ارزیابی تولید ترکیب ضد سرطان ویتافرین A در کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های نابجا و تراریخت گیاه دارویی کاکَنج

بهناز حسینی[۱]، محمد حسین میرجلیلی*[۱]،حسن رضادوست[۲]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی و استادیار گروه کشاورزی، پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۲- استادیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکدهٔ گیاهان ومواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

*نویسندهٔ مسئول: m-mirjalili@sbu.ac.ir

چکیده

کاکَنج با نام علمی *Withania somnifera* گیاهی دارویی از خانوادهٔ Solanaceae می‌باشد و غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمندی نظیر ویتانولیدها (لاکتون‌های استروئیدی) است که امروزه اثرات فارماکولوژیکی قابل توجهی از آن‌ها گزارش شده است. ویتافرین A از مهمترین ویتانولیدهای موجود در این گیاه است که اثرات ضد سرطانی آن ثابت شده است. بیان مضاعف ژن اسکوالن سینتاز (Squalene synthase, *sqs*) به عنوان عامل کلیدی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات استروئیدی از جمله ویتانولیدها و ویتافرین A با هدف افزایش تولید این ترکیبات در منابع گیاهی بویژه گونه‌های جنس ویتانیا بسیار مورد توجه می‌باشد. در تحقیق پیش رو، ریشه‌های مویینهٔ تراریخت گیاه دارویی کاکَنج حاوی ژن *sqs* کد کنندهٔ آنزیم اسکوالن سینتاز از گیاه *Arabidopsis thaliana* و تحت کنترل پروموتور ۳۵ اِس ویروس موزاییک کلم با ریشه‌های نابجای گیاه از نظر شاخص رشد و مقدار تولید ویتافرینA طی یک دورهٔ کشت، مورد مطالعه قرارگرفته‌اند. نتایج نشان داد که ریشه‌های مورد مطالعه از الگوی رشد سیگموئید برخوردار هستند. نتایج همچنین نشان داد که شاخص رشد ریشه‌های تراریخت در هفتهٔ پنجم از کشت ۲ برابر ریشه‌های نابجا می-باشد. زمان دو برابر شدن وزن تر ریشه‌های تراریخت و نابجا به ترتیب ۱۸ و ۳۰ روز بدست آمد. اندازه‌گیری مقدار ویتافرین A در ریشه‌های مورد مطالعه نشان داد که ریشه‌های تراریخت (۱/۱۹میکروگرم/گرم مادهٔ خشک)، حاوی ۸ برابر ویتافرین A بیشتر در مقایسه با ریشه‌های نابجا (۰/۱۴۶ میکروگرم/گرم مادهٔ خشک) می‌باشد. نتایج این تحقیق می‌تواند برای تولید این ترکیب دارویی ارزشمند در سیستم کشت‌های انبوه و کنترل شده مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ویتانیا، کاکَنج، خانوادهٔ سیب زمینی، ضد سرطان، ریشهٔ مویینه، ریشهٔ نابجا، ویتافرین A

مقدمه

گیاه دارویی ویتانیا سومنیفرا یک گیاه دارویی مهم از خانوادهٔ سیب زمینی (سولاناسه) می‌باشد. که با نام‌های آشواگاندها، آسگاندها، یا جینسینگ هندی نامیده می‌شود (Singh et al., 2015). این گیاه در ایران به نام‌های محلی کاکَنج، کاکه، آویشک و عروسکِ پشت پرده شناخته می‌شود (مظفریان، ۱۳۸۳). در واقع این گیاه، یک گیاه مهم در سیستم‌های پزشکی آیورودا و بومی برای بیش از ۳۰۰۰ سال بوده است (Winters, 2006). بدین ترتیب در سال‌های اخیر توجه زیادی را به دلیل حضور تعداد زیادی از لاکتون‌ها و آلکالوئیدهای استروئیدی که به عنوان ویتانولیدها شناخته می‌شوند، دریافت کرده است. در حال حاضر،۱۲ آلکالوئید، ۳۵ ویتانولید و چندین سیتواینِدوزاید از این گیاه جدا و مطالعه شده است. ویتانولید اصلی در این گیاه ویتافرینA می باشد (Baldi et al., 2008). این ماده به عنوان ضد التهاب (Al-Hindawi et al., 1992)، ضد تومور (Devi et al., 1992) و(Wadhwa et al., 2013)، آنتی اکسیدانت (Bhattacharya et al., 1997) و ضد تشنج (Kulkarni et al., 1998) شناخته می‌شود. در حال حاضر ویتانولیدها به صورت تجاری از طریق استخراج با حلال از ریشه‌ها و برگ‌های گیاه بدست می‌آیند. عملکرد کم از منبع طبیعی، تغییرات ژنوتیپی و فیتوشیمیایی، ناهماهنگی در محتوا، دورهٔ طولانی انتظار (۴- ۵ سال) بین کاشت و برداشت، و سنتز شیمیایی غیر

اقتصادی، محدودیت‌های عمده در تولید ویتانولید صنعتی می‌باشد (Baldi et al., 2008). به منظور افزایش چشم انداز تجاری برای تولید ویتانولیدها، کشت‌های کنترل شدهٔ سلولی و ریشه‌های مویینهٔ گیاه می‌تواند یک انتخاب جایگزین مناسب باشد (Banerjee et al., 1994). ریشه‌های مویینه از طریق تراریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط اگروباکتریوم مولد ریشه (یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی) تشکیل می‌شوند. رشد سریع، زمان دو برابرشدن پایین، پایداری ژنتیکی در طول دورهٔ کشت، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیفی از ترکیبات شیمیایی در ریشه‌های مویینه از جمله مزایایی است که آن‌ها را به منبعی مهم و دایمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند تبدیل نموده است. ریشه‌های مویینه منابع ارزشمندی برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفادهٔ دارویی، آرایشی و افزودنی‌غذایی می‌باشند. بسیاری از گیاهان دارویی به طور موفقیت آمیزی با استفاده از اگروباکتریوم مولد ریشه، تراریخته شده و ریشه‌های مویینهٔ القا شده، تولید نسبتاً بالایی از متابولیت ثانویه (که دارای ارزش دارویی می‌باشد) را نشان داده‌اند. ریشه‌های مویینهٔ تراریخته مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی را تقلید می‌نمایند و حتی مقادیر بالاتری را نشان می‌دهند. بنابراین ابزاری قدرتمند جهت انجام تحقیقات به منظور بالا بردن میزان تولید متابولیت‌های دارویی با ارزش محسوب می‌شوند. پتانسیل بالای سیستم ریشه‌های مویینه برای تولید متابولیت‌ها باعث جلب توجه شرکت‌های خصوصی شده است. این موضوع شاخص مهمی است تا در آینده نزدیک بیوتکنولوژیست‌ها از ریشه‌های مویینه به منظور دستیابی به منابع زیرزمینی سلسلهٔ گیاهی دست پیدا نمایند (حسنلو، ۱۳۸۷). در تحقیق پیش رو، شاخص رشد و توانایی تولید ویتافرین A به عنوان یک ترکیب دارویی با ارزش توسط ریشه‌های نابجا و تراریخت گیاه کاکَنج مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی: ریشه‌های مویینهٔ القا شده بوسیله ی نژاد اگروباکتریوم حاوی آر آی پلاسمید دارای ژن اسکوالن سینتاز همراه با نشانگر مقاومت به کانامایسین و ریشه‌های نابجا حاصل از برگ‌های گیاه کاکنج در شرایط درون شیشه ایی ، که هر دو در محیط کشت نیمه غلظت جامد MS نگهداری می‌شدند، به عنوان مواد گیاهی لازم برای این آزمایش محسوب خواهد شد.

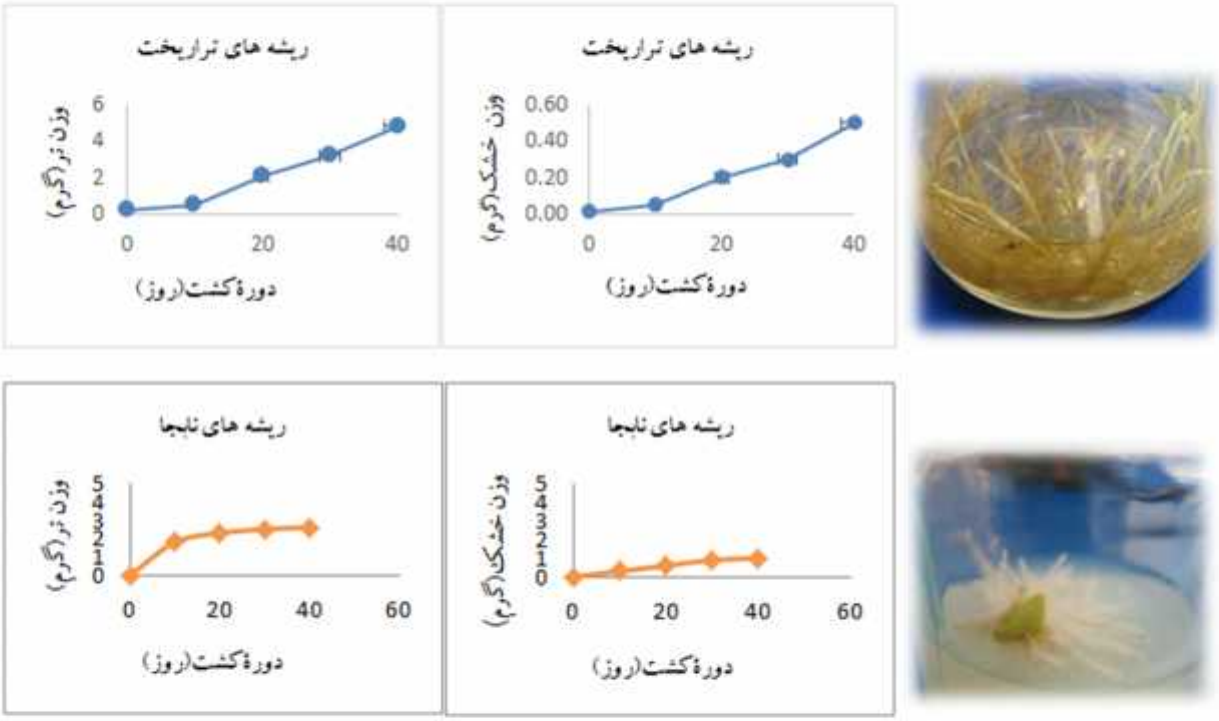
۲-۲- اندازه‌گیری شاخص رشد: غربالگری مقدماتی کلون‌های ریشهٔ مویینه برای انتخاب لاین‌های پررشد بر اساس مشاهدهٔ پلیت ها انجام گرفت. ظرفیت رشد و تولید بیومس برای غربالگری و انتخاب لاین‌های برتر ریشه بدین ترتیب انجام گرفت که، مقدار ۰/۵ گرم از هر لاین ریشه و با فنوتیپ مویینه شکل به عنوان اینوکلوم روی محیط نیمه غلظت MS، با ۸ درصد آگار کشت داده شد. شاخص رشد برای لاین‌های مورد مطالعه بعد از ۴ هفته با محاسبه‌ی وزن تازه و تعیین نسبت آن به وزن اینوکلوم اولیه محاسبه گردید.

۲-۳- استخراج و آنالیز ویتافرین A بوسیلهٔ اچ پی اِل سی: همه ی ریشه‌ها خشک و به خوبی پودر شده(۱گرم وزن خشک) وبا حلال متانول به میزان ۱ میلی لیتر تحت شرایط فراصوت (sonication) به مدت ۳۰ دقیقه استخراج شدند. نمونه‌ها برای مدت ۱ هفته در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دسیکاتورخلاء نگهداری شدند، پس مانده‌های باقی مانده دوباره در ۵ میلی لیتر متانول حل شدند و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی سپس با فیلتر ۰/۲۲ میکرو برای آنالیز اِچ پی اِل سی فیلتر شد. از دستگاه اِچ پی اِل سی مدل Knauer برای آنالیز استفاده شد.

نتایج و بحث

الگوی رشد ریشه ها به صورت سیگموئیدی می‌باشد. با توجه به منحنی‌های رشدی، ریشه‌های تراریخت سرعت رشد بالاتری نسبت به ریشه‌های نابجا داشته‌اند و شاخص رشد این ریشه‌ها نیز بالاتر می‌باشد، نتایج نشان داد که شاخص رشد ریشه‌های تراریخت در هفته پنجم ازکشت ۲ برابر ریشه‌های نابجا می‌باشد. زمان دو برابر شدن وزن‌تر ریشه‌های تراریخت و نابجا به ترتیب ۱۸ و ۳۰ روز بدست آمد. اندازه‌گیری مقدار ویتافرین A در ریشه‌های مورد مطالعه نشان داد که ریشه‌های تراریخت (۱/۱۹میکروگرم/گرم مادهٔ

خشک)، حاوی ۸ برابر ویتافرین A بیشتر در مقایسه با ریشه‌های نابجا (۰/۱۴۶ میکروگرم/گرم مادهٔ خشک) می‌باشند. نتایج این تحقیق می‌تواند برای تولید این ترکیب دارویی ارزشمند در سیستم کشت‌های انبوه و کنترل شده مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱- منحنی رشد ریشه های تراریخت و نابجا بر حسب وزن تر و وزن خشک

منابع

۱. حسنلو، ط، رضازاده، ش، رهنما، ح، زمستان ۱۳۸۷، ریشه‌های مویین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی، فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، دوره اول، شماره مسلسل بیست و نهم.

۲. مظفریان ولی اله، ۱۳۸۳، درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، صفحه ۱۰۰۳

3. Al-Hindawi, M. K., Al-Khafaji, S. H. and Abdul-Nabi, M. H. 1992. Anti-granuloma activity of Iraqi *Withania somnifera*. Journal of ethnopharmacology, 37: 113-116.
4. Baldi, A., Singh, D. and Dixit, V. K. 2008. Dual elicitation for improved production of withaferin A by cell suspension cultures of Withania somnifera. Applied biochemistry and biotechnology, 151: 556-564.
5. Banerjee, S., Naqvi, A., Mandal, S. and Ahuja, P. 1994. Transformation of *Withania somnifera* (L) Dunal by *Agrobacterium rhizogenes*: infectivity and phytochemical studies. Phytotherapy Research, 8: 452-455.
6. Bhattacharya, S., Satyan, K. S. and Ghosal, S. 1997. Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. Indian Journal of Experimental Biology, 35: 236-239.
7. Devi, P. U., Sharada, A., Solomon, F. and Kamath, M. S. 1992. In vivo growth inhibitory effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma 180. *Indian* journal of experimental biology, 30: 169-172.
8. Kulkarni, S., George, B. and Mathur, R. 1998. Protective effect of *Withania somnifera* root extract on electrographic activity in a lithium-pilocarpine model of status epilepticus. Phytotherapy Research, 12: 451-453.
9. Singh, P., Guleri, R., Singh, V., Kaur, G., Kataria, H., Singh, B., Kaure, G., Kaul, S. C., Wadhwa, R. and Pati, P. K. 2015. Biotechnological interventions in *Withania somnifera* (L.) Dunal. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1-20.

10. Wadhwa, R., Singh, R., Gao, R., Shah, N., Widodo, N., Nakamoto, T., Ishida, Y., Terao, K. and Kaul, S. C. 2013 .Water extract of ashwagandha leaves has anticancer activity: Identification of an active component and its mechanism of action. PloS one, 8: e77189.
11. Winters, M. 2006. Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology. Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic, 11: 269-277.

Evaluation of anticancer compound withaferin A production through in vitro adventitious and transformed roots of *Withania somnifera* L. (Dunal)

B. Hosseini[1], M.H. Mirjalili[1,*], H. Rezadoost[2]

1-M.Sc of Medicinal plants and Assistant professors, respectively, Dep. of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University of Tehran. 2- Assistant Professor, Dep. of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University of Tehran.
*Corresponding author: m-mirjalili@sbu.ac.ir

Abstract

Withania somnifera (L.) Dunal belongs to the Solanaceae family and is enriched in a group of valuable compounds as steroidal lactones called withanolides which their remarkable pharmacological properties have been reported. Withaferin A (WFA) is an important withanolides which has been isolated from the plant with proven anticancer activity. Squalene synthase gene (*sqs*) expression as a key factor in the biosynthesis of withanolides as withaferin A to increase of these compounds has been highly considered in *Withania* species. In the present study, hairy transformed roots (HTRs) of *W. somnifera* containing *sqs* gene encoding squalene synthase from *Arabidopsis thaliana* under the control of the CaMV35S promoter were compared with the hairy adventitious roots (HARs) of the plant for their growth index and WFA content during a period culture. Both studied roots showed sigmoid pattern. The results showed that the GI of HTRs after five week of culture was 2-fold more than HARs. The doubling time of HTRs and HARs biomass was 18 and 30 day. Quantitative evaluation of WFA in the studied roots showed that HTRs (1/19µg/g dry weight) contain 8-fold WFA more than HARs (0/146µg/g dry weight). These findings can be used for the production of WFA as a valuable medicinal compound through controlled and scaling up cultures.

Keywords: *Withania* sp., Kakanj, Solanaceae, Anticasncer, Hairy root, Adventitous root, Withaferin A