اثر نیتریک اکسید بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

مدینه خضرلو*[۱]، بهمن حسینی[۲]، جعفر امیری[۳]، سیدهادی مدنی[۴]

[۱*] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

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

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

[۴] دانشجوی دکترای گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*نویسنده مسئول: m.khezerluo70@gmail.com

چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) گیاهی علفی، دوساله و متعلق به تیره‌ی Solanaceae می باشد. به لحاظ تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین که ترکیبات مورد علاقه‌ی صنعتی و دارویی هستند، به‌طور گسترده‌ای در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دست‌ورزی محیط کشت ریشه‌های موئین با استفاده از محرک‌ها، از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. در پژوهش حاضر، به‌منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی، کشت‌های ریشه موئین مشتق شده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی تراریخت شده با سویه‌ی *Agrobacterium rhizogenes* A7، توسط محرک غیرزیستی تحریک گردید. تأثیر غلظت‌های مختلف نیتریک اکسید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار)، در زمان‌های مختلف تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه ANOVA، به ترتیب بیشترین میزان هیوسیامین و آسکوپولامین (حدود ۱/۲ و ۱/۵ برابر بیشتر از شاهد)، در اثر تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیتریک اکسید به مدت ۴۸ و ۲۴ ساعت مشاهده گردید. با توجه به این نتایج، بیوتکنولوژی گیاهی می‌تواند به‌عنوان راهکار مؤثر جهت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله آلکالوئیدهای تروپانی مورد استفاده قرار گیرد.

***کلمات کلیدی:* آلکالوئیدهای تروپانی، بذرالبنج مشبک، تهییج، ریشه موئین، نیتریک اکسید**

مقدمه

بذرالبنج مشبک گیاهی است از راسته‌ی سولانال‌ها (Solanales)، تیره‌ی سیب‌زمینی (Solanaceae)، جنس هیوسیاموس (*Hyoscyamus*) و گونه‌ی رتیکولاتوس (*reticulatus*).

سدیم نیتروپروساید یک ترکیب رها کننده نیتریک اکسید (NO) است که در حالت محلول به‌شدت به نور، حساس بوده و تجزیه آن توسط اکسیژن و دمای زیاد تسریع می‌شود (Wieczorek *et al*., 2006). نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد گازی شکل با نیمه‌عمر نسبتاً طولانی (در مقایسه با دیگر رادیکال‌های آزاد) می‌باشد که نیمه‌عمر آن در سیستم‌های بیولوژیکی ۵-۳ ثانیه است. اعتقاد بر این است که احتمالاً برجسته‌ترین نقش نیتریک اکسید، پیام‌رسانی و تنظیم پاسخ‌های دفاعی در مقابل تنش‌هاست. بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی برای حفاظت گیاهان در مقابل حمله حشرات، گیاهخواران، پاتوژن‌ها و یا بقا تحت تنش‌های غیر زیستی گزارش شده است. ازاین‌رو، القا تولید نیتریک اکسید توسط محرک‌ها در ارتباط با تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان با خواص دارویی ذکر شده است (Xu, 2007). هدف از تحقیق حاضر، مطالعه اثر نیتریک اکسید بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه ریشه موئین گیاه بذرالبنج ابتدا با استفاده از تیمار جیبرلیک اسید به مدت ۲۴ ساعت و اسید سولفوریک ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه اقدام به رفع رکود بذور نموده و بذرها پس از ضدعفونی سطحی با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد و چند قطره توین ۸۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، به محیط کشت MS منتقل می‌شوند. پس از گذشت ۲ هفته از کشت (۱۰ روز پس از جوانه‌زنی) ریزنمونه‌های کوتیلدونی تهیه و با سویه مناسب A7، *Agrobacterium rhizogenes* تلقیح می‌گردد. ریشه‌های القا شده از ریزنمونه جدا و در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به مدت ۲۱ روز نگه‌داری می‌گردد. پس‌ازآن حدود ۱ گرم از ریشه‌های موئین انتخاب و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر MS مایع اضافه و سپس در شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگه‌داری می‌شوند. در ادامه تیمارهای مختلف نیتریک اکسید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) و در زمان‌های مختلف (۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار) اعمال و نمونه‌ها برداشت می‌گردد. پس از پایان اعمال تیمار، آلکالوئیدهای تروپانی به روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) استخراج گردید و میزان تولید آن با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مشخص گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SAS آنالیز و توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه‌ی میانگین گردید.

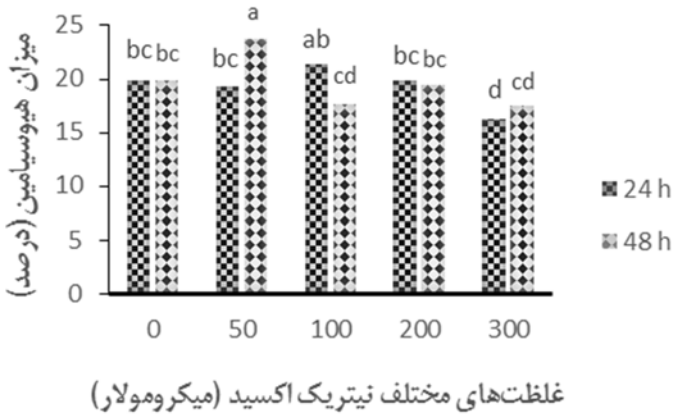
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر ساده غلظت و اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک نیتریک اکسید، در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین نشان داد. همچنین، اثر ساده‌ی زمان نیز در سطح احتمال ۵ درصد بر تولید آلکالوئید تروپانی آسکوپولامین معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها تشان داد حداکثر میزان هیوسیامین (۲۳/۶۶ درصد) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۵۰ میکرومولار نیتریک اکسید در زمان ۴۸ ساعت به‌دست آمد که نسبت به ریشه‌های موئین شاهد (۱۹/۷۵ درصد) حدود ۱/۲ برابر افزایش نشان داد. همچنین در رابطه با آلکالوئید تروپانی آسکوپولامین، بیشترین میزان آن (۲۳/۵۶ درصد) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیتریک اکسید به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد (۱/۵ برابر بیشتر از شاهد).

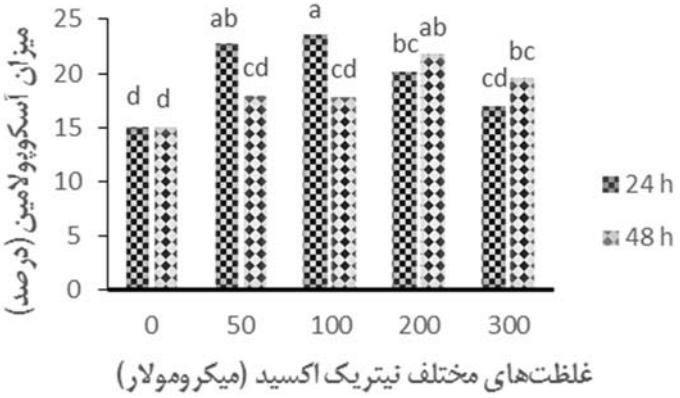
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نیتریک اکسید بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	
		میزان هیوسیامین (درصد)	میزان آسکوپولامین (درصد)
غلظت محرک (a)	۴	۱۶/۶۶**	۳۶/۵۱**
زمان تیمار (b)	۱	۰/۷۱ ns	۱۲/۱۷*
اثر متقابل (a×b)	۴	۱۲/۸۳**	۲۲/۰۳**
اشتباه آزمایشی	۲۰	۰/۴۰	۱/۸۶
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۲۸	۷/۱۴

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



نمودار ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با نیتریک اکسید بر میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد.



نمودار ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با نیتریک اکسید بر میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی آسکوپولامین. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد.

Durner و همکاران (۱۹۹۸) نشان داده‌اند که تیمار برگ‌های تنباکو با نیتریک اکسید باعث تحریک سنتز اسید سالسیلیک داخلی می‌شود که برای بیان ژن‌های تنظیم‌کنندگی آهن مورد نیاز هستند. از طرف دیگر، نیتریک اکسید برای انجام وظیفه به اسید سالسیلیک نیاز دارد که می‌تواند تأثیر نیتریک اکسید را واسطه‌گری یا تسهیل کند. ازاین‌رو می‌توان گفت که اسید سالسیلیک شرایط تنشی را در گیاه القا کرده و به‌عنوان پیام درونی در پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده عمل کرده و سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه شده و بخشی از راهکار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب می‌گردد (Samadi *et al.*, 2014).

در رابطه با آلکالوئید تروپانی آسکوپولامین نیز نتایج نشان داد که در مدت زمان ۲۴ ساعت، در غلظت‌های پایین میزان تولید آسکوپولامین بیشتر بوده و با افزایش غلظت کاهش یافته است. بسیاری از اعمال تأثیرگذار نیتریک اکسید مربوط به میل ترکیبی شدید آن به آهن، مانند اثر روی پروتئین‌های تنظیمی آهن (Wattsr *et al.*, 2003) می‌باشد.

از طرفی، کاربرد خارجی نیتریک اکسید در گیاهان و یا در کشت‌های سلولی منجر به جلوگیری از فعالیت برخی از آنزیم‌ها از جمله اکونیتاز می‌گردد (Del Rio *et al.*, 2004).

در واقع اکونیتاز آنزیم آهن سولفور است که تبدیل سیترات به ایزوسیترات (تنفس) را در گیاه تنباکو کاتالیز می‌کند (Navarre *et al.*, 2000) و ازاین‌رو مهار اکونیتاز سیتوسولی ممکن است عاملی برای تبدیل شدن به یک پروتئین تنظیم‌کننده‌ی آهن باشد که باعث افزایش Fe^{2+} درون‌سلولی می‌شود (Vanlerberghe and Mclntosh, 1996). بنابراین انتظار

می‌رود که تیمار ریشه‌های موئین با محرک نیتریک اکسید توانسته آهن (Fe^{2+}) مورد نیاز جهت انجام این واکنش آنزیمی را فراهم نماید و منجر به افزایش تولید آسکوپولامین در غلظت‌های پایین گردد. در گیاهان نیتریک اکسید وظایف بیولوژیکی پیچیده‌ای دارد که هم می‌تواند به‌عنوان محافظ سلولی عمل کند و هم سمیت سلولی ایجاد کند. وظایف دو گانه‌ی نیتریک اکسید به‌عنوان یک اکسید کننده قوی یا آنتی‌اکسیدان، به غلظت و موقعیت نیتریک اکسید در سلول‌ها وابسته است (Schmidt and Walter, 1994).

منابع

Bao, X., Lu, C. and Frangos, J.A. (1999). Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NFKB and egr-1. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 19: 996-1003.

Del Rio, L.A., Corpas, F.J. and Barroso, J.B. 2004. Nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry, 65: 783-792.

Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 10328-10333.

Hashimoto, T. and Yamad, Y. 1986. Hyoscyamine 6β- hydroxylase, a 2-oxoglutarate- dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root culture, Journal of Plant Physiology, 81 (2): 619-625.

Hashimoto, T. and Yamad, Y. 1987. Purification and characterization of hyoscyamine 6β- hydroxylase from root culture of *Hyoscyamus niger* L. European Journal of Biochemistry, 194: 277-285.

Navarre, D.A., Wendehenne, D., Durner, J., Noad, R. and Klessig, D.F. 2000. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. Plant Physiology, 122 (2): 573-582.

Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. 2014. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus*) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Journal of Plant Products Research, 21 (4): 135-148.

Schmidt, H.W. and Walter, U. 1994. NO at work. Cell, 78: 919-925.

Vanleberghe, G.C. and Mclntosh, L. 1996. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. Plant Physiol, 111: 589-595.

Wattsr, R.N., Ponka, P. and Richardson, D.R. 2003. Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. Biochemical Journal, 369 (3): 429-440.

Wieczorek, J.F., Milczarek, G., Arasimovicz, M. and Ciszewski, A. 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants. Planta, 224: 1363-1372.

Xu, M.J. 2007. Nitric oxide: a potential key point of the signaling network leading to plant secondary metabolite biosynthesis. Progress in Natural Science, 17: 1397-1404.

Kamad, 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.

The Effect of Nitric Oxide on the Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of *Hyoscyamus reticulates* L.

Madineh khezerluo[1], Bahman Hosseini[2], Jaafar Amiri[3], Seyed Hadi Madani[4]

1. M.Sc. student of Horticulture Medicinal plants, Department of science horticulture, Urmia University, Urmia
2. Associate professor of horticulture science, Urmia University, Urmia
3. Assistance professor of horticulture science, Urmia University, Urmia
4. PhD student of Horticulture Medicinal plants, Department of science horticulture, Urmia University

Corresponding Author: m.khezerluo70@gmail.com

Abstract

***Hyoscyamus reticulatus* L. is an herbaceous, biennial, belonging to Solanaceae family. Due to production of tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine, that interested compounds in pharmaceutical and industrial, they are widely used in medicine. Hairy roots media manipulation using elicitors by activating defense mechanisms is one of the main strategies to induce secondary metabolism and increased production of valuable metabolites. In the present study, in order to increase production of tropane alkaloids, cotyledon-derived hairy root cultures transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A7, elicited by abiotic elicitor. Effects of different concentrations of nitric oxide (0, 50, 100. 200 and 300 µM) at different exposure times (24 and 48 h) were investigated. According to the ANOVA results, the highest hyoscyamine and scopolamine production (about 1.2-fold and 1.5-fold increase over the control) was observed in 50 and 100 µM nitric oxide at 48 and 24 hours of exposure time, respectively. According to these results, plant biotechnology can be used as effective strategies for the production of plant secondary metabolites such as tropane alkaloids.**

***Keywords*: Elicitation, Hairy root, *Hyoscyamus reticulatus* L., Nitric oxide, Tropane alkaloids.**