بررسی تاثیر الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات بر بیان ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز II در گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*)

میترا پارسا (۱)، قاسمعلی گروسی (۲) و رحیم حداد (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، ۲- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

چکیده

گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) گیاه دارویی مهمی است که به واسطه تاثیر بر روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک در درمان تشنج، سیاه سرفه، سل، برونشیت مزمن مورد استفاده قرار می گیرد. هیوسیامین و هیوسین به عنوان دو آلکالوئید اصلی تروپان در گیاهان خانواده سیب زمینی *(Solanaceae)* محسوب می شوند. این آلکالوئیدها می توانند تحت تیمار الیسیتورهای شیمیایی از جمله متیل جاسمونات و جاسمونات، افزایش یابند. در این تحقیق، تاثیر تیمار الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات و تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید (IBA)، در میزان بیان ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز II که در حالت رقابتی با آنزیم اصلی مسیر سنتز هیوسین (تروپینون ردوکتازI) می باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که میزان بیان ژن تروپینون ردوکتازII در حضور الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات به نحو قابل انتظار کاهش می یابد.

مقدمه

الیسیتورها مواد شیمیایی و یا فاکتورهای زیستی از منابع مختلف هستند که می توانند موجب تغییرات فیزیولوژیکی موجودات زنده شوند(۷). متیل جاسمونات و جاسمونات به عنوان مولکول های انتقال سیگنالی هستند که دارای اثرات چندجانبه ای بر روی رشد، نمو و پاسخ به استرس ها دارند(۶). این الیسیتورها می توانند بر روی تولید متابولیت های ثانویه از جمله تروپان آلکالوئیدها تاثیر گذارند. با توجه به اینکه این آلکالوئیدها اساسا در ریشه های گیاه سنتزمی شوند، بنابراین کشت ریشه ها، می تواند آلکالوئیدهای بیشتری را حتی نسبت به بخش هوایی گیاهان والد تولید کنند(۴). در مسیر متابولیکی آلکالوئیدهای تروپان دو آنزیم وجود دارد که با هم در رقابت هستند. آنزیم تروپینون ردوکتاز II که در تولید آلکالوئیدهای غیر تروپانی نقش دارد و آنزیم تروپینون ردوکتاز I که عکس آن عمل می نماید؛ بطوریکه، آنزیم TR-I پیش ماده تروپینون را در مسیر منتهی به سنتز ماده تروپانی هیوسیامین سوق می دهد و آنزیم TR-II آن را به یک ترکیب غیر تروپانی تبدیل می نماید(۵). بنابراین یکی از راههای افزایش تولید هیوسیامین می تواند ممانعت از فعالیت آنزیم تروپینون ردوکتاز(TR-II) باشد. بنابراین اثر الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات می تواند در افزایش میزان تروپان آلکالوئیدها نقش بسزایی داشته باشد.

در این پژوهش، اثر الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات بر روی بیان ژن عامل تروپینون ردوکتاز II گیاه بنگدانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه بنگدانه *(Hyoscyamus niger)* از سازمان تحقیقات جنگل ها و مراتع تهیه و جهت تسریع در جوانه زنی با اسید جیبرلیک ۲۰۰ ppm به مدت ۲۴ ساعت تیمار وپس از ضدعفونی بر روی محیط کشت جامد B5 فاقد هورمون به مدت

۴ روز کشت شدند. ریشه چه بدست آمده از دانه رست ها جدا و در محیط کشت مایع B5 حاوی ۳٪ (w/v) ساکاروز و به ترتیب در تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید با غلظت ۱ میکرومولار و دو الیسیتور متیل جاسمونات و جاسمونات با غلظت ۱ میکرومولار، در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر با ۱۰۰rpm و به مدت ۹۶ ساعت کشت شدند. ریشه ها پس از گذشت ۹۶ ساعت از محیط کشت خارج و در نیتروژن مایع منجمد شدند. جهت استخراج RNA از روش لیتیوم کلراید استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز حاوی فرم آلدئید و اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز II، از آغازگر عمومی الیگوdt استفاده شد. از محصول بدست آمده پس از بررسی کیفیت توسط الکتروفورز روی ژل آگارز، جهت واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. جهت واکنش زنجیره ای پلی مراز از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱/۷۵ میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰میلی مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر اختصاصی رفت (۲۰ pmol)، ۱ میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت (۲۰ pmol)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز در حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتری طبق این شرایط صورت گرفت: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: (دمای واسرشتگی(Denaturation) ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه ، دمای اتصال (Annealing) ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ، دمای طویل شدن (Extenasion) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت۱ دقیقه) و یک مرحله دمای طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت۱۰ دقیقه. درستی بیان ژن تروپینون ردوکتاز II توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٫۲٪ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که کیفیت RNA استخراجی به روش لیتیوم کلراید بدون تیمار با الیسیتورها قابل اعتماد بوده و وضوح و کیفیت باندهای ریبوزومی با نتایج ابراهیم زاده و همکاران(سال ۲۰۰۳) مشابه است (۲). RNA استخراج شده نشان داد که کمیت آن در تیمار با الیسیتورهای جاسمونات و متیل جاسمونات نسبت به تیمار هورمونی IBA پایین و میزان بیان ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز II نیز در نتیجه تیمار الیسیتورهای فوق نیز کاهش می یابد. نتایج حاصل با یافته های Kang و همکاران (سال ۲۰۰۳) وهمچنین Biondi و همکاران (سال ۱۹۹۹)مشابهت دارد (۱و۳). اندازه قطعه تکثیر شده و مورد انتظار در واکنش PCR، (۷۸۳ bp) با اندازه و توالی ژن ثبت شده در بانک اطلاعاتی مطابقت داشت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر حسن مداح عارفی (سازمان جنگلها و مراتع استان تهران) جهت اهدای بذور گیاه بنگدانه و همچنین سرکار خانم مهندس قنادنیا و جناب آقای مهندس سلیمانی (کارشناسان محترم آزمایشگاه های کشت بافت و بیولوژی مولکولی) جهت همکاری در انجام آزمایش ها ، تشکر و قدردانی می نماید.

منابع

1- Biondi S, Fornale S, Oksman-Caldentey K.M, Eeva M, Agostani S and Bagni N. (2000). "Jasmonates induce over-accumulation of methyleputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. Root cultures". *Plant Cell Report*. 19: 691-697.

2- Ebrahimzadeh H., Teimoori A and Lohrasbi T. (2003). "Hyoscyamin 6-β-hydroxylase gene isolation from *in vitro* cultured roots of *Hyoscyamus niger* L. and *Hyoscyamus tenuicaulis schonbeck-Temesy*". *Daru*. 11(1): 34-37.

3- Kang S.M, Hung H-Y, Kang Y-M, Yun D-J, Bahk J-D, Yang J-K and Choi M-S. (2004). " Effect of methyle jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora". Plant Science.* 166: 745-751.
4- Klan Z. (1991). " Influence of period of vegetative and development of plant on alkaloidal content *of Hyoscyamus niger*". *J. Amer. Pharm. Assoc.* 20: 1163-75.
5- Richter U, Rothe G, Anne-Kartin Fabian, Rahfeld B and DragerB. (2005). "Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures". *Experimental Botany*. 56 (412): 645-652.
6- Singh G, Gavrieli J, Oakey J. S and Curtis W.R. (1998). " Intraction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root culture". *Plant Cell Report*. 17: 391-395.
7- Vasconsuelo A and Boland R. (2007). "Molecoular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants". *Plant Science*. 72: 861-875.

Study of jasmonate and methyl jasmonate elicitors on tropinone reductase II gene expression in *Hyoscyamus niger*

[1]Parsa, mitra; [2]garoosi, ghasem ali and [2]haddad, rahim
1- M.Sc. student, International University of Imam Khomeini 2- Departemnt of biotechnology, , International University of Imam Khomeini

Abstract
Hyoscyamus niger is an important medicinal plant in which hyoscyne and hyoscyamine are Two important tropane alkaloids in *solanaceae* family which have been used for pertussis and bronchitis remedy because of their anti tensionpang decreacing effects,. These alkalioids impressed on parasampatic nervous system. Alkaloids RNA and concequentely related product contents could beenincreased with elicitor treatments such as jasmonate and methylejasmonate. In this research, elicitor treatments and also phytohormone treatment(IBA) have been studied on tropinone reductaseII gene expression content which its production is in competent with tropinone reductase I. Result were shown, tropinone reductaseII gene expression content decreased as expected, under treatment with jasmonate and methylejasmonate elicitors.