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

لیلا پناهنده (۱)، قاسمعلی گروسی(۲) 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)

ریشه های برخی از گونه های خانواده سولاناسه (Solanaceae) مانند گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) توانایی تولید آلکالوئیدهای تروپانی مانند هیوسیامین، اسکوپولامین و به مقدار کمتر آتروپین را دارند. این متابولیت ها منابع مهمی از نظر دارویی می باشند. ذخیره این قبیل از متابولیت ها اغلب در گیاهانی که در معرض استرس هایی از قبیل انواع الیسیتورها قرار گرفته باشند، اتفاق می افتد. به منظور بررسی تاثیر استرس ها در جهت افزایش تولید هیوسامین در محیط درون شیشه (in vitro)، میزان تاثیر دو هورمون جاسمونات و متیل جاسمونات به عنوان الیسیتورهای شیمیایی، در افزایش ژن کد کننده آنزیم تروپینون ردوکتاز I که در مسیر منتهی به سنتز اسکوپولامین، پیش ماده تروپینون را به هیوسامین تبدیل می کند، مورد بررسی قرار گرفت. درستی بیان این ژن با استفاده از واکنش های زنجیر ه ای پلی مراز (PCR) و افزایش بیان در نمونه های تیمار شده توسط الیسیتورها، با استفاده از استخراج RNA کل ریشه ها و ژل الکتروفورسیس مورد تایید قرار گرفت.

مقدمه

آلکالوئید های گیاهی به عنوان نمونه ای از متابولیت های ثانویه، گروه های بزرگی از تولیدات طبیعی را تشکیل می دهند، که ترکیبات فعال دارویی فراوانی را مهیا می سازند. یک گروه از این ترکیبات، آلکالوئید های تروپانی می باشند که در ریشه تعدادی از گونه های خانواده Solanaceae مانند گونه های *Atropa* و *Duboisia* و *Hyoscyamus* تولید می شوند. گیاه بنگدانه *Hyoscyamus niger* دارای ترکیبات متنوعی از آلکالوئید های تروپانی مانند هیوسامین، هیوسین یا اسکوپولامین و به مقدار کم آتروپین است. این آلکالوئید ها از نظر دارویی دارای اهمیت بوده و بر روی سیستم اعصاب سمپاتیک تاثیر گذارهستند (۵). تولید متابولیت های ثانویه گیاهی به مقدار زیاد توسط تکنیک های کشت سلول گیاهی با محدودیت های بیوتکنولوژی و بیولوژی زیادی مواجه است. یکی از مهمترین موانع، بازده پایین متابولیت های ثانویه گیاهی در کشت های سلول گیاهی می باشد. از آنجایی که ذخیره این قبیل از متابولیت ها اغلب در گیاهانی که در معرض استرس هایی از قبیل انواع الیسیتورها و مولکول های سیگنال قرار گرفته اند اتفاق می افتد. بنابراین بعضی از راهبرد ها بر پایه این اصل، برای بهبود بازده تولید متابولیت های ثانویه به روش کشت سلولی توسعه یافته است. در یک مفهوم کلی، الیسیتورها فاکتورهای زنده و غیر زنده ای هستند که در تحریک پاسخ های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و همچنین تولید فیتوآلکسین در گیاهان نقش دارند، تعداد زیادی از این قبیل تیمارها به طور موثر تولید سطح وسیعی از متابولیت های ثانویه گیاهی را هم در کشت درون شیشه (in vitro) و هم درون محیط زنده (in vivo) افزایش داده است (٤).

در این پژهش میزان تاثیر دو هورمون جاسمونات و متیل جاسمونات به عنوان الیسیتورهای شیمیایی، در افزایش ژن کد کننده آنزیم تروپینون ردوکتاز I مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی، کشت ریشه و اعمال تیمارها

بذرهای بنگدانه *H.niger* از سازمان جنگل ها و مراتع استان تهران تهیه شده و پس از تیمار جوانه زنی به مدت ٢٤ ساعت در محلول ppm ٢٠٠ جیبرلیک اسید، ضد عفونی و در محیط کشت جامد B5 فاقد هورمون، در تاریکی و دمای ٢٥ درجه سانتی گراد، کشت داده، بعد از گذشت ٤ روز ریشه چه های حاصل از دانه رست ها، جدا و در محیط کشت مایع B5 حاوی ایندول بوتریک اسید به مدت ١ ماه، روی شیکر با سرعت rpm ٧٠، در تاریکی و دمای ٢٥ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. ریشه های رشد یافته به محیط کشت مایع B5 حاوی تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید و ٢ تیمار جداگانه جاسمونات و متیل جاسمونات، هر کدام با غلظت ١ میکرومولار به مدت ٩٦ ساعت انتقال یافتند. به منظور استخراج RNA، ریشه ها در اندازه های ٢/٥ گرمی وزن شده و در نیتروژن مایع منجمد شدند.

استخراج RNA

جهت استخراج RNA از روش لیتیوم کلراید استفاده و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز حاوی فرم آلدئید مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز

برای سنتز cDNA ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز I، از آغازگر عمومی Oligo dt استفاده شد. محصول بدست آمده پس از بررسی کیفیت توسط الکتروفورز روی ژل آگارز، جهت واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بکار برده شد.

واکنش PCR با استفاده از PCR Master kit محصول شرکت سیناژن با کمی تغییرات و آغاز گرهای اختصاصی ژن TR-I در شرایط زیر انجام گرفت:

واسزشتگی اولیه ٣ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی گراد، ٣٥ چرخه شامل: (واسرشتگی (Denaturation) ٣٠ ثانیه ٩٤ درجه سانتی گراد، اتصال (Annealing) ١ دقیقه ٥٦ درجه سانتی گراد، امتداد (Extenasion) ١ دقیقه ٧٢ درجه سانتی گراد) و یک مرحله ١٠ دقیقه امتداد نهایی در ٧٢ درجه سانتی گراد برای تکمیل قطعه تکثیر شده در واکنش. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز برده شده و مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

استخراج RNA به روش لیتیوم کلراید از کیفیت قابل قبولی برخوردار و وضوح و کیفیت باندهای١٨ s و ٢٨ s ریبوزومی با کیفیت باندهای RNA در روش استخراج با گوانیدین ایزوتیوسیونات و شیب سزیم کلراید انجام شده توسط ابراهیم زاده و همکاران مشابه است (٢). نتایج بدست آمده از بررسی کمیت RNA استخراج شده، افزایش میزان بیان ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز I (TR-I)، به ترتیب در نمونه های تیمار شده توسط متیل جاسمونات، جاسمونات و ایندول بوتیریک اسید ومحصول واکنش زنجیره ای پلیمراز صحت بیان این ژن را نشان داده و اندازه قطعه تکثیر شده و مورد انتظار (bp ٧٨٣)، با اندازه ثبت شده در بانک اطلاعاتی (NCBI) مورد تایید گرفت.

مطالعات در این زمینه اندک بوده ولی بهر حال Kang و همکاران در سال ٢٠٠٣ اثر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید را بر روی تولید آلکالوئید های تروپان و بیان دو آنزیم PMT و H6H در کشت ریشه های گیاه Scopolia parviflora مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه دست یافتند که این تیمارها به طور مستقیم یا غیر مستقیم موجب افزایش بیان ژن این دو آنزیم و در نتیجه افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها می شوند (٣). Biondi و همکاران.در سال ١٩٩٩ نیز نشان دادند که با توجه به فعالیت بیشتر

آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز نسبت به آرژنین دکربوکسیلاز در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدهای گیاه Hyoscyamus muticus، تیمار متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت این دو آنزیم، به ترتیب تا دو و چهار برابر می شود در حالیکه جاسمونات با اثر افزایشی بر روی ترکیبات پوترسین و متیل پوترسین موجب افزایش تروپان آلکالوئیدها می **شود (۱)**.

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- **Zhao J, Davis L. C and Verpoorte R.** (2005). "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites". *Biotechnology Advances*. 23: 283-333
5- **Zhang L, Ding R and etal**. (2004). "Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures". *PNAS*. 101(17): 6786-6791.

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

[1]Panahandeh, Leila; [2]garousi, ghasem ali and [2]haddad, rahim

Abstract
Roots of some speices solanceae family such as *hyoscyamus niger* can produce tropane alkaloids for example hyosyamine, scoplamine and a littles atropine. These metabolites are unique source for pharmaceuticals. Accumulation of such metabolites often occure in plants subjected to streeses including various elicitors.
Intended to study of stresses effect to increasing hyoscyamin production in in vitro culture, two phytohormone, jasmonate and methyl josmonat effect as a chemical elicitors were studied for enhancing of tropinone reductas I expression which convert to hyoscyamine in scopolamine synthesis pathway.
Accurence of gene eapression demonstrated with PCR and expression increasing in elicitor treatmented samples with total RNA extraction and gel electrophoresis were confirmed.
Key word: *Hyoscyamus niger*, elicitor, jusmonate, methyl jusmonate, electrophoresis gel