بررسی تأثیر عصاره مخمر بر میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین گیاه دارویی بذرالبنج کوتاه

کمال خضری[۱]، بهمن حسینی*[۲]، عباس حسنی[۳]، احد هدایتی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی گرایش گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۳] استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۴] دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

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

چکیده

آلکالوئیدهای گیاهی یکی از بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه دارویی و صنعتی هستند. آسکوپولامین و هیوسیامین از تروپان آلکالوئیدهای متداول گیاه بذرالبنج کوتاه (*Hyoscyamus pusillus*) با کاربردهای وسیع در صنعت داروسازی هستند. القای مسیرهای بیوسنتزی فیتوشیمیایی توسط محرک‌های مختلف از راهکارهای مهم جهت افزایش تولید و انباشت ترکیبات با ارزش دارویی می‌باشد. در این تحقیق، اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در دو مدت زمان تیمار (۴۸ و ۷۲ ساعت) بر میزان رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن تر (۷/۸۱ گرم) و خشک (۰/۵ گرم) ریشه‌های موئین به ترتیب در محیط کشت‌های حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر عصار مخمر و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت و صفر میلی‌گرم بر لیتر (شاهد) بدست آمد. کمترین میزان وزن تر (۵/۲۲ گرم) و خشک (۰/۳۲ گرم) نیز در محیط کشت‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصار مخمر و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بدست آمد. در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی به روش frap، بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (۰/۵۹ mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) در محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصار مخمر و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت و کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (mmol Fe^{+2} ۰/۰۳g^{-1} FW) در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصار مخمر و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت مشاهده شد.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، تروپان آلکالوئیدها، فعالیت آنتی اکسیدانی، وزن‌تر، وزن خشک

مقدمه:

استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به‌طورکلی فرآورده‌های طبیعی، به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهم‌ترین علت آن اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی بوده (Rota *et al.*, 2004). امروزه از گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع عمده برای تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود، بطوریکه برداشت بی‌رویه آن‌ها از رویشگاه‌های طبیعی جهت استحصال این ترکیبات دارویی سبب شده برخی از این گیاهان در معرض انقراض قرار (امید بیگی، ۱۳۸۲). با توجه به اهمیت و نیاز به افزایش تولید متابولیت های ثانویه به دلایل کاربردهای دارویی و غذایی، به نظر می‌رسد که روش‌های زیست فن‌آوری در کنار روش‌های کلاسیک که در بسیاری از موارد جوابگوی نیازهای مصرف نیستند، می‌تواند در به ثمر رسیدن این اهداف مفید باشند

(Verpoorte *et al.*, 2002). جنس *Hyoscyamus* متعلق به تیره Solanaceae می‌باشد که ۹ گونه آن منحصراً در ایران و ۱۸ گونه در ایران و کشورهای اطراف پراکنده هستند (امید بیگی، ۱۳۸۲). بذرالبنج یا بنگ‌دانه کوتاه (*Hyoscyamus pusillus* L.)، گیاهی یک‌ساله و خاص تپه‌های شنی، مزارع و مناطق بایر است که گیاهی روزبلند با عدد

IrHC2019

کروموزومی ۲n =۶۸ می‌باشد (خاتم‌ساز، ۱۳۷۷). آلکالوئیدهای تروپانی (Tropane alkaloids) از قبیل آسکوپولامین[1]، هیوسیامین[2] و آتروپین[3]، معروف‌ترین آلکالوئیدهایی هستند که از گونه‌های مختلف تیره سولاناسه استخراج می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌کولینرژیک و ضد اسپاسم می‌باشند و بر سیستم عصبی پاراسمپاتیک اثر می‌گذارند

(Palazon *et al*., 2008). میزان تأثیر آسکوپولامین، هیوسیامین و آتروپین روی سیستم عصبی متفاوت است و به همین دلیل در حال حاضر تقاضای تجاری، برای آسکوپولامین نسبت به هیوسیامین و آتروپین ۱۰ برابر بیشتر است (Hashimoto and Yamada, 1986). ریشه موئین نوعی بیماری گیاهی است که توسط باکتری گرم منفی خاکزی به نام آگروباکتریوم رایزوژنز[4] ایجاد می‌شود. این باکتری با انتقال ژن‌های مولد اکسین به سلول‌های گیاهی باعث افزایش تولید اکسین در سلول‌های تراریخت شده و بنابراین ایجاد ریشه‌های موئین را در گیاه القاء می‌کند. بزرگ‌ترین مزیت ریشه‌های موئین، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با گیاهان مادری است (Hu and Du, 2006). راهبردهای متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌ها درکشت ریشه‌های موئین اتخاذشده است. این موارد شامل استفاده از عوامل محرک متفاوت از جمله ترکیبات سیگنالی و تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشد (Chen and Feng, 2000). عصاره مخمر ترکیبی از آمینواسیدها، ویتامین‌ها و موادمعدنی مختلف می‌باشد و اثرات تحریک زایی آن ممکن است به دلیل محتوی کاتیون‌هایی مثل روی (Zn)، کلسیم (Ca) و کبالت (Co) در عصاره مخمر باشد (Suzuki *et al*., 1985). تا کنون مطالعات متعددی در مورد تاثیر عصاره مخمر بر میزان رشد و تغییرات بیوشیمیایی در گیاها انجام شده است. نتایج تحقیق Arastefar و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*) در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است. در ریشه‌های موئین القا شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*) آلکالوئیدهای تروپاتی بیشتری تولیدشده است (Bonhomme *et al*., 2000). ریشه‌های موئین تراریخت نسبت به گیاه کامل در درمنه (*Artemisia annua*) مقدار سزکوئی‌ترپن بیشتری را تولید کردند (Souret *et al*., 2003). هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به عنوان محرک زیستی بر میزان رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (FRAP) ریشه‌های موئین گیاه دارویی بذرالبنج مشبک می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

کشت بذر و تهیه ریزنمونه

در این تحقیق به‌منظور تهیه ریشه موئین، بذور گیاه بذرالبنج کوتاه جهت رفع رکود، ابتدا با استفاده از اسید جیبرلیک ۵۰۰ ppm در لیتر به مدت ۲۴ ساعت آغشته و سپس با اسید سولفوریک ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند و سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی شدند و در مرحله بعد با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ دصد فعال و همراه با چند قطره توین ۸۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در زیر هود ضدعفونی شده و پس از شستشو، در محیط کشت MS کشت شدند.

القاء ریشه‌های موئین

سویه A13 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* جهت القاء ریشه‌های موئین از بانک میکروبی موسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران-ایران تهیه گردید. تمامی 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

[1]- Scopolamine
[2]- Hyoscyamine
[3]- Atropine
[4]- *Agrobacterium rhizogenes*

IrHC2019

کشتی، ریزنمونه جهت حذف باکتری به محیط کشت MS حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل و تا زمان ظهور ریشه‌های موئین در اتاق رشد با دمای۲ ±۲۵ و در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

تأثیر محرک عصاره مخمر بر میزان رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین

ریشه‌های القاشده از ریزنمونه جدا و در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به مدت ۲۱ روز نگه‌داری شدند. سپس حدود ۲ گرم از ریشه‌های موئین انتخاب و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر MS مایع اضافه و در دور ۱۲۰ rpm، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شیکر انکوباتور نگه‌داری می‌شوند. در ادامه ریشه‌های موئین با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و مدت زمان تیمار مختلف (۴۸ و ۷۲ ساعت) تیمار و جهت اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP برداشت شدند.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با ۳ تکرار انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این آزمایش در نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسات میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج و بحث

۱۴ 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، پر رشد ترین لاین انتخاب و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر محرک عصاره مخمر بر رشد ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره مخمر بر میزان رشد ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل سطوح مختلف غلظت عصاره مخمر و مدت زمان تیمار در سطح احتمال ۱ درصد، تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه داشت. همچنین اثر متقابل سطوح مختلف غلظت عصاره مخمر و مدت زمان تیمار در سطح احتمال ۵ درصد، تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه‌های موئین داشت.

شکل ۱: مراحل مختلف رشد ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه : الف) ظهور ریشه‌های موئین از برگ‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم، ب) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد و ج) تیمار ریشه‌های موئین با غلظت‌های مختلف محرک عصاره مخمر در محیط کشت مایع

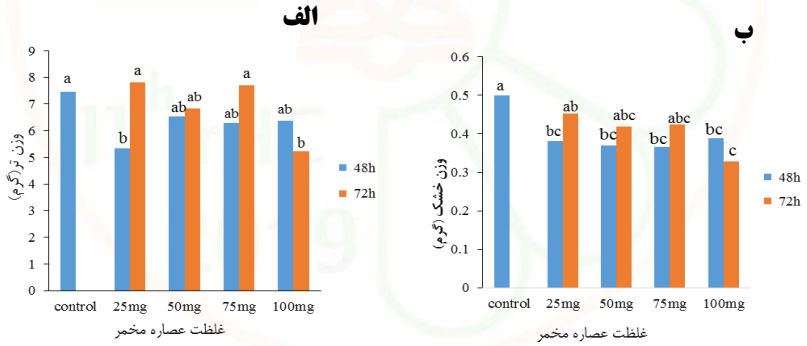
IrHC2019

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت‌زمان تیمار با عصاره مخمر بر رشد ریشه‌های موئین شابیزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن‌تر	وزن خشک
زمان تیمار (a)	۱	۲/۸۰*	۰/۰۴۴ns
غلظت محرک (b)	۴	۲/۲۰**	۰/۰۱۶**
اثر متقابل (a×b)	۴	۲/۹۲**	۰/۰۰۴*
اشتباه آزمایشی	۲۹	۳۱/۸۰	۰/۱۲
ضریب تغییرات (درصد) (CV%)		۹/۶۹	۹/۴۷

ns, **,* به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد،تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت منجر به کاهش معنی‌دار وزن‌تر ریشه‌های موئین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. به‌طوری که کمترین میزان وزن‌تر (۵/۲۲ گرم) در تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بود، همچنین بیشترین میزان وزن‌تر (۷/۸۱ گرم) در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و مدت‌زمان ۷۲ ساعت بود. بیشترین میزان وزن خشک (۰/۵۰ گرم) در تیمار شاهد و کمترین میزان وزن خشک (۰/۳۲ گرم) در تیمار ۷۲ ساعت و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (نمودار ۱-الف و ب). رشد سلول گیاهی و تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های کشت شده وابسته به غلظت و تعامل مواد غذایی موجود در محیط کشت می‌باشد. اجزاء محیط کشت، گاهی اوقات می‌تواند نرخ رشد ریشه‌های موئین و عملکرد متابولیت های تجمع یافته را تغییر دهد.



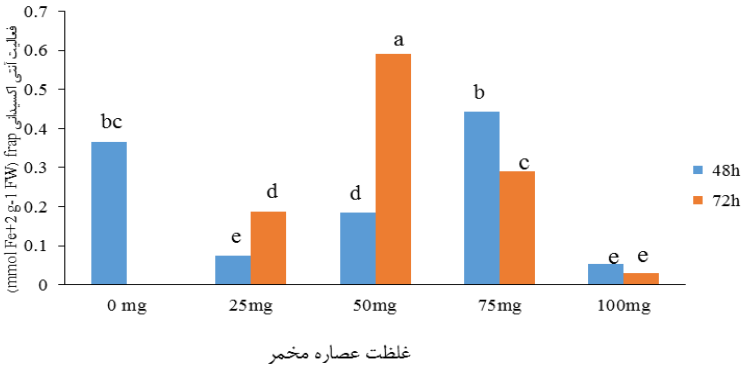
نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و مدت زمان تیمار بر میزان وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه

تأثیر محرک عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین

در تحقیق حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله روش frap مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین میزان (0/59 mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) فعالیت انتی اکسیدانی در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر و در مدت زمان ۷۲ ساعت بدست آمد و همچنین کمترین میزان (۰/۰۳ mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) فعالیت انتی اکسیدانی نیز در تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر و مدت زمان ۷۲ ساعت بدست آمد (نمودار ۲). در روش frap فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق پتانسل کاهش اکسیداسیون مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این روش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با Ferric Tri-Pyridyl-Triazine Complex (Fe (III)-TPTZ) واکنش می‌دهند و موجب ایجاد رنگ آبی

IrHC2019

می‌شوند. تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در محتوای فنول و فلاونوئید کل می‌باشد (Singh *et al.*, 2007).



نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و مدت زمان تیمار بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (FRAP) ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه

منابع

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۲. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی، ۴۳۸ صفحه.

خاتم‌ساز، م. ۱۳۷۷. فلور ایران، شماره ۲۴، تیره سیب‌زمینی. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ۱۱۲ صفحه.

Arastefar, A., Riahi-Madvar, A., Tohid Far, M. and Yousefi, K. 2013. Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in *Glycine max* seedlings. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(3): 1-18.

Bonhomme, V., Laurain-Matter, D., Lacoux, J., Fliniaux, M.A. and Jacquin-Dubreuil, A. 2000. Tropan alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and Ag*robacterium tumefaciens* containing *rol*A, B, C genes only. Journal of Biotechnology, 81: 151-158.

Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A., Feio, S., Tomi, F., Casanova, J. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Clinopodium ascendens (Jordan) Sampaio from Madeira. Flavor and Fragrance Journal, 22:139– 144.

Chen, H. and Feng, C. 2000. Induction of phytoalexin formation in crown gall and hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* by methyl viologen. Biotechnology Letters, 22: 715-720.

Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1986. Hyoscyamine 6-β hydroxylase, a 2-Oxoglutarate dependent dioxygenase in alkaloid producing root cultures. Journal of Plant Physiology, 81: 619-625.

Hu, Z.B. and Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology, 48: 121-127.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37: 91-102.

Rosić, N., Momcilovic, I., Kovacevic, N. and Grubisic, D. 2006. Genetic transformation of *Rhamnus fallax* and hairy roots as a source of anthraquinones. Biologia Plantarum, 50 (4): 514-518.

Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J. and Herrera, A. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. Journal of food protection, 67: 1252–1256.

Singh, B. D., 2007. Plant tissue culture. Biotechnology fundamentals and application. New Dehli. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 14: 332-425.

Souret, F.F., Yoojeong, K., Barbara, E.W., Kristin, K.W. and Pamela, J.W. 2003. Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produce complex patterns of terpenoid gene expression. Biotechnology and Bioengineering, 83: 653-657.

Suzuki, T., Mori, H., Yamame, T. and Shimuzu, S. 1985. Automatic supplementation of minerals in fed batch culture to high cell mass concentration. Biotechnology and Bioengineering, 27: 192-201.

IrHC2019

Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1: 13-25.

Effect of Yeast Extract on Growth and Antioxidant Activity of *Hyoscyamus pusillus* L. Hairy Roots

Kamal Khezri[1], Bahman Hosseini[1*], Abbas Hassani, Ahad Hedayati[1]
[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[*]*Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract

Plant alkaloids, are one of the largest groups of pharmaceuticals and industrial secondary metabolites. Scopolamine and Hyoscyamine are most common tropane alkaloids in *Hyoscyamus pusillus* L. with great application in pharmaceutical industry. Phytochemical biosynthetic pathways induction via various elicitors is an effective strategy for increasing the production and accumulation of valuable substances. In this research, the influence of various yeast extract concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 mg/l) at two exposure time (48 and72 h) on growth rate and antioxidant activity of *H. pusillus* L. hairy roots were investigated. The results show that the highest hairy root fresh and dry weight (7.81 and 0.50 g, respectively) were found in the medium supplemented with 25 mg L^{-1} at 72 hours of exposure time and 0 mg L^{-1} (respectively) yeast extract and the lowest fresh and dry weight (5.22 and 0.32 g, respectively) were found in the medium supplemented with 100 mg L^{-1} at 72 hours of exposure time. In the case of antioxidant activity, the highest (0/59 mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) frap value was observed in the medium supplemented with 50 mg L^{-1} at 72 hours of exposure time and lowest (0/03 mmol Fe^{+2} g^{-1} FW) frap value was observed in the medium supplemented with 100 mg L^{-1} at 72 hours of exposure time.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Antioxidant activity, Dry weight, Fresh weight, Tropan alkaloid

IrHC2019