دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.108073.1865
جلد ۳۳، شماره ۳، صفحه ۴۸۰-۴۶۶ (۱۳۹۶)

تأثیر عصاره مخمر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

فرشته محرمی[۱]، بهمن حسینی[۲*]، منوچهر فرجامی‌نژاد[۳] و علی شرفی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲-* نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل، ایران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

گونه‌های بنگ‌دانه (هیوسیاموس) ازجمله بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) منابع غنی آلکالوئیدهای تروپانی، عمدتاً هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشند که به‌دلیل اثرات گشاد کردن مردمک چشم، ضد اسپاسم، آنتی‌کولینرژیک، آرام‌بخش و مسکن مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌دلیل ساختار شیمیایی پیچیده، این آلکالوئیدها از منابع طبیعی به‌طور عمده گیاهان تیره سیب‌زمینی بدست می‌آیند. القاء مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله محرک‌های مختلف، راهکار مؤثری برای افزایش تولید و بهره‌وری متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در این پژوهش، به‌منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی، از ریشه موئین بدست آمده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی تراریخت شده با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده گردید. این آزمایش در قالب فاکتوریل شامل فاکتور اول، غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و فاکتور دوم، زمان‌های مختلف تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و هر تیمار در سه تکرار انجام گردید. مطابق نتایج بدست آمده، به‌ترتیب بیشترین میزان هیوسیامین (۲ برابر) و اسکوپولامین (۲/۵ برابر بیشتر از شاهد)، در اثر تیمار با غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر در مدت زمان ۴۸ ساعت تحریک‌زایی بدست آمد. نتایج نشان داد، تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و نیز افزایش مدت زمان تیمار منجر به کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های موئین تیمار شده، در مقایسه با شاهد بیشتر بود. براساس نتایج، چنین استنباط می‌شود که تهییج با عصاره مخمر، منجر به القاء تنش اکسیداتیو شده است. نتایج حاصل از این پژوهش پیشنهاد می‌کند که عصاره مخمر می‌تواند به‌عنوان محرکی مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی ازجمله آلکالوئیدهای تروپانی در زیست‌فناوری گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدهای تروپانی، اسکوپولامین، هیوسیامین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، عصاره مخمر.

مقدمه

هیوسیامین (Hyoscyamine) و اسکوپولامین (Scopolamine) دو آلکالوئید تروپانی اصلی در گیاهان خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) هستند که ترکیب‌هایی با خاصیت پاراسمپاتولیتیک (Anticholinergic) می‌باشند و به‌طور گسترده در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zayed & Wink, 2004). بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) بومی مناطق خشک و نیمه‌خشک مصر، جنوب‌غرب آسیا، ایران و ترکیه است. گزارش شده است که آلکالوئید اصلی این گیاه، هیوسیامین و پس از آن اسکوپولامین و سایر ترکیب‌های آلکالوئیدی مانند آپوهیوسیامین، نورهیوسیامین، لیتورین و تروپین می‌باشد (Ionkova, 2002).

آلکالوئیدهای تروپانی عمدتاً در ریشه سنتز شده و بعد به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند، همچنین با توجه به جای‌گیری اختصاصی بعضی از آنزیم‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز این آلکالوئیدها (به‌عنوان مثال بیان وابسته به پریسیکل پوتریسین متیل ترنسفراز (PMT) و جای‌گیری اختصاصی هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (H6H) در پریسیکل ریشه)، تلاش برای تولید تروپان آلکالوئیدها به‌ویژه اسکوپولامین در سیستم‌های زیست‌فناوری، عمدتاً مبتنی بر کشت ریشه‌های موئین می‌باشد (Palazon *et al*., 2008). رویکردهای متعددی مثل استفاده از محرک‌های متفاوت و تحریک مسیر بیوسنتزی برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین اتخاذ شده است (Hasanloo *et al*., 2009). تهییج یا تحریک‌زایی روندی است که به‌وسیله القاء سیستم‌های دفاعی گیاهان، باعث افزایش ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهان شده و بقاء، تداوم و رقابت‌پذیری آنها را تضمین می‌کند (Namdeo, 2007). کاربرد عصاره مخمر در کشت ریشه‌های موئین چریش (*Azadirachta indica*) با تولید ۵/۲۰ میلی‌گرم بر گرم آزادیراکتین، میزان آن را نسبت به شاهد (۳/۳۱ میلی‌گرم بر گرم) ۱/۶ برابر افزایش داد (Srivastava & Srivastava, 2013). در کشت ریشه‌های موئین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L)، ریشه‌های موئین ۲۸ روزه تیمار شده با عصاره مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت، تا ۵ برابر سطح تولید نورآدرنالین را در مقایسه با شاهد افزایش داد (Pirian & Piri, 2013). در کشت ریشه‌های موئین *Salvia miltiorrhiza*، Chen و همکاران (۲۰۰۱)، افزایش رشد ریشه‌های موئین را از ۳/۹ گرم بر لیتر به ۷/۳ گرم بر لیتر وزن خشک گزارش کردند. تیمار ریشه‌های موئین گیاه *Pueraria* با عصاره مخمر با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش ۴/۵ برابری نسبت به شاهد گردید (Udomusk *et al*., 2010). از اثرات شناخته شده محرک عصاره مخمر، ایجاد تنش در گیاهان و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Savitha *et al*., 2006). این ترکیب‌ها نقش پیام‌بر ثانویه را در پاسخ‌های سلولی بر عهده دارند ولی مقادیر بالای آنها باعث آسیب شدید به سلول می‌شود (Mittler *et al*., 2011). گیاهان به‌وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی رادیکال‌های آزاد را کنترل کرده و از این طریق اثرات مخرب آنها را کاهش می‌دهند (Vranova *et al*., 2002). با توجه به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و نیز به‌دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آنها در گیاهان دارویی، راهکارهایی مثل کشت ریشه‌های موئین و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود ببخشد. بنابراین، در این پژوهش تأثیر عصاره مخمر به‌عنوان محرک زیستی، در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار، بر افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمند هیوسیامین و اسکوپولامین، رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین گیاه بذرالبنج مشبک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه بذرالبنج مشبک

کلیه آزمایش‌های مربوط به کشت و آنالیز مولکولی و فعالیت آنزیمی در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه

ارومیه و آنالیز فیتوشیمیایی آلکالوئیدهای تروپانی در آزمایشگاه فیتوشیمی دانشگاه آزاد اردبیل انجام شد. بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بعد از ضدعفونی بذرها، بذرها در داخل محیط کشت MS تکمیل شده با ۳٪ ساکارز و ۷٪ آگار، کشت و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القاء و بهینه‌سازی ظهور ریشه‌های موئین

به‌منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی، کوتیلدون‌ها از گیاهچه‌های مادری استریل جدا و به‌مدت ۳ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی *Agrobacterium rihzogenes* سویه A7 غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد (محیط هم‌کشتی) منتقل و به‌مدت ۴۸ ساعت، داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس به‌منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به‌وسیله آب مقطر استریل حاوی سفوتاکسیم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) شستشو و به محیط کشت MS جامد بدون هورمون حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. ۲ هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌ها، به تدریج ریشه‌های موئین ظاهر شدند. بعد از گذشت یک هفته، برای افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون و حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردیدند. واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جدید هر ۱۰ روز یک‌بار انجام شد. از میان ۷۵ لاین ریشه موئین القاء شده، یک لاین پر رشد برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب گردید.

تهییج ریشه‌های موئین با محرک عصاره مخمر

عصاره مخمر از شرکت لیوفیلکم (Liofilchem) ایتالیا تهیه گردید. برای انجام این آزمایش محیط کشت‌های MS مایع حاوی غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر تهیه گردید. ۱/۵ گرم از ریشه‌های موئین ۱۰ روزه داخل هر یک از ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره مخمر، در ۳ تکرار، منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین از محیط کشت MS خارج و به محیط کشت MS مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، ریشه‌های موئین برداشت و بعد از شستشو با آب مقطر و حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها به‌وسیله کاغذ صافی، وزن‌تر آنها اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌های موئین به‌مدت ۲ روز در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی‌گراد هوا خشک شده و وزن خشک آنها ثبت گردید.

استخراج آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییر انجام شد. مطابق با این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین خشک، پودر و بعد کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵٪، به نسبت ۱۵ :۵ :۱ به نمونه‌های گیاهی اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض اولتراسونیک قرار گرفتند. پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم، برای تبخیر مرحله کلروفرمی از دستگاه روتاری اواپراتور استفاده گردید. به عصاره باقی‌مانده و خشک شده، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال اضافه و کاملاً هم زده شد. در مرحله بعد، با ریختن مخلوط بدست آمده داخل دکانتور دو مرحله تشکیل شد. مرحله کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و مرحله آبی حاوی آلکالوئیدها به یک بشر منتقل شد و pH آن روی یخ و به‌وسیله آمونیاک ۲۸٪ تا ۱۰ تنظیم گردید. محلول قلیایی داخل دکانتور ریخته شد و آلکالوئیدها یک مرتبه توسط ۲ میلی‌لیتر و دو مرتبه توسط ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. مرحله کلروفرمی بدست آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک

به‌منظور حذف آب موجود، از صافی عبور داده شده و کاغذ صافی توسط ۱ تا ۲ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول صاف شده به‌وسیله روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و جامد بدست آمده در ۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد.

آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی به روش GC/MS

به‌منظور جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین از دستگاه کروماتوگراف گازی Hewlett–Packard (HP, Palo Alto, CA, USA)، 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 لایه فاز ساکن ۰/۲۵ استفاده گردید. دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

بدین‌منظور، DNA ژنومی ریشه‌های موئین و ریشه غیر تراریخت حاصل از جوانه‌زنی بذرهای کشت شده به روش CTAB (Khan *et al*., 2007) استخراج شد. به‌منظور تأیید حضور ژن rol B اگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام گردید و توالی آغازگرهای:

Forward Primer: 5'- TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA- 3'

Reverse Primer: 5'- TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC- 3'

به‌منظور تکثیر قطعات ۷۸۰ bp ژن rol B مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

برای تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد. طبق این روش، ۰/۵ گرم وزن تر ریشه موئین از کلیه تیمارها توزین و به داخل هاون سرد منتقل گردید و توسط ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار، pH–۷/۵، $MgCl_2$ ۳ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار) به‌وسیله دسته هاون به‌خوبی ساییده شد. بافر استخراجی برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز، حاوی ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربات بود. هموژنات حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی حاصل به‌عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6)

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با اندازه‌گیری میزان تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، با استفاده از روش Maehly و Chance (۱۹۵۹) انجام گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز (کاهش پراکسید هیدروژن) به‌صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت کاتالاز از ضریب خاموشی (ضریب جذب مولی) ($۴۳/۶\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

$$\text{Units (mM/min)} = \frac{\frac{doD}{min\ (sl\ ope)} \times \text{Vol.of assay (.0003)}}{\text{Extinction cofficient (43.6)}}$$

$\frac{doD}{min\ (sl\ ope)}$= اختلاف بین دو قرائت در یک دقیقه

Vol.of assay (.0003)= حجم محلول داخل سل

Extinction coefficient (43.6)= ضریب خاموشی

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX; EC 1.11.1.7)

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به صورت افزایش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز از ضریب خاموشی ($۲۶/۶\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

$$\text{Units (mM/min)} = \frac{\frac{doD}{min\ (sl\ ope)} \times \text{Vol.of assay (.0001)}}{\text{Extinction coefficient (26.6)}}$$

$\frac{doD}{min\ (sl\ ope)}$= اختلاف بین دو قرائت در یک دقیقه

Vol.of assay (.0001)= حجم محلول داخل سل

Extinction coefficient (26.6)= ضریب خاموشی

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX; EC1.11.1.11.)

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Chen و Asada (۱۹۸۹) با اندکی تغییر انجام شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (اکسیداسیون آسکوربات) به‌صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی ($۲/۸\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

$$\text{Units (mM/min)} = \frac{\frac{doD}{min\ (sl\ ope)} \times \text{Vol.of assay (.0001)}}{\text{Extinction cofficient (2.8)}}$$

$\frac{doD}{min\ (sl\ ope)}$= اختلاف بین دو قرائت در یک دقیقه

Vol.of assay (.0001)= حجم محلول داخل سل

Extinction coefficient (2.8)= ضریب خاموشی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل از رادیکال آزاد و پایدار DPPH استفاده شد. مطابق با روش Chiuo و همکاران (۲۰۰۷)، به ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها، ۹۵۰ میکرولیتر DPPH (۶×۱۰^{-۵} مول بر لیتر) اضافه و پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه نگهداری در شرایط تاریکی و دمای اتاق، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و در فرمول زیر جای‌گذاری گردید. برای تهیه بلنک (blank) به جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰٪ اضافه شد.

$$(Ab - AS) \div Ab \times 100$$

Ab: میزان جذب نوری بلنک (blank)

As: میزان جذب نوری نمونه (sample)

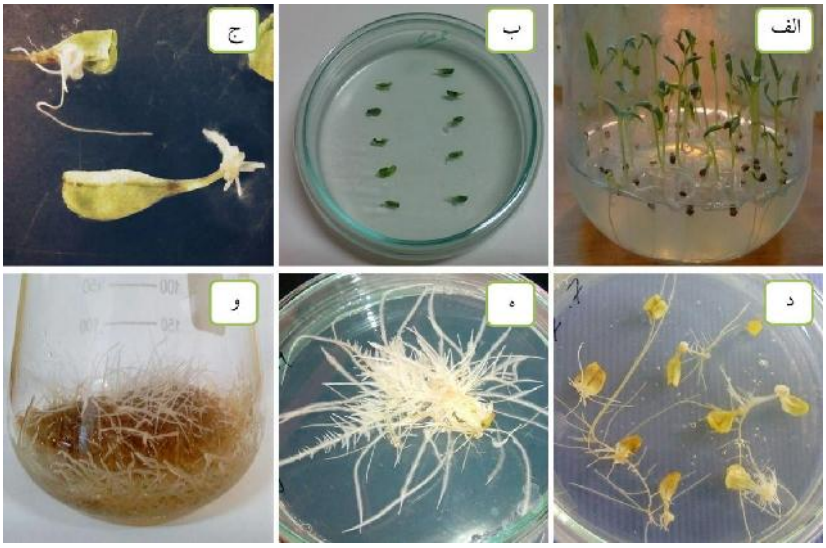
آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

آزمایش‌ها به‌صورت 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 تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

القاء ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های گیاهی بذرالبنج مشبک

یک هفته پس از جوانه‌زنی (شکل ۱–الف)، کوتیلدون‌های بذرالبنج مشبک از گیاهچه‌های مادری استریل جدا شده و با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح گردیدند (شکل ۱–ب). ۲ هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی، به‌تدریج ریشه‌های موئین ظاهر شدند (شکل ۱–ج). بعد از گذشت یک هفته (شکل۱–د)، برای افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون (شکل ۱–ه) و محیط کشت مایع (شکل ۱–و) منتقل شدند.

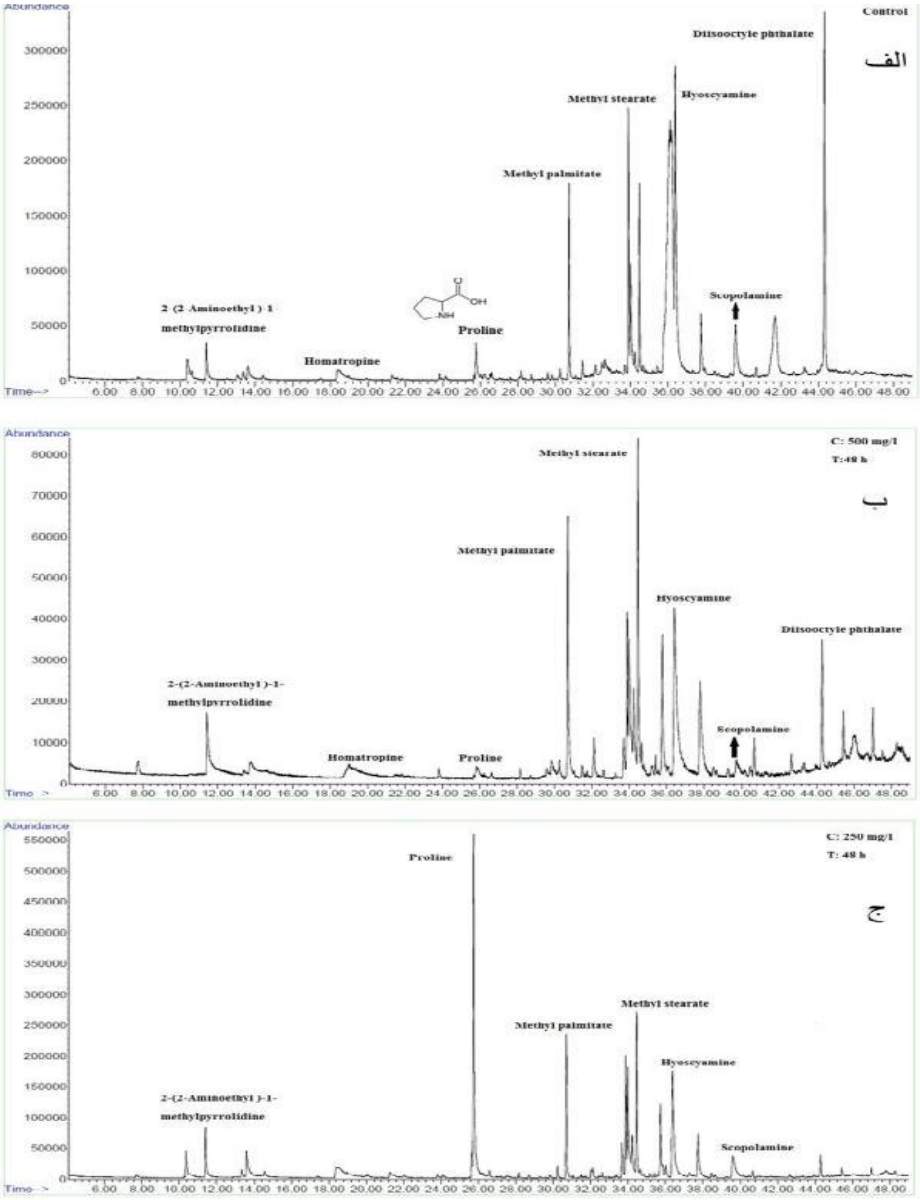


شکل ۱- القاء ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی بذرالبنج مشبک

الف) گیاهچه‌های یک هفته‌ای رشد کرده در محیط MS؛ ب) تلقیح کوتیلدون‌های جدا شده از گیاهچه‌های مادری استریل بذرالبنج مشبک با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز؛ ج) ظهور ریشه‌های موئین ۲ هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم رایزوژنز؛ د) ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط MS جامد؛ ه) انتقال ریزنمونه‌های ریشه‌دار به صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS جامد؛ و) ریشه‌های موئین رشد کرده در محیط MS مایع

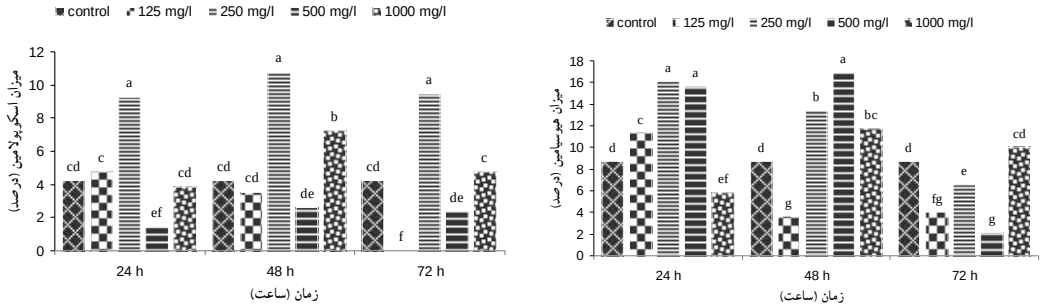
تأثیر عصاره مخمر بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره مخمر نشان داد که این محرک در سطح احتمال ۱٪، به‌طور معنی‌داری تولید هیوسیامین و اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار داد. بیشترین میزان هیوسیامین (۱۶/۹۷٪) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت بدست آمد که میزان تولید آن را نسبت به ریشه‌های موئین شاهد حدود ۲ برابر افزایش داد. همچنین، هیوسیامین تولید شده در این تیمار با میزان هیوسیامین تولید شده تحت تأثیر تیمار با غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری نداشت. البته کمترین میزان هیوسیامین (۲/۱۲٪) در تیمار با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد که نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳). تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت، منجر به تولید بیشترین میزان اسکوپولامین (۱۰/۷۸٪) در مقایسه با کشت‌های شاهد (۲/۵ برابر افزایش) شد (شکل ۲) که با میزان تولید شده آن در سایر زمان‌های تیمار اختلاف معنی‌داری نداشت. در این پژوهش، در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۷۲ ساعت، آلکالوئید اسکوپولامین شناسایی نشد (شکل ۳). از موارد جالب توجه در این مطالعه، افزایش تولید پرولین در ریشه‌های تیمار شده با محرک می‌باشد. با توجه به این موضوع که اندازه‌گیری پرولین جزء اهداف مطالعه نبوده است، تغییر غلظت این اسیدآمینه نشان‌دهنده پاسخ فیزیولوژیک بافت گیاهی به تنش اعمالی می‌باشد.



شکل ۲- کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز GC/MS نمونه‌های ریشه موئین تیمار شده با عصاره مخمر

الف) کروماتوگرام ریشه‌های موئین شاهد، ب) کروماتوگرام ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت، ج) کروماتوگرام ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با عصاره مخمر بر تولید آلکالوئید تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ است.

تأثیر محرک عصاره مخمر بر رشد ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی و اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره مخمر نشان داد که اثر اصلی سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار به‌ترتیب در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشت. نتایج نشان داد که تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر منجر به کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. به‌طوری که کمترین میزان وزن تر (۶/۵۹ گرم) ریشه‌های موئین در مقایسه با شاهد (۹/۲۵ گرم) تحت تأثیر تیمار با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر محرک بدست آمد (شکل ۲). مقایسات میانگین اثر اصلی زمان‌های مختلف تیمار بر وزن تر ریشه‌های موئین نشان داد که بیشترین (۸/۱۶ گرم) و کمترین (۶/۸۵ گرم) وزن تر به‌ترتیب در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار با عصاره مخمر مشاهده شد (شکل ۴). طبق نتایج بدست آمده سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار با عصاره مخمر تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن خشک ریشه‌های موئین تیمارشده نداشت ($P<0.01$). با این حال، حداکثر وزن خشک (۰/۵۲ گرم) مربوط به ریشه‌های موئین شاهد و حداقل آن (۰/۴۵ گرم) مربوط به ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر بود.

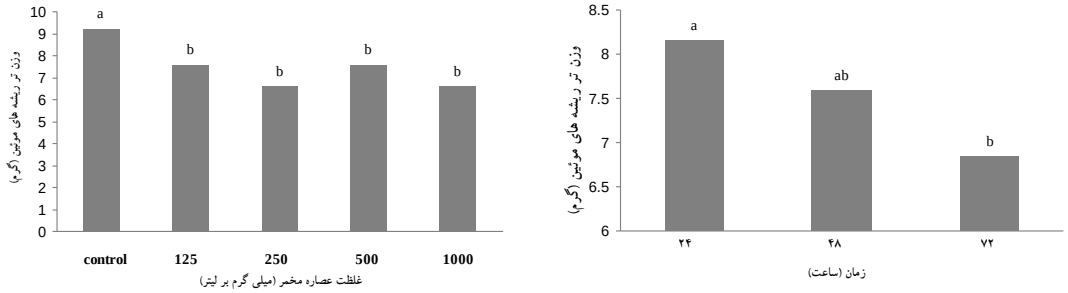
تأثیر محرک عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره مخمر نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک در سطح احتمال ۱٪، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت و زمان تیمار قرار گرفته است (جدول ۱). به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اثر تیمار با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت مشاهده گردید که نسبت به شاهد حدود ۳ برابر افزایش نشان داد و کمترین میزان آن تحت تأثیر تیمار با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۷۲ ساعت بدست آمد. همچنین با افزایش مدت زمان تیمار، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ریشه‌های موئین روند کاهشی داشت (شکل ۵).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره مخمر بر رشد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

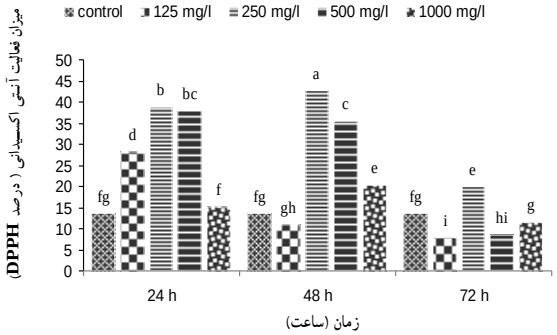
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (٪)
غلظت محرک (**a**)	۴	۱۰/۴۷ **	۰/۰۱۰۲ ns	۷۱۲/۳۴ **
زمان تیمار (**b**)	۲	۶/۴۱ *	۰/۰۰۸۸ ns	۹۰۷/۶۳ **
اثر متقابل (**a×b**)	۸	۲/۰۷ ns	۰/۰۰۸۷ ns	۱۸۵/۷۲ **
اشتباه آزمایشی	۳۰	۱/۴۸	۰/۰۰۴۸	۱/۳۷
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۱۶	۱۴/۲۴	۵/۵۵

ns، * و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت عصاره مخمر بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ است.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با عصاره مخمر بر فعالیت آنتی‌اکسیدان کل ریشه موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ است.

تأثیر محرک عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

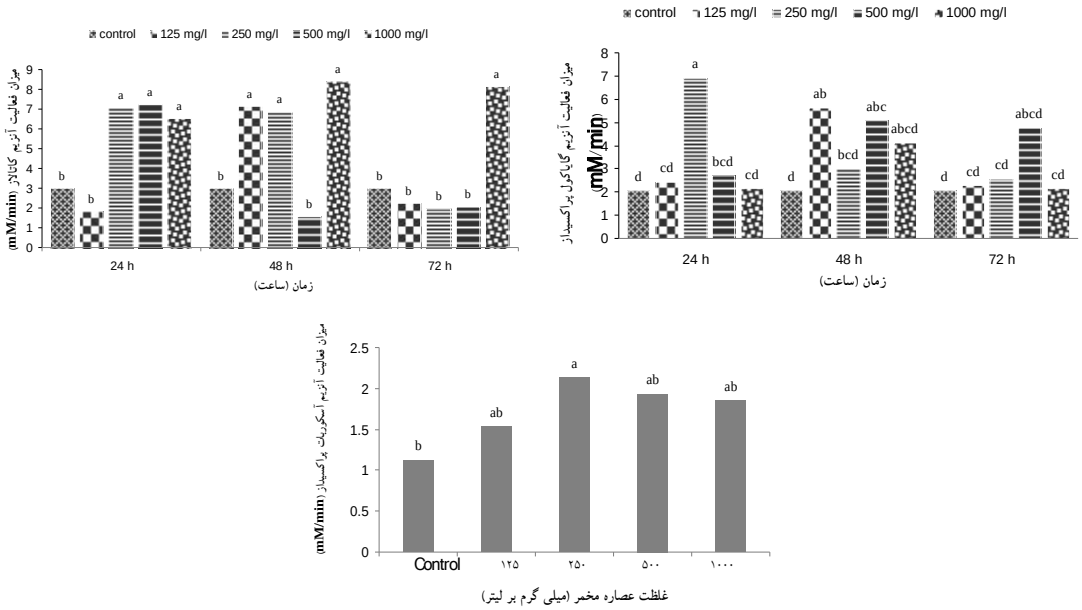
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار، در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گایاکول پراکسیداز داشت (جدول ۲). همچنین اثر اصلی غلظت در سطح احتمال ۵٪، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. بیشترین و کمترین

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، به‌ترتیب در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۶). همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مربوط به ریشه‌های موئین تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر به مدت ۲۴ ساعت و کمترین میزان آنها مربوط به کشت‌های شاهد بود (شکل ۶).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کاتالاز (mM/min)	گایاکول پراکسیداز (mM/min)	آسکوربات پراکسیداز (mM/min)
غلظت محرک (a)	۴	۳۲/۴۴ **	۰/۵۵ **	۰/۲۲ *
زمان تیمار (b)	۲	۱۶/۰۹ **	۰/۴۰ **	۰/۰۲ ns
اثر متقابل (a×b)	۸	۱۶/۹۶ **	۰/۴۶ **	۰/۰۳ ns
اشتباه آزمایشی	۳۰	۱/۵۲	۰/۰۰۴۸	۰/۰۶
ضریب تغییرات (٪)		۲۶/۴۲	۰/۰۸	۲۰/۱۳

ns، *، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.

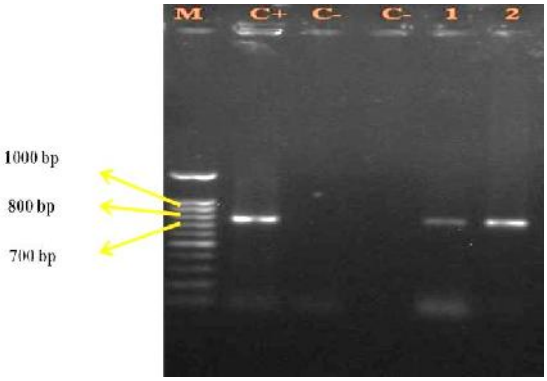


شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز ریشه موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ است.

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه ۷۸۰bp مربوط به ژن rol B را در ریشه‌های حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد که هم اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (اگروباکتریوم) بود (فایل تکمیلی ۳). همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (کنترل منفی) هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نشد. به‌عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰ bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن rol B در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک بود (شکل ۷).



شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تعیین حضور ژن *rol* B در ریشه‌های تراریخت بذرالبنج مشبک

لاین M: DNA مارکر kb ۱ (Fermentase)، لاین۱ و ۲: ریشه‌های موئین القاء شده در ریزنمونه‌های کوتیلدونی توسط سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز، لاین C^-: ریشه‌های غیرتراریخت بذرالبنج مشبک به‌عنوان کنترل منفی و لاین C^+: باکتری اگروباکتریوم سویه A7 به‌عنوان کنترل مثبت

بحث

در این پژوهش، کاربرد عصاره مخمر به‌عنوان محرک زیستی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار، به‌طور مؤثری میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار داد. عصاره مخمر ترکیبی از آمینواسیدها، ویتامین‌ها و موادمعدنی مختلف می‌باشد و ممکن است اثرات تحریک‌زایی آن به‌دلیل محتوی کاتیون‌هایی مثل روی (Zn)، کلسیم (Ca) و کبالت (Co) در عصاره مخمر باشد (Suzuki *et al*., 1985) که می‌توانند به‌عنوان محرک‌های غیر زیستی عمل کنند. غلظت یون کلسیم در محیط کشت، فعالیت آنزیم پوترسین متیل ترنسفراز (PMT) و به‌دنبال آن ظرفیت سنتز آلکالوئیدهای تروپانی را تنظیم می‌کند. از آنجایی که عصاره مخمر از ترکیب‌هایی غیر از آمینواسیدها، ویتامین‌ها و موادمعدنی تشکیل شده است، این امکان نیز وجود دارد که اثرات تحریکی آن به‌دلیل ترکیب‌های دیگری باشد که هنوز شناخته نشده‌اند (Pinol Teresa *et al*., 1999). همچنین اثر تحریکی عصاره مخمر می‌تواند به‌دلیل نقش آن در افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) باشد، که آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد. در واقع آنزیم PAL حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است که عمل اصلی آن دآمینه کردن L- فنیل آلانین و تولید ترانس سینامیک اسید است که به‌عنوان پیش‌ماده در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مختلف می‌باشد و محرک‌ها عمدتاً با القاء پاسخ‌های دفاعی و شرکت در انتقال سیگنال درون سلولی و برون سلولی بافت‌های گیاهی، تأثیر خود را اعمال می‌کنند (Seidel *et al*., 2002). تمام محرک‌ها می‌توانند با ایجاد فشار اسمزی به‌عنوان عوامل تنشی عمل کنند که باعث فعال‌سازی سریع آنزیم‌های کلیدی در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Goel *et al*., 2011). در این پژوهش، تیمار با عصاره مخمر احتمالاً در میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی مانند

هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (H6H) و پوترسین N- متیل ترنسفراز (PMT) مؤثر بوده و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، بیان ژن‌های h6h و pmt را تحت‌تأثیر قرار داده و موجب افزایش میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین شده است.

اثر القائی محرک‌های زیستی به احتمال زیاد به‌دلیل اولیگوساکاریدهای موجود در آنها می‌باشد که گزارش شده است به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی قوی، رشد و نمو و مکانیسم‌های دفاعی گیاهان را تنظیم می‌کنند (Raomai *et al*., 2015). عصاره مخمر، غنی از آمینواسیدهای مختلف، ویتامین‌ها و سایر ترکیب‌های تحریک‌کننده رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد و می‌تواند به‌صورت ترکیبی از آمینواسیدها مورد استفاده قرار گیرد که مزایای زیادی نسبت به کاربرد یک آمینواسید به تنهایی دارد (Hakobyan *et al*., 2012). بنابراین، می‌تواند رشد بافت‌ها را در محیط کشت‌هایی با مقادیر نسبتاً کم ویتامین یا نیتروژن افزایش دهد، اما تأثیر دقیق آن بر گیاهان هنوز مشخص نشده است (Wu & Shi, 2008). هم محرک‌های زیستی و هم محرک‌های غیر زیستی ممکن است تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت بافت و سلول گیاهی افزایش دهند، اما هیچ محرکی گزارش نشده است که دارای یک اثر عمومی بر بسیاری از سیستم‌های کشت باشد و هیچ سیستم کشتی یافت نشده است که به تمام محرک‌ها پاسخ دهد (Bais *et al*., 2002). بنابراین، غربالگری و آزمایش محرک‌های مختلف و غلظت بهینه برای محرکی خاص برای بهبود و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مورد نظر، مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که عصاره مخمر به‌عنوان محرک زیستی، نقش مؤثری در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف مانند هیوسیامین و اسکوپولامین در کشت ریشه تاتوره (*Datura stramonium* L.)، (Ajungla *et al*., 2009) اسکوپولامین در کشت ریشه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) (Hong *et al*., 2012)، فلاونوئید در کشت ریشه‌های موئین *Glycyrrhiza uralensis* (Zhang *et al*., 2009)، آزادیراکتین در کشت ریشه‌های موئین گیاه چریش (Srivastava & Srivastava, 2013)، تانشینون در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Salvia castanea* (Li *et al*., 2015) و کشت ریشه‌های نابجای *Perovskia abrotanoides* (Zaker *et al*., 2015) بربرین در کشت کالوس گیاه ابوتیلون (*Cissampelos pariera*) (Shad & Deepa, 2015) داشته است که نتایج بدست آمده از این مطالعه با نتایج این تحقیقات مطابقت دارد.

نتایج نشان داد، تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر منجر به کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. همچنین، کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز GC-MS عصاره‌های استخراج شده از ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک تیمار شده با سطوح مختلف غلظت عصاره مخمر در زمان‌های مختلف، نشان‌دهنده افزایش میزان پرولین نسبت به کشت‌های شاهد می‌باشد. گزارش شده است که اختصاص کربن بیشتر در ساختار مواد آلی مؤثر در تنظیم اسمزی، همانند پرولین می‌تواند باعث کاهش رشد شود (Javanmardi *et al*., 2010). بنابراین، در این پژوهش سنتز بیشتر پرولین در اثر تیمار ریشه‌های موئین با عصاره مخمر، ممکن است یکی از عوامل کاهنده رشد باشد. همچنین افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین در اثر تهییج با عصاره مخمر نشان‌دهنده این است که تخصیص منابع کربنی، بیشتر در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بوده است. البته اثرات سمّی غلظت‌های بالای عصاره مخمر و نیز افزایش مدت زمان تیمار (شرایط تنشی) می‌تواند از دلایل دیگر کاهش رشد ریشه‌های موئین باشد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج تحقیقات Hong و همکاران (۲۰۱۲) در کشت ریشه‌های *Hyoscyamus niger* و El-Nabarawy و همکاران (۲۰۱۵) در کشت کالوس *Zingiber officinale* مطابقت دارد. ثابت شده‌است که تنش‌های زنده و غیر زنده سبب افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد (از قبیل گونه‌های فعال اکسیژن) می‌شوند. رادیکال‌های آزاد اثرات مخربی بر مولکول‌های آلی دارند و سبب ایجاد عوارض و پیامدهای خطرناکی بر گیاهان می‌شوند. گیاهان در برابر این رادیکال‌ها، دارای مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، عمومی‌ترین

واکنش گیاهان در مواجهه با صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو است. البته تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور گسترده در بسیاری از گیاهان تحت تنش گزارش شده است (Halliwell, 1999). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش نیز احتمالاً به‌علت افزایش رادیکال‌های آزاد به‌ویژه پراکسید هیدروژن می‌باشد. مطالعات اندکی در مورد اثر الیسیتورها بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوای پرولین و قندهای محلول انجام شده است. نتایج تحقیق Arastefar و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*) در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج تحقیق فوق مطابقت دارد.

با توجه به نتایج این پژوهش و تحقیقات متعدد در زمینه اثرات مثبت تحریک‌زایی عصاره مخمر در تولید متابولیت‌های ثانویه مورد علاقه دارویی و صنعتی، به‌نظر می‌رسد که کاربرد عصاره مخمر به‌عنوان محرک زیستی راهکار مناسبی برای افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- 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.
- Arastefar, A., Riahi-Madvar, A., Tohid Far, M. and Yousefi, K., 2013. Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters *in Glycine max* seedlings. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(3): 1-18.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Schwelzer, H.P. and Vivanco, J.M., 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 983-995.
- Chen, G.X. and Asada, K., 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant and Cell Physiology, 30: 987-998.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C. and Lo, C.M.Y., 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Enzyme and Microbial Technology, 28: 100-105.
- Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K., 2007. Currants (*Vitis vinifera*) content of simple phenolics an antioxidant activity. Food Chemistry, 102(2): 516-522.
- El-Nabarawy, M.A., El-Kafafi, S.H., Hamza, M.A. and Omar, M.A., 2015. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. Annals of Agricultural Science, http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2014.11.020
- Goel, M.K., Mehrotra, S. and Kukreja, A.K., 2011. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165: 1342-1355.
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L. and Trchounian, A., 2012. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by Rhodobacter sphaeroides strains from mineral springs. International Journal of Hydrogen Energy, 37(8): 6519-6526.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defense mechanism from the beginning to the end. Free Radical Research, 31: 261-272.
- Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H., 2009. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. Journal of Medicinal Plants, 4(29): 1-17.
- Hong, M.L.K., Bhatt, A., Ping, N.S. and Keng, C.L., 2012. Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Romanian Biotechnological Letters, 17(3): 7340-7351.
- Ionkova, I., 2002. In vitro culture and the production of secondary metabolites in *Hyoscyamus reticulatus* L.: 75-95. In: Nagata, T. and Ebizuka, Y., (Eds.). Medicinal and Aromatic Plants XII. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 348p.
- Javanmardi, S., Fotovat, R. and Saba, J., 2010. Relationship between osmotic adjustment with soluble carbohydrates and proline and role of osmotic adjustment in grain yield of wheat lines under drought stress. Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources, 14(53): 65-73.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy

and bioreactor. Process Biotechnology, 41: 50-60.
- Seidel, V., Windhovel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroo, R.R.J., Medarde, M., Petersen, M. and Wolley, J.G., 2002. Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. Planta, 215: 1013-1039.
- Shad, V. and Deepa, M.A., 2015. Elicitation, biovonversion and quantification of berberine from *Cissampelos pariera* callus cultures. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6(6): 2636-2640.
- Srivastava, S. and Srivastava, A.K., 2013. Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of azadirachta indica. Applied Biochemistry and Biotechnology, 6: 664-676.
- Suzuki, T., Mori, H., Yamame, T. and Shimuzu, S., 1985. Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. Biotechnology and Bioengineering, 27: 192-201.
- Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. and Putalun, W., 2011. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. Biotechnology Letters, 33: 369-374.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smith, B.N., 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 121: 453-461.
- Vranova, E., Inze, D. and Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany, 53: 1227-1236.
- Wu, J.Y. and Shi, M., 2008. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Applied Microbiology and Biotechnology, 78(3): 441-448.
- Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S.H. and Wawrosch, C., 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitiousroot cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. Industrial Crops and Products, 67: 97-102.
- Zayed, R. and Wink, M., 2004. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Zeitschrift für Naturforschung, 59: 863-867.
- Zhang, H.C., Liu, J.M., Lu, H.Y. and Gao, S.L., 2009. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. Plant Cell Reports, 28: 1205-1213.

root cultures in *Atropa belladonna* Plant. Cell Reports, 5: 239-242.
- Kang, H.M. and Saltveit, M.E., 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum, 115: 571-576.
- 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 medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology, 6: 175-178.
- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., Yan, X. and Zhu, Y., 2015. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag^{+}, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. Protoplasma, 9: 790-804.
- Maehly, A.C. and Chance, B., 1959. The assay of catalase and peroxidase: 357-424. In: Glick, D., (Ed.). Methods of Biochemical Analysis (Vol. 1). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 532p.
- 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: 300-309.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews, 1(1): 69-79.
- Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M.H., 2008. Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. Molecules, 13: 1722-1742.
- Pinol Teresa, M., Palazon, J., Cusido, R.M. and Ribo, M., 1999. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy root. Plant Science, 141: 41-49.
- Pirian, K. and Piri, K., 2013. Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(11): 2960-2964.
- Raomai, S., Kumaria, S., Kehie, M. and Tandon, P., 2015. Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. Plant Growth Regulation, 75(1): 341-353.
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A., 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask

Effects of yeast extract on antioxidant activity and tropane alkaloids production in hairy roots cultures of *Hyoscyamus reticulatus* L.

F. Moharrami[1], B. Hosseini[2*], M. Farjaminezhad[3] and A. Sharafi[4]

1- MSc. Student, Horticulture sciences Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Horticulture sciences Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Medicinal Plants Research Center, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
4- Pharmaceutical Biotechnology Department, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Received: October 2016 Revised: January 2017 Accepted: February 2017

Abstract

Hyoscyamus species such as *Hyoscyamus reticulatus* L. are rich sources of tropane alkaloids, mainly hyoscyamine and scopolamine, which are used for their mydriatic, antispasmodic, anticholinergic, analgesic and sedative properties. Due to complex chemical structures, these alkaloids are obtained from natural sources, mainly Solanaceae plants. Elicitation of secondary metabolites biosynthetic pathways by different kind of elicitors is an effective strategy to increase secondary metabolites productivity. In the present study, in order to increase production of tropane alkaloids, cotyledon-derived hairy root cultures transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A7, were elicited with yeast extract (YE) as biotic elicitor. Effect of different concentrations (0, 125, 250, 500 and 1000mg/l) of YE elicitor at different exposure times (24, 48 and 72 h) were investigated. According to the results, YE at the concentration of 500 and 250 mg/l after 48 h treatment, significantly increased hyoscyamine (2-fold) and scopolamine (2.5-fold) production in comparison with control, respectively. The results showed that treatment with different concentrations of YE and also increasing the exposure time led to significant decrease in growth of hairy roots in comparison with control. The activity of antioxidant enzymes including catalase, guaiacol peroxidase, and ascorbate peroxidase was also elevated in treated hairy roots rather than of the control. Based on the results, it can be concluded that elicitation with YE leads to induce an oxidative stress. These results suggest that YE could be used as an effective elicitor in plant biotechnology for the production of plant secondary metabolites such as tropane alkaloids.

Keywords: Tropane alkaloid, scopolamine, hyoscyamine, antioxidant enzymes, yeast extract.