تأثیر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر میزان زیست توده و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی ریشه‌های موئین گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

مدینه خضرلو[۱]، بهمن حسینی[۲*] و جعفر امیری[۱]

[۱] **ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی**

[۲] **ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

بذرالبنج مشبک گیاهی علفی، دوساله و متعلق به تیره سیب‌زمینی سانان می‌باشد و به‌دلیل تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین به‌طور گسترده‌ای در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پژوهش حاضر، به‌منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی، کشت ریشه موئین مشتق شده از ریز نمونه برگ‌های لپه‌ای تراریخت شده با سویه‌ی *Agrobacterium rhizogenes* A7، توسط نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم تحریک گردیدند. تأثیر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم (۵/۱ : ۹/۹، ۱۰/۲۵ : ۱۹/۷۵، (شاهد) ۲۰/۵ : ۳۹/۵، ۴۱ : ۷۹ و ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌متر) در دو تیمار زمانی (۲۴ و ۴۸ ساعت) مورد بررسی قرارگرفت. براساس مقایسه میانگین، بیشترین محتوای هیوسیامین و آسکوپولامین (۱/۵ و ۱/۱۷ برابر بیشتر از شاهد)، به ترتیب در تیمار نسبت ۵/۱ : ۹/۹ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به‌مدت ۲۴ ساعت مشاهده گردید. همچنین، بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز (۳۵/۶۱۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، ۲۴ ساعت پس از تیمار با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم، پراکسیداز (۶۴/۳۷۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، ۴۸ ساعت پس از تیمار با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم و آسکوربات پراکسیداز (۱۵۶/۱۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، ۴۸ ساعت پس از تیمار با نسبت ۱۰/۲۵ : ۱۹/۷۵ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به دست آمد. باتوجه به این نتایج، محرک نیترات به آمونیوم می‌تواند در بیوتکنولوژی گیاهی به عنوان محرک مؤثر جهت تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی ازجمله آلکالوئیدهای تروپانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدهای تروپانی، بذرالبنج مشبک، محرک، ریشه موئین، نیترات به آمونیوم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۸ ، پست الکترونیکی: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

بذرالبنج مشبک به لحاظ تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین که ترکیبات مورد علاقه‌ی صنعتی و دارویی هستند، به‌طور گسترده‌ای در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱و ۳). آسکوپولامین ارزشمندترین آلکالوئید تروپانی می‌باشد و تقاضای جهانی آن حدود ۱۰ برابر بیشتر از هیوسیامین است (۲۳). در بسیاری موارد کشت‌های درون شیشه‌ای در شرایط کاملاً کنترل شده و به‌طور دقیق می‌توانند همان ترکیبات باارزش گیاهان را تولید کنند (۲۵). با توجه به ارزش دارویی متابولیت‌های ثانوی می‌توان میزان تولید این ترکیبات را با استفاده از روش‌های زیست‌فناوری افزایش داد. ولی بااین‌حال بازده پایین و تکرارپذیری کم کشت‌ها و عدم ثبات تولید، عامل محدودکننده در زمینه کشت‌های تمایز نیافته مثل کشت پینه و تعلیق یاخته‌ای می‌باشد که امروزه

تکنیک‌های جدیدی در زمینه کشت بافت به‌منظور رفع این عیوب مورد استفاده قرار می‌گیرد که ازجمله این تکنیک‌ها، تکنیک کشت ریشه‌های موئین می‌باشد (۴۵). القای ریشه موئین از مناسب‌ترین سیستم‌ها برای تولید متابولیت‌های ثانوی است. در شرایط آزمایشگاهی، تراریختی گیاه با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* موجب تولید سیستم ریشه موئین با سرعت رشد بالا و توانایی سنتز متابولیت-های مهم و حتی متابولیت‌های ناشناخته می‌شود (۱۰ و ۱۱). ثبات بیوشیمیایی، ژنتیکی و توانایی رشد در محیط فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از دیگر ویژگی‌های ریشه‌های موئین است که استفاده از آن‌ها را در زیست‌فن-آوری ترغیب می‌نماید (۱۷). با توجه به این‌که آلکالوئیدهای تروپانی عمدتاً در ریشه سنتز و سپس به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند (۲۱) همچنین، با توجه به جای‌گیری اختصاصی بعضی از آنزیم‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز این آلکالوئیدها (به‌عنوان‌مثال بیان وابسته به پریسیکل پوتریسین‌متیل‌ترانسفراز (PMT= Putrescine N-methyltransferase) ، و جای‌گیری اختصاصی هیوسیامین ۶β- بتا هیدروکسیلاز (H6H= Hyoscyamine-6β-hydroxylase) ، در دایره محیطیه ریشه)، تلاش برای تولید تروپان آلکالوئیدها به ویژه آسکوپولامین در سیستم‌های زیست‌فن‌آوری عمدتاً مبتنی بر کشت ریشه‌های موئین می-باشد (۳۶). تجمع متابولیت‌های ثانوی در گیاه بخشی از واکنش دفاعی گیاه در برابر حمله پاتوژن‌هاست که به‌وسیله محرک‌ها که ترکیبات سیگنالی مربوط به واکنش‌های دفاعی گیاهان هستند آغاز و فعال می‌شود (۵۰). در شرایط درون شیشه، گیاهان و سلول‌های گیاهی به عوامل شیمیایی، فیزیکی و میکروبی تحت عنوان محرک‌ها، واکنش‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی نشان می‌دهند. تحریک‌زایی (Stimulation) روندی است که باعث افزایش ساخت متابولیت‌های ثانوی گیاهان شده و بقا، تداوم و رقابت-پذیری آن‌ها را تضمین می‌کند (۳۵). عوامل تغذیه‌ای از قبیل نیتروژن، شاخص مهمی است که تولید آلکالوئیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶). از آنجایی که آلکالوئیدها ترکیبات نیتروژن دار هستند، پیش‌بینی شده که قابلیت استفاده از نیتروژن نقش مهمی در بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها در گیاهان ایفا نمایند (۴۸). پژوهش‌های بن‌صداک و همکاران (۱۵) بر روی ریشه‌های مویین دو کلون شابیزک (*Atropa belladonna*) نشان داد که افزایش در نسبت آمونیوم منجر به کاهش رشد ریشه‌های مویین شد، در حالی که نیترات اثر مشخصی بر مقدار آلکالوئید داشت. تولید آلکالوئیدها در نسبت‌های ۱۵/۸ میلی‌مولار نیترات و ۲۰/۵ میلی‌مولار آمونیوم ۱/۴-۱/۲ برابر بیشتر از هنگامی که ریشه‌ها در محیط MS (Murashig and Skoog) استاندارد (با ۳۹/۵ میلی مولار نیترات و ۲۰/۵ میلی مولار آمونیوم) رشد داده شدند، به دست آمد. در پژوهشی وانگ و تان (۴۹) نشان دادند که غلظت بهینه نیتروژن کل برای تولید آرتمیزین (Artemisinin) در گیاه درمنه (*Artemisia annua*) ۲۰ میلی‌مولار می‌باشد. همچنین بررسی‌های چن و همکاران (۱۸) در محیط B_5 در کشت تعلیق سلولی سرخدار (*Taxus yunnanensis*) نشان داد که غلظت بهینه نیترات برای رشد و تولید تاکسول (Taxol) ۳۰-۲۰ میلی‌مولار می‌باشد. نتایج بررسی‌های پان و همکاران (۳۷) نیز نشان داد که بیشترین عملکرد کامپتوتسین (Camptothecin) (۶/۳ میلی‌گرم بر لیتر) با ۴۰ میلی‌مولار نیتروژن کل به دست آمد. بررسی صورت گرفته توسط شینده و همکاران (۴۳) در گیاه بابچی (*Psoralea corylifolia*) نشان داد که محیط کشت MS تکمیل شده با نسبت ۱۰ : ۲۰ میلی‌مولار آمونیوم به نیترات حداکثر زیست توده (۱۳/۸۶ گرم بر لیتر وزن خشک) را تولید کرد و این محیط بیشترین قابلیت تولید ایزوفلاون دایدزئین (Daidzein) (۲/۰۵ درصد وزن خشک) و جنیستئین (Genistein) (۰/۵۱ درصد وزن خشک) را دارا بود. بیشترین تولید ویتانولید (Withanolide A) (۱۴/۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در گیاه بوزیدان (*Withania somnifera*) در نسبت ۱۸/۸۰ : ۰۰/۰۰ میلی‌مولار آمونیوم

به نیترات گزارش شد (۳۹). با توجه به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانوی از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً پر هزینه، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و نیز به دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آن‌ها در گیاهان دارویی، استفاده از راهکارهایی مثل کشت ریشه موئین تراریخت و محرک‌ها می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود بخشد. ریشه‌های موئین تراریخت منبع ارزشمندی برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با کاربرد دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی می‌باشند. این ریشه‌ها همچنین می‌توانند بیش از یک متابولیت تولید نمایند و بنابراین ثابت شده که از نظر تولید تجاری و اقتصادی هستند. تولید متابولیت‌های ثانوی با استفاده از تکنولوژی کشت بافت گیاهی هنوز هم دچار محدودیت‌های بیولوژیکی و بیوتکنولوژیکی است. یکی از این موارد، درصد پایین متابولیت‌های تولیدشده در این تکنیک می‌باشد. بنابراین رویکردهای متعددی مثل استفاده از محرک‌های متفاوت و تحریک مسیر بیوسنتزی برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین تراریخت استفاده شده است. بنابراین، در پژوهش حاضر، تأثیر محرک غیرزیستی نیترات به آمونیوم در نسبت‌ها و زمان‌های مختلف، بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کشت ریشه‌های موئین تراریخت گیاه بذرالبنج مشبک مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

کشت گیاه بذرالبنج مشبک: این پژوهش در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده زیست‌فن‌آوری دانشگاه ارومیه انجام گردید. بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک (*H. reticulatus* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها ابتدا به مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد (حجمی- حجمی) و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد (حجمی- حجمی) ضدعفونی شدند و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو انجام گردید. پس از ضدعفونی، بذرها در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۷ درصد آگار (وزنی- حجمی) کشت و به‌منظور جوانه‌زنی به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

القای ریشه موئین: برای تهیه ریشه‌های موئین (Hairy root) از سویه *Agrobacterium rhizogenes* A7 استفاده شد که این سویه از بانک میکروبی مؤسسه‌ی ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فن‌آوری تهران تهیه گردید. به منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی، یک هفته پس از جوانه‌زنی، برگ‌های لپه‌ای از گیاهچه‌های مادری استریل جدا و به‌مدت سه دقیقه درون محلول تعلیق باکتری غوطه‌ور شدند. قطعات برگ‌های لپه‌ای آلوده بر روی محیط کشت MS جامد (محیط هم کشتی (Co-culture) ریزنمونه با باکتری) کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت، داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از آن، به محیط کشت MS جامد عاری از تنظیم‌کننده رشد که حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. بعد از گذشت ۱۰ روز، جهت افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هریک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت مجزا و لاین‌های انفرادی به محیط کشت پایه MS جامد عاری از تنظیم‌کننده رشد و حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. واکشت ریز نمونه‌ها در محیط جدید هر ۱۰ روز یکبار صورت گرفت. در هر مرحله واکشت، اندکی از بافت ریزنمونه حذف گردید و غلظت آنتی‌بیوتیک به نصف کاهش یافت. در نهایت پس از ۴ مرحله واکشت، با حذف کامل ریزنمونه و آنتی‌بیوتیک، ریشه‌های موئین تراریخت بدون آلودگی باکتریایی و با سرعت زیاد در محیط کشت تکثیر یافتند. از میان ۴۵ لاین ریشه‌موئین القاء شده، یک لاین پر رشد جهت انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب گردید.

تائید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین: برای تائید تراریختی ریشه‌های موئین از روش مولکولی استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی ریشه‌های موئین به روش خان و همکاران (۲۶) استخراج و پس از آن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* B

Forward Primer: 5'-
ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA- 3'

Reverse Primer: 5'-
TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC- 3'

و طبق برنامه (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی اولیه، ۳۵ چرخه شامل: دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۱۰ ثانیه و دمای طویل شدن مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محلول PCR به همراه ۳ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی متیلن بلو در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت، به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. جهت مشخص شدن اندازه قطعات حاصل، از DNA مارکر Orange Rule 50 bp DNA Ladder (Sinaclon) استفاده گردید.

تحریک ریشه‌های موئین توسط نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم: به‌منظور تعیین تأثیر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر روی رشد ریشه و تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین، محیط کشت MS پایه تغییر داده شد. لازم به ذکر است که برای تهیه‌ی محیط کشت MS پایه از دو نمک KNO_3 و NH_4NO_3 که حاوی ۲۰/۵ : ۳۹/۵ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم می‌باشد به‌عنوان شاهد استفاده گردید و از نمک KNO_3 برای تأمین نیترات و از نمک $(NH_4)_2SO_4$ به منظور تأمین آمونیوم محیط کشت‌های تغییر یافته با ترکیبات مختلف یون‌های نیترات به آمونیوم (۵/۱ : ۹/۹، ۱۰/۲۵ : ۱۹/۷۵، ۴۱ : ۷۹ و ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار) از نظر منبع نیتروژن استفاده گردید. برای انتخاب نسبت‌ها و نمک‌های مورد استفاده در محیط کشت تغییر یافته از نتایج مطالعات بن صداک و همکاران (۱۵) باکمی تغییرات به‌عنوان نمونه کار استفاده گردید. حدود یک گرم از لاین پر رشد ریشه موئین ۱۰ روزه داخل محیط کشت MS مایع حاوی نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم، در سه تکرار، منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین از محیط کشت حاوی محرک، خارج و به محیط کشت MS مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت ۱۰ روز، عمل برداشت ریشه‌های موئین صورت گرفت و بعد از شستشو با آب مقطر و حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها، وزن‌تر ریشه‌ها با استفاده ار ترازوی حساس (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌ها به مدت دو روز در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، هوا خشک شده و وزن خشک آن‌ها ثبت گردید.

استخراج تروپان آلکالوئیدها: استخراج آلکالوئیدها به روش کامادا و همکاران (۲۴) با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم ماده گیاهی خشک پودر شده با کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۸ درصد (حجمی- حجمی) به ترتیب با نسبت‌های ۱۵ : ۵ : ۱ و به مدت یک ساعت در معرض حمام فراصوتی (دمای ۴۳ درجه سانتی-گراد) قرار گرفت. پس از عبور عصاره از کاغذ صافی، فاز کلروفرمی به کمک دستگاه تبخیرکننده دوار خشک شد. در مرحله بعد، مخلوط ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و دو میلی‌لیتر اسیدسولفوریک یک نرمال به عصاره اضافه شد. محلول پایینی جدا و دور ریخته شد و محلول رویی حاوی آلکالوئید تا pH ۱۰ الی ۱۱ و با استفاده از آمونیاک ۲۸ درصد (حجمی- حجمی)، بر روی یخ تنظیم شد. آلکالوئیدها یک‌بار با دو میلی‌لیتر کلروفرم و دو بار با یک

میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. ماده نهایی پس از اضافه کردن سولفات سدیم، آبگیری و صاف شد. در نهایت برای آنالیز GC-MS، نمونه در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل شد.

سنجش آلکالوئیدها به روش GC-MS: به منظور شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین از دستگاه کروماتوگراف گازی (HP, Palo Alto, CA, USA) Hewlett-Packard، مدل HP 7890A GC و کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی Hewlett-Packard، مدل 5975C، مجهز به ستون موئینه HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، با ضخامت لایه‌ی فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر استفاده گردید. دمای رابط GC/MS، منبع یون و کوادروپل به ترتیب ۲۸۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، میزان تزریق ۱ میکرولیتر و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود. در کروماتوگرافی گازی در برنامه‌ریزی حرارتی ستون، دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه بود که با افزایش پنج درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد رسید و به مدت پنج دقیقه در این دما باقی ماند. سپس با افزایش پنج درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت پنج دقیقه در این دما باقی ماند. دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد (حجمی- حجمی) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای آنالیز نتایج این مطالعه از نرم‌افزار MSD CHEMSTATION DATA ANALYSIS استفاده گردید. همچنین از دو کتابخانه WIELY و NIST استفاده شد. لازم به ذکر است که به‌جهت فراریت کافی خود گونه‌ها، مشتق‌سازی صورت نگرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: به منظور تهیه عصاره گیاهی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH = ۷/۵ بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه ساییده شد تا یک عصاره کاملاً همگن به دست آید. همگنای حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شد. محلول رویی از رسوب جدا شده و به منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش آبی (۱۲)، آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و آسادا (۳۴) و پراکسیداز به روش مک آدام و همکاران (۲۸) مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری: آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گردید و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT=Duncan Multiple Range Test) صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

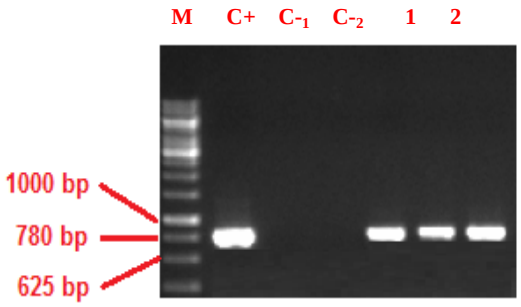
القاء ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های گیاهی بذرالبنج مشبک: ریشه‌های موئین دو هفته پس از تلقیح ریزنمونه با سویه‌ی باکتری، به‌تدریج ظاهر شدند. پس از گذشت ۱۰ روز به‌منظور افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط MS جامد، هر یک ار ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط MS جامد عاری از تنظیم‌کننده‌های رشد (شکل ۱ الف و ب) و محیط کشت مایع منتقل شدند (شکل ۱ ج).

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین: نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (وزنی- حجمی) محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه bp ۷۸۰ مربوط به ژن *rol* B را در ریشه‌های حاصل از ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای

توسط سویه‌ی *Agrobacterium rhizogenes* A7 نشان داد (شکل ۲) که هم‌اندازه‌ی قطعه تکثیر شده در نمونه‌ی کنترل مثبت (آگروباکتریوم مورد استفاده در تلقیح) بود.

شکل ۱- القاء ریشه‌های موئین از ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای بذرالبنج مشبک: الف و ب: ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط جامد MS، ج) ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط MS مایع

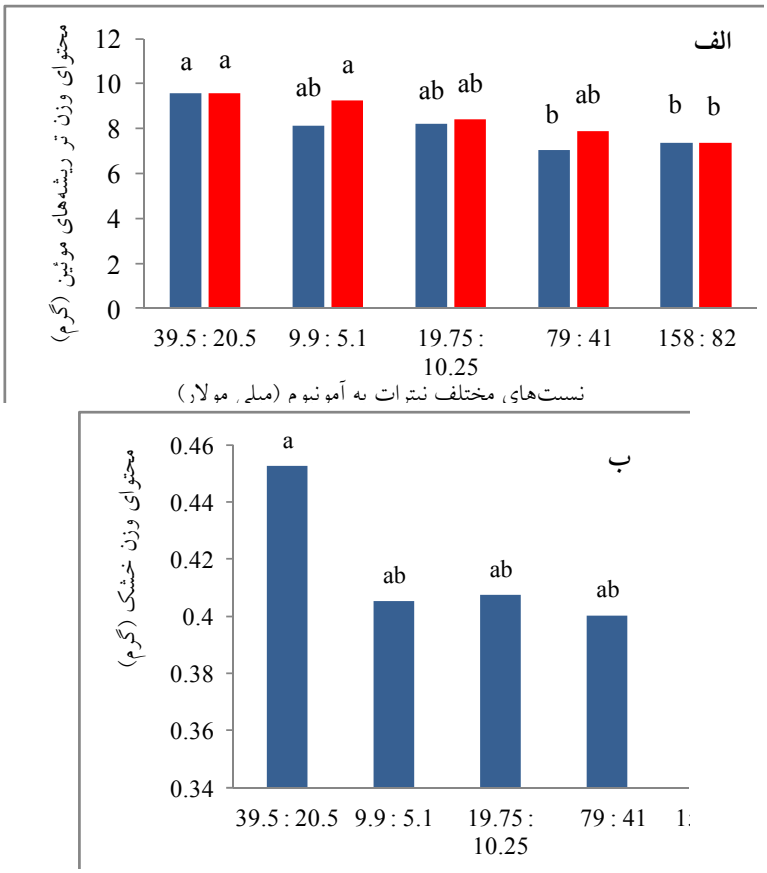
همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (به عنوان کنترل منفی) هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه bp ۷۸۰ مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol* B در ریشه‌های موئین بود.



شکل ۲- آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تعیین حضور ژن *rol* B در ریشه‌های تراریخت بذرالبنج مشبک. لاین M: DNA مارکر ۱ kb (Fermentase)، لاین +C: باکتری آگروباکتریوم سویه‌ی A7 به عنوان کنترل مثبت و لاین -C: ریشه‌های غیر تراریخت بذرالبنج مشبک به عنوان کنترل منفی لاین ۱، ۲ و ۳: ریشه‌های موئین القاء شده در ریز نمونه برگ‌های لپه‌ای توسط سویه‌ی *Agrobacterium rhizogenes* A7.

وزن‌تر و خشک: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر ساده نسبت نیترات به آمونیوم در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل نسبت و زمان تیمار، در سطح احتمال پنج درصد بر تغییرات وزن‌تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک معنی‌دار بوده است (جدول ۱). میانگین داده‌ها نشان داد، تیمار با محرک نیترات به آمونیوم منجر به کاهش معنی‌دار وزن‌تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. به‌طوری که کمترین تغییرات وزن‌تر (۷/۰۳ گرم) در اثر تیمار با نسبت ۴۱ : ۷۹ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به مدت ۲۴ ساعت مشاهده شد و بیشترین تغییرات وزن‌تر ریشه‌های موئین نیز در کشت‌های شاهد (۹/۵۷ گرم) به‌دست آمد (شکل ۳ الف). طبق نتایج به‌دست آمده اثر ساده نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری بر تغییرات وزن خشک ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشت و منجر به کاهش وزن خشک ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. به‌طوری که حداقل تغییرات وزن خشک (۰/۳۹ گرم) در اثر تیمار با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم و بیشترین تغییرات آن در شاهد (۰/۴۵ گرم) به‌دست آمد (شکل ۳ ب).

فعالیت‌های آنزیمی: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر نسبت، زمان و اثر متقابل نسبت و زمان تیمار با محرک نیترات به آمونیوم در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز داشت (جدول ۱).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ساده نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر تغییرات الف: وزن‌تر و ب: وزن خشک ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن می‌باشد.

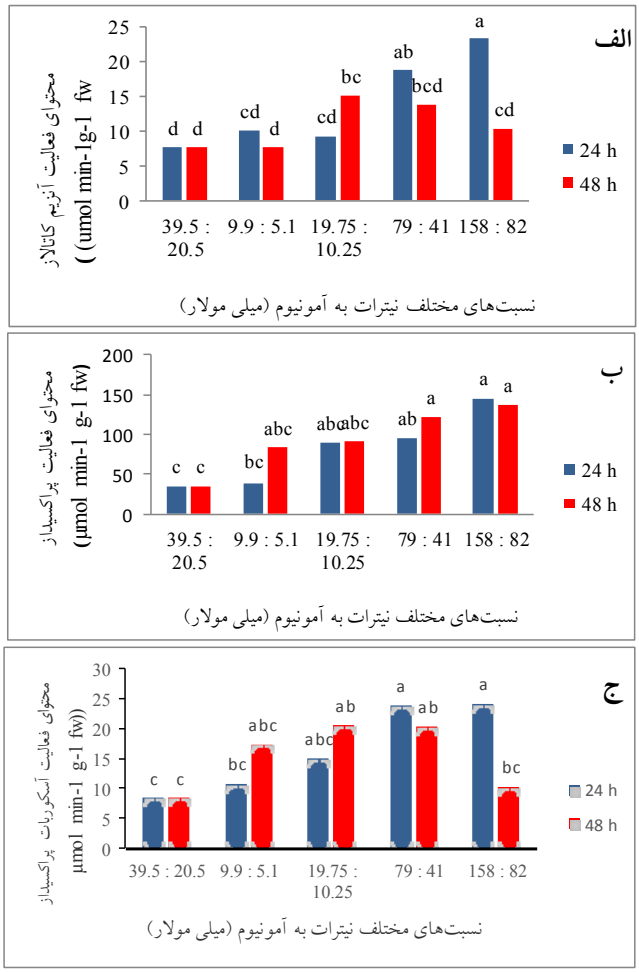
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر نسبت و مدت‌زمان تیمار با نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر ویژگی‌های رشدی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات (MS)						
		وزن‌تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	CAT	POD	APX	محتوای هیوسیامین (درصد)	محتوای آسکوپولامین (درصد)
نسبت محرک نیترات به آمونیوم	۴	۴,۹۷**	۰,۰۰۳۷*	۳۷۰,۷۹**	۲,۴۳**	۱,۱۱**	۲۳۸,۸۲**	۳۸۹,۶۲**
زمان تیمار (b)	۱	۱,۴۷^{ns}	۰,۰۰۵۱ ^{ns}	۴۱,۴۶ ^{ns}	۰,۴۳*	۰,۰۰۶ ^{ns}	۳۰,۲۴**	۴۱۱,۵۷**
اثر متقابل (a×b)	۴	۰,۳۹*	۰,۰۰۲۲ ^{ns}	۹۹,۹۲**	۰,۱۶**	۰,۱۹۴**	۹,۶۰**	۵۰,۷۵**
خطای آزمایشی	۲۰	۰,۹۱	۰,۰۰۱۹	۲۳,۳۹	۰,۰۷۱	۰,۱۳۵	۲,۳۳	۲,۲۶
ضریب تغییرات (درصد)		۱۱,۵۳	۱۰,۶۷	۲۳,۴۰	۸,۱۵	۸,۳۸	۳,۷۶	۳,۸۹

** و * و ^{ns} به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (۳۵/۶۱۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، در اثر تیمار ریشه‌های موئین به مدت ۲۴ ساعت با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به‌دست آمد و

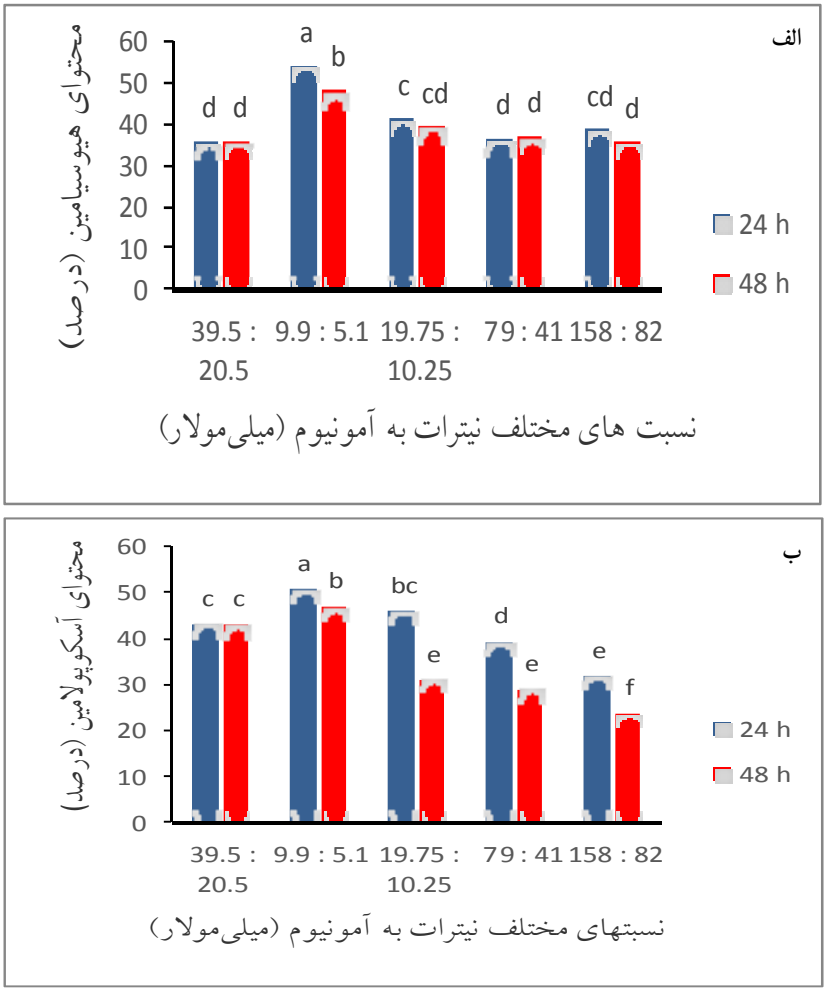
کمترین تغییرات آن (۱۰/۵۰۹ میکرومول بر دقیقه بر میلی-گرم پروتئین)، مربوط به کشت‌های شاهد بود (شکل ۴ الف). بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز (۶۴/۳۷۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، مربوط به ریشه-های موئین تیمار شده با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به‌مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد و حداقل فعالیت آنزیم پراکسیداز (۱۰/۴۲۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، در کشت‌های شاهد بود (شکل ۴ ب). در رابطه با آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز بیشترین فعالیت آنزیمی (۱۵۶/۱۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، در اثر تیمار ریشه‌های موئین با نسبت ۱۰/۲۵ : ۱۹/۷۵ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۴۱ : ۷۹ میلی‌مولار به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به‌مدت ۲۴ ساعت نداشت و کم‌ترین تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۳۹/۲۱۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، مربوط به کشت‌های شاهد بود (شکل ۴ ج).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل نسبت و زمان تیمار با محرک نیترات به آمونیوم بر میزان فعالیت آنزیم الف: کاتالاز، ب: پراکسیداز، ج: آسکوربات پراکسیداز. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد آزمون دانکن می‌باشد.

آلکالوئیدهای تروپانی: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم، زمان و اثر متقابل نسبت و زمان اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشتند (جدول ۱). تیمار ریشه‌های موئین با نسبت ۵/۱ : ۹/۹ میلی‌مولار نیترات به

آمونیوم به مدت ۲۴ ساعت، منجر به تولید بیشترین محتوای آسکوپولامین (۵۰/۷۷ درصد) شد و کم‌ترین محتوای آن (۲۳/۹۳ درصد) در اثر تیمار با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد (شکل ۵ الف). میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین محتوای هیوسیامین (۵۴/۳۴ درصد) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با نسبت ۵/۱ : ۹/۹ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به‌مدت ۲۴ ساعت به‌دست آمد که محتوای تولید آن را نسبت به ریشه‌های موئین شاهد حدود ۱/۵ برابر افزایش داد. کم‌ترین محتوای هیوسیامین (۳۵/۹۲ درصد) در اثر تیمار با نسبت ۸۲ : ۱۵۸ میلی‌مولار نیترات به آمونیوم به مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد (شکل ۵ ب).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نسبت و زمان تیمار با محرک نیترات به آمونیوم بر محتوای تولید آلکالوئید الف: آسکوپولامین و ب: هیوسیامین.
حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد آزمون دانکن می‌باشد.

بحث

اثر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر تغییرات وزن‌تر و خشک ریشه‌های موئین: نیتروژن، یک عنصر معدنی مهم برای گیاهان و یکی از اجزای عمده تشکیل دهنده‌ی اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد، همچنین شناخته شده که نیتروژن ممکن است رشد و نمو گیاهی را تحت تأثیر قرار دهد (۴۲). در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که با افزایش نسبت نیترات

به آمونیوم (نسبت به شاهد)، میزان وزن‌تر و خشک ریشه-های موئین بذرالبنج مشبک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. وقتی نیترات وارد ریشه می‌شود مقداری از آن احیا شده و به آمونیوم و بعد به پروتئین تبدیل می‌شود. احیای نیترات نیاز به انرژی و مواد هیدروکربنه برای تهیه اسیدهای آلی اسکلت اسیدهای آمینه دارد. بنابراین اگر مقدار زیادی نیترات توسط گیاه جذب شود احیای آن‌ها انرژی و مواد هیدروکربنه زیادی را مصرف می‌کند و ریشه ازلحاظ مواد هیدروکربنه فقیر می‌شود و بنابراین رشد نمی‌کند (۶). از طرفی، آمونیوم به دلیل انتشار سریع به‌آسانی در بافت‌ها تجمع یافته و درصورتی‌که فوراً متابولیزه نگردد ایجاد سمیت می‌کند (۵ و ۴۰). یکی از پیامدهای تجمع آمونیوم این است که می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از آسیمیله شدن نیترات جلوگیری کند (۱۹). ممانعت آمونیوم از رشد گیاهان از بی‌نظمی در احیای آمونیوم، کاهش pH، اثر سمیت آمونیوم آزاد، کمبود مواد غذایی معدنی مثل پتاسیم، کلسیم و منیزیم و محدودیت کربوهیدرات‌ها ناشی از مصرف بیش‌ازحد قندهای محلول برای آسیمیلاسیون آمونیوم، تأثیر می‌پذیرد (۴۱).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: یکی از پاسخ‌های مهم در برابر محرک‌های زیستی و غیر زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌باشد (۳۲ و ۴۶). این ترکیبات نقش پیام‌بر ثانوی را در پاسخ‌های سلولی بر عهده دارند ولی مقادیر بالای آن‌ها باعث آسیب شدید به سلول می‌شود (۳۱). گیاهان به وسیله‌ی سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر را کنترل کرده و از این طریق اثرات مخرب آن‌ها را کاهش می‌دهند (۱۳ و ۴۷). طبق نتایج به‌دست آمده، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم افزایش داشته است. در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز، ۲۴ ساعت پس از تیمار با نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم افزایش داشت و در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت پس از تیمار، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ابتدا افزایش و سپس روند کاهشی داشت. تغییر در میزان متابولیسم اولیه و ثانویه تحت تأثیر عوامل درونی ژنتیکی و تغییر عوامل محیطی می‌باشد. با تغییر میزان و نسبت تأمین نیتروژن در محیط کشت، تولید برخی از متابولیت‌ها به‌ویژه متابولیت-های ثانوی با ساختار نیتروژن نیز دچار تغییر می‌گردد. نتایج مطالعات نشان داده است که تغییر منبع ازت و افزایش آن در محیط می‌تواند با ایجاد شرایط تنش در محیط باعث افزایش تولید آلکالوئیدها شود (۲۲). در شرایط تنشی که متابولیسم اولیه دچار تغییر شده است، تولید یکسری از ترکیبات اکسیژن مانند هیدروکسید اکسیژن و یا گونه‌های فعال اکسیژن شود. در این شرایط، سلول و یا بافت گیاهی به منظور برطرف کردن اثرات نامطلوب این ترکیبات، با تغییر در تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، باعث کاهش اثرات مخرب این ترکیبات بر سلول و بافت گیاهی می‌گردد (۲۷).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم بر آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین: گیاهان خانواده بذرالبنج از مهم‌ترین منابع تأمین آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند و با توجه به این موضوع که غلظت این مواد در بافت گیاهی به‌شدت پایین بوده و تحت تأثیر شدید شرایط محیطی می‌باشد، به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی ازجمله آلکالوئیدها، روش‌های مختلف بیوتکنولوژیکی امروزه استفاده می‌گردد. از این روش‌ها می‌توان به کشت سلول و اندام، مهندسی ژنتیک، مهندسی متابولیک، تیمار با پیش‌سازها و تحریک‌زایی اشاره کرد. کشت ریشه موئین به‌دلیل ثبات بالا، رشد سریع و عدم نیاز به کاربرد هورمون خارجی در مقایسه با کشت سلول، گسترش روزافزونی داشته است. پس از القای ریشه موئین میزان بیومس تولیدی افزایش می‌یابد اما میزان تولید متابولیت‌های ثانوی خیلی دچار تغییرات معنی‌دار نمی‌گردد. به همین دلیل از

روش‌هایی نظیر تحریک‌زایی (Elicitation) با انواع محرک-های زیستی و غیرزیستی استفاده می‌شود. تغییر نسبت نیترات به آمونیوم نه تنها می‌تواند به عنوان یک تنش و محرک باشد بلکه با تغییر منبع تأمین نیتروژن مورد نیاز ساختار آلکالوئیدها، باعث بهبود تولید آنها نیز بشود. براساس نتایج به‌دست آمده، کاربرد نسبت‌های کم‌تر نیترات به آمونیوم منجر به افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی مذکور گردید ولی با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم، محتوای تولید هیوسیامین و آسکوپولامین به‌صورت تدریجی کاهش یافت. فاکتورهای تغذیه‌ای از قبیل نیتروژن شاخص مهمی است که تولید آلکالوئیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶). از آنجایی که آلکالوئیدها ترکیبات نیتروژن دار هستند، پیش‌بینی شده که قابلیت استفاده از نیتروژن نقش مهمی در بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها در گیاهان ایفا می‌کنند (۴۸). نیتروژن یک عنصر معدنی مهم برای گیاهان و یکی از اجزای عمده تشکیل دهنده‌ی اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها می‌باشد (۴۲). آمونیومی که از جذب آمونیوم و احیای نیترات به-دست می‌آید از مسیر گلوتامین سینتتاز و گلوتامات سنتاز به ترکیبات آلی وارد می‌شود. اسیدآمینه‌های مختلفی نظیر متیونین، اورنیتین (Ornithine)، آرژنین (Arginine) و لیزین (Lysine) می‌توانند به عنوان پیش‌ماده ترکیبات پلی-آمینی بکار روند. (۲و ۸). دی آمین پوتریسین از اسیدآمینه آرژنین و اورنیتین به وجود می‌آید. در چرخه نیتروژن، دو اسیدآمینه آرژنین و اورنیتین قابل تبدیل به یکدیگر هستند که این تبدیل به‌وسیله آنزیم آرژیناز کاتالیز می‌شود. دی آمین پوتریسین می‌تواند از دو مسیر سنتز شود: مسیر اول تک‌مرحله‌ای است و شامل دکربوکسیله شدن اورنیتین به‌وسیله اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC= Ornithine Decarboxylase) می‌باشد که به تولید پوتریسین منجر می-شود (۳۱). مسیر دوم یک فرایند سه مرحله‌ای است: در این مسیر ابتدا آرژنین به‌وسیله آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (ADC= Arginine Decarboxylase) دکربوکسیله شده و به اگماتین تبدیل می‌شود و سپس به پوتریسین تبدیل می-گردد (۲۹). از این‌رو پلی‌آمین‌ها پیش‌ماده تعداد کثیری از متابولیت‌های ثانویه ازجمله آلکالوئیدهای تروپان و فرم‌های اتصالی اسید سینامیک هستند که نقش اساسی در مکانیسم-های دفاعی گیاه ایفا می‌کنند (۹). همان‌طور که قبلاً نیز گزارش شده رقیق‌سازی محیط کشت و کاهش غلظت نیتروژن، رشد و مقدار آلکالوئید را در کشت ریشه‌های موئین تیره سیب‌زمینی‌سانان فراهم می‌کند (۳۸و ۴۴) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

در پژوهشی موراناکا و همکاران (۳۳) گزارش نمودند که غلظت‌های بالای نیترات ممکن است برخی اثرات سمی را در شرایط فیزیولوژیکی بافت ریشه داشته باشد. احیا نیترات سبب افزایش pH محل احیا نیترات می‌گردد (۱۴). افزایش مقدار پوتریسین در گیاهانی که با آمونیوم تغذیه می‌شوند می‌تواند به‌عنوان واکنش ریشه‌ها نسبت به pH کم سلول باشد و همچنین می‌توان آن را به عنوان جزیی از مکانیزم تنظیم pH سلول به‌وسیله‌ی ساخت این ترکیبات بازی در نظر گرفت. بدین ترتیب تغذیه آمونیوم هنگامی که pH محیط بالا می‌باشد در تشکیل پوتریسین کم‌تر مؤثر می‌باشد (۳۰). بنابراین احتمال دارد که با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم محتوای تشکیل پوتریسین و به‌دنبال آن سنتز آلکالوئیدهای تروپانی کاهش یابد. از طرفی، اکسیژن مولکولی برای تبدیل هیوسیامین به آسکوپولامین نیاز می-باشد. ثابت شده که میزان تنفس در شرایط تاریکی با افزایش سطح نیتروژن، افزایش می‌یابد (۲۱) که این می-تواند به افزایش میزان ورود سوبسترا به چرخه کرپس برای فراهم شدن اسکلت‌های کربنی بیشتر برای ورود آمونیوم به ساختمان مواد آلی مربوط شود (۸). بنابراین به‌نظر می‌رسد که سطوح بالاتر نیتروژن در محیط رشد می‌تواند از طریق افزایش تنفس، مقدار اکسیژن مورد نیاز برای تولید آسکوپولامین را کاهش دهد (۲۰). که همین امر می‌تواند منجر به کاهش تولید آسکوپولامین در نسبت‌های بالاتر نیترات به آمونیوم گردد. در ارتباط با اثرات آنزیم‌های آنتی

اکسیدانی بر مسیر تولید ترکیبات تروپان آلکالوئیدی گزارش شده است که در مسیر تبدیل هیوسیامین به آسکوپولامین، دو مرحله اصلی وجود دارد که مرحله‌ی اول شامل هیدروکسیلاسیون هیوسیامین به ۶- بتا هیدروکسی هیوسیامین است که نیازمند ۲- اکسوگلوتارات، Fe^{2+}، اکسیژن مولکولی و آسکوربات می‌باشد و از آنجایی که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت فزونی یافته می‌توان این احتمال را داد که آسکوربات مورد نیاز جهت تبدیل هیوسیامین به آسکوپولامین با محدودیت مواجه گردیده است و از اینرو در غلظت‌های بالای نیترات به آمونیوم، سنتز آسکوپولامین به‌تدریج کاهش یافته است (۲۳).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که بهترین تیمار نیترات به آمونیوم به‌منظور سنتز آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین نسبت ۵/۱ : ۹/۹ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت می‌باشد. در این مطالعه، با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بسته به زمان تیمار تغییر نمود. فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش نسبت نیترات به آمونیوم افزایش نشان داد. اما در زمان تیمار ۴۸ ساعت، فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در غلظت بالا کاهش نشان داد. در مسیر تبدیل هیوسیامین به آسکوپولامین، با توجه به جمع‌بندی نتایج، به‌نظر می‌رسد که تغییر نسبت نیترات به آمونیوم به‌عنوان یک محرک غیرزیستی می‌تواند راهکار مناسبی جهت افزایش تولید متابولیت‌های باارزش دارویی در شرایط کشت درون شیشه ریشه موئین مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشکده زیست‌فن‌آوری دانشگاه ارومیه انجام شده است. از ریاست پژوهشکده و کارشناسان محترم آن تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- اسمعیل‌زاده بهابادی، ص.، و شریفی، م.، ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی، مجله سلول و بافت، ۴ (۲)، صفحات ۱۲۸-۱۱۹.

۲- اصغری، م. ر.، ۱۳۹۴. هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جدید (غیر کلاسیک)، انتشارات دانشگاه ارومیه، ۳۴۵ صفحه.

۳- پارسا، ا.، و زینالی، ا.، ۱۳۹۶. اثیر 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.، مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۰(۴)، صفحات ۹۵۵-۹۴۳.

۴- جوانمردی، ش.، فتوت، ر.، و صبا، ج.، ۱۳۸۹. رابطه بین کربوهیدرات‌های محلول و پرولین با تنظیم اسمزی و نقش تنظیم اسمزی در عملکرد گندم تحت شرایط تنش خشکی، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب‌وخاک، سال ۱۴، شماره ۵۳، صفحات ۷۲-۶۵.

۵- خارا، ج.، ۱۳۸۵. کمبود و سمیت عناصر غذایی در گیاهان زراعی، انتشارات مهد تمدن، چاپ اول، ۲۷۷ صفحه.

۶- سالاردینی، ع. الف.، ۱۳۸۴. حاصلخیزی خاک، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ هفتم، ۴۳۴ صفحه.

۷- سیدطباطبایی، ب. الف.، و امیدی، م.، ۱۳۹۰. کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، ۳۶۸ صفحه.

۸- طباطبائی، ج.، ۱۳۹۲. اصول تغذیه معنی گیاهان، انتشارات دانشگاه تبریز، چاپ اول، ۵۴۴ صفحه.

۹- فهیمی، ح.، ۱۳۷۶. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۷۲ صفحه.

۱۰- سهرابی‌نژاد، ز.، مرعشی، ح.، و مشتاقی، ن.، ۱۳۹۶. بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی همیشه بهار *Calendula officinalis* به منظور تولید ترکیب دارویی اولئانولیک اسید، مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۱(۳): ۶۵۴-۶۴۰.

11- Aberham, A., Pieri, V., Croom, E. M. J. R., Ellmerer, E., and Stuppner, H., 2011. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthones in *Centaurium erythraea*, *Frasera carpliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC, Journal of Pharmceutical and Biomedical Analysis, 54, PP: 517-525.

12- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods in enzymology, 105, PP: 121-126.

13- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. Annuol Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, PP: 601-639.

14- Assimakopolou, A., 2006. Effect of iron supply and nitrogen form on growth, nutritional status and ferric reduction activity of spinach in nutrient solution culture. Scientia Horticulturae, 110, PP: 21-29.

15- Bensaddek, I., Gillet, F., Edmundo Nava Saucedo, J., and Fliniaux, M. A., 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology, 85, PP: 35-40.

16- Berlin, J., Beier, H., Fecker, L., Noe, W., Sasse, F., Schiel, O., and Wray, V., 1985. Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures. In: Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E. (Eds), Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer Berlin, PP: 272-280.

17- Chandra, S., and Chandra, R., 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews, 10, PP: 371-395.

18- Chen, Y. Q., Yi, F., Cai, M., and Luo, J. X., 2003. Effects of amino acids, nitrate and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*, Plant Growth Regulation, 41, PP: 265-268.

19- Crawford, N. M., 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. The Plant Cell, 7, PP: 859-868.

20- Demeyer, K., and Dejaegere, R., 1998. Nitrogen and alkaloid accumulation and partitioning in *Datura stramonium* L, Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 5, PP: 15-23.

21- Flores, H. E., Vivanco, J. M., and Loyola-Vargas, V.M., 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends Plant Science, 4, PP: 220-6.

22- Ghorbanpour, M., Ghafarzadegan, R., and Hatami, M., 2014. Seed alkaloids content and antioxidant enzymes activity in black henbane as influenced by ammonium nitrate application and water deficit stress. Journal of Medicinal Plants, 1(49), PP: 75-86.

23- Hashimoto, T., and Yamada, Y., 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. Annual Review of Plant Physiology, 45, PP: 257-285.

24- 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, PP: 239-242.

25- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3, PP: 1222-1239.

26- Khan, S., Irfan, Q. M., Kamaluddin, A. T., and Abdin, M. Z., 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of nedicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology, 6, PP: 175-178.

27- Liu, J. R., Chen, G. F., Shi, H. N., and Kuo, P. C., 2008. Enhanced antioxidant bioactivity of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) products prepared using nanotechnology, Phytomedicine, 15, PP: 23-30.

28- Macadam, J. W., Nelson, C. J., and Sharp, R. E., 1992. Peroxidaes activity in the leaf elongation zone of tall fescue, Plant Physiology, 99, PP: 872-878.

29- Malmberg, A., Lewis, G., David, A., and Allebeck, P., 1998. Pre – morbid adjustment and personality in people with schizo- phrenia. British Journal of Psychiatry, 172, PP: 308-313.

30- Marshner, H., 2001. Superior plant mineral nutrition. Shiraz university press. First, 26 volume. First edition, 495 p.

31- Martin-Tanguy, J., 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation, 34 (1), PP: 135-148.

32- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: the new wave. Trends in Plant Science, 16, PP: 300-309.

33- Muranaka, T., Ohkawa, H., and Yamada, Y., 1992. Scopolamine release into media by

Duboisia leichhardtii hairy root clones. Appl Microbiology Biotechnology, 37, PP: 554-559.

34- Nakano, Y., and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22 (5), PP: 867-880.

35- Namdeo, A. G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: Areview. Pharmacognosy Reviews, 1, PP: 69-79.

36- Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L., and Mirjalili, M. H., 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules, 13, PP: 1722-1742.

37- Pan, X. W., Xu, H. H., Liu, X., Gao, X., and Lu, Y. T., 2004. Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminate*. Biotechnology Letters, 26, PP: 1745-1748.

38- Payne, J., Hamill, J. D., RobinsMZ, R. J. M., and Rhodes, J. C., 1987. Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. Planta Medica, 53, PP: 474-478.

39- Praveen, N., and Murthy, H. N., 2013. Withanolide A production from *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elementsand nitrogen source in the medium, Acta Physiologiae Plantarum, 35, PP: 811-816.

40- Richter, G., 1993. Metabolisme des vegetaux, physiologie et biochimie, Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, PP: 341-344.

41- Ruiz, J. M., Castilla, N., and Romero, L., 2000. Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. Journal Agreculture and Food Chemical, 48, PP: 2925-2929.

42- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios- Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., and Still, M., 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. Plant Physiological, 136, PP: 2483-2499.

43- Shinde, A. N., Malpathak, N., and Fulzele, D. P., 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*, Journal of Natural Medicines, 64, PP: 340-353.

44- Sugimoto, Y., Sugimura, Y., and Yamada, Y., 1988. Effects of culture conditions on bisbenzylisoquinoline alkaloid production in cultured roots of *Stephania cepharantha*. Agricultural and Biological Chemistry, 52, PP: 1495-1498.

45- Tripathi, L., and Tripathi, J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2, PP: 243-253.

46- Van Breusegem, F., James, F., Dat, D., and Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction, Plant Science, 161, PP: 405-414.

47- Vranova, E., Inze, D., and Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress, Journal of Experimental Botany, 53, PP: 1227-1236.

48- Waller, G. R., and Nowacki, E. K., 1979. Alkaloid biology and metabolism in plants. Plenum Press, New York.

49- Wang, J. W., and Tan, R. X., 2002. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. Biotechnology Letters, 24, PP: 1153-1156.

50- Zhao, J., Davis, L. C., and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, Biotechnology Advances, 23, PP: 283-333.

Effect of different nitrate/ammonium ratios on biomass content and some biochemical characteristics of lattice henbane plant (*Hyoscyamus reticulatus* L.) hairy roots.

Khezerluo M.,[1] Hosseini B.[2] and Amiri J.[1]

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

[2] Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Hyoscyamus reticulatus L. is an herbaceous, biennial plant, belonging to Solanaceae family and Due to production of tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine are widely used in medicine. In the present study, in order to increase production of tropane alkaloids, cotyledon-derived hairy root cultures transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A7, elicited by various ratio of nitrate to ammonium. The effect of different ratio of nitrate to ammonium (9.9:5.1, 19.75:10.25, 39.5:20.5 (control), 79:41 and 158:82 mM) in two exposure times (24 and 48 h) were investigated. According to the ANOVA results, the highest hyoscyamine and scopolamine production (about 1.5-fold and 1.17-fold increase over the control) was observed in treatment 9.9: 5.1 mM nitrate to ammonium at 24 hours of exposure time, respectively. Therefore, the highest catalase antioxidant enzymes activity (23/40 µmol min^{-1} mg^{-1} pro) and peroxidase (145/32 µmol min^{-1} mg^{-1} pro) and ascorbate peroxidase (24/22 µmol min^{-1} mg^{-1} pro), was obtained in nitrate to ammonium ratio (158: 82 mM) with 24 hours exposure time. According to these results, nitrate to ammonium ratio as elicitor can be used as effective strategies in plant biotechnology in order toenhance production of plant secondary metabolites such as tropane alkaloids.

Key words: Elicitation, Hairy root, *Hyoscyamus reticulatus* L., Nitrate to ammonium, Tropane alkaloid