تأثیر عصاره مخمر بر رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

(*Hyoscyamus reticulatus*)

فرشته محرّمی[1*]، بهمن حسینی[2]، منوچهر فرجامی‌نژاد[3] و علی شرفی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه. ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه. ۳- استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل. ۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

*نویسنده مسئول: fereshte.moharrami@yahoo.com

چکیده

گونه‌های بنگ‌دانه (هیوسیاموس) از جمله بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) منابع غنی آلکالوئیدهای تروپانی، عمدتاً هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشند که به دلیل اثرات آنتی کولینرژیک، به طور گسترده‌ای در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این پژوهش تأثیر عصاره مخمر بر میزان رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و نیز افزایش مدت زمان تیمار منجر به کاهش معنی دار وزن تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. همچنین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل در سطح احتمال ۱ درصد، به طور معنی داری تحت تأثیر غلظت و زمان تیمار قرار گرفته است. بر اساس نتایج، چنین استنباط می‌شود که تهییج با عصاره مخمر، منجر به القاء تنش اکسیداتیو گردیده است.

کلمات کلیدی: بذرالبنج مشبک، ریشه موئین، عصاره مخمر، فعالیت آنتی اکسیدانی

مقدمه

با توجه به این که ریشه‌ها جایگاه اصلی بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی هستند و همچنین با توجه به جای‌گیری اختصاصی بعضی از آنزیم‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز این آلکالوئیدها در ریشه، تلاش برای تولید تروپان آلکالوئیدها در سیستم‌های بیوتکنولوژیک عمدتاً مبتنی بر کشت ریشه‌های موئین می‌باشد (Palazón *et al*., 2008). تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از این تکنیک هنوز هم دچار محدودیت‌هایی است. یکی از این موارد، درصد پایین متابولیت‌های تولید شده می‌باشد. بنابراین رویکردهای متعددی در این زمینه، مانند استفاده از محرک‌های متفاوت و تحریک مسیر بیوسنتزی برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین اتخاذ شده است. عصاره مخمر به عنوان یک محرک زیستی شناخته می‌شود که به دلیل تنظیم بالقوه‌ی متابولیسم ثانویه، در کشت بافت و سلول گیاهان به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می گیرد (Shi *et al*., 2007). تمام محرک‌ها می‌توانند با ایجاد فشار اسمزی به عنوان عوامل تنشی عمل کنند که باعث فعال سازی سریع آنزیم‌های کلیدی در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Gagnon and Ibrahim, 1997). یکی از پاسخ‌های مهم در برابر محرک‌های زیستی و غیر زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد.گیاهان به وسیله‌ی سیستم‌های آنتی اکسیدانی، گونه‌های فعال اکسیژن را کنترل کرده و از این طریق اثرات مخرب آن‌ها را کاهش می‌دهند (Vranova *et al*., 2002). این پژوهش با هدف بررسی تأثیر عصاره مخمر در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار بر میزان رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی کل در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و پس از رفع خواب فیزیولوژیکی بذور با استفاده از جیبرلین ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، کشت بذرها در محیط کشت MS صورت گرفت. به منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی از سویه A7 *Agrobacterium rhizogenes*، استفاده گردید و کوتیلدون‌های یک هفته‌ای، به مدت ۳ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده غوطه‌ور شدند. ۲ هفته پس از تلقیح، به تدریج ریشه‌های موئین ظاهر و بعد از گذشت یک هفته، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به صورت لاین‌های مجزا به پتری‌های جداگانه منتقل شدند. واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جدید هر ۱۰ روز یکبار صورت گرفت. محیط کشت‌های حاوی عصاره مخمر در غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. تیمار ریشه‌های موئین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در ۳ تکرار انجام گرفت. پس از گذشت این مدت زمان، ریشه‌های موئین از محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف محرک خارج و به محیط کشت MS مایع عاری از محرک جهت رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، ریشه‌های موئین برداشت و وزن تر و خشک و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل آن‌ها با استفاده از DPPH و به روش Chiuo و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری گردید. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

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 به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشت (جدول ۱). نتایج نشان داد، تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر منجر به کاهش معنی دار وزن تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. به طوری که کمترین میزان وزن تر (۶/۵۹ گرم) ریشه‌های موئین در مقایسه با شاهد (۹/۲۵ گرم) تحت تأثیر تیمار با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر محرک به دست آمد (نمودار ۱). 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 به ترتیب در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار با عصاره مخمر مشاهده گردید (نمودار ۲). طبق نتایج به دست آمده سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار با عصاره مخمر تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن خشک ریشه‌های موئین تیمار شده 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 در لیتر عصاره مخمر بود. همچنین، مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره مخمر نشان داد که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک در سطح احتمال ۱ درصد، به طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت و زمان تیمار قرار گرفته است. به طوری که، بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل در اثر تیمار با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت مشاهده گردید که نسبت به شاهد حدود ۳ برابر افزایش نشان داد و کمترین میزان آن تحت تأثیر تیمار با غلظت ۱۲۵میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر به مدت ۷۲ ساعت به دست آمد(نمودار ۳). همچنین با افزایش مدت زمان تیمار، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل ریشه‌های موئین روند کاهشی داشت.

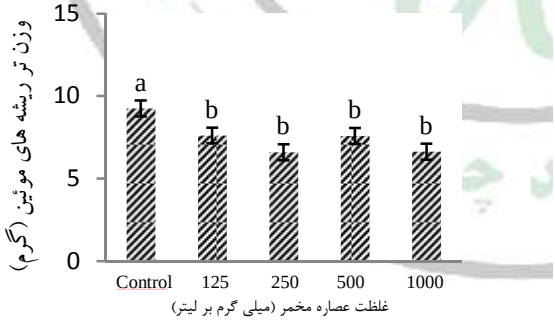
طی تنش اکسیداتیو، وقایعی در گیاهان صورت می‌گیرد که عبارتند از افزایش تولید ROS، افزایش میزان آنتی اکسیدان‌ها، افزایش پرولین و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی که منجر به افزایش تحمل گیاه به تنش می‌شوند. در پژوهش حاضر نیز، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل احتمالاً به علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن می‌باشد. این نتایج با نتایج تحقیق Abraham و همکاران (۲۰۱۱) در کشت گیاهچه‌های *Curcuma mangga* مطابقت دارد. در این پژوهش، کروماتوگرام-های حاصل از آنالیز GC-MS عصاره‌های استخراج شده از ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک تیمار شده با سطوح مختلف غلظت

عصاره مخمر در زمان‌های مختلف، نشان دهنده‌ی افزایش میزان پرولین نسبت به کشت‌های شاهد می‌باشد (شکل ۱ و ۲). به نظر می‌رسد اختصاص کربن بیشتر در ساختار مواد آلی مؤثر در تنظیم اسمزی، همچون پرولین می‌تواند باعث کاهش رشد شود. بنابراین، در پژوهش حاضر سنتز بیشتر پرولین در اثر تیمار ریشه‌های موئین با عصاره مخمر، ممکن است یکی از عوامل کاهنده‌ی رشد باشد. اثرات سمی غلظت‌های بالای عصاره‌ی مخمر و نیز افزایش مدت زمان تنش می‌تواند از دلایل دیگر کاهش رشد ریشه-های 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.

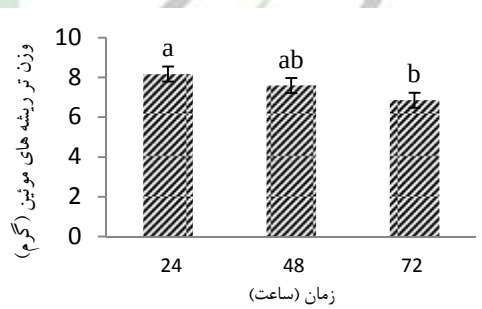
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره‌ی مخمر بر رشد و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل ریشه های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	فعالیت آنتی اکسیدانی کل (درصد)
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 (درصد)		۱۶/۱۶	۱۴/۲۴	۵/۵۵

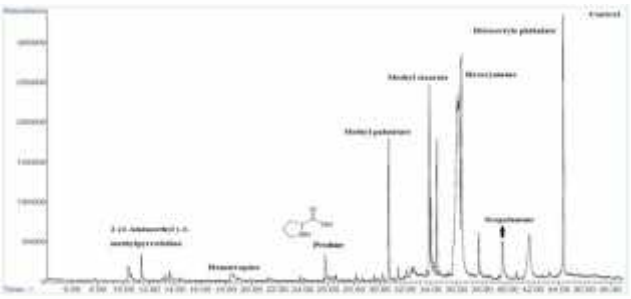
^{ns},*,** به ترتیب نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.



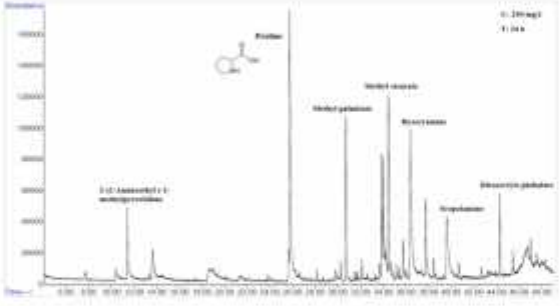
نمودار ۱- مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت عصاره‌ی مخمر بر وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون



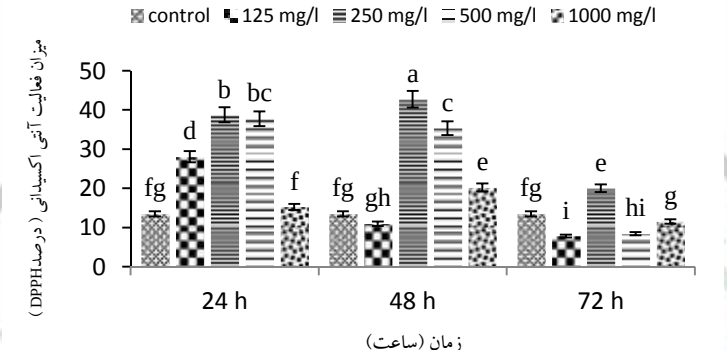
نمودار ۲- مقایسه میانگین اثر اصلی زمان تیمار با عصاره مخمر بر وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵



شکل ۱- کروماتوگرام ریشه‌های موئین



شکل ۲- کروماتوگرام ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۲۴ ساعت



نمودار ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با عصاره‌ی مخمر بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱

منابع

1. Abraham, F., Bhatt, A., Keng, C. L., Indrayanto, G. and Sulaiman, S. F. (2011). Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of Curcuma mangga in vitro plantlets. African Journal of Biotechnology, 10 (40): 7787-7795.
2. 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.
3. 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
4. Gagnon, H. and Ibrahim, R. K. (1997). Effect of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. Phytochemistry, 448: 1463-1467.
5. 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.
6. Palazón, 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.
7. Shi, M., Kwok, K. W. and Wu, J. Y. (2007). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. Biotechnology and Applied Biochemistry, 46: 191-196.
8. Vranova, E., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany, 53: 1227-1236.

Effect of yeast extract on growth and antioxidant activity of *Hyoscyamus reticulatus* hairy roots

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

1- M. Sc of Horticultural Science, Urmia University. 2- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, Urmia University. 3- Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Islamic Azad University, Ardabil. 4- Assistant Professor, Dep. of Pharmaceutical Biotechnology, Zanjan University of Medical Science.
*Corresponding author: fereshte.moharrami@yahoo.com

Abstract

Hyoscyamus species such as *Hyoscyamus reticulatus* L., are rich sources of tropane alkaloids, mainly hyoscyamine and scopolamine, which are used widely in medicine for their anticholinergic properties. In this research, the effect of yeast extract (YE) at different concentrations (0, 125, 250, 500 and 1000 mg/l) and exposure times (24, 48 and 72 h) on growth and antioxidant activity of *H. reticulatus* hairy roots were investigated. ANOVA results showed that treatment with different concentrations of YE, as well as increase of exposure time led to significant decrease in hairy roots fresh weight in comparison with control. Antioxidant activity of hairy roots was also affected by different concentrations of YE and exposure time ($P<0.01$). Based on the results, it can be concluded that elicitation with YE lead to induce an oxidative stress.

Key words: Antioxidant activity, Hairy root, Hyoscyamus reticulatus, Yeast extract