افزایش تولید ویتافرین‌آ با استفاده از الیسیتورهای زنده و غیر زنده در کشت ریشه های مویینه گیاه کاکَنج (*Withania somnifera* (L.) Dunal)

بهناز حسینی*[۱]، محمد حسین میرجلیلی[۲]، زینب یوسفیان[۱]، حسن رضادوست[۳]
[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه شهیدبهشتی تهران
[۲] دانشیارگروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
[۳] استادیارگروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
* نویسنده مسئول: behnaz.hosseini7@gmail.com

چکیده

گیاه دارویی کاکَنج با نام علمی ویتانیا سومنیفرا از خانواده‌ی سیب زمینی، غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمندی نظیر لاکتون‌های استروئیدی (ویتانولیدها) می‌باشد. بیان مضاعف ژن اسکوالن سینتاز به عنوان عامل کلیدی مسیر بیوسنتزی ترکیبات استروئیدی از جمله ویتانولیدها با هدف افزایش تولید این ترکیبات در منابع گیاهی بویژه گونه‌های جنس ویتانیا بسیار مورد توجه می‌باشد. در تحقیق پیش‌رو دو لاین ریشه‌ی مویینه (ترانسفورم شده با نژاد وحشی اگروباکتریوم مولد ریشه‌زایی و نژاد حامل ژن اسکوالن سینتاز (SQS) از نظر میزان تولید ترکیب ضد سرطان ویتافرین‌آ تحت تیمار انگیزنده (الیسیتور) های زیستی (دیواره‌ی سلولی قارچ اندوفیت جدا شده از درخت سرخدار) و غیرزیستی (سولفات مس ، کلرید کادمیوم) با یکدیگر مقایسه شدند. بیشترین میزان تولید ویتافرین‌آ به میزان ۵۰۰ (میکروگرم بر وزن خشک) هنگامی بدست آمد که دو الیسیتور زیستی و غیر زیستی (کلرید کادمیوم و الیسیتور قارچی) همزمان با یکدیگر به‌کار برده شد. نتایج این پژوهش با توجه به استعداد متابولیتی ریشه‌های تراریخت این گیاه در بیوسنتز و تولید ویتانولیدها، امکان بهبود راندمان تولید و بهره‌برداری تجاری از ریشه‌های مویینه‌ی تراریخت این گونه را فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: **کاکَنج، خانواده سیب‌زمینی، ویتافرین‌آ، کشت ریشه مویینه، الیسیتور**

مقدمه

ویتانیا سومنیفرا بدلیل مقدار فراوان ویتانولیدهای موجود در آن، یکی از مهم‌ترین گونه‌های مورد مطالعه در خانواده‌ی سیب زمینی، می‌باشد. ترکیبات اصلی و بیوشیمیایی ریشه‌های ویتانیا، آلکالوئیدها و لاکتون‌های استروئیدی است، که در کلاس ویتانولیدها نام‌گذاری می‌شوند. تا کنون، ۱۲نوع آلکالوئید، ۴۰ نوع ویتانولید و چندین سیتوئیندوزید (سیتوئیندوزید، ویتانولیدی دارای یک مولکول قند در موقعیت کربن شماره ۲۷ می‌باشد) از این گیاه استخراج شده و مورد مطالعه قرار گرفته‌است (Mirjalili et al., 2009). اکثر فعالیت‌های فارماکولوژیکی ویتانیا مربوط به حضور دو نوع از ویتانولیدها، ویتافرین‌آ و ویتانولید دی می‌باشد. در سال‌های اخیر، مطالعات فارماکولوژیکی بر روی ویتانولیدها، شواهدی دال بر خواص ضد سرطان، ضد باکتری، ضد پیری و محافظت از دستگاه عصبی این ترکیبات را فراهم کرده‌اند. همچنین اثرات مثبت آن بر روی غدد درون ریز، بیماری‌های قلبی و سیستم اعصاب مرکزی گزارش شده است. ویتافرین‌آ، یکی از ویتانولیدهای شناخته شده، در مقابل محدوده‌ی وسیعی از سرطان‌ها، شامل سلول‌های سرطانی سینه، کلیه، پوست و روده بزرگ، تخمدان و تیروئید مؤثر می‌باشد (Mondal *et al*., 2010; Ryeong and singh, 2013) . با توجه به اهمیت دارویی ویژه‌ی این گیاه، در مطالعات خارجی، تحقیقات گسترده‌ای برای تولید ویتانولیدها از گیاه ویتانیا سومنیفرا و در شرایط کشت بافت و سیستم ریشه‌های مویینه انجام گرفته است (Bandyopadhyay *et al*.,

(2007. در تحقیق حاضر، برای اولین بار سیستم کشت ریشه‌ی مویینه‌ی تاریخت ایجاد شده از سویه‌ی حامل ژن اسکوالن سینتاز در گیاه ویتانیا سومنیفرا، به منظور بررسی تغییرات و ارزیابی تولید ترکیب با ارزش ویتافرینA تحت تیمار با الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی قرار گرفته است و تولید این ترکیب در لاین‌های تاریخت با لاین‌های سویه‌ی وحشی ایجاد شده در شرایط درون‌شیشه‌ایی مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفته است.

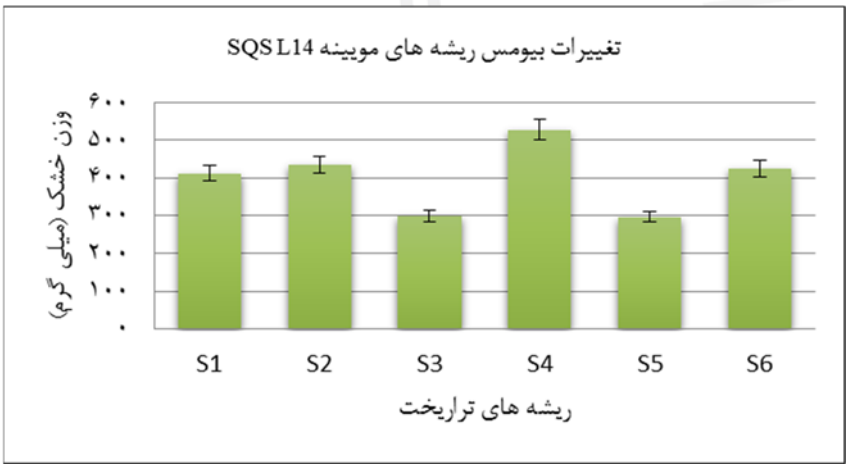
مواد و روش‌ها

در این پژوهش القای ریشه‌های مویینه بر روی نمونه‌های برگی گیاه ویتانیا سومنیفرا حاصل از گیاهچه‌های استریل در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت. به این منظور نژاد وحشی اگروباکتریوم مولد ریشه زایی(A4) و نژاد اگروباکتریوم مولد گال طوقه حاوی آر آی پلاسمید دارای ژن اسکوالن سینتاز (SQS) همراه با نشانگر مقاومت به کانامایسین کلون شده در ناقل پی‌بی‌آی (Kribii, 1997; Van Larebeke, 1974) استفاده شد. پس از ظهور ریشه‌های مویینه در طول دوره‌ی رشد، به تناوب و به فواصل زمانی کوتاه، ریشه‌ها بر روی محیط کشت جدید حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون هورمون به همراه آنتی بیوتیک واکشت داده شدند (بیش از ۱۵ بار). DNA کل از کلون‌های ریشه‌های مویینه پس از مشاهده‌ی رشد کافی بر روی پلیت، استخراج و برای آزمایشات مولکولی استفاده گردید. تایید هویت ژنتیکی لاین‌های تراریخت با استفاده از واکنش PCR برای شناسایی هر کدام از ژن‌های ترانسفورم شده انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های RolC، ژن Ags و ژن SQS پس از واکنش اتصال، به ترتیب قطعات DNA به اندازه‌های ۵۳۴، ۳۴۷ و ۱۹۵ جفت باز تولید می‌کنند. در ادامه به منظور مطالعه الگوی رشد ریشه ها و بهینه سازی آن‌ها در محیط سوسپانسیون از محیط MS نیمه غلظت به همراه ساکارز ۳ درصد، پی اِچ ۵/۸ و دوره‌ی واکشت دوهفته‌ای استفاده شد. کشت‌های سوسپانسیون درون شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه قرار داده شدند (Praveen and Murthy, 2012; Praveen and Murthy, 2010). با توجه به داده‌های حاصل از بررسی الگوی رشد ریشه‌ها، تنها از دولاین ریشه‌ی مویینه‌ی سویه‌ی وحشی و سویه‌ی تراریخت شده، به دلیل توان تولیدی بیومس بالایی که داشتند، برای آزمایش الیسیتور استفاده گردید. بر اساس آزمایشات پیشین انجام شده الیسیتورهای منتخب برای انگیزش شامل؛ سولفات مس[1]، کلرید کادمیوم[2] و پلی‌ساکارید قارچی[3] بودند (Sivanandhan *et al*., 2014Baldi *et al*., 2008;). سولفات مس و کلرید کادمیوم مورد استفاده ابتدا وزن شده و سپس در آب مقطر دوبار استریل[4] حل شدند. به دلیل حساسیت این دو ماده به دما، برای استریل کردن، زیر هود لامینار از فیلتر ۰/۲۲میکرون برای استریل کردن، عبور داده شدند. برای تهیه‌ی پلی ساکارید قارچی، قطعات قارچ مورد نظر در محیط جامد پی دی اِی کشت شدند و بعد از رشد به محیط مایع نیمه غلظت MS منتقل شده و به مدت ۲۱ روز در این محیط و بر روی شیکر با دور ۸۰ آرپی‌ام در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شدند. توده‌ی قارچ رشد کرده با استفاده از صافی جدا و هیف‌های قارچ با استفاده از دستگاه فریزدرایر در دمای منفی ۴۰ درجه تحت خلاء خشک شد و بعد در ازت مایع پودر گردید و عصاره‌ی قارچی نیز جهت تیمار طبق مقاله یونگ و ون (Li and Tao, 2009) استخراج گردید. پس از اعمال تیمارهای انگیزش با استفاده از الیسیتورهای ذکر شده، ریشه های مویینه به منظور تعیین میزان ویتافرینA، خشک و عصاره گیری نمونه‌های پودر شده با کمک متانول خالص و دستگاه سونیک انجام گرفت. برای آنالیز، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[5] استفاده شد.

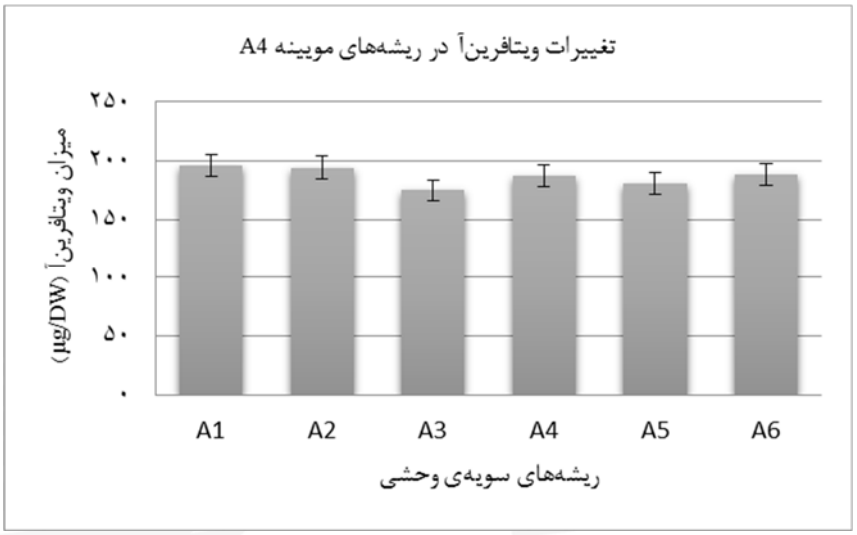
[1] $CuSO_4.5H_2O$
[2] $CdCl_2.2\ ½H_2O$
[3] *Stemphylium sedicola*
[4] SDDW(sterile double-distilled water)
[5] High liquid choromatography

نتایج و بحث

با اعمال الیسیتورها بر ریشه‌های موینه‌ی تراریخت، تغییرات بیومس پس از ۴۸ ساعت در معرض الیسیتور قرار گرفتن ریشه‌ها ثبت شد. وزن خشک ریشه‌ها پس از قرار دادن ریشه‌های تیمار شده در هوای آزاد اندازه‌گیری و ثبت گردید. این تغییرات بیومس برای ریشه‌های تراریخت حامل ژن، طبق (نمودار۱) می‌باشند. بعد از اعمال الیسیتیشن بر ریشه‌های موینه، عصاره‌ی متانولی این ریشه‌ها در سه تکرار به دستگاه اِچ پی اِل سی کالیبره شده، تزریق شدند. نتایج حاصل از اِچ پی اِل سی نمونه‌های ریشه‌ی موینه نشان داد که؛ در ریشه‌های موینه‌ی سویه‌ی وحشی کاربرد الیسیتورها تأثیر زیادی بر میزان ویتافرینآ تولیدی نداشته، به گونه‌ایی که تغییرات میزان ویتافرینآ نسبت به شاهد تفاوت مشخص و قابل توجهی نداشتند، با این حال بیشترین تأثیر بر تغییر ویتافرینآ هنگامی مشاهده شد که کلرید کادمیوم به محیط کشت ریشه‌ها اضافه گردید، و کمترین میزان ویتافرینآ زمانی بدست آمد که سولفات مس به عنوان الیسیتور استفاده گردید و ویتافرین تولیدی حتی از شاهد هم کمتر بدست آمد. بعد از کلرید کادمیوم بیشترین تأثیر بر تولید این ترکیب را استفاده‌ی همزمان الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی (قارچ + سولفات مس) داشت (نمودار۲). در صورتی که تأثیر الیسیتورهای مورد استفاده بر تولید ویتافرینآ از طریق ریشه‌های موینه‌ی تراریخت نتایج متفاوت و جالب توجهی را ارائه داد (نمودار۳). طبق داده‌های بدست آمده از این آزمون، بیشترین میزان تأثیر بر تولید ویتافرینآ در ریشه‌های تراریخت، زمانی بدست آمد که دو الیسیتور زیستی(قارچ) و غیر زیستی (کلرید کادمیوم) با یکدیگر بکار برده شد. این میزان ۵۰۰ (میکروگرم بر گرم از وزن خشک)، بیشترین میزان تولید ویتافرینآ از طریق ریشه‌های موینه تحت تأثیر الیسیتورها بود. کمترین میزان تولید این ترکیب در اثر کاربرد الیسیتور قارچی بدست آمد. این استراتژی باعث افزایش ویتافرینآ نسبت به شاهد در لاین‌های موینه شکل ریشه، بویژه در لاین‌های حامل ژن اسکوآلن سینتاز شد. علاوه بر بالاتر بودن شاخص رشد نژاد حامل ژن SQS نسبت به دیگر لاین‌ها و حتی گیاه مادری، این لاین‌های تراریخت دارای پتانسیل تولید بالاتری نیز برای ترکیب ضدسرطان ویتافرینآ می‌باشد. این مزیت باعث می‌شود بتوان با کاربرد استراتژی‌های مختلفی مانند بکارگیری الیسیتورهای مختلف توان تولید این لاین‌های مورد بحث را چندین برابر کرد. نتایج این پژوهش با توجه به استعداد متابولیتی ریشه‌های تراریخت این گیاه در بیوسنتز و تولید ویتانولیدها، امکان بهبود راندمان تولید و بهره‌برداری تجاری از ریشه‌های موینه‌ی تراریخت این گونه را فراهم می‌کند.



نمودار۱: تغییرات بیومس بر اساس وزن خشک ریشه‌های SQS L14 بعد از تیمار با الیسیتورها (S1: شاهد، S2: کلرید کادمیوم S3، سولفات مس ، S4: الیسیتور قارچی، S5: الیسیتور قارچی و کلرید کادمیوم ، S6: الیسیتور قارچی و سولفات مس)



نمودار۲: تغییرات میزان ویتافرینA در ریشه‌های سویه‌وحشی تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی (A1: شاهد، A2: کلرید کادمیوم ،A3: سولفات مس ، A4: الیسیتور قارچی، A5: الیسیتور قارچی و کلرید کادمیوم ، A6: الیسیتور قارچی و سولفات مس)

نمودار۳: تغییرات میزان ویتافرینA در ریشه‌های سویه‌ی تراریخت تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی (S1: شاهد، S2: کلرید کادمیوم ، S3: سولفات مس ، S4: الیسیتور قارچی، S5: الیسیتور قارچی و کلرید کادمیوم ، S6: الیسیتور قارچی و سولفات مس)

منابع

Baladi, 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.

Bandyopadhyay, M., Jha, S. and Tepfer, D. 2007. Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. Plant Cell Reports. 26: 599-609.

Bulgakov, V.P., Khodakovskaya, M.V., Labetskaya, N.V., Chernoded, GK. and Zhuravlev., Y.N. 1998. The impact of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. Phytochemistry; 49:1929–34.

Kribii, R., Arró, M., Del Arco, A., González, V., Balcells, L. and Delourme, D. 1997. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase. European

Journal of Biochemistry; 249: 61-69.

Li, Y.-C. and Tao, W.-Y. 2009. Interactions of taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus spp*.) during taxol accumulation. Cell biology international. 33: 106-112.

Mondal, S., Mandal, C., Sangwan, R., Chandra, S. and Mandal, C. 2010. Withanolide D induces apoptosis in leukemia by targeting the activation of neutral sphingomyelinase ceramide cascade mediated by synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. Molecular. Cancer. 9, 239.

Mirjalili, M.H., Fakhr-Tabatabaei, S.M., Bonfill, M., Alizadeh, H., Cusido, RM., Ghassempour, A. and Palazon, J. 2009. Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures- Engineering in Life. Sciences; 9:197-204.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum; 10:1399-3054.

Praveen, N. and Murthy, H. 2010. Production of withanolide-A from adventitious root cultures of *Withania somnifera*. Acta physiologiae plantarum; 32: 1017-1022.

Praveen, N. and Murthy, H. 2012. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. Industrial Crops and Products; 35: 241-243.

Eun-Ryeong, Hahm. and Shivendra, S.V. 2013. Withaferin A-induced apoptosis in human breast cancer cells is associated with suppression of inhibitor of apoptosis family protein expression. Cancer Letters; 334: 101–108.

Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. and Manickavasagam, M. 2014. Enhanced biosynthesis of withanolides by elicitation and precursor feeding in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in shake-flask culture and bioreactor.

Van, Larebeke., N, Zaenen, I., Teuchy, H., Van Montagu, M., and Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Journal of molecular Biology; 86: 109–127.

Enhanced Production of Withaferin A in Hairy Root Cultures of *Withania Somnifera* Following Biotic & Abiotic Elicitation

Behnaz Hosseini*[1], Mohammad Hossein Mirjalili[2], Zeynab Yousefian[1], Hassan Rezadoost[3]

[1]*Graduated from Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran*

[2]*Associate professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran*

[3]*Assistant professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran*

**Corresponding Author: behnaz.hosseini7@gmail.com*

Abstract

Kakang with scientific name of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae) is a medicinal plant rich in valuable phytochemical compounds such as steroidal lactones (withanolids). Overexpression of squalene synthase gene as a key component of isoprenoids biosynthesis pathway could be of significant importance in order to enhance the total withanolids of withania. In this study, two lines of the hairy roots established *W. somnifera* which are increased by two strain of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pRiA4) and (pBIs *SQS1*) infection has been used. In this inquiry, concurrent impact of two types (biotic and abiotic) of elicitors on the production of WFA was studied. The elicitors include: copper sulfate II, cadmium chloride and fungal (*Stemphylium sedicola* isolated as an endophytic-taxol producing fungus from *Taxus baccata*) cell extract. Maximum production of WFA (500 µg/DW) was observed when cadmium chloride with *Taxus sp.* endophyte fungal cell extract added to medium. This strategy caused a significant increase in the WFA compared to control. The results can be used in mass culture and control system for producing this precious compound.

***Keywords*: *Withania somnifera* (L.), Solanaceae, withaferin A (WFA), hairy root, elicitor**