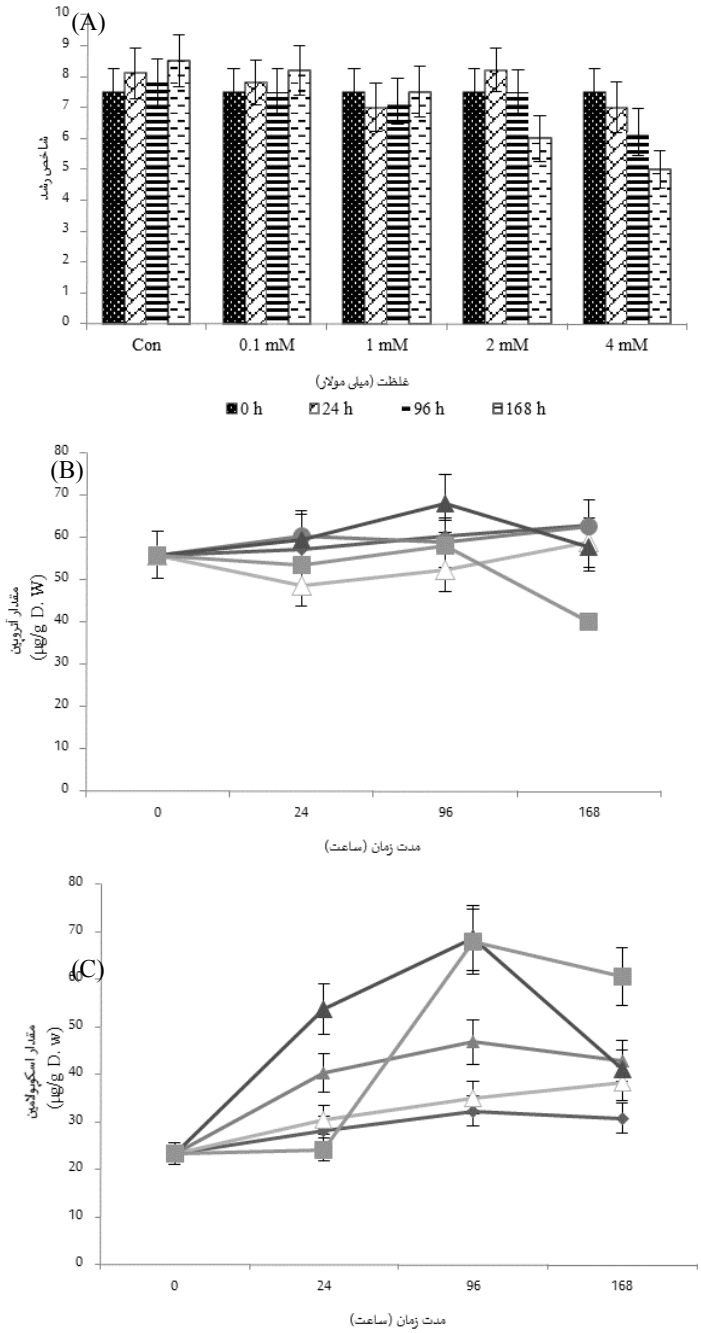
ریشه‌های مویین: شاخص رشد ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۲ و۴ میلی مولار جاسمونیک اسید و پس از مدت

زمان ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد، اما بیشترین کاهش در تیمار ۴ میلی مولار (۴۱/۲٪) مشاهده شد. در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی مولار جاسمونیک اسید کاهش معنی دار شاخص رشد مشاهده نشد.

بیشترین مقدار آلکالوئید آتروپین (۶۷/۹۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک ریشه) در تیمار ۲ میلی مولار جاسمونیک اسید و پس از گذشت ۹۶ ساعت مشاهده شد که حدود ۱۱ برابر نسبت به شاهد بیشتر بود (نمودار 5B). با افزایش غلظت جاسمونیک اسید طی ۹۶ ساعت، محتوای اسکوپولامین افزایش یافت به طوری که بالاترین مقدار اسکوپولامین (۶۸/۶۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در غلظت ۲ و ۴ میلی مولار مشاهده شد. بررسی مقدار اسکوپولامین در تیمارهای مختلف جاسمونیک اسید حاکی از معنی دار بودن محتوای این متابولیت در زمان‌های متفاوت نسبت به شاهد بود (نمودار 5C). با این تفاوت که محتوای اسکوپولامین در مدت زمان ۹۶ ساعت افزایش و پس از آن کاهش یافت. به عبارت دیگر زمان عامل بسیار تاثیرگذار بر مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های مویین بوده است.

بحث

زمانی که جاسمونات‌ها مانند جاسمونیک اسید و استر متیله آن یعنی متیل جاسمونات به صورت خارجی بر بافت‌های گیاهی اعمال می‌شوند، اثرات مهارکنندگی یا تحریک کنندگی در پدیده‌های مربوط به رشد و نمو، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان از خود نشان می‌دهند که برخی از این اثرات، تقریبا مشابه با آبسیزیک اسید است (۲۹ و ۳۰). اثرات فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به گونه گیاهی، مرحله نموی، نوع جاسمونات و غلظت به کار رفته متفاوت است. این مواد دارای نقش تنظیمی در گیاهان می‌باشند و در طول دوره نمو گیاه و سازگاری با تنش‌های زیستی و غیرزیستی به عنوان مولکول‌های علامت رسان عمل می‌کنند. در این پژوهش کاهش شاخص رشد و در اکثر موارد کاهش در مقدار تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در غلظت‌های بالای متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید مشاهده شد. بازدارندگی از رشد ریشه می‌تواند ناشی از پاسخ دفاعی گیاه در مقابل تنش‌های غیرزیستی باشد (۸، ۲۲ و ۳۰). همانطور که در نتایج پژوهش مشاهده شد، در غلظت‌های پایین الیسیتورها، تفاوت معنی‌داری در شاخص رشد مشاهده نشد، اما در غلظت‌های بالای این ترکیبات، شاخص رشد ریشه‌ها به شدت کاهش یافت. می‌توان بیان کرد که در غلظت بالای این ترکیبات، به علت ایجاد تنش‌های شدید، بافت ریشه از طریق آسیب به غشای سلول و یا لیز شدن سلولی آسیب دیده و منجر به کاهش و یا عدم رشد و همچنین کاهش متابولیسم می‌شود (۲۲). شبانی و همکاران نیز کاهش وزن خشک ریشه و افزایش تولید گلیسیریزین را در نتیجه تیمار گیاهچه‌های *شیرین بیان* با متیل جاسمونات گزارش کردند (۳۵). قناتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ علت کاهش شاخص رشد ریشه گیاه همیشه *بهار* در تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات را تنش ریشه و آسیب به آن و در نتیجه کاهش متابولیسم بیان داشتند (۶). Kai و همکاران (۲۰۱۲) نیز به این نتیجه دست یافتند که اضافه کردن الیسیتورها می‌تواند موجب اثرات منفی بر روی رشد ریشه‌های مویین گیاه *Anisodus acutangulus* مانند عدم رشد ریشه و قهوه‌ای شدن آن شود. آن‌ها دلیل این تاثیر منفی را تجمع تروپان آلکالوئیدها در محیط کشت معرفی نموده و بیان داشتند که این عامل می‌تواند موجب صدمه زدن به ریشه مویین شود (۲۰). کاهش رشد زیست توده ریشه‌های گیاه *Oxalis tuberosa* تحت تیمار جاسمونیک اسید نیز گزارش شده است (۱۰). نتایج بررسی Kang و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه *Scopolia parviflora* نیز حاکی از اثر منفی متیل جاسمونات بر رشد ریشه‌های نوپدید بوده است (۲۲).



نمودار ۵- اثر جاسمونیک اسید بر شاخص رشد (A)، میزان آتروپین (B) و اسکوپولامین (C) در ریشه‌های مویین گیاه *H. niger* شاهد (◆)، ۰/۱ میلی مولار (△)، ۱ میلی مولار (●)، ۲ میلی مولار (▲)، ۴ میلی مولار (■).

علاوه بر نقش متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید بر شاخص رشد، این الیسیتورهای شیمیایی معمولا موجب تسریع در تشکیل متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (۳۱). مکانیسم‌های دفاعی گیاه با شناسایی این الیسیتورها از طریق گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی و در نتیجه، تولید ترکیبات اسید جاسمونیک درونی فعال

می‌شود. با فعال شدن پاسخ دفاعی، پروتئین‌های مرتبط با مکانیسم‌های دفاع سلولی، سنتز و موجب القای متابولیت‌های ثانویه می‌شود (۳۷). الیسیتورهای متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید می‌توانند متابولیسم اولیه را کاهش و متابولیسم ثانویه را افزایش دهند. رابطه معکوس بین تولید زیتوده و تولید متابولیت ثانویه ممکن است در نتیجه الیسیته کردن و شروع سنتز متابولیت ثانویه باشد (۲۲). به طور کلی تاثیر الیسیتورها (محرک‌ها) بر رشد و مقدار متابولیت‌ها به عوامل مختلفی از جمله غلظت و ویژگی الیسیتور، طول مدت تیمار و مرحله رشدی گیاه بستگی دارد. همانطور که نتایج این پژوهش نشان داد، محتوای تروپان آلکالوئیدها در غلظت‌های مختلف الیسیتورهای متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید تغییر یافت. در تحقیقات متعدد نتایج مشابهی مبنی بر افزایش محتوای تروپان آلکالوئیدها در اثر تیمار الیسیتورهای متیل جاسمونات یا جاسمونیک اسید مشاهده شده است. برای مثال Zayedb و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند که مقدار هیوسیامین تحت تاثیر متیل جاسمونات در گیاه *Brugmansia suaveolens* ۲۵٪ افزایش یافت (۴۵). نتایج بدست آمده از بررسی‌های Zabetakis و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که غلظت ۰/۱ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت ریشه گیاه *Datura stramonium* منجر به افزایش صد در صدی مقدار هیوسیامین نسبت به شاهد شد (۴۴). Kang و همکاران (۲۰۰۴)، بیشترین میزان هیوسیامین و هیوسین را در ریشه‌های گیاه *Scopolia parviflora* در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات گزارش کردند (۲۲). Bulkagov و همکاران (۲۰۰۲)، کالوس‌های تراریخته و غیر تراریخته گیاه *Rubia cordifolia* را تحت تاثیر الیسیتورهای مختلف و از جمله متیل‌جاسمونات قرار داده و به این نتیجه دست یافتند که مقدار متابولیت آنتراکوینون در هر دو نوع کالوس افزایش می‌یابد (۱۳). Taguchi و همکاران پس از تیمار گیاه *تنباکو* با متیل جاسمونات، افزایش مقدار ماده کومارین را گزارش کردند (۳۶).

علاوه بر غلظت الیسیتورها، مدت زمان تیمار یکی از عوامل مهم در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. مطابق داده‌های این پژوهش، پس از گذشت یک هفته (۱۶۸ ساعت) تیمار الیسیتورها، محتوای تروپان آلکالوئیدها کاهش چشمگیری یافت. نتایج مشابهی در رابطه با همبستگی زمان و غلظت الیسیتورهای جاسمونات بر محتوای تروپان آلکالوئیدها و یا متابولیت‌های ثانویه دیگر در سایر گونه‌های گیاهی نظیر *Lithospermum erythrorhizon* (۳۴)، *Arnebia euchroma* (۱۶)، *Salvia miltiorrhiza* (۴۲)، *Taxus chinesis* (۴۰) و *Taxus cuspidate* (۲۳) گزارش شده است.

با مقایسه همزمان دو سیستم کشت ریشه از طریق کشت بافت و ریشه مویین، نتایج این پژوهش نشان داد که شاخص رشد ریشه‌های مویین در شرایط کنترل سریع‌تر از شاخص رشد ریشه‌های حاصل از کشت بافت بود. همچنین در اکثر موارد در شرایط کنترل و تیمار با جاسمونات‌ها، در ریشه‌های مویین، مقدار آتروپین نسبت به اسکوپولامین بیشتر بوده اما در ریشه‌های حاصل از کشت بافت مقدار اسکوپولامین نسبت به آتروپین بیشتر بود. Moyano و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند که هیوسیامین از آلکالوئیدهای اصلی در ریشه‌های مویین بسیاری از گیاهان خانواده *سیب زمینی* و از جمله *Hyoscyamus* است (۲۵). Kamada و همکاران (۱۹۸۶) نیز گزارش کردند که مقدار تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و هیوسین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Atrapa belladonna* کمتر از ریشه‌های مویین است (۲۱). در حالی که نتایج تحقیق Zolala و همکاران (۲۰۰۷) حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار مقدار آتروپین و اسکوپولامین حاصل از ریشه‌های مویین گیاه *H. muticus* نسبت به ریشه‌های حاصل از کشت بافت بود (۴۶).

نتیجه گیری

محتوای تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در محیط کشت حاوی الیسیتورهای جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و ریشه‌های مویین افزایش یافت، به طوری‌که بیشترین مقدار آتروپین در ریشه‌های مویین و در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات (۱۸۱/۷۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و بیشترین مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های حاصل از کشت بافت و در غلظت ۴ میلی‌مولار جاسمونیک اسید (۴۹۹/۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد. بنابراین این الیسیتورها می‌توانند به عنوان راهکاری مناسب درکشت ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت جهت استخراج آلکالوئیدهای مزبور مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱- احمدیان چاشمی، ن.، شریفی، م.، کریمی، ف. و رهنما، ح. (۱۳۸۹). بررسی مقایسه‌ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخت و گیاهچه‌های *شاهبیزک* (*Atropa belladonna* L.) تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید، مجله زیست شناسی گیاهی ایران. سال دوم. شماره اول. ۷۶-۶۳.

۲- پارسا، م.، گروسی، ق. و حداد، ر. (۱۳۹۰). بررسی تأثیر الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات بر کمیت و کیفیت RNAکل استخراج شده از ریشه‌های بدست آمده از کشت بافت گیاه *بنگدانه* (*Hyoscyamus niger*). دومین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی. یزد. ایران.

۳- پارسا، م.، زینالی، ا. و یوسف زادی، م. (۱۳۹۰). القای ریشه مویین با دو سویه از اگروباکتریوم رایزوژنز (A4, LBA9402) درگیاه *بنگدانه* (*Hyoscyamus niger*). دومین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی. یزد. ایران.

۴- خاتم‌ساز، م. (۱۳۷۷). تیره سیب زمینی، شماره ۲۴. نشر سازمان جنگل‌ها و مراتع.

۵- سلیمانی، ط.،کیهانفر، م.، پیری، خ.، حسنلو، ط. و گودرزی، م. (۱۳۸۹). ایجاد ریشه‌های مویین در سه گیاه دارویی بومی ایران و مطالعه اثر محرک‌های مناسب بر تولید متابولیت‌های ثانویه در این ریشه‌ها. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا.

۶- قناتی، ف.، بختیاریان، س. و عبدالمالکی، پ. (۱۳۸۹). تاثیر متیل جاسمونات بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاه همیشه *بهار* (*Calendula officinalis L.*). علوم و فناوری زیستی مدرس. دوره ۱. شماره ۱. ۳۱-۲۱.

7- Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B. and Nikam, T. D. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of Hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. Indian Journal of Biotechnology. 8: 317-322.

8- Akula, R. and Gokare Aswathanarayana, R. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. 6: 11: 1720-1731.

9- Akramian**,** M**.,** Fakhr Tabatabaei**,** S. M. and Mirmasoumi**,** M. (2008). Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Genetic Transformation of Four *Hyoscyamus* Species**.** American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 3: 759-763.

10- Bais, H. P., Vepachedu, R. and Vivanco, J. M. (2003). Root specific elicitation and exudation of fluorescent β-carbolines in transformed root cultures of Oca (*Oxalis tuberosa* L.). Plant Physiology and Biochemistry. 41: 345-353.

11- Biondi, S., Fornalé, S., Oksman-Caldentey, K. M., Eeva, M., Agostani, S. and Bagni, N. (2000). Jasmonates induce over-accumulation of methyl putrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. Plant Cell Reports. 19: 691–697.

12- Bruce, N. (2008). Alkaloids. In: Biotechnology Set (Eds. Rehm, H.-J., Reed, G. and Bruce N.C.) 332-350. Wiley, Cambridge, UK.

13- Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., Zvereva, E. V., Fedoreyev, S. A. and Zhuravlev, Yu. N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. Journal of Biotechnology. 97: 213–221.

14- Dra¨ger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. Journal of Chromatography. A 978: 1-35.

15- Ebrahimzadeh, H., Teimoori, A. and Lohrasbi, T. (2003). Hyoscyamin 6-β-hydroxylase gene isolation from *in vitro* cultured roots of *Hyoscyamus niger* L. and *Hyoscyamus tenuicaulis.* Daru. 11: 34-37.

16- Fu, X. O. and Lu, D. L. (1999). Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation in situ extraction in suspension cultures of *Arnebiaeuchroma*. Enzyme Microbiology Technology. 24: 243–246.

17- Gamborg, O. L**.,** Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 151-158.

18- Grynkiewicz, G. and Gadzikowska, M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. Pharmacological Reports. 60: 439-463.

19- Grynkiewicz, M. and Gadzikowska, G. (2002). Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. Acta Polonine pharmaceuica. 59 (2): 149-160.

20- Kai, G., Yang, S. H., Zhang, Y., Luo, X., Fu, X., Zhang, A. and Xiao, J. (2012). Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. Molecular Biology Reports. 39:1721–1729.

21- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports. 5: 239-242.

22- Kang, S-M., Jung, H-Y., Kang, Y-M., Yun D-J., Bahk J-D., Yang J-K. and Choi M-S. (2004). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science, 166 (3): 745-751.

23- Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M., Croteau, R. B. and Shuler, M. L. (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnology and Bioengineering. 62: 97–105.

24- Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B. E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Report. 12: 706-709.

25- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazón, J., Cusidó, R. M., Piñol, M. T., Teeri, T. H., Oksman-Caldentey, K-M. (2003). Effect of pmt gene over expression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. Journal of Experimental Botany. 54: 203–211.

26- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

27- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy. 1(1): 69- 79.

28- Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M.H. (2008). Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. Molecules. 13: 1722-1742.

29- Paul, E., Staswick, Wenpei, S. T and Howell, S. H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 6837-6840.

30- Pazirandeh1, M. S. , Hasanloo T., Shahbazi, M., Niknam, V. and Moradi-Payam, A. (2015). Effect of Methyl Jasmonate in Alleviating Adversities of Water Stress in Barley Genotypes. International Journal of Farming and Allied Sciences. 4-2:111-118.

31- Ramachandra, S. R.and Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advanced. 20: 1001-153.

32- Ravishankar, G. A. and Ramachandra, R. S. (2000). Biotechnological production of phytopharmaceuticals. Journal of Biochmistry Molecular Biology and Biophysics. 4: 73-102.

33- Roos, R. W. and Lau-Cam, C., (1986). General reversed- phase HPLC method for the separation of drugs using triethyamine as a competing base. Journal of Chromatography. 370: 403-418.

34- Sim, S. J. Chang, H. N., Liu, J. R. and Jung, K. C. (1994). Production and secretion of indole alkaloids by cultures of *Catharanthus roseus* hairy root:effect of in situ adsorption, Journal of Fermentas Bioengineering. 78: 229–234.

35- Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asgari, G. and Emami, J. (2009). Glycyrrhizin production by in vitro cultured Glycyrrhiza glabra elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology. 56(5): 621–626.

36- Taguchi, G., Sharan, M., Gonda, K., Yanagisawa, K., Shimosaka, M., Hayashida, N. and Okazaki, M. (1998). Effect of methyl

jasmonate and elicitor on PAL expression in tobacco cultured cells. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 7: 79-84.

37- Talarczyk, A. and Hennig, J. (2001). Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. Cell and Molecular Biology Letters. 6: 955–970.

38- Valko, M., Izakovic. M., Mazur, M., Rhodes, C. J. and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular Cell Biochemistry. 1-2: 37-56.

39- Verpoorte, R., Heijden, R. and Memelink, J. (2000). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. Transgenic Research. 9: 323–343.

40- Wang, C., Wu, J., Mei, X. (2001), Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. Biotechnolgy Program. 17(1):89-94.

41- Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z., and Zheng, Y. (2009). Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bay berries. Journal of Agricultural Food and Chemistry. 57: 5809-5850.

42- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Yong, J. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots. Plant Science. 1(4): 853–858.

43- Zhang L., Yang, B., Lu, B., Kai, B. G., Wang, Z. Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W. and Tang, K. (2007). Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing Putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. Planta. 225: 887–896.

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

45- Zayedb, R. and Winka, M, Z. (2004). Induction of Tropane Alkaloid Formation in ransformed Root Cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Naturforsch. 59: 863-867.

46- Zolala, J., Farsi, M., Gordan, H. R. and Mahmoodnia, M. (2007). Producing a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Agricultural Sciences and Technology. 9: 327-339.

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

Parsa M. and Zeinali A.

Plant physiology and Genetic Dept.,, Applied Science Institute, Jahad-e- Daneshgahi (ACECR), Shahid Beheshti University of Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The tropane alkaloids play a crucial role in controlling diseases such as the toxic and septic shock. In the present study, the effects of methyl jasmonate (MJ) and jasmonic acid (JA) on the production of two alkaloids, atropine and scopolamine, were studied in hairy root and *in vitro* grown root cultures of *Hyoscyamus niger* L. The roots were cultured in liquid B5 medium containing different concentrations of MJ and JA (0, 0. 1, 1, 2 and 4 mM) in various exposure times (24, 96 and 168 hours).Eventually, root growth index and production of atropine and scopolamine were assayed. In hairy roots, treatment with 0.1mM MJ resulted in the highest production of atropine (181.72 µg/g D. W) and scopolamine (92.62 µg/g D. W) after 96 hours, while the largest amount of these metabolite (68.68 µg/g D. W) took place in 2mM JA and 96 hours conditions. The most significant contents of atropine and scopolamine in *in vitro* grown roots were seen in the medium containing 1 and 0.1 mM MJ after 96 h, respectively. In hairy root cultures, the highest content of atropine and scopolamine was achieved in medium treated with 2 mM MJ and JA after 96 hours. Treatment of *in vitro* grown roots with 4 mM JA resulted in the highest contents of atropine after 24 hours (55.15 µg/g D. W). In the medium supplemented with 4 mM JA, scopolamine production enhanced up to 8 times compare to control (499.3 µg/g D. W). In general, atropine content in hairy roots was considerably higher than *in vitro* grown roots. In contrast, scopolamine content in *in vitro* grown roots was significantly more than hairy roots. Moreover, the rate of root growth declined as a result of increasing of elicitor concentration in the medium.

Key words: *Hyoscyamus niger*, elicitor, methyl jasmonate, jasmonic acid, hairy root, *in vitro*