

بررسی بیش‌بیانی ژن *pmt* بر خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک تحت تأثیر غلظت بهینه عصاره مخمر



شهلا شامه^۱، بهمن حسینی^{۱*} و خاویر پالازون^۲

^۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

^۲ اسپانیا، دانشگاه بارسلونا، دانشکده داروسازی، گروه فیزیولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶

چکیده

مهندسی ژنتیک و محرک‌ها از راهکارهای مفید جهت بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح انبوه هستند. در این مطالعه، ریشه‌های موئین از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) با سویه‌های A4 از *Agrobacterium tumefaciens* حاوی ژن *pmt* تولید شدند. سپس تأثیر ترکیب بیش‌بیانی ژن *pmt* و غلظت بهینه عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۴۸ ساعت) بر خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین حاصل از دو سویه مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر نشان داد که در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1، وزن تر (۲/۸۵ برابر) و خشک (۲/۲۷ برابر)، فنول (۱/۷۴ برابر)، فلاونوئید (۱/۷۶ برابر) و آلکالوئید کل (۱/۷۷ برابر) بیشتر از ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 شد. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش IC₅₀ (۱/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و FRAP (۱۴/۷۷ میلی‌مول آهن II بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گاپاکول پراکسیداز در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 به ترتیب ۲/۴۵، ۱/۳۰، ۱/۸۲ و ۲/۱۸ برابر بیشتر از ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 به دست آمد. همچنین بیشترین میزان تولید هیوسامین (۱/۳۷ برابر) و اسکوپولامین (۱/۳۴ برابر) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 حاصل شد. نتایج مشخص کرد که ترکیب بیش‌بیانی ژن *pmt* و غلظت بهینه عصاره مخمر می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مناسب جهت افزایش تولید ترکیبات فیتوشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدکل، بیش‌بیانی، تروپان آلکالوئیدها، عصاره مخمر، مهندسی ژنتیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۸، پست الکترونیکی: pbhosseini@yahoo.com

مقدمه

بادمجانیان (Solanaceae) است که بومی مناطق خشک و نیمه خشک مصر، جنوب غرب آسیا، ایران و ترکیه است (۱۲). تمام پیکر گیاه، حاوی آلکالوئید است که مهمترین آن‌ها را هیوسامین، اسکوپولامین و آتروپین تشکیل می‌دهند (۱). از کاربردهای تروپان آلکالوئیدها در پزشکی

رویکرد روز افزون مصرف داروهای با منشأ گیاهی توسط مردم جهان، سبب افزایش تقاضا در زمینه مواد مؤثره گیاهان دارویی به‌عنوان تولیدات قابل مصرف در صنایع آرایشی-بهداشتی و دارویی شده است (۵۲). بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) یکی از گیاهان تیره

گیاهی است که توسط باکتری آگروباکتریوم رایوزنز ایجاد می‌گردد (۳۸). کشت ریشه موئین به علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (۱۹ و ۱۳). اگرچه روش‌های مختلف برای انتقال ژن وجود دارد اما استفاده از *A. tumefaciens* به دلایل متعدد از جمله: بازدهی بیشتر با هزینه‌ی کمتر، امکان انتقال قطعات بزرگ DNA و انتقال تعداد کمی DNA کم نسبت به سایر روش‌ها ارجحیت دارد (۶۲ و ۵۱)

اخیراً، رویکردهای متعددی مثل استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی و تحریک مسیر بیوسنتزی برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین به‌کار گرفته شده است (۴۱). محرک‌ها با القاء سیستم دفاعی گیاه منجر به افزایش بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (۶۴). عصاره مخمر (به‌عنوان محرک زیستی)، ترکیبی از آمینو اسیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی مختلف و سایر ترکیب‌های تحریک‌کننده رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۵۰). تاکنون مطالعات زیادی مبنی بر بیش‌بانی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی مختلف و استفاده از محرک‌ها به‌عنوان راهکاری مهم به منظور بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موئین ارائه شده است. *pmt* به‌عنوان ژن بالادست در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها نقش دارد که افزایش تعداد رونوشت‌های مربوط به آن می‌تواند به‌عنوان یکی از راهکارهای مؤثر جهت افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها باشد (۳۷). در تحقیقی با بررسی بیش‌بانی ژن *pmt* به منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمند هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های موئین *Hyoscyamus muticus*، محتوی هیوسیامین در ریشه‌های تراریخت شده ۳-۲ برابر ریشه‌های شاهد مشاهده گردید، اما محتوی اسکوپولامین مشابه ریشه‌های شاهد بود (۳۷). در تحقیقی که توسط Kang و همکاران

می‌توان به مواردی مانند آرام نمودن علائم بیماری پارکینسون، گشادکردن مردمک چشم و افزایش ضربان قلب، خنثی کردن سستی ماهیچه‌های صاف ناشی از ترکیبات فسفره آلی و کاهش ترشح عرق و اسید معده اشاره نمود (۸). ارزش تجاری اسکوپولامین به دلیل عملکرد متفاوت در سیستم عصبی و فعالیت فیزیولوژیکی بالاتر نسبت به هیوسیامین بیشتر می‌باشد (۳۳). در سال‌های اخیر، تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا مواردی وجود دارد که میزان متابولیت‌های موجود در کشت سلول‌های گیاهی خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و یا حتی سلول‌های کشت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شوند (۵۴). با توجه به اهمیت و نیاز به افزایش تولید ترکیبات با ارزش در گیاهان دارویی به دلایل کاربرد در صنایع دارویی و غذایی، به نظر می‌رسد که روش‌های زیست فناوری مانند کشت سلول و اندام می‌توانند در به‌ثمر رسیدن این اهداف مفید باشند (۵۷). در حال حاضر استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک، از جمله پرکاربردترین فوننی به‌شمار می‌روند که در شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژن‌های دخیل در این مسیرها، افزایش بیان ژن‌ها، دستورزی آن‌ها و انتقال آن‌ها از موجودی به موجود دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۹). مهندسی متابولیت به‌عنوان راهکار نهایی برای تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از دو سیستم کلی افزایش و کاهش بیان ژن‌های بیوسنتزکننده است (۵۹). به‌طور کلی می‌توان گفت که تغییر بیان ژن‌های کلیدی درگیر در تولید یک یا دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، از مهمترین راهبردهای مورد استفاده در بالابردن تولید متابولیت‌ها در گیاهان دارویی محسوب می‌شوند (۹). تراریختی به واسطه‌ی آگروباکتریوم این مزیت را داراست که با قرار دادن هر ژن خارجی مورد علاقه در یک ناقل دوگانه (Binary vector)، بتوان آن را به کلون‌های ریشه موئین تراریخت انتقال داد (۱۹). ریشه موئین نوعی بیماری

گزارشات بالا نشان می‌دهند که بیش بیانی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی و استفاده از محرک‌ها از روش‌های موثر بر ای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موئین است. در این مطالعه برای اولین بار ترکیب بیش بیانی ژن *pmt* و غلظت بهینه عصاره مخمر بر خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه سویه‌های باکتری: در این مطالعه از *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 (به‌عنوان کنترل) و *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58C1 (pRiA4-pBMI) حامل ژن *pmt* جهت تولید ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک استفاده شد (شکل ۲-الف). این دو سویه به ترتیب از بانک میکروبی مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران و دانشگاه بارسلونا، اسپانیا تهیه شدند (۳۶).

کشت بذر و تهیه ریز نمونه: ابتدا بذرهای گیاه بذربالنج مشبک (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) با اسید سولفوریک ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه خراشیده شدند. سپس بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. بذور ضد عفونی شده جهت جوانه‌زنی و تهیه ریزنمونه در محیط کشت MS (۳۹) فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و دارای ۷ گرم بر لیتر آگار کشت گردیدند. بذرها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

تلقیح ریز نمونه و ظهور ریشه موئین: پس از کشت شبانه، هر دو نوع سویه باکتری (A4 و C58C1) با غلظت بهینه (OD_{600}) بین ۰/۶ تا ۰/۸ جهت تلقیح در محیط کشت مایع Luria-Bertani (LB) حاوی ریفامپیسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای هر دو سویه باکتری) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم

(۲۶) صورت گرفت، بررسی بیش بیانی ژن *h6h* در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Scopolia parviflora* نشان داد که میزان تولید اسکوپولامین ۳ برابر نسبت به ریشه‌های شاهد افزایش یافت. در تحقیق دیگر Yang و همکاران (۶۰)، اثر بیش بیانی ژن *pmt* و *h6h* به منظور افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین تراریخته شده شایبیک (*Atropa belladonna*) مورد مطالعه قرار دادند، نتایج نشان داد که محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت به ترتیب ۱۱ و ۵ برابر ریشه‌های غیر تراریخت افزایش یافت.

در پژوهشی تیمار ریشه‌های موئین خرفه (*Portulaca oleracea*) با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت، سطح تجمع نورآدرنالین را نسبت به ریشه‌های شاهد ۵ برابر افزایش داد (۴۴). در تحقیقی که توسط رحیمی آشتیانی و همکاران (۳) صورت گرفت، بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در زمان‌های مختلف بر کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) نشان داد که بیشترین میزان تولید سیلی مارین در تیمار با ۶ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در مدت ۷۲ ساعت حاصل شد که نسبت به شاهد ۵ برابر افزایش نشان داد. تیمار عصاره مخمر در ریشه‌های موئین چریش (*Azadirachta indica*)، تولید آزادیراکتین را نسبت به شاهد ۱/۶ برابر بهبود بخشید (۴۸). کاربرد عصاره مخمر در ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک (*H. reticulatus*) در غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت، بالاترین میزان تولید هیوسیامین (۲ برابر) و اسکوپولامین (۲/۵ برابر بیشتر از شاهد) در غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر در مدت زمان ۴۸ ساعت تحریک زایی به دست آمد (۳۵). Udomusk و همکاران (۵۵) گزارش کردند میزان تولید ایزوفلاونوئید کل در ریشه‌های موئین *Pueraria candollei* به وسیله عصاره مخمر در غلظت و زمان‌های مختلف، ۴/۵ برابر بیشتر از ریشه‌های موئین شاهد بود.

3'-TGGATCCCAAATTGCTATCCACGA-5'
 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3'
 انجام شد.

تیمار ریشه‌های موئین با غلظت بهینه عصاره مخمر:
 عصاره مخمر از شرکت لیوفیلکم (Liofilchem) تهیه شد. غلظت بهینه عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) (۳۵) جهت تیمار ریشه‌های موئین هر دو سویه باکتری در محیط کشت MS مایع تهیه گردید. یک گرم از ریشه‌های موئین هر دو سویه باکتری به داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ۳ تکرار، منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند (شکل ۲-ت). پس از ۲۱ روز، محیط کشت MS مایع حاوی غلظت بهینه عصاره مخمر به ارلن‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین به محیط کشت MS مایع فاقد عصاره مخمر انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، عمل برداشت ریشه‌های موئین صورت گرفت و بعد از شستشو با آب مقطر و حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها توسط کاغذ صافی، وزن تر اندازه‌گیری شد. پس از خشک شدن ریشه‌ها توسط فریز درایر (به مدت ۴۸ ساعت) وزن خشک اندازه‌گیری و ثبت شدند.

عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: یک گرم وزن تر از ریشه‌های موئین سویه A4 و C58C1 داخل هاون توسط ازت مایع پودر شدند و سپس به پودرهای ریشه موئین ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد. در نهایت عصاره‌گیری با استفاده از روش اولتراسونیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد (۵۸).

اندازه‌گیری فنول و فلاونوئید کل: اندازه‌گیری فنول کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) به روش Singleton و Slinkard (۴۷) اندازه‌گیری شد. ۱۸۰

بر لیتر، برای سویه C58C1 در شرایط تاریکی بر روی شیکر انکوباتور (۱۲۰ دور در دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) کشت شدند. پس از جدا کردن ریزنمونه‌های کوتیلدونی (ریزنمونه) توسط اسکالپل، روش اولتراسونیک (Germany, Singen, Elmasonic) با فرکانس ۱۲۰ هرتز و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه جهت تلقیح بهتر ریزنمونه‌ها با سویه‌های A4 و C58C1 استفاده گردید (۴۶). پس از ۲ روز، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد حاوی سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای هر دو سویه) و کانامایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای سویه C58C1) منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته، برای افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به صورت تکی و لاین-های مجزا به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون و حاوی سفوتاکسیم (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای هر دو سویه) و کانامایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای سویه C58C1) منتقل گردیدند. واکنش ریزنمونه‌ها هر ۲ هفته یکبار انجام شد. از میان ۱۰ و ۵۴ لاین ریشه موئین القاء شده به ترتیب توسط سویه‌های A4 و C58C1، لاین‌های ۶ و ۱۳ بعنوان لاین پر رشد جهت انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند (شکل ۲-پ).

آنالیز مولکولی ریشه‌های موئین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): جهت اثبات حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* استفاده شد. DNA ژنومی ریشه‌های موئین حاصل از هر دو سویه به روش CTAB با اندکی تغییرات استخراج گردید (۱۶). واکنش در ۹۴ درجه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۸۰ ثانیه در ۶۰ درجه و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه) انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و بوسیله دستگاه ژل داگ عکسبرداری شد. تکثیر قطعات ۷۸۰ bp ژن *rol B* با استفاده از آغازگر رفت 5'-

کاتالاز، مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مولار H₂O₂ را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش Nakano و Asada (۴۰) در ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار در pH=7، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۵ درصد) و ۱۰ میکرولیتر اسید اسکوربیک (۵۰ میکرومول) اضافه شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اسید اسکوربیک اکسید شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه تعیین شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با روش Mac-Adam و همکاران (۳۲) در ۴۳۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار در pH=7)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول و ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳ درصد) اضافه شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر محاسبه گردید.

عصاره گیری آلکالوئیدها: استخراج تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین موجود در ریشه‌های موئین حاصل از دو سویه باکتری به روش Kamada و همکاران (۲۵) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین خشک، پودر و کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵ درصد، به نسبت‌های ۱۵: ۵: ۱ به نمونه‌های پودر شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با اولتراسونیک عصاره‌گیری شدند. پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم، برای تبخیر فاز کلروفرمی از دستگاه تبخیر کننده دوار (روتاری اواپراتور) (Rotary evaporator) استفاده گردید. به عصاره‌های باقی مانده و خشک شده، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم

اسپکتروفتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها بر اساس میلی‌مول آهن II بر گرم وزن تر بیان شد (۶۵).

عصاره‌ی گیاهی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها: ۰/۵ گرم از هر نمونه تازه (ریشه‌های حاصل از هر دوسویه) در نیتروژن مایع پودر شدند و در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی ۰/۵ درصد تری هیدروکلراید (Tris HCL) و ۰/۵ درصد پلی وینیل پیرولیدون (PVP) در pH=8 حل شد. عصاره حاصل سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی، از مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد (۴۹).

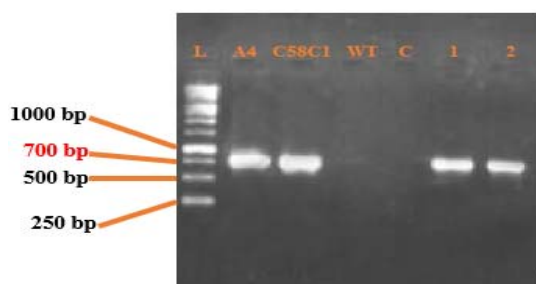
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Giannopolitis و Ries (۱۸) و به کمک سنجش مهار احیای نوری (Photoreduction) نیتروبلوترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، انجام گرفت. برای هر نمونه، ۵۰ میکرولیتر عصاره به لوله‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر بافر واکنش (متشکل از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=7)، ۱۳ میلی‌مولار ال-متیونین، ۰/۱ مولار EDTA، ۷۵ میکرومولار NBT و ۲ میکرومولار ریوفلاوین) اضافه شد. پس از قرار گرفتن لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نمونه قرائت گردید. یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT می‌گردد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Aebi (۵) در ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه، ۵ میکرولیتر عصاره (۲۵ برابر رقیق شده) به لوله‌های حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار در pH=7) و ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳ درصد) اضافه شد. یک واحد آنزیمی

افزار SAS 9.4 و آزمون T-test جفت نشده استفاده گردید. نمودارها با استفاده از نرم افزار R رسم شدند.

نتایج

تأیید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین: نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ریشه‌های موئین تراریخت احتمالی، حضور قطعه با اندازه حدودی ۷۸۰bp مربوط به ژن *rol B* را در ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی با سویه A4 از *Rhizogenes Agrobacterium* و سویه C58C1 از *Agrobacterium tumefaciens* تأیید نمود که هم‌اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (هر دو سویه آگروباکتریوم مورد استفاده در تلقیح) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه بذربینج مشبک و محصول واکنش PCR بدون DNA الگو (به‌عنوان کنترل منفی)، هیچ باند تکثیری مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین بود (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت تأیید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های تراریخت: L: DNA مارکر (1 kb ladder Fermentas), A4: *Agrobacterium rhizogenes* به‌عنوان کنترل مثبت، C58C1: *Agrobacterium tumefaciens* به‌عنوان کنترل مثبت، WT: ریشه‌های طبیعی بذربینج مشبک به‌عنوان کنترل منفی، C: محصول واکنش PCR بدون DNA الگو، 1: ریشه‌های موئین القا شده با سویه A4، 2: ریشه‌های موئین القا شده با سویه C58C1

۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال اضافه و کاملاً هم زده شدند. در مرحله بعد مخلوط به دست آمده داخل دکانتور ریخته شد که باعث تشکیل دو فاز شد. فاز کلروفرمی (فاز پایینی) جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها به یک بشر منتقل شد و pH آن روی یخ و به وسیله ی آمونیاک ۲۸ درصد تا ۱۰ تنظیم گردید و محلول قلیایی داخل دکانتور اضافه شد و آلکالوئیدها یک مرتبه توسط ۲ میلی‌لیتر و دو مرتبه توسط ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. فاز کلروفرمی به دست آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک به منظور حذف آب اضافی موجود، از صافی عبور داده شده و کاغذ صافی توسط ۱ تا ۲ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شدند. در نهایت محلول صاف شده به وسیله روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و ماده جامد به دست آمده که آلکالوئید کل نامیده می‌شود در ۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد.

آنالیز تروپان آلکالوئیدها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): به‌منظور سنجش میزان تروپان آلکالوئیدها (هیوسامین و اسکوپولامین) در عصاره‌های استخراجی از ریشه‌های موئین دو سویه باکتری، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مدل Smartline (Knauer)، آلمان) با آشکارساز PDA مدل K-2800 با طول موج ۲۱۵ نانومتر استفاده شد. ستون مورد استفاده $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times$ C-18 (250 mm) بود. سرعت جریان حلال $1/4$ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و فاز متحرک شامل استونیتریل و بافر استات به نسبت‌های ۲۰:۸۰ بود. مقدار عصاره استفاده شده برای هر تزریق ۲۰ میکرولیتر و جمع‌آوری و پردازش داده‌ها توسط نرم افزار EZChrom Elite انجام شد. میزان دو آلکالوئید هیوسامین و اسکوپولامین بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

آنالیز آماری داده‌ها: برای مقایسه و تحلیل داده‌ها از نرم

تر (۲/۰۲±۰/۰۹ گرم) و خشک (۰/۱۸±۰/۰۱ گرم) ریشه-های موئین حاصل از سویه A4 در مقایسه با ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 (وزن تر= ۵/۷۶±۰/۰۳ گرم، وزن خشک= ۰/۴۱±۰/۰۰ گرم) از لحاظ آماری به طور معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد کمتر است (جدول ۱).

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم و غلظت بهینه عصاره مخمر بر رشد ریشه‌های موئین: در ریزنمونه‌های کوتیلدونی تلقیح شده با سویه A4 و C58C1 به ترتیب بعد از ۴ و ۲ هفته ریشه‌های موئین از محل زخم ظاهر شدند (شکل ۲-ب). نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین نشان داد که وزن



شکل ۲-الف- واکشت *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 (۱) و *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58C1 (۲). ب: ظهور ریشه‌های موئین از ریزنمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم، پ: رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد و ت: کشت ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع.

جدول ۱- تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر صفات رشدی و فیتوشیمیایی ریشه‌های موئین بذرالینج مشبک و آزمون T-test جفت نشده

(انحراف معیار میانگین نمونه) ±SE میانگین					
نوع سویه	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	فنول کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر)	فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر)	آلکالوئید کل (میکروگرم بر گرم وزن خشک)
سویه A4	2.02±0.09	0.18±0.01	4.20±0.05	1.04±0.02	46.81±0.26
سویه C58C1	5.76±0.03	0.41±0.00	7.32±0.05	1.84±0.05	82.87±0.40
مقدار آماره t	-36.23**	-13.04**	-42.05**	-14.56**	-75.26**

بهینه عصاره مخمر بر میزان فنول و فلاونوئید کل ریشه‌های موئین نشان داد که میانگین فنول (۷/۳۲±۰/۰۵ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر) و فلاونوئید کل

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان فنول و فلاونوئید: نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت

بهمراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان IC_{50} ریشه‌های موئین نشان داد که میانگین IC_{50} ($1/0 \pm 62/02$) میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ریشه‌های حاصل از سویه C58C1 کمتر از میانگین IC_{50} ($2/0 \pm 12/03$) میکروگرم بر میلی‌لیتر) ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 بود که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). این موضوع نشان می‌دهد که ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 در مقایسه با ریشه‌های حاصل از A4 فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهد (جدول ۲).

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP: نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی به روش FRAP ریشه‌های موئین نشان داد که میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP ($14/0 \pm 77/16$) میلی‌مول آهن II بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 بیشتر از میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP ($11/0 \pm 71/11$) میلی‌مول آهن II بر گرم وزن تر) ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 بود که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

($1/84 \pm 0/05$) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 بیشتر از میانگین فنول ($4/20 \pm 0/05$) میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر) و فلاونوئید کل ($1/04 \pm 0/02$) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 بود که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. (جدول ۱). طبق نتایج به دست آمده، میزان افزایش فنول و فلاونوئید کل در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 به ترتیب $1/74$ و $1/76$ برابر نسبت به ریشه‌های موئین کنترل افزایش یافت.

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان آلکالوئید کل: نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان آلکالوئید کل ریشه‌های موئین نشان داد که میانگین آلکالوئید کل ($82/87 \pm 0/40$) میکروگرم بر گرم وزن خشک:) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 $1/77$ برابر بیشتر از میانگین آلکالوئید کل ($46/81 \pm 0/26$) میکروگرم بر گرم وزن خشک) ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 بود که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. (جدول ۱).

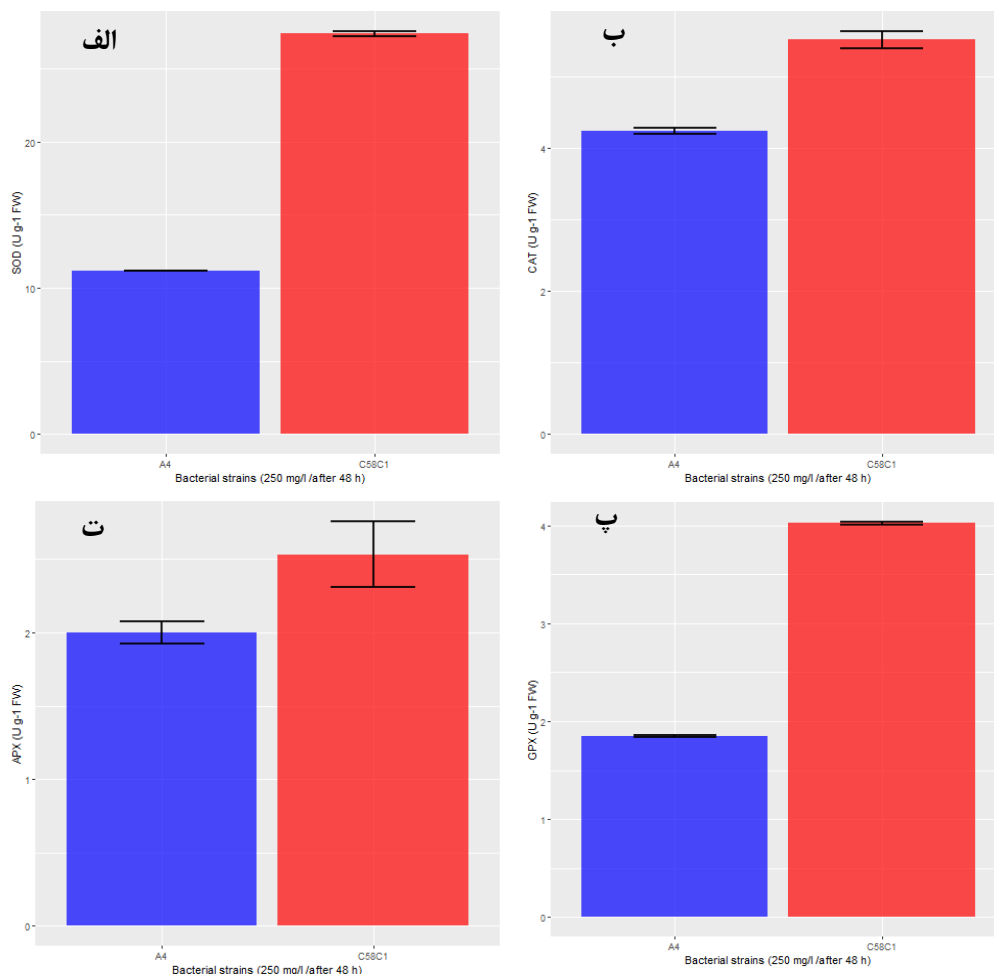
تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم

جدول ۲- تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP و DPPH ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و آزمون T-test جفت نشده

(انحراف معیار میانگین نمونه) \pm SE میانگین		
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP (میلی مول آهن II بر گرم وزن تر)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	نوع سویه
11.71 \pm 0.11	2.12 \pm 0.03	سویه A4
14.77 \pm 0.16	1.62 \pm 0.02	سویه C58C1
-15.50**	11.97**	مقدار آماره t

که میانگین فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی (SOD، CAT، GPX، APX) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 به ترتیب ۲/۴۵، ۱/۳۰، ۱/۸۲ و ۲/۱۸ برابر بیشتر از میانگین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 بود که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۳).

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز ریشه‌های موئین نشان داد



شکل ۳- تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، الف: سوپراکسید دیسموتاز، ب: کاتالاز، ت: آسکوربات پراکسیداز، پ: گایاکول پراکسیداز

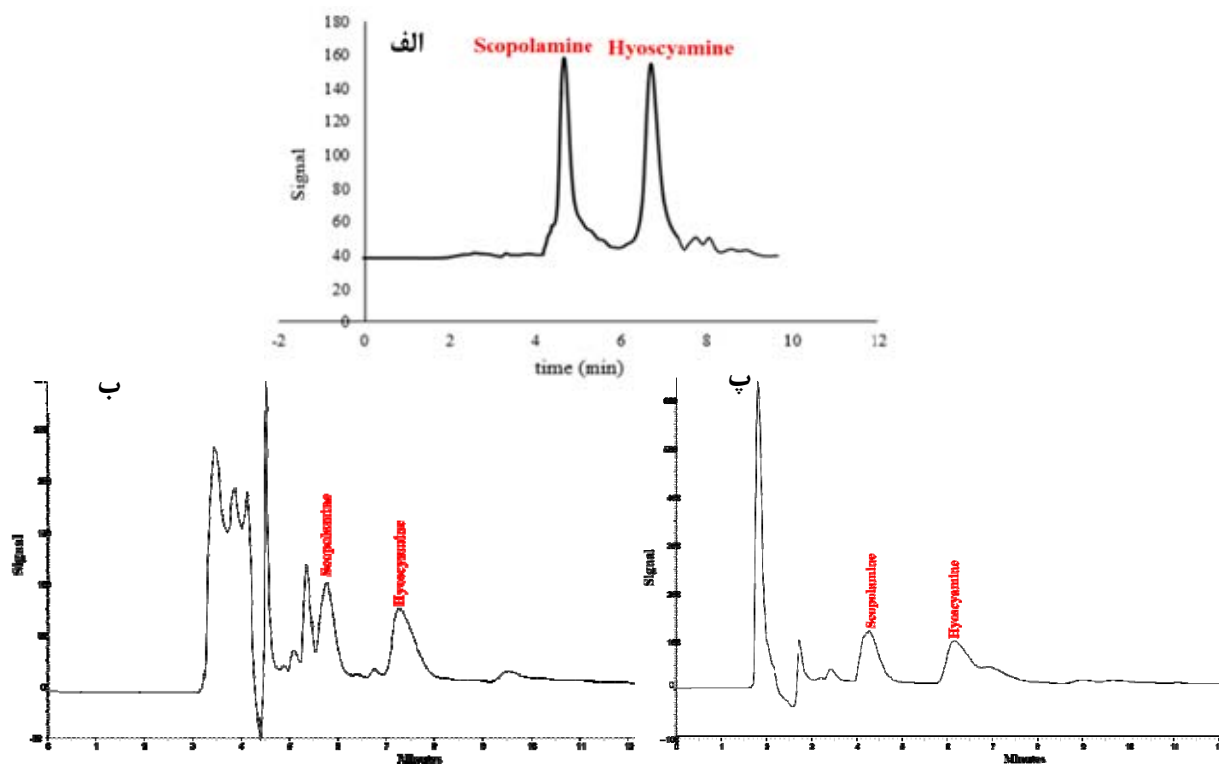
ریشه‌های موئین دو سویه A4 و C58C1 تیمار شده با غلظت بهینه عصاره مخمر در شکل ۴ آورده آمده است. نتایج مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان تولید هیوسیامین

تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به همراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها: کروماتوگرام مربوط به استاندارد ترکیبات هیوسیامین و اسکوپولامین و همچنین کروماتوگرام‌های مربوط به عصاره

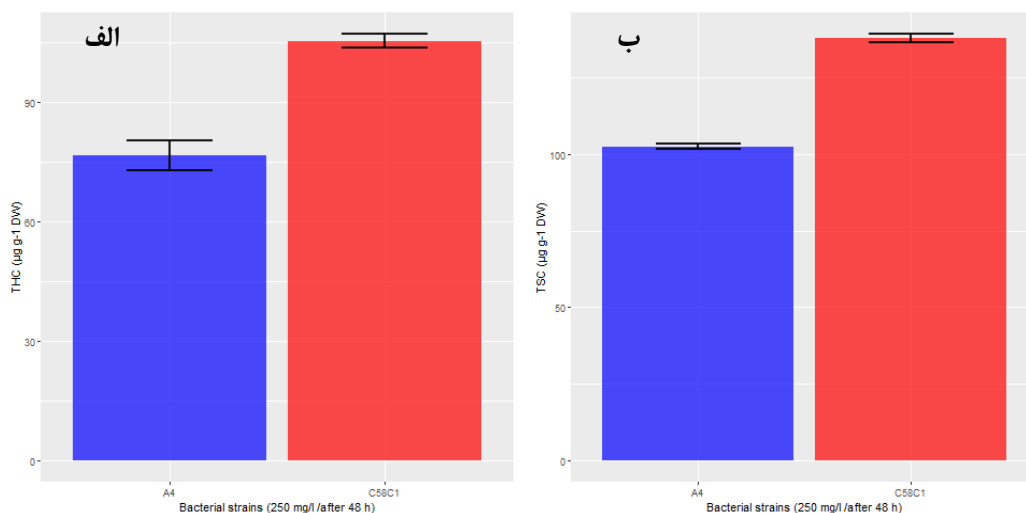
بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مقایسه دو سویه مختلف باکتری آگروباکتریوم (سویه A4 از *A. rhizogenes* و سویه C58C1 از *A. tumefaciens*) به‌مراه غلظت بهینه عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بعد از ۴۸ ساعت به‌عنوان محرک زیستی نشان داد که وزن تر و خشک ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 نسبت به سویه A4 به‌طور مؤثری در گیاه بذرالبنج مشبک تحت تأثیر عصاره مخمر قرار گرفت. اختلاف در مورفولوژی و میزان رشد ریشه‌های موئین را می‌توان به تنوع پلاسمیدهای وارد شده توسط سویه‌های مختلف باکتری نسبت داد که به چگونگی تأثیر ژن‌های *rol* مربوط می‌شود. بیان این ژنها، سطح هورمون‌های اکسین و سیتوکینین گیاه میزبان و نیز میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطح هورمون رشد را تغییر می‌دهند (۵۳).

و اسکوپولامین ریشه‌های موئین نشان داد که میانگین تولید هیوسامین ($76/66 \pm 3/75$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و اسکوپولامین ($102/30 \pm 0/88$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 کمتر از میانگین تولید هیوسامین ($105/30 \pm 1/76$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و اسکوپولامین ($137/70 \pm 1/45$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 بود (شکل ۵) که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۵). طبق نتایج به دست آمده، میزان افزایش تولید هیوسامین و اسکوپولامین در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 به ترتیب ۱/۳۷ و ۱/۳۴ برابر نسبت به ریشه‌های موئین کنترل افزایش یافت.



شکل ۴-الف- کروماتوگرام پیک‌های استاندارد حاصل از دستگاه HPLC تروپان آلکالوئیدها، ب: کروماتوگرام ریشه‌های موئین القا شده با سویه A4 و پ: کروماتوگرام ریشه‌های موئین القا شده با سویه C58C1



شکل ۵- تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به‌مراه غلظت بهینه عصاره مخمر بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها، الف: هیوسیامین ب: اسکوپولامین

و ارزان برای تولید آسان و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۵۹).

سه آنزیم مهم در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها شامل هیوسیامین -۶- بتا هیدروکسیلاز (H6H)، تروپینون ردوکتاز (TR-I) و پوترسین -N- متیل ترانسفراز (PMT) هستند (۴۵). بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها مانند هیوسیامین و اسکوپولامین با تشکیل یون -N- متیل پیرولینیوم از آمینواسیدهای اورنیتین و آرژینین آغاز می‌شود. پوترسین -N- متیل ترانسفراز (PMT) آنزیم دخیل در برداشت پوترسین از مخزن پلی آمین می‌باشد و -N- متیلاسیون دی آمین را به شکل -N- متیل پوترسین کاتالیز می‌کند. این مرحله اولین مرحله مشترک در بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها و نیکوتین می‌باشد و منجر به تولید یک ترکیب حدواسط دارای بار مثبت (-N) متیل پیرولینیوم) می‌گردد. سپس مسیر تروپان آلکالوئیدها از مسیر تولید نیکوتین جدا می‌شود. آخرین مرحله در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها، توسط آنزیم هیوسیامین -۶- بتا هیدروکسیلاز انجام می‌شود. در این مرحله، آنزیم هیوسیامین -۶- بتا هیدروکسیلاز، هیدروکسیلاسیون هیوسیامین را به -۶- بتا هیدروکسی هیوسیامین و نیز

همچنین دلیل دیگر این تفاوت‌ها، بیان متفاوت ژن‌های T-DNA ریشه‌های تراریخته، تعداد کپی‌های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNA به ژنوم گیاه می‌باشد (۷).

در این مطالعه، مقایسه تأثیر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم به‌مراه غلظت بهینه عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم بر لیتر) بعد از ۴۸ ساعت به‌عنوان محرک زیستی نشان داد که سویه C58C1 در ریشه‌های موثین به طور مؤثری میزان تولید و تجمع ترکیبات فیتوشیمیایی به ویژه فنول و فلاونوئید کل، آلکالوئید کل، هیوسیامین و اسکوپولامین را نسبت به سویه A4 تحت تأثیر قرار داد. از دلایل افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موثین ممکن است انتقال T-DNAی باکتری آگروباکتریوم و اختلال در مسیر بیوسنتز ترکیبات با ارزش باشد (۴). به طور کلی تولید انبوه و سریع متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بالا با استفاده از روش‌های شیمیایی مشکل و یا غیرممکن می‌باشد (۴۱). از راهبردهای متعددی برای بهبود تولید متابولیت‌ها می‌توان به کشت بافت گیاهی، استفاده از پیش‌سازها، کاربرد انواع محرک‌ها و مهندسی ژنتیک اشاره کرد که راه حلی مناسب

های آزاد است (۲۷). IC_{50} غلظت لازم برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد (۲۴). بین مقدار IC_{50} و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه‌ی معکوسی وجود دارد (۳۰). در روش FRAP ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با Ferric tri-pyridyl-triazine complex (Fe (III)-TPTZ) واکنش می‌دهند و موجب ایجاد رنگ آبی می‌شوند (۲۰). افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 با هر دو روش DPPH و FRAP را می‌توان با افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول، فلاونوئید و آلکالوئیدکل توضیح داد (۲۳). جامی و همکاران (۲) گزارش کردند با افزایش تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در گیاه نوروبک (*Salvia teriifolia Benth.*) فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با هر دو روش FRAP و DPPH افزایش یافت.

نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که تیمار با غلظت بهینه عصاره مخمر منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 در مقایسه با سویه A4 شد. در روابط گیاه-میکروب، دو سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی وجود دارد (۱۷). آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که مستقیماً با رادیکال‌های اکساینده واکنش نموده و آن‌ها را به فرآورده‌های غیر رادیکالی تبدیل می‌نمایند (۶۱). سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که از اکسیده شدن غشای لیپیدها جلوگیری می‌کند و در تبدیل سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نقش دارد (۲۲). آنزیم کاتالاز در پراکسی‌زوم‌ها و گلی-اکسی‌زوم‌های گیاهی حضور دارد و نقش تجزیه‌کننده H_2O_2 تولید شده طی تنفس نوری در پراکسی‌زوم‌ها یا H_2O_2 تولید شده طی بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در گلی‌اکسی-زوم‌ها را برعهده دارد. این آنزیم برای انجام فعالیت خود به نیروی احیایی نیاز ندارد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز یک پاسخ سازشی برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از سطوح بالا،

اپوکسیداسیون ۶- بتا هیدروکسی هیوسیامین را به اسکوپولامین (هیوسین)، کاتالیز می‌کند (۶۳). Kohnen-Johannsen و Kayser (۲۸) نشان دادند که بیش بیانی ژن‌های درگیر در فعال‌سازی آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها منجر به تجمع تولید این ترکیبات می‌شوند. علاوه بر این، استفاده از عصاره مخمر بعنوان محرک می‌تواند فعالیت آنزیم پوترسین متیل ترانسفراز (PMT) و به دنبال آن ظرفیت سنتز تروپان آلکالوئیدها رو به دلیل محتوی یون کلسیم (Ca) تنظیم می‌کند (۴۳). در این مطالعه از یک طرف، کاربرد *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58C1 به‌عنوان حامل ژن *pmt* و از طرف دیگر تیمار با عصاره مخمر، احتمالاً در میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها مانند H6H و PMT مؤثر بوده و به طور مستقیم یا غیر مستقیم، بیان ژن‌های *pmt* و *h6h* را تحت تأثیر قرار داده و موجب افزایش تروپان آلکالوئیدها می‌شوند. گزارشات مختلف نشان می‌دهد میزان تجمع تروپان آلکالوئیدها با بیش بیانی ژن‌های *pmt* و *h6h* در کشت ریشه‌های موئین شایبزرک (*Atropa belladonna*) بهبود یافت (۶۰ و ۳۱). همچنین مطالعات مختلف نشان می‌دهند که عصاره مخمر نقش مؤثری در افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در کشت ریشه موئین بدرالبنج مشبک (*H. reticulatus L.*) (۳۵)، اسکوپولامین در کشت ریشه موئین بنگ دانه (*H. niger L.*) (۲۱)، سیلی مارین در کشت سوسپانسیون سلولی خار مریم (*S. marianum*) (۳)، ایزوفلاونوئید کل در ریشه‌های موئین (*P. candollei*) (۵۵) داشته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با غلظت بهینه عصاره مخمر منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 در مقایسه با سویه A4 شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH یک روش ساده، سریع و حساس برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها جهت مهار رادیکال-

درصد) به مدت ۸ ساعت میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافته است (۱۱).

در کل با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که ترکیب بیش‌بیلی بیانی ژن *pmt* و استفاده از غلظت بهینه عصاره مخمر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت باعث افزایش رشد ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 نسبت به سویه A4 گردید. میزان تولید و تجمع ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله فنول، فلاونوئید و آلکالوئید کل و به دنبال آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 را بیشتر از ریشه‌های موئین سویه A4 افزایش داد. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 نسبت به سویه A4 افزایش یافت. نتایج آنالیز HPLC نیز نشان داد که تحت تأثیر بیش‌بیلی بیانی ژن *pmt* و غلظت بهینه عصاره مخمر میزان تولید و تجمع هیوسیمین و اسکوپولامین در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 افزایش قابل توجهی داشتند. بنابراین، ترکیب بیش‌بیلی بیانی و محرک می‌تواند بعنوان یک روش موفق آمیز جهت بهبود تولید تروپان آلکالوئیدها در شرایط درون شیشه‌ای باشند.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله حاضر از کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و کارشناسان بخش آنالیز دانشگاه شهید بهشتی جهت همکاری ارزشمندشان صمیمانه تشکر و امتنان را دارند. همچنین از تمام افرادی که در انجام این مطالعه ما را راهنمایی نمودند قدردانی می‌شود.

سمی و احیاکننده H_2O_2 می‌باشد که طی متابولیسم سلول تولید می‌گردد. آسکوربات پراکسیداز نقش کلیدی در پاکسازی ROS و حفاظت سلول‌ها در مقابل اثرات مخرب آن‌ها در گیاهان عالی دارد (۳۴). آسکوربات پراکسیداز، یک پراکسیداز اختصاصی می‌باشد که H_2O_2 را از طریق چرخه آسکوربات-گلوتاتیون با کمک اسیدآسکوربیک به آب و مونو دهیدور آسکوربات تجزیه می‌نماید (۴۲). یکی دیگر از آنزیم‌های اکسیدکننده ترکیبات فنولی آنزیم گایاکول پراکسیداز می‌باشد که نقش مهمی در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی دارد. گایاکول پراکسیدازها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که ترکیبات فنولی را مانند یک دهنده هیدروژن مصرف کرده و در فرآیندهای نمو، بیوسنتز اتیلن، لیگنین‌سازی، دفاع و التیام زخم‌ها شرکت می‌کنند (۵۶). در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین حاصل از سویه C58C1 در مقایسه با کنترل افزایش یافته است که این افزایش ممکن است دو دلیل داشته باشد: ۱- سطح بالای بیان ژن T-DNA از طریق *A. tumefaciens* در مقایسه با *A. rhizogenes* (۱۴) ۲- تولید بیشتر ROS در این غلظت از عصاره مخمر و مقابله گیاه با این ROSها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. نتایج تحقیق Ara و همکاران (۱۰) نشان داد با بیش‌بیلی بیانی ژن‌های *FeSOD* و *MnSOD* در ساقه و ریشه دو گونه مختلف خیار (*Cucurbita maxima*) و (*Cucurbita moschata*) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در ریشه موئین بذربالنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L) بوسیله عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم بر عصاره مخمر بعد از ۲۴ ساعت) افزایش یافت (۳۵). در گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*) در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و

منابع

۲. جامی، س.، اسمعیل زاده بهابادی، ص. و مدرس، م. (۱۳۹۷). تأثیر کیتوزان بر ریز ازدیادی، محتوی تولید متابولیت‌های ثانویه و

۱. امید بیگی، ر. (۱۳۸۸). تولید و فرآوری گیاهان دارویی جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی، ۳۴۷ صفحه.

۴. سهرابی نژاد، مرعشی، س.ح. و مشتاقی، ن. (۱۳۹۷). بهینه‌سازی کشت ریشه‌های موپین گیاه دارویی همیشه بهار *Calendula officinalis* به منظور تولید ترکیب دارویی اولتانولیک اسید. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۱(۳): ۶۴۰-۶۵۴.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروک *Salvia leritifolia* (Benth.) مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۱(۳): ۵۶۸-۵۷۸.

۳. رحیمی آشتیانی، س، حسنلو، ط و بی‌همتا، م. (۱۳۸۸). به کارگیری عصاره مخمر به‌عنوان یک راهکار به منظور افزایش محتوای فلاونوئیدها در کشت تعلیقی سلولی گیاه خار مریم از طریق مکانیزم تحریک، فصلنامه گیاهان دارویی، ۸(۴): ۱۰۹-۱۱۹.

5. Aebi H (1984) In: Colowick SP, Kaplan NO Catalase in vitro. Method Enzymol Florida: Acad pp, 114-121.
6. Ajanal M, Gundkalle MB, Nayak SU (2012) Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. Anc Sci Life 31, 198-201.
7. Akramian M, Fakhr Tabatabaei SM, Mirmasoumi M (2008) Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. Am Eurasian J Agric Environ Sci 3, 759-763.
8. Al-Snafi AE, (2018). Therapeutic importance of *Hyoscyamus* species grown in Iraq (*Hyoscyamus albus*, *Hyoscyamus niger* and *Hyoscyamus reticulatus*)-A review. IOSR J Pharm 8, 18-32.
9. Alvarez MA, Marconi PL (2011) Genetic transformation for metabolic engineering of tropane alkaloids. In Genetic Transformation, pp. 291-304.
10. Ara N, Nakkanong K, Lv W, Yang J et al. (2013) Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two *cucurbit* species ("*Cucurbita maxima*" and "*Cucurbita moschata*") and their interspecific inbred line "Maxchata". Int J Mol Sci 14, 24008-24028.
11. Arastefar A, Riahi-Madvar A, Tohid Far M, Yousefi K (2013) Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in *Glycine max* seedlings. J Agric Biotech 5, 1-18.
12. Bahmanzadegan A, Sefidkon F, Sonboli A et al. (2009) Determination of hyoscyamine and scopolamine in four *Hyoscyamus* species from Iran. Iran J Pharm Res 8, 65-70.
13. Banerjee S, Singh S, Rahman LU (2012) Biotransformation studies using hairy root cultures—review. Biotechnol. Adv 30, 461-468.
14. Bulgakov VP, Aminin DL, Shkryl YN, Gorpenchenko TY et al. (2008) Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene. Mol Plant Microbe Interact 21, 1561-1570.
15. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal, 178-182.
16. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 39-40.
17. Gheisary B, Hosseini B, Hassanpour H, Rahimi A (2018) Effects of Silicon and AgNO₃ Elicitors on Biochemical Traits and Antioxidant Enzymes Activity of Henbane (*H. reticulatus* L.) Hairy Roots. J Med Plants Res, 7, 135-144.
18. Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. Plant Physiol 59, 309-314.
19. Giri A, Narasu ML (2000) Transgenic hairy root: recent trends and application. Biotechnol. Adv 18, 1-22.
20. Gülçin İ (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch Toxicol 86, 345-391.
21. Hong MLK, Bhatt A, Ping NS, Keng CL (2012) Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Rom Biotechnol Lett 17, 7340-7351.
22. Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Med J 54, 287-293.
23. Ismail H, Dilshad E, Waheed MT, Sajid M et al. (2016) Transformation of *Lactuca sativa* L. with *rolC* gene results in increased antioxidant potential and enhanced analgesic, anti-

- inflammatory and antidepressant activities *in vivo*. *Appl Biochem Biotechnol* 6, 1-11.
24. Jadid N, Hidayati D, Hartanti SR, Arraniry BA, Rachman RY, Wikanta W (2017) Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay. *AIP Conf Proc* 1854, 020019-1–020019-6.
 25. Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1985) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep* 5, 239-242.
 26. Kang YM, Lee OS, Jung HY, Kang SM et al. (2005) Overexpression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase (*h6h*) gene and enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* hairy root lines. *J Microbiol. Biotechnol* 15, 91-98.
 27. Khalili M, Hasanloo T, Kazemi TS, Sepehrfar R (2010). Effect of salicylic acid on antioxidant activity in milk thistle hairy root cultures. *J Med Plants* 35, 51-60.
 28. Kohnen-Johannsen KL, Kayser O (2019) Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* 24, 796.
 29. Kumar J, Gupta PK (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnol Rep* 2(2), 93-112.
 30. Li X, Wu X, Huang L (2009) Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae sinensis* (Danggui). *Molecules* 14, 5349-5361.
 31. Liu X, Yang C, Chen M, Li M et al (2010) Promoting scopolamine accumulation in transgenic plants of *Atropa belladonna* generated from hairy roots with over expression of *pmt* and *h6h* gene. *J Med Plant Res* 4, 1708-1713.
 32. MacAdam JW, Nelson CJ, Sharp RE (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol* 99, 872-878.
 33. Madani H, Hosseini B, Dehghan E, Rezaei-chiyaneh E (2015) Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. *Acta Physiol Plant* 37, 55-68.
 34. Mishra A, Jha B (2011) Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Bot Mar* 54, 195–199.
 35. Moharrami F, Hosseini B, Sharafi A, Farjaminezhad M (2017) Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 53, 104-111.
 36. Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó RM et al. (2002) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the *pmt* gene. *Phytochem* 59, 697-702.
 37. Moyano E, Jauhikainen K, Tammela P, Palazón J et al. (2003) Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J Exp Bot* 54, 203-211.
 38. Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Sci Eng* 2, 29-48.
 39. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
 40. Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *J Soc Political Psychol* 28, 131-140.
 41. Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev* 1, 69–79.
 42. Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249- 279.
 43. Pinol Teresa M, Palazon J, Cusido RM, Ribo M (1999) Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy root. *Plant Sci J* 141, 41-49.
 44. Pirian K, Piri K, (2013) Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L. *Intl J Agron Plant Prod* 4, 2960-2964.
 45. Pramod KK, Singh S, Jayabaskaran C (2010) Expression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase in the root pericycle cells and accumulation of its product scopolamine in leaf and stem tissues of *Datura metel* L. *Plant Sci* 178, 202-206.
 46. Qavami N, Azizi M, Yazdian F, Qaderi A (2018). Effective induction of hairy roots in persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.) using sonication method. *J. Med. Plant* 17(65), 73-82.

47. Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic* 28, 49-55.
48. Srivastava S, Srivastava AK (2013) Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *azadirachta indica*. *Appl Biochem Biotechnol*. 6, 664-676.
49. Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci J* 161, 613-619.
50. Suzuki T, Mori H, Yamané T, Shimizu S (1985) Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. *Biotechnol Bioeng* 27, 192-201.
51. Tepfer D (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol Plant* 79, 140-146.
52. Tilburt JC, Kaptchuk TJ (2008) Herbal medicine research and global health an ethical analysis. *Bull. World Health organ* 86, 594-599.
53. Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC (2007) Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Rep* 26, 199-210.
54. Tripath L, Tripathi JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop J Pharm Res* 2, 243-253.
55. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W (2011) Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol Lett* 33, 369-374.
56. Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164, 645-655.
57. Verpoort R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1, 13-25.
58. Weremczuk-Jeżyna I, Grzegorzczuk-Karolak I, Frydrych B, Królicka A, Wysokińska H (2013) Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential. *Acta Physiol Plant* 35, 2095-2103.
59. Wu JY, Shi M (2008) Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Appl Biochem Biotechnol* 78, 441-448.
60. Yang C, Chen M, Zeng L, Zhang L et al. (2011) Improvement of Tropane Alkaloids Production in Hairy Root Cultures of *Atropa belladonna* by Overexpressing *pmt* and *h6h* Genes. *Plant Omics* 4, 29-33.
61. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby CL (2002) Antioxidant properties of cereal products. *J Food Sci* 67, 2600-2603.
62. Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89, 11799-11803.
63. Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M et al. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 101, 6786-6791.
64. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23, 283-333.
65. Zugic A, Dordevic S, Arsic I, Markovic G et al. (2014) Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Ind Crop Prod* 52, 519-527.

Investigation of *pmt* gene overexpression on morphological, biochemical characteristics and production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots under the influence of optimal concentration of yeast extract

Shameh Sh.¹, Hosseini B.¹ and Palazon J.²

¹ Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

² Dept. of Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Abstract

Genetic engineering and elicitors are useful strategies to optimize high level production of secondary metabolites. In this study, hairy roots were produced with inoculated cotyledon explants of *Hyoscyamus reticulatus* L. with strain A4 of *Agrobacterium rhizogenes* and strain C58C1 (pRiA4-pBMI) carrying the *pmt* gene of *Agrobacterium tumefaciens*. Then, the effect of *pmt* gene overexpression and optimal concentration of yeast extract (250 mg l⁻¹ after 48 h) were evaluated on morphological, biochemical characteristics and production of tropane alkaloids in hairy roots obtained from two strains. The results of the effect of different *Agrobacterium* strains with the optimal concentration of yeast extract showed that in hairy roots obtained from C58C1 strain, fresh weight (2.85 times) and dry weight (2.27 times), total phenol (1.74 times), flavonoid (1.76 times) and alkaloid (1.77 times) were higher than the hairy roots obtained from A4 strain. The maximum antioxidant capacity using two methods IC₅₀ (1.62 μg ml⁻¹) and FRAP (14.77 mmol Fe²⁺ g⁻¹ FW) were observed in hairy roots obtained C58C1 strain. The activity of antioxidant enzymes including superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase in hairy roots obtained from C58C1 strain were 2.45, 1.30, 1.82 and 2.18 times higher than hairy roots obtained from A4 strain, respectively. Also, the highest production of hyoscyamine (1.37 times) and scopolamine (1.34 times) was obtained in hairy roots from C58C1 strain. The results showed that the combination of *pmt* gene overexpression and the optimal concentration of yeast extract could be used as a suitable method to increase the production of phytochemicals, antioxidant capacity, activity of antioxidant enzymes and tropane alkaloids in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots.

Key words: Genetic Engineering, Overexpression, Total Alkaloids, Tropane Alkaloids, Yeast Extract.