بهینه سازی شرایط کشت بافتی پیاز نرگس (*Narcissus tazetta*)، جهت افزایش تولید ترکیب ضد آلزایمر گالانتامین

سیده صبا طاهری*[۱]، محمد حسین میرجلیلی[۲]، محسن فرزانه[۲] و حسن رضادوست[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران. ۲- استادیار گروه مهندسی کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران و ۳- استایار گروه فیتوشیمی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

*نویسنده مسئول: s.taheri14@gmail.com

چکیده

تیره نرگسیان (Amaryllidaceae) شامل انواع گونه‌های سوخ‌دار می‌باشد که علاوه بر کاربردهای زینتی در طراحی فضای سبز، حاوی مواد موثره مختلفی از جمله آلکالوئیدهایی می‌باشند که اثرات فارماکولوژیکی متعددی از قبیل بازدارندگی آنزیم استیل کولین استراز و فعالیت‌های ضد توموری برای آن‌ها گزارش شده است. گونه‌های مختلف جنس نرگس (*Narcissus* spp.) از این تیره می‌باشند که طی چند سال گذشته به علت شناسایی و معرفی آلکالوئید گالانتامین در آن‌ها از اهمیت دارویی زیادی برخوردار شده‌اند. گالانتامین، به عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز برای پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر معرفی شده است. در تحقیق حاضر، بهینه سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای پیاز نرگس به منظور تولید ترکیب گالانتامین مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است. برای این منظور یک آزمایش فاکتوریل کامل(۲^n) در قالب کاملاً تصادفی با چهار فاکتور و هر فاکتور در دو غلظت با سه تکرار انجام شد. ۱۶ نوع محیط کشت به همراه محیط شاهد (MS) که از نظر میزان یون‌های آمونیم و نیترات، پتاسیم فسفات و همچنین منبع کربن (ساکارز) با یکدیگر متفاوت بودند، تهیه شد. جهت ارزیابی رشد و تولید گالانتامین، صفات وزن خشک، وزن تر، نسبت وزن تر به خشک، کلروفیلa، b و کل، و همچنین مقدار گالانتامین اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که محیط کشت شماره‌ی ۱۴ (۰/۸۹ گرم در لیتر آمونیوم نیترات، ۴/۵۰ گرم در لیتر پتاسیم نیترات، ۰/۱۰ گرم در لیتر پتاسیم فسفات، ۱/۲۵ گرم در لیتر آمونیوم سولفات و ۶۰/۰۰ گرم در لیتر ساکارز) بهترین محیط کشت از نظر تولید آلکالوئید گالانتامین (۳۸/۶۹ میکروگرم بر گرم ماده خشک) است.

کلمات کلیدی: تیره نرگسیان، گالانتامین، کشت درون شیشه‌ای، استیل کولین استراز، آلزایمر

مقدمه

تیره‌ی نرگسیان حاوی آلکالوئیدهایی با طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل ضددرد، ضدویروس، ضدمالاریا و ضدسرطان می‌باشند (Aniszewski, 2007) و مطالعات اخیر نشان داده است که گونه‌های مختلف جنس نرگس حاوی آلکالوئید گالانتامین است که یک ترکیب مهم دارویی برای پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر می‌باشد (Fináková et al., 2007). بیماری آلزایمر، نوعی انحطاط سیستم عصبی است، که باعث زوال حافظه می‌گردد. در حال حاضر، برای درمان بیماری آلزایمر از داروهای مهارکننده‌ی استیل کولین استراز استفاده می‌شود (Kihara & Shimohama, 2004). گالانتامین به واسطه‌ی اثر طولانی، انتخابی، برگشت‌پذیر و بازدارنده‌ی آنزیم استیل کولین استراز و همچنین به علت عوارض جانبی کم آن مورد توجه قرار گرفت (Thomsen & Kewitz 1990). با توجه به غلظت کم آلکالوئید گالانتامین و افزایش روز افزون تقاضا به داروی گالانتامین جهت پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر، نیازمند یافتن راهی برای تولید در مدت زمانی کوتاه و مستمر هستیم. بهینه‌سازی اجزای محیط کشت گامی مهم در جهت ایجاد یک فرآیند بیوتکنولوژی برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است (Georgiev et al., 2009). در اغلب موارد، ترکیب عناصر مغذی محیط کشت با توجه به غلظت مولفه‌های کلیدی غذایی (منابع کربن، نیتروژن و فسفر) و یا

نسبت C/N بهینه شده است (Wilhelmson et al., 2006). در سال ۲۰۰۹ جرجیو و همکاران موفق به ارائه‌ی یک محیط کشت موراشیگ و اسکوگ اصلاح شده برای کسب حداکثر گالانتامین در کشت شاخساره گل برفی تابستانی، شدند (Georgiev et al., 2009). در این تحقیق، همانند جرجیو و همکاران، اثر چهار متغییر ساکارز، یون‌های آمونیوم، نیترات و فسفات را روی تولید زیست توده و بیوسنتز گالانتامین گیاه نرگس (*Narcissus tazetta*) بررسی شد و موفق به ارائه‌ی یک محیط کشت بهینه شده برای تولید حداکثر میزان گالانتامین شدیم.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر نمونه‌های گیاهی جمعیت‌های برتر کشت بافتی گیاه نرگس موجود در پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی داروئی دانشگاه شهید بهشتی، در محیط‌های کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۲میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۲میلی‌گرم نفتالین استیک اسید همراه با مقادیر مختلف ساکارز (۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر)، پتاسیم فسفات (۰/۲۴ و ۰/۱۰ گرم در لیتر) و یون‌های آمونیوم (۰/۲ و ۰/۵۴ گرم در لیتر) و نیترات (۳/۴۴ و ۱/۴۴ گرم در لیتر) در سه تکرار کشت شدند (جدول۱). پیازهای نرگس به مدت ۳۰ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در این محیط‌ها قرار گرفتند.

جدول۱: طراحی تمام فاکتورهای آزمایش (2^4) (Georgiev et al., 2009)

تیمار	متغیرهای مستقل (برحسب گرم بر لیتر)			
	NH_4^+	NO_3^-	KH_2PO_4	ساکارز
۱	۰/۲	۱/۴۴	۰/۱۰	۳۰
۲	۰/۲	۱/۴۴	۰/۲۴	۳۰
۳	۰/۲	۳/۴۴	۰/۱۰	۳۰
۴	۰/۵۴	۱/۴۴	۰/۱۰	۳۰
۵	۰/۵۴	۳/۴۴	۰/۲۴	۳۰
۶	۰/۵۴	۳/۴۴	۰/۱۰	۳۰
۷	۰/۵۴	۱/۴۴	۰/۲۴	۳۰
۸	۰/۲	۳/۴۴	۰/۲۴	۳۰
۹	۰/۲	۱/۴۴	۰/۱۰	۶۰
۱۰	۰/۲	۱/۴۴	۰/۲۴	۶۰
۱۱	۰/۲	۳/۴۴	۰/۱۰	۶۰
۱۲	۰/۵۴	۱/۴۴	۰/۱۰	۶۰
۱۳	۰/۵۴	۳/۴۴	۰/۲۴	۶۰
۱۴	۰/۵۴	۳/۴۴	۰/۱۰	۶۰
۱۵	۰/۵۴	۱/۴۴	۰/۲۴	۶۰
۱۶	۰/۲	۳/۴۴	۰/۲۴	۶۰
۱۷	۰/۳۷	۲/۴۴	۰/۱۷	۳۰

به منظور استخراج آلکالوئید، ۳۰۰ میلی‌گرم پیاز خشک شده با ۵ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفتند و با دستگاه روتاری خشک شدند. عصاره‌ی خشک شده در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با اسید سولفوریک اسیدی شد (pH~ 2) و به آن ۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و فاز کلروفرمی حذف گردید. سپس با آمونیاک بازی شد (pH~ 11) و دوباره ۵

میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه شد و در این مرحله فاز کلروفرمی جمع‌آوری شد. در نهایت فاز کلروفرمی جمع‌آوری شده با روتاری تغلیض گردید. تمامی مراحل ذکر شده سه بار تکرار شدند. عصاره‌ی حاصل در ۱ میلی‌لیتر متانول با درصد خلوص کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) حل گردید و ۲۰ میکرولیتر آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل، میزان ۰/۱ گرم از بافت تازه‌ی برگ پیاز نرگس با ترازوی دقیق توزین شد و با استون ٪۸۰ در هاون چینی به خوبی له گردید. حجم نهایی استون مصرفی ۱۵ میلی‌لیتربود. سپس نمونه‌ها با حداکثر سرعت به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت دانسیته نوری محلول روشناور در طول موج ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد (Arnon, 1967). این آزمایش به صورت فاکتوریل کامل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و برای تجزیهٔ داده‌ها از نرم افزار SAS نسخه ۱۶ استفاده شد. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

جدول۲: مقایسه‌ی میانگین اثر محیط‌های مختلف بر صفات رشدی و مقدار گالانتامین پیاز نرگس

تیمار/صفات	FW(g)	DW(g)	FW/DW	Chla(mg/g)	Chlb(mg/g)	Chlt(mg/g)	GAL(µg/g)
۱	۳/۳۲a	۰/۳۸a	۸/۶۲b	۰/۸۷de	۰/۲۸fg	۱/۱۵ef	۲۳/۸۷b
۲	۲/۵۵b	۰/۴۲a	۶/۰۵fgh	۰/۶۴h	۰/۲۲hi	۰/۸۶h	۲۱/۹۳bc
۳	۲/۱۹cd	۰/۳۴b	۶/۰۱efgh	۰/۸۱f	۰/۳۶cd	۱/۳۴cd	۲۱/۶۱bcd
۴	۱/۲۷gh	۰/۲۰de	۶/۳۰efgh	۰/۵۱j	۰/۱۷j	۰/۶۷i	۲۳/۵۴b
۵	۲/۵۵b	۰/۲۴dc	۱۰/۶۰a	۱/۰۲c	۰/۳۵de	۱/۳۶bc	۱۵/۸۱efg
۶	۲/۱۳cd	۰/۳۲b	۶/۶۴efg	۰/۵۹hi	۰/۱۹ij	۰/۷۸hi	۱۷/۱۷defg
۷	۱/۷۷ef	۰/۲۵c	۷/۰۷de	۰/۵۸i	۰/۱۹ij	۰/۷۸hi	۱۳/۸۴b
۸	۲/۳۶bc	۰/۳۳b	۷/۰۸de	۰/۳۷k	۰/۱۰k	۰/۴۷j	۱۷/۱۵defg
۹	۱/۹۷de	۰/۳۲b	۶/۱۵fgh	۰/۸۴ef	۰/۲۵gh	۱/۰۹fg	۱۶/۰۰efg
۱۰	۱/۰۴hi	۰/۱۳fg	۸/۲۱bc	۰/۸۳ef	۰/۳۲ef	۱/۱۴ef	۱۳/۰۴g
۱۱	۰/۶۴j	۰/۱۱gh	۵/۸۳gh	۰/۶۲hi	۰/۲۵gh	۰/۸۷h	۱۵/۴۰fg
۱۲	۱/۰۶hi	۰/۱۸e	۵/۷۷h	۱/۰۸b	۰/۳۹c	۱/۴۷b	۲۲/۶۷b
۱۳	۰/۷۷ij	۰/۱۱fgh	۵/۷۳def	۰/۹۰d	۰/۴۴b	۱/۳۴cd	۱۷/۹۱cdef
۱۴	۱/۵۳fg	۱/۲۰de	۷/۵۳cd	۱/۲۲a	۰/۵۲a	۱/۷۴a	۳۸/۶۹a
۱۵	۰/۸۱ij	۰/۱۲fgh	۶/۷۷def	۰/۹۱d	۰/۳۴de	۱/۲۴de	۱۴/۷۵fg
۱۶	۱/۰۶hi	۰/۱۶ef	۶/۷۲def	۰/۷۰g	۰/۲۸fg	۰/۹۸g	۱۹/۹۹bcde
۱۷	۰/۶۲j	۰/۰۸h	۸/۱۳bc	۰/۵۲j	۰/۱۹ij	۰/۷۰i	۱۳/۸۲fg

FW: وزن تر، DW: وزن خشک، FW/DW: نسبت وزن تر به وزن خشک، BD: قطر پیاز، BN: تعداد پیازچه، Chla: کلروفیلa، Chlb: کلروفیلb، Chlt: کلروفیل کل و GAL: گالانتامین.

نتایج و بحث

طبق جدول۲ مربوط به مقایسه‌ی میانگین صفات ارزیابی شده و با توجه به ضرایب دانکن، بیشترین میزان وزن تر پیاز در محیط کشت شماره‌ی۱ (۳/۳۲ گرم) و کمترین در محیط کشت‌های شماره‌ی ۱۱ (۰/۶۴ گرم) و شاهد (۰/۶۳ گرم) مشاهده شد. بیشترین مقدار وزن خشک، در محیط کشت‌های شماره‌ی۲ (۰/۴۲ گرم) و محیط کشت شماره‌ی۱ (۰/۳۸ گرم) و کمترین مقدار وزن خشک در محیط کشت شاهد (۰/۰۸ گرم) اندازه‌گیری و بیشترین مقدار نسبت وزن تر به خشک که نشان دهنده‌ی میزان آب بافت است، در محیط کشت شماره‌ی۵ (۱۰/۶۰) و کمترین مقدار در محیط کش شماره‌ی۱۲ (۵/۷۷) دیده شد. بیشترین مقدار کلروفیلa و b در محیط کشت شماره‌ی ۱۴ و کمترین مقدار آن‌ها در محیط کشت شماره‌ی ۸ اندازه‌گیری شد. این نتیجه در صفت کلروفیل کل نیز تکرار شد. بین محیط‌های کشت از نظر میزان گالانتامین مانند سایر صفات اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بدین صورت که بهترین محیط کشت از نظر تولید گالانتامین، محیط کشت شماره‌ی۱۴ (۳۸/۶۹ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک) و پس از آن محیط‌های شماره‌ی۱ (۲۳/۸۷ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک)، محیط کشت شماره‌ی۷ (۲۳/۸۴ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک)، محیط کشت شماره‌ی۴ (۲۳/۵۴ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک) و محیط کشت شماره‌ی۱۲ (۲۲/۶۷ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک) بیشترین مقدار گلانتامین را تولید کردند. از طرفی کمترین مقدار گالانتامین در محیط کشت شماره‌ی۱۰ (۱۳/۰۴ میکروگرم در گرم ماده‌ی خشک) مشاهده شد. طی بررسی‌هایی که جورجیو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی کشت درون شیشه‌ای گیاه گل برفی تابستانی انجام دادند نیز محیط کشت شماره‌ی۱۴ بهترین محیط کشت از نظر تولید گالانتامین اعلام شد (Georgiev et al., 2009). طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که اثر تمامی فاکتورهای آمونیوم، نیترات، فسفات و ساکارز بر روی افزایش گالانتامین موثر است و همچنین افزایش وزن تر و وزن خشک اثر چندانی در افزایش تولید گالانتامین ندارد، بلکه افزایش ساکارز همراه با کاهش میزان فسفر اثر موثر مثبتی بر افزایش تولید گالانتامین دارد. سِلِس و همکاران نیز نشان دادند که افزایش میزان ساکارز اثر مثبتی بر افزایش تولید گالانتامین دارد(Sellés et al., 1997). در طی مطالعه‌ای روی میزن تروپان آلکالوئیدهای گیاه بذرالبنج، نشان داده شد که افزایش غلظت ساکارز بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان را نیز افزایش می‌دهد (چلبیان و مجد، ۱۳۸۲). علاوه بر این هرچه میزان آمونیوم نسبت به نیترات کمتر باشد، افزایش میزان آلکالوئیدها را خواهیم داشت. انتظار می‌رود حداکثر تولید گالانتامین (آلکالوئیدها) با افزایش میزان نسبت کربن به نیتروژن (C/N) بدست آید (Ilieva & Pavlov, 1997) ، زیرا مولکول گالانتامین در ساختار خود حاوی نیتروژن است. در محیط کشت شماره‌ی۱۴ میزان آمونیوم و نیترات نسبت به محیط کشت شاهد (محیط کشت شماره‌ی۱۷) بیشتر است و همچنین میزان منبع کربن (ساکارز) نیز بیشتر است. این نتایج با نتایج خاوری نژاد و محمدی (۱۳۸۶) بر روی تروپان آلکالوئیدهای گیاه بنگ‌دانه نیز مطابقت دارد (خاوری نژاد و محمدی، ۱۳۸۶). قربانپور و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان کردند که سطح مناسبی از نیتروژن در تولید تروپان آلکالوئیدها می‌تواند به عنوان یک محرک عمل کند (Ghorbanpour et al., 2014). اثر متقابل هر چهار فاکتور آمونیوم، نیترات، پتاسیم فسفات و ساکارز با هم بر روی میزان گالانتامین موثر است و در کل با افزایش میزان نیتروژن و کاهش میزان فسفات و همچنین با افزایش میزان ساکارز میزان آلکالوئیدها افزایش می‌یابد (Georgiev et al., 2009, Sellés et al., 1997).

منابع

۱. چلبیان، ف.، و مجد، ا. (۱۳۸۲). بررسی تغییر میزان آلکالوئیدهای تروپان در زمان رشد رویشی، پیش گلدهی، گلدهی و میوه دهی گیاه بذرالبنج و تاثیر تغییر عناصر و قند بر بیوستز این آلکالوئیدها در کشت بافت. علوم پایه. ص ۴۱۴۱-۴۱۵۳.

۲. خاوری نژاد، ر.، و محمدی، ن. (۱۳۸۶). تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات ردوکتاز و تروپان آلکالوئیدها در گیاه بنگدانه. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد۷، شماره۴. ص۹۶۳-۹۷۲.

3. Aniszewski, T. 2007. Alkaloids – Secrets of Life. London: Elsevier’s Science & Technology.
4. Arnon, A. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agro. J. 23: 112-21.

5. Firáková, S. Šturdíková, M. Múčková, M. 2007. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. Biologia - Springer, 62(3), 251-257.
6. Georgiev, V., Berkov, S., Georgiev, M., Burrus, M., Codina, C., Bastida, J., Ilieva, M. and Pavlov, A. 2009. Optimized nutrient medium for galanthamine production in *Leucojum aestivum* L. *in vitro* shoot system. Zeitschrift für Naturforschung C. 64: 219-24.
7. Ghorbanpour, M., Ghafarzadegan, R. & 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, 75-86.
8. Ilieva M. and Pavlov A. 1997, Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 683 – 688.
9. Kihara, T. and Shimohama, S. 2004. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. Acta neurobiologiae experimentalis. 64: 99-106.
10. Sellés, M., Bergonón, S., Viladomat, F., Bastida, J. and Codina, C. 1997. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49: 129-36.
11. Thomsen , T. and Kewitz , H. 1990. Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine *in vitro* and *in vivo*. Life sciences. 46: 1553-8.
12. Wilhelmson, A., Häkkinen, S.T., Kallio, P.T., Oksman-Caldentey, K.M. and Nuutila, A.M. 2006. Heterologous expression of *Vitreoscilla hemoglobin* (VHb) and cultivation conditions affect the alkaloid profile of Hyoscyamus muticus hairy roots. Biotechnology progress. 22: 350-8.

Optimization of *in vitro* culture conditions of *Narcissus tazetta* L. for the production of galantamine as anti-Alzheimer's disease compound

S.S. Taheri[1*], M.H. Mirjallili[2], M. Farzaneh[2], H. Rezadoost[3]

1-M. Sc Horticultural Science Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University. 2- Assistant Professor Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, 3- Assistant Professor Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University
*Corresponding author: s.taheri14@gmail.com

Abstract

Amaryllidaceae family consists of bulbous plant species which in addition of ornamental and landscape applications, contain different active substances such as alkaloids and their various pharmacological effects including acetylcholinesterase inhibition and antitumor activity have been reported. In recent years, some members of this family, *i.e. Narcissus* species are well-known because of their galantamine (GAL) content. GAL with the inhibitory effect of acetylcholinesterase enzyme, has been introduced for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. In this study, *in vitro* culture optimization of *Narcissus tazetta* in a complete factorial design experiment (2^n), based on CRD four factors, two levels and three replicate to produce GAL has been conducted. In total, 16 Murashig and Skoog (MS) media culture with different amount of NH_4^+, NO_3^-, KH2PO4 and sucrose as well as a control have been tested. Fresh weight (FW), dry weight (DW), fresh weight/dry weight (FW/DW), chlorophyll a (Chla), b (Chlb) and total (Chlt) and GAL content have been measured. Our results showed that the medium culture No. 14 (0.89 g/l NH_4NO_3, 4.5 g/l KNO_3, 0.10 g/l KH_2PO_4, 1.25 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 60.0 g/l sucrose) was the best medium for GAL production (38.69 µg/g DW).

Key words: Amaryllidaceae, Galantamine, *in vitro*, Acetylcholinesterase, Alzheimer