تاثیر نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم (SiO_2) بر تولید هیوسیامین و آسکوپولامین در ریشه‌های موئین تراریخت بذرالبنج کوتاه (*Hyoscyamus pusillus* L.)

احد هدایتی[۱]، بهمن حسینی[۱*]، رامین ملکی[۲]، خاویر پالازون[۳]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۲] گروه شیمی تجزیه، جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، ارومیه

[۳] گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده داروسازی، دانشگاه بارسلون، اسپانیا

*نویسنده مسئول: **b.hosseini@urmia.ac.ir**

چکیده

گیاهان متعلق به جنس بذرالبنج (*Hyoscyamus*) برخی از ترکیبات مهم از جمله هیوسیامین و آسکوپولامین را به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی و سمی را نشان می‌دهند. بذرالبنج کوتاه (*H. pusillus*) یکی از گیاهان دارویی است که از منابع اصلی تروپان آلکالوئیدهایی مثل هیوسیامین و آسکوپولامین شناخته می‌شود. کشت ریشه‌های موئین و استفاده از محرک‌ها جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد شده است. نانوذرات گروه جدیدی از محرک‌ها هستند که به عنوان تحریک کننده تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند. در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مدت زمان تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) بر رشد و میزان تولید هیوسیامین و آسکوپولامین در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن تر (۱۰/۴۸ گرم) در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم به مدت ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۷/۷۳ گرم) در ریشه‌های موئین کنترل بدست آمد. بیشترین میزان تولید هیوسیامین (۷/۴۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و آسکوپولامین (۱۵/۵۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک) که به ترتیب دو و سه برابر نمونه کنترل بود، به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد. بر اساس نتایج می‌توان گفت که نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید محرک موثری جهت افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین می‌باشد.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، تروپان آلکالوئید، محرک، وزن تر

مقدمه

تیره Solanaceae شامل ۹۰ جنس و ۲۵۰ گونه است که گیاهان این تیره به اشکال مختلف علفی، درخت و درختچه می‌باشند. جنس بذرالبنج یا بنگ دانه (*Hyoscyamus*) متعلق به این تیره می‌باشد که ۹ گونه آن منحصراً در ایران و ۱۸ گونه در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارند (مظفریان، ۱۳۸۲). گونه بذرالبنج کوتاه (*Hyoscyamus pusillus* L.) یکی از گونه‌های این جنس است که به دلیل داشتن آلکالوئیدهای با ارزش تروپانی دارای خاصیت دارویی می‌باشد. یکی از تفاوت‌های آشکار این گونه با سایر گونه‌ها، بالا بودن میزان آسکوپولامین نسبت به هیوسیامین در سه اندام ریشه، ساقه و برگ می‌باشد. میزان آسکوپلامین به عنوان آلکالوئید اصلی این گیاه در اندام‌های مختلف متفاوت بوده و در ریشه ۰/۰۸۷ درصد، ساقه ۰/۰۵۷ درصد و برگ ۰/۰۹۰ درصد گزارش شده است (Bahmanzadegan*a et al.*, 2009) و با توجه به این‌که در حال حاضر تقاضای تجاری برای آسکوپولامین نسبت به هیوسیامین و آتروپین ۱۰ برابر بیشتر است این گونه می‌تواند منبع مناسبی برای

IrHC2019

آسکوپولامین باشد. این ترکیب به عنوان داروی مهار کننده اعصاب پاراسمپاتیک می‌باشد و در واقع آنتاگونیست رقابتی استیل کولین در گیرنده‌های موسکارین‌ها می‌باشد و به عنوان ضد اسپاسم، ضد کولینرژیک، ضد درد و آرام بخش استفاده می‌شود (Bahmanzadegana *et al.*, 2009). باکتری *Agrobacterium rhizogenes* نوعی باکتری گرم منفی خاکزی است که مسئول القاء ریشه موئین در محل تلقیح است. استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز و کشت ریشه موئین به علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (Banerjee *et al.*, 2012). در بیشتر مواقع، تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش نیاز به محرک (Elicitor) دارد. از محرک‌های غیر زیستی می‌توان به نانو ذرات اشاره کرد که مجموعه‌های اتمی یا مولکولی با حداقل ابعاد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی در مقایسه با توده مواد خود دارند (Monica and Cremonini, 2009). از آن‌جا که نانو ذرات قادر به تحریک مکانیسم دفاعی در سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه هستند، اخیراً از آن‌ها در محیط‌های کشت به عنوان محرک استفاده شده است. سیلیسیوم دومین عنصر فراوان در سطح کره زمین و یکی از عناصر غذایی مفید در رشد و سلامت گیاهان می‌باشد. اگرچه سیلیسیوم عنصر غیر ضروری برای گیاهان در نظر گرفته شده است، اما در برخی از گیاهان یک عنصر ضروری است (Doshi *et al.*, 2008). این عنصر می‌تواند موجب تقویت سیستم حفاظتی گیاه در شرایط نامساعد محیطی، بیماری و حمله حشرات شود (خوشگفتار منش، ۱۳۸۹). مطالعه حاضر اولین بررسی در مورد تاثیر نانو ذرات دی‌اکسید سیلسیوم (SiO_2) بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و آسکوپولامین در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تهیه ریزنمونه

بذور مورد نیاز گیاه بذرالبنج کوتاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و در زیر هود لامینار توسط الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید. بذور جهت جوانه زنی و تهیه ریزنمونه در محیط کشت MS مورد کشت قرار گرفتند.

القاء ریشه‌های موئین

سویه A13 باکتری *A. rhizogenes* جهت القاء ریشه‌های موئین از بانک میکروبی موسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران-ایران تهیه گردید. ریزنمونه‌های برگی پس از تلقیح توسط سویه باکتری در محیط کشت MS فاقد هورمون به مدت ۴۸ ساعت و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت هم کشتی، ریزنمونه جهت حذف باکتری به محیط کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم منتقل و تا زمان ظهور ریشه های موئین در اتاق رشد با دمای۲ ±۲۵ و در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

بررسی اثر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید بر میزان رشد و تولید تروپان آلکالوئیدهای ریشه‌های موئین

در این آزمایش غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محرک نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم به صورت جداگانه تهیه و اثر آن‌ها بر رشد و میزان تولید هیوسیامین و آسکوپولامین در ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه در دو مدت زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور حدود ۲ گرم از ریشه‌های تازه به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۳۰ میلی لیتر از هریک از محیط‌های کشت انتقال یافت و کشت‌ها در شیکر انکوباتور

IrHC2019

با ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد جهت رشد قرار داده شدند. ریشه‌های موئین بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت که به حداکثر رشد خود رسیده بودند، با غلظت‌های مختلف محرک به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از یک هفته، ریشه‌ها توسط آب مقطر استریل شستشو شده و پس از حذف رطوبت اضافی توسط کاغذ صافی استریل، جهت اندازه گیری وزن تر و خشک و ارزیابی‌های فیتوشیمیایی توسط دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفتند. جهت سنجش میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و آسکوپولامین عصاره گیری از ریشه‌های موئین خشک شده با روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) انجام گردید.

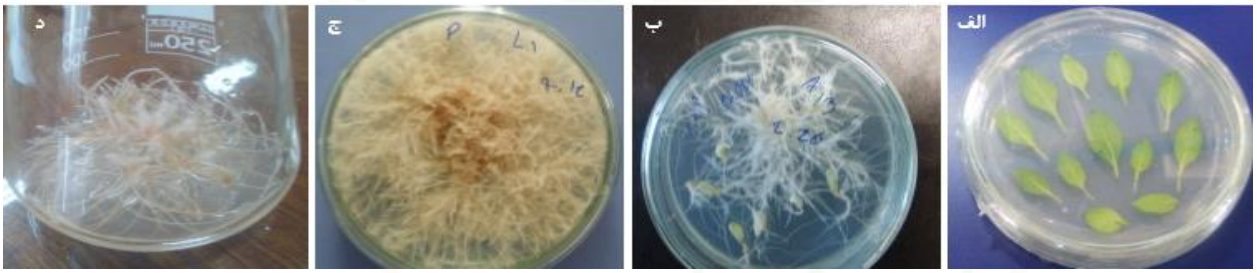
آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجم گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2013 استفاده شد.

نتایج و بحث

ظهور ریشه‌های موئین

ده روز پس از آلودگی ریزنمونه‌ها با باکتری، ظهور ریشه‌های موئین آغاز و تا ۲ هفته در ریزنمونه‌ها ریشه‌های موئین تشکیل گردید (شکل ۱). پس از ظهور ریشه‌های موئین، از میان چندین لاین پررشد، پررشدترین لاین انتخاب و برای مراحل بعدی و اعمال تیمار مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱- مراحل مختلف رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی بدرالبنج کوتاه: الف) تلقیح ریزنمونه‌های برگی با آگروباکتریوم، ب) ظهور ریشه‌های موئین از برگ‌های تلقیح یافته، ج) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد و د) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع

تاثیر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید بر وزن تر ریشه‌های موئین تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میزان وزن تر (۱۰/۴۸ گرم) در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۷/۷۳ گرم) در ریشه‌های موئین شاهد مشاهده گردید. در مورد وزن خشک نیز اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید معنی‌دار نبوده ولی اثر ساده زمان تیمار بر میزان وزن خشک معنی‌دار بود. سیلسیوم عنصر ضروری برای رشد و نمو سلول‌های گیاهی نمی‌باشد ولی در غلظت‌های کمتر حضور سیلسیوم منجر به افزایش رشد سلول‌های گیاهی می‌شود. در مطالعه‌ای که بر روی ریشه‌های موئین زرین گیاه انجام شده است نیز در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید، بیشترین میزان وزن تر بدست آمده است (Nourozi *et al*., 2019).

IrHC2019

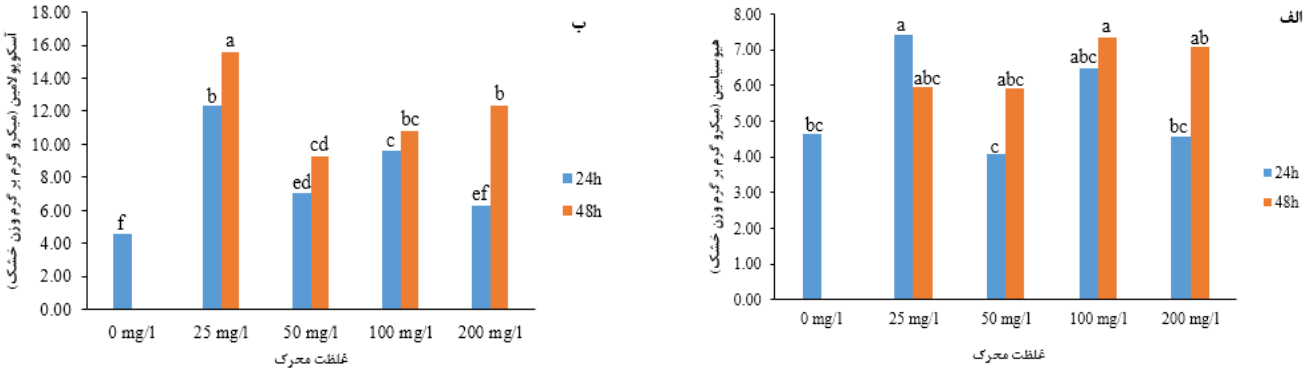
جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر وزن تر و خشک و میزان تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر	وزن خشک	هیوسیامین	آسکوپولامین
زمان تیمار (a)	۱	۳/۰۶ ns	۰/۰۲۴ *	۴/۲۶۳*	۴۸/۵۳**
نانو تیتانیوم دی‌اکسید (b)	۴	۴/۵۹ ns	۰/۰۱۰ ns	۶/۰۸۵**	۲۷۸/۰۴**
اثر متقابل (a*b)	۴	۰/۱۹ns	۰/۰۰۳ ns	۳/۶۹*	۳۰۲/۰۱۱**
خطای آزمایش	۲۰	۲/۰۰۶	۰/۰۰۴	۱/۰۰	۱/۰۰
ضریب تغییرات (CV %)		۱۶/۳۳	۱۶/۶۹	۱۷/۲۱	۱۰/۸۲

**، * و ns به ترتیب نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱و ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین، اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان هیوسیامین و در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان آسکوپولامین معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان هیوسیامین (۷/۴۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم به مدت ۴۸ ساعت بود که نسبت به کمترین میزان آن (۴/۰۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید به مدت ۲۴ ساعت، حدود دو برابر شده است (شکل ۲-الف). در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت با افزایش غلظت محرک تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان هیوسیامین افزایش یافته و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یک کاهش جزئی نشان داده است. بیشترین میزان آسکوپولامین (۱۵/۵۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در ریشه‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سیلسیوم دی‌اکسید تیمار شده بودند بدست آمد که در مقایسه با کمترین میزان آسکوپولامین (۴/۵۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در ریشه‌های موئین شاهد، افزایش سه برابری را نشان داد (شکل ۲-ب). عوامل مختلفی مثل غلظت محرک، سن کشت، زمان افزودن محرک به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد. محرک‌ها در واقع سیگنال‌هایی هستند که سبب تسریع تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. محرک‌ها پاسخ‌های دفاعی، از جمله توانایی القای تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند تروپان آلکالوئیدها را به عهده دارند. نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم در گیاهان با افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن تاثیر می‌گذارد و از آنجا که آلکالوئیدهای تروپانی پایه نیتروژنی دارن تولید آن‌ها افزایش می‌یابد (اورنگ و همکاران، ۱۳۹۷).

IrHC2019



شکل ۲- تاثیر غلظت و زمان تیمار با نانوذرات دی‌اکسید سیلسیوم بر میزان هیوسیامین (الف) و آسکوپولامین (ب) در ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه

منابع

مظفریان، و. ۱۳۸۲. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، چاپ سوم، تهران، ۹۶۲ صفحه.

اورنگ، ص.، درگاهی، ص. و پور ایواندره، ع. ۱۳۹۷. اثرات نانو محرک دی‌اکسید تیتانیوم بر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین در مامیران کبیر. ینتیک نوین، ۱۳ (۴): ۵۱۳-۵۲۳.

Bahmanzadegan, A., Sefidkon, F. and Sonboli, A. 2009. Determination of Hyoscyamine and Scopolamine in four *Hyoscyamus* species from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8 (1): 65-70.

Banerjee, S., Singh, S. and Rahman, L.U. 2012. Biotransformation studies using hairy root cultures – a review. Biotechnology Advances, 30: 461-468.

Doshi, R., Braida, W., Christodoulatos, C., Wazne, M. and G, O'connor. 2008. Nano aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plant and soil communities. Environmental Research, 106: 296-303.

Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports, 5:239-242.

Monica, R.C. and Cremonini, R. 2009. Nanoparticels and higher plants. Jornal of Caryologia, 62 (2): 161-165.

Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R. and Abdollahi Mandoulakani , B. 2019. *Dracocephalum kotschyi* hairy roots elicited by SiO_2 nanoparticles**.** Industrial Crops and Products, 133: 435-446.

IrHC2019

Effects of silicon dioxide nanoparticles (SiO_2 nanoparticles) on hyoscyamine and scopolamine production in transgenic *Hyoscyamus pusillus* L. hairy roots

Ahad Hedayati[1], Bahman Hosseini[1,*], Ramin Maleki[2], Javier Palazon[3]
[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Academic Center for Education, Culture and Research, Urmia Branch, Urmia University, Iran
[3] Department of Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain
[*]*Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract

Hyoscyamus genus Plants produces some important compounds such as hyoscyamine and scopolamine as secondary metabolites, which exhibits a wide range of pharmacological and toxic activity. *H. pusillus* is a medicinal plant known as main source of tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine. Hairy root cultures and elicitation are proposed to enhance important metabolites production. Nanoparticles are a new group of elicitors that are used as stimulants for the production of secondary metabolites. In the present study, the effects of different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 mg L^{-1}) of silicon dioxide nanoparticles (SiO_2 NPs) at different exposure times (24 and 48 h) on growth and hyoscyamine and scopolamine production in hairy root cultures of *H. pusillus* were analyzed. The results showed that the highest hairy root fresh weight (10.48 g) obtained in the medium supplemented with 25 mg L^{-1} SiO_2 NPs at 48 hours of exposure time and the lowest fresh weight (7.73 g) were found in the control samples. The highest hyoscyamine (7.43 µg g^{-1} FW) and scopolamine (15.56 µg g^{-1} FW) production (about tow and threefold increase over none-elicited hairy roots respectively) were achieved with 100 and 25 mg L^{-1} SiO_2 NPs at 48 h of exposure time, respectively. We suggest that SiO_2 NPs could be an effective elicitor in hairy root cultures in order to increase tropane alkaloid production.

***Keywords*:** *Agrobacterium rhizogenes*, Elicitor, Tropane alkaloid, Fresh weight

IrHC2019