تولید ریشه‌های مویین با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه دارویی تاتوره تماشایی (*Datura innoxia* L.) و بررسی اثر محرک‌های زیستی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر محتوای آتروپین و اسکوپولامین

سمیه قادرمزی[۱]، مسعود توحیدفر[۲]*، سیدمهدی میری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی و فناوری، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: کرج، گروه باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی
تلفن: ۲۹۹۰۳۲۴۴ (۰۲۱) ، نمابر: ۲۲۴۳۱۹۶۴ (۰۲۱)
پست الکترونیک: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۵/۱۷

چکیده

مقدمه: استفاده از ***Agrobacterium rhizogenes*** جهت ایجاد ریشه‌های مویین تراریخت، روش بسیار کارآمد برای افزایش متابولیت‌های ثانویه است.

هدف: هدف از این تحقیق کشت ریشه‌های مویین تراریخت به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه تاتوره تماشایی است.

روش بررسی: در این تحقیق تولید ریشه‌های مویین با تلقیح ریز نمونه‌های برگ و کوتیلدون حاصل از گیاهچه‌های ۲ ماهه، توسط سویه‌های A_4، A_7 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوژنز به دو روش درشت تزریقی و غوطه‌وری انجام شد و به منظور القای الیسیتور متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار و سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولار در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت داده شدند و محتوای آتروپین و اسکوپولامین ریشه‌های مویین تراریخت تحت غلظت‌های مذکور توسط **HPLC** بررسی شد.

نتایج: بیشترین و کمترین تولید ریشه مویین تراریخته به ترتیب مربوط به سویه A_4 و سویه ۱۵۸۳۴ بود. بهترین ریز نمونه جهت تولید ریشه‌های مویین با تلقیح برگ در سویه A_4 و کوتیلدون در سویه A_7 گزارش شد. روش درشت تزریقی با بیشترین تولید ریشه مویین تراریخته به عنوان برترین روش شناسایی شد. اثر محرک‌های سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی مولار سبب افزایش ۴/۳ برابری محتوای آتروپین در ریشه‌های مویین تراریخته نسبت به نمونه شاهد در غلظت مذکور شد. همچنین نتایج نشان داد، استفاده از متیل جاسمونات در غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ میکرومولار) باعث کاهش محتوای آتروپین و اسکوپولامین می‌شود.

نتیجه‌گیری: اگروباکتریوم به عنوان یک روش مناسب جهت تولید ریشه‌های مویین و الیسیتورهای هورمونی به عنوان تیمار مناسب برای افزایش آلکالوئیدهای مورد نظر می‌توانند ایفای نقش کنند.

گل‌واژگان: آتروپین، اسکوپولامین، الیسیتور، تاتوره تماشایی، ریشه‌های مویین

مقدمه

گیاه تاتوره تماشایی (*Datura innoxia* L.)، گیاهی است یکساله از خانواده سیب‌زمینی و متعلق به تیره خمیده رویان‌ها و طایفه Hyosyameae که بوسیله بذر تکثیر می‌یابند [۱]. این گیاه دارای گل‌های سفید رنگ و میوه آن غالباً کپسول و تخم‌مرغی شکل بوده و ارتفاع آن به ۲ متر هم می‌رسد. همچنین تاتوره یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی به شمار می‌رود که از برگ و دانه‌های آن برای ساخت مسکن‌ها در صنایع داروسازی استفاده می‌شود [۲]. این گیاه دارای اثرات ضد تشنج، رفع آسم و دردهای عصبی می‌باشد [۳]. هیوسیامین و اسکوپولامین، تروپان آلکالوئیدهای عمده در جنس تاتوره اند [۴] و آتروپین فرم راسمیک هیوسیامین است که حین فرآیند استخراج گیاه شکل می‌گیرند [۵]. این تروپان آلکالوئیدها توزیع مشابهی در اندام‌های مختلف گیاه ندارند به طوری که در ساقه‌ها اسکوپولامین و در ریشه‌ها بیشتر هیوسیامین وجود دارند. اسکوپولامین ارزشمندترین تروپان آلکالوئید است و با توجه به اینکه تقاضای جهانی آن حدود ده برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیزه آن (آتروپین) است، تلاش‌های زیادی جهت افزایش این آلکالوئیدها در کشت‌های in vitro صورت گرفته است [۸، ۷، ۶]. آتروپین نیز در ایست قلبی و قبل از بیهوشی جهت کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد کاربرد دارد [۹]. در حال حاضر یک سوم داروهای مورد استفاده بشر را داروهایی با منشاء گیاهی تشکیل می‌دهند و این میزان بی‌تردید رو به افزایش است. طبق آمار سازمان ملل متحد طی سال ۱۹۹۳ صادرات ایران در زمینهٔ گیاهان دارویی حدود ۲۰ میلیون دلار و در همان سال صادرات امارات متحده عربی بالغ بر ۳۲ میلیون دلار بوده است (www.irteb.com). بنابراین به دلیل عملکرد بد و ضعیف تجار ایرانی، ما سهم شایسته‌ای از این بازار را در اختیار نداریم. طبق آمار سازمان غذا و دارو تا پایان شهریور ماه سال ۱۳۹۳ واردات داروی آتروپین سولفات که جهت بیماری‌های چشمی تجویز می‌شود ۳۹۴ میلیون دلار بوده است که با تدبیر در حوزه تولید دارو و بهره‌مندی از تکنیک‌های کشت بافت بر روی گیاهان دارویی می‌توان گیاهانی با درصد ماده مؤثره بالا تولید و موجب افزایش ارزآوری مشتقات دارویی این گیاهان نمود. یکی از موانع اصلی در تولید تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین، فقدان اطلاعات کافی در مورد مسیرهای بیوسنتیک و مکانیسم‌های کنترل‌کننده تجمع آنها است. اگرچه پژوهش‌های بسیاری در رابطه با تولید تروپان آلکالوئیدها با استفاده از تکنیک‌های خاص تولید ریشه‌های مویین تراریخته مخصوصاً در گیاه تاتوره صورت پذیرفته و در برخی موارد نیز کمک برخی الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی موفقیت‌هایی نیز حاصل شده است، اما به طور کلی به دلیل جایگاه خاص و ویژه بعضی آنزیم‌های مسیر سنتز تروپان آلکالوئیدها، عمده تلاش‌ها سعی در کشف این مسیرها و توانایی بالاترین درصد این آلکالوئیدها می‌باشد. با توجه به اینکه تروپان آلکالوئیدها عمدتاً در ریشه سنتز و سپس به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند و سنتز بیشتر آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی این دسته از آلکالوئیدها در سلول‌های جوان ریشه رخ می‌دهد. امروزه تلاش برای تولید تروپان آلکالوئیدها مخصوصاً اسکوپولامین در سیستم‌های کشت ریشه‌های مویین متمرکز شده است [۱۱، ۱۰]. بنابراین با کشت ریشه مویین به صورت مصنوعی می‌توان به تولید انبوه و تجاری آنها پرداخت. گاهی نیز افزودن الیسیتورهایی نظیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به عنوان عامل تحریک‌کننده تولید متابولیت‌های ثانویه کمک شایانی به تولید آتروپین و اسکوپولامین می‌کند، زیرا الیسیتورها سبب تسریع تشکیل متابولیت‌های ثانویه و کاهش زمان فرآیند دستیابی به مقادیر بالای متابولیت‌ها می‌شوند [۱۲]. در پژوهش حاضر نیز هدف به گونه‌ای پایه ریزی شده است که با توجه به اهمیت عوامل ژنتیکی (نوع سویه باکتری، زمان حضور باکتری، روش‌های انتقال باکتری و ژنوتیپ گیاه) و محیطی متنوعی که بر میزان تولید ریشه‌های مویین، نحوه رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها تأثیرگذار است مورد بررسی قرار گرفته شوند، به طوری که بهینه‌سازی هریک از این عوامل در رشد ریشه‌های مویین ممکن است افزایش بازده تولید ترکیبات دارویی را از طریق کشت ریشه‌های مویین گیاه تاتوره تماشایی به دنبال داشته باشد. آنچه این تحقیق را متمایز از تحقیقات دیگر می‌نماید استفاده از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم بر

روی نمونه‌های مختلف با اعمال روش‌های مختلف تلقیح بر روی ژنوتیپ جدید (که تا بحال کار نشده) است. پس در نهایت نوع مناسبی از باکتری و روشی که بتواند مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها را در این ژنوتیپ تحت تأثیر قرار دهد، از اهداف اصلی این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

بذرهای گیاه تاتوره تماشایی با شماره ثبتی 1006952 p از بانک بذر مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. به منظور استریل نمودن بذرها به ترتیب، بذور در زیر آب جاری و توین ۲۰ به مدت ۳۰ دقیقه شسته شدند و ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. پس از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی شده و در نهایت با آب مقطر استریل ۳ مرتبه آبشویی شدند [۱۳]. به دلیل عدم جوانه‌زنی بذور، آزمایش‌هایی به منظور شکست خواب و تحریک جوانه‌زنی بذر تاتوره انجام گرفت. بدین‌منظور تیمارهای کشت جنین، خراش با سنباده، آب جوش و خراش ناحیه خروج جنین (قطع سر جنین) بر روی بذور تاتوره انجام شد. در تیمار کشت جنین ابتدا بذرها به مدت نیم ساعت در آب راکد خیسانده شدند و سپس با یک اسکالپل، به دقت پوسته آنها جدا شد. در تیمار خراش با سنباده تنها پوسته بذرها توسط سنباده کاملاً خراش داده شد اما در تیمار آب جوش بذور در مدت زمان‌های ۱،۲،۵،۱۰ دقیقه بر روی بخار آب قرار داده شدند. در تیمار خراش محل خروج جنین (قطع سر جنین)، پوسته اولیه بذر کاملاً حذف شد و قسمت خروج جنین با اسکالپل خراش داده شد. سپس با کمی فشار بذر بوسیله پنس استریل کمی جنین به سمت بیرون هدایت شد. به جز تیمار خراش پوسته بذر توسط سنباده که بعدا مراحل استریل آن انجام شد، سایر تیمارها در شرایط کاملاً استریل بر روی بذور انجام شدند. در ادامه برای رشد و جوانه-زنی، از محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (حاوی ۳ درصد ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH برابر ۵/۷) استفاده شد.

القای ریشه‌های مویین

به منظور القای ریشه مویین از نژادهای A_4، A_7 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوژنز که از بانک مولکولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شده بودند، استفاده شد. سویه‌های مذکور در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰-۲۰۰ دور در دقیقه کشت شدند. کشت‌هایی با ۱ - ۰/۵ OD_{600}= انتخاب و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شدند تا از این سوسپانسیون برای تلقیح ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون استفاده شود. برای تهیه ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل ۱ و ۲ ماهه و برای آلوده کردن ریزنمونه‌ها از دو روش درشت تزریقی توسط سوزن سرنگ و غوطه‌وری استفاده شد [۱۴].

در روش درشت تزریقی، از گیاهچه‌های ۱ و ۲ ماهه، قطعات ۱ سانتی‌متری برگ و کوتیلدون به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌های آلوده شده به اگروباکتریوم رایزوژنز، به محیط کشت MS منتقل و در دمای ۲ ± ۲۵ درجه نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. در روش غوطه‌وری نیز، همانند روش درشت تزریقی از قطعات ۱ سانتی‌متری برگ و کوتیلدون جهت تلقیح با سوسپانسیون باکتری استفاده شد. ریزنمونه‌ها به مدت ۳، ۱ و ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد MS با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چهل و هشت ساعت پس از تلقیح به منظور حذف کامل باکتری نمونه‌ها به محیط کشت MS جامد حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم تحت شرایط قبل انتقال یافتند. بعد از ظهور ریشه‌های مویین، هنگامی که اندازه آنها به ۲ سانتی‌متر رسید از محل رویش قطع و به محیط کشت مایع MS ۱/۲ فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد انتقال و در شیکر- انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۴۰ دور در دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. واکشت ریشه‌های مویین هر ۲ هفته یکبار صورت گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB [۱۵] انجام شد.

آنالیز مولکولی ریشه‌های مویین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

اثبات تراریخته بودن ریشه‌های مویین احتمالی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* بررسی شد (جدول شماره ۱). واکنش در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه) انجام شد. ریشه‌های مویین تراریخته‌ای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مثبت بودند، جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم (*vir D*) بررسی شدند (جدول شماره ۱). واکنش فوق در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۴۶/۴ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه) انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید بوسیله دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

بررسی میزان متابولیت‌های آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخته

آنالیز HPLC ریشه‌های مویین تراریخته

به منظور بررسی اثر محرک‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر روس محتوای آتروپین و اسکوپولامین آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی ریشه‌های شاهد (بدون تیمار) و مویین تراریخته انجام شد. کلون‌های تراریخته‌ای که رشد ظاهری بهتری داشتند، انتخاب و به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع MS ۱/۲ منتقل و برای ادامه رشد به شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه منتقل شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز از رشد ریشه‌های مویین تراریخته، محرک‌های سالیسیلیک اسید در ۴ غلظت (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) و متیل جاسمونات در سه غلظت (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به محیط‌های کشت اضافه شدند و نمونه کروماتوگرام HPLC نمونه‌های شاهد (بدون تیمار) و ریشه‌های مویین تراریخته ثبت شد. استخراج محتوای تروپان آلکالوئیدها با تلفیقی از روش‌های Kaufman *et al*., 1999; DeAlbuquerque *et al*., 1997 [۱۷، ۱۶] با کمی تغییر انجام شد. در ابتدا پودر ریشه‌ها در۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم، متانول و هیدورکسید آمونیوم ۲۸ درصد (۱۵:۱۵:۱) حل شد و پس از قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت، از کاغذ صافی عبور داده شد و ۲ مرتبه با ۱ سی‌سی کلروفرم شستشو یافت. پس از سانترفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و فیلتر کردن محلول رویی، مقادیر یکسانی از عصاره‌های به دست آمده به لوله‌های جدید منتقل شدند تا متانول آن تبخیر شود. عصاره باقی‌مانده در ۲-۱ میلی‌لیتر متانول حل و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد. فاز متحرک متانول: آب با نسبت (۳: ۷) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج ۲۸۳ نانومتر برای آنالیز نمونه‌های استاندارد و ریشه‌ها و آشکارساز فرابنفش – ۲۵۰۱– k Detector (Wellchrom UV استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد، غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول استاندارد هر یک از تروپان آلکالوئیدهای

جدول شماره ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR و دمای بهینه اتصال جهت تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین احتمالی

آغازگرها	توالی	طول قطعه تکثیری (bp)	دمای بهینه اتصال (°C)
rol B	Forward : GCTCTTGCAGTGCTAGATTT 5´ Reverse:GCTCTTGCAGTCCTAGATTT 5´	420	55
vir D	Forward:GAAGGTGCAAGCTACCTCTC 5´ Reverse: GAAGGTGCAAGCTACGGATC 5´	423	46/4

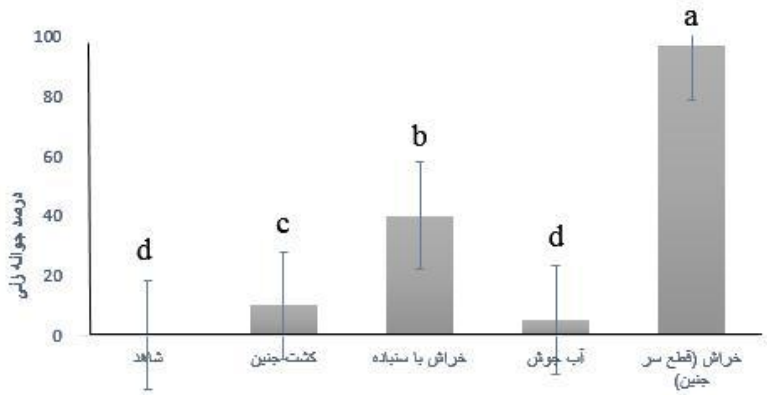
آتروپین و اسکوپولامین (Sigma, St. Louis, USA) در متانول تهیه شد و هریک در سه تکرار به دستگاه HPLC ستون 18C تزریق شد. از روی سطح زیر منحنی به دست آمده بر حسب غلظت، منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد آتروپین و اسکوپولامین به طور مجزا رسم شد.

نتایج

نتایج مربوط به تیمارهای شکست خواب بذر (کشت جنین، خراش با سنباده، آب جوش و خراش ناحیه خروج جنین (قطع سر جنین)) که بر روی بذور تاتوره اعمال شده بودند، نشان داد که تیمار خراش محل خروج جنین (قطع سر جنین)، بهترین تیمار برای شکست خواب بذور است (نمودار شماره ۱). در بذور شاهد جوانه‌زنی تقریباً ۳/۵ درصد بود در حالیکه در تیمار خراش محل خروج جنین (قطع سر جنین) این مقدار به ۱۰۰ درصد رسید. بنابراین این تیمار برای ادامه کار انتخاب شد.

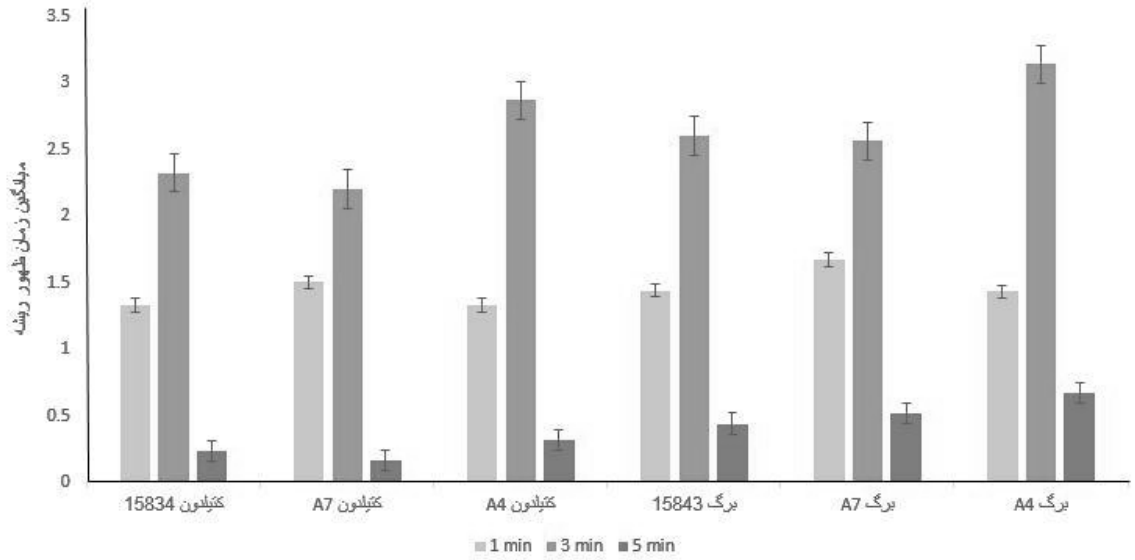
القای ریشه‌های مویین

نتایج مربوط به تولید ریشه‌های مویین نشان داد که تمام سویه‌های باکتری مورد استفاده در این تحقیق قادر به تولید ریشه مویین بودند، به طوریکه بیشترین درصد ظهور ریشه‌های مویین مربوط به سویه‌های A_4 (۸۹/۶۶ درصد)، A_7 (۷۵/۹۵ درصد) و کمترین آن مربوط به سویه ۱۵۸۳۴ (۲۰/۴۸ درصد) بود (نمودار شماره ۲). این نتایج حاکی از آن است که نوع سویه باکتری به طور معنی‌داری در میزان تولید ریشه‌های مویین تراریخته مؤثر است. از طرف دیگر نوع و سن ریزنمونه نیز در این مورد حائز اهمیت است به طوریکه ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون با سن تقریبی ۱ ماه نسبت به نمونه‌هایی که ۲ ماه سن داشتند عملکرد بالاتری از نظر تولید ریشه‌های مویین نشان دادند. همچنین بالاترین درصد ظهور ریشه‌های مویین به ترتیب به ریزنمونه برگ و کوتیلدون اختصاص داشت. دو روش تلقیح باکتری به کار رفته در این پژوهش نیز نشان داد روش درشت تزریقی (۵۴ درصد) نسبت به روش غوطه‌وری (۲۷/۳ درصد) بالاترین درصد تراریختگی را داشته است. در روش غوطه‌وری، طول زمان قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری تأثیر زیادی بر رشد ریشه‌ها داشت. به طوریکه هرچه زمان غوطه‌وری بیشتر بود، میزان رشد و تولید ریشه‌ها کندتر انجام می‌شود، به طوریکه گاهی اوقات با توقف رشد همراه بود. اولین علائم ظهور ریشه مویین در روش غوطه‌وری در بازه زمانی ۴۵ – ۵۰ روز به دست آمد. مدت زمان غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتری نیز از فاکتورهایی بود که در تولید ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی نقش داشت، به طوری که بهترین زمان در این نمونه‌ها ۲/۵–۳ دقیقه بود (نمودار شماره ۳). نتایج سرعت رشد ریشه‌های مویین در بازه زمانی ۲۵ روز نشان داد که ریشه‌های حاصل از ریزنمونه برگ با سویه A_4 بیشترین افزایش طول و سرعت رشد را دارا بودند



نمودار شماره ۱– مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر جوانه‌زنی بذور تاتوره تماشایی
اعداد متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

نمودار شماره ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر سویه‌های مختلف با ریزنمونه‌ها بر درصد تراریختگی ریشه‌های مویین احتمالی



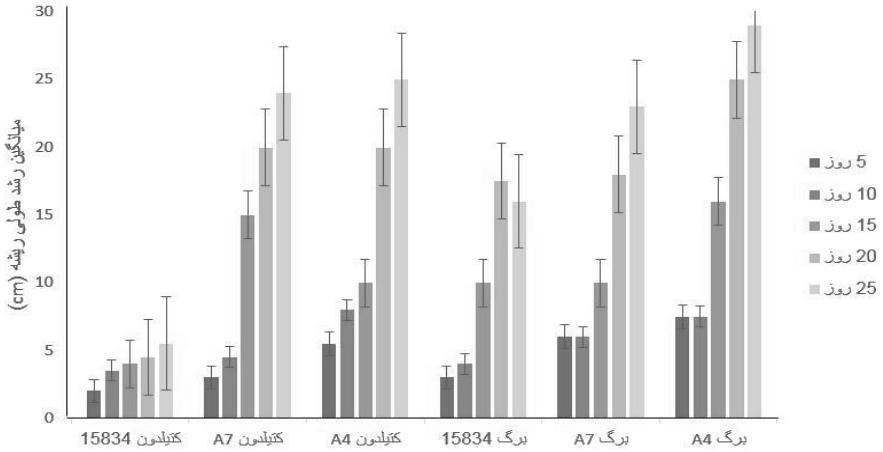
نمودار شماره ۳- نمودار مقایسه میانگین اثر فاکتور زمان به همراه ریزنمونه و سویه باکتری بر القای ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی در روش غوطه‌وری

(نمودار شماره ۴). در روش درشت تزریقی اولین علائم ظهور ریشه‌های مویین درست ۲۰ – ۲۳ روز پس از تلقیح با هر سه سویه باکتری مشاهده شد. بالاترین درصد پاسخ‌گویی ریز-نمونه‌ها به این روش در ریزنمونه‌های برگ و بالاترین درصد ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی در سویه A_4 مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که روش غوطه‌وری در تولید ریشه-های مویین تراریخته گیاه تاتوره تماشایی مؤثر واقع نشد و اغلب ریشه‌های تراریخته احتمالی حاصل، با استفاده از روش تزریق باکتری به ریزنمونه حاصل شده‌اند.

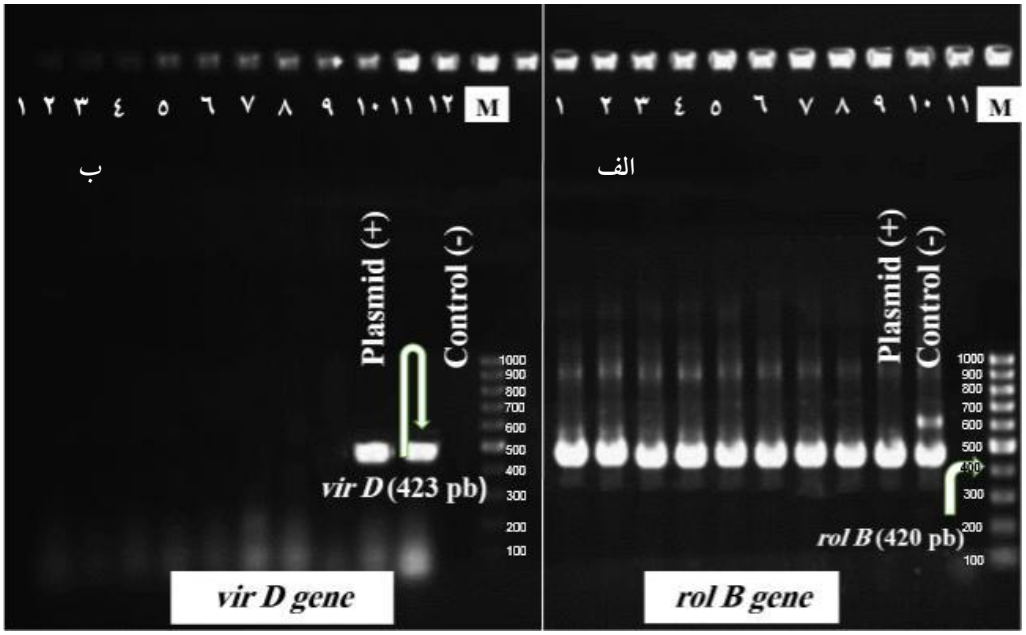
تأیید تراریختگی ریشه‌های مویین

به منظور اثبات حضور ژن *rol B*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی انجام شد. نتایج نشان دادند که از ۱۵۰ ریزنمونه برگ تلقیح یافته، ۸۱ ریشه مویین

تراریخته احتمالی به دست آمد که تنها ۶/۲ درصد از نمونه‌های تراریخته احتمالی به آزمون PCR پاسخ مثبت نشان دادند (شکل شماره ۱). بیشترین درصد تراریزش (۳/۷ درصد) مربوط به سویه A4 و ریزنمونه برگ و کمترین درصد تراریزش ۱/۰۲ درصد مربوط به سویه ۱۵۸۳۴ و ریزنمونه برگ بود. همچنین جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir D* انجام شد. باند ۴۲۳ جفت بازی در نمونه اگروباکتریوم مشاهده شد و عدم ظهور این باند در ۹ کلون انتخابی دیگر، نشان‌دهنده عدم وجود اگروباکتریوم در این ریشه‌ها و اثبات صحت تراریختگی آنها است (شکل شماره ۱).



نمودار شماره ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر زمان به همراه ریزنمونه و سویه باکتری بر رشد طولی ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی



شکل شماره ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *rol B* و *vir D* در ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی

الف- محصول PCR مربوط به ژن *rol B* ، چاهک‌های شماره‌های ۱ الی ۹ مربوط به ریشه مویین تراریخته، چاهک شماره ۱۰ پلاسمید باکتری (کنترل مثبت) و چاهک شماره ۱۱ شاهد (کنترل منفی) و چاهک M: نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb)

ب- محصول PCR مربوط به ژن *vir D* ، چاهک‌های شماره‌های ۱ الی ۹ مربوط به ریشه مویین تراریخته، چاهک شماره ۱۰ پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، چاهک شماره ۱۱ مربوط به ژن *vir D* و چاهک شماره ۱۲ شاهد (کنترل منفی). چاهک M: نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb)

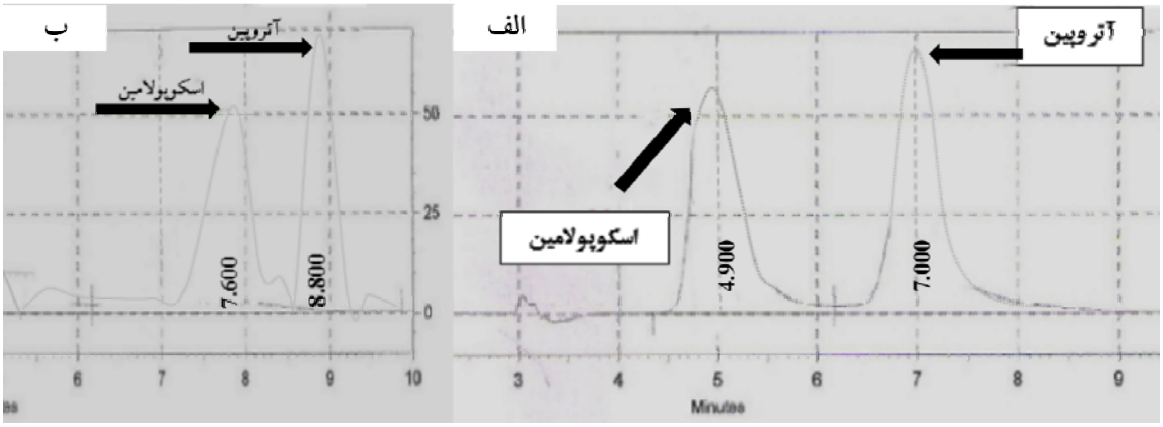
بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی

نتایج به دست آمده از نمونه کروماتوگرام HPLC نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مقدار آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخته افزایش یافت، اما این افزایش رابطه خطی نداشت و در برخی نمونه‌ها با افزایش غلظت مقدار آلکالوئیدها کاهش یافت. بیشترین مقدار اسکوپولامین در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار در ریشه مویین تراریخته حاصل از کوتیلدون مشاهده شد. در حالی که محتوای این آلکالوئید در غلظت‌های بالاتر نسبت به نمونه شاهد کاهش چشمگیری داشت. بیشترین مقدار آتروپین نیز در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در ریشه‌های مویین تراریخته حاصل از ریز نمونه برگ مشاهده شد (جدول شماره ۲). در بررسی تروپان آلکالوئیدها توسط HPLC، پیک زمان بازداری برای آتروپین در ریزنمونه ریشه مویین تراریخت حاصل از ریزنمونه برگ در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید ۸/۸۰ دقیقه و برای اسکوپولامین ۷/۶۰ دقیقه به دست آمد (شکل شماره ۲) و (شکل شماره ۳). این درحالی است که پیک زمان بازداری اسکوپولامین در نمونه مذکور در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار ۴/۵۵ دقیقه و برای آتروپین ۶/۱۵ دقیقه گزارش شد. در نمونه شاهد پیک زمان بازداری برای آتروپین ۷ دقیقه و برای اسکوپولامین ۴/۹۰ دقیقه بود. همچنین در بررسی صورت گرفته بر روی ریشه مویین تراریخته، محتوای اسکوپولامین افزایش یافت به طوری که در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید پیک زمان بازداری اسکوپولامین ۵/۳۵ دقیقه را نشان داد. در حالی که در نمونه شاهد مقدار اسکوپولامین ۴/۸۵ دقیقه گزارش شده بود (شکل شماره ۴).

این نتایج نشان دادند که محتوای آتروپین در ریشه‌های مویین تراریخته حاصل از ریز نمونه برگ نسبت به ریشه‌های مویین تراریخته حاصل از ریزنمونه کوتیلدون تحت تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار، افزایش چشمگیری داشته است به طوری که این میزان حدود ۴/۳ برابر بیشتر از ریشه‌های مویین تراریخته حاصل از زیرنمونه کوتیلدون تحت تیمار مذکور بوده است. در مقابل، محتوای اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخته حاصل از ریزنمونه کوتیلدون تحت تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار نسبت به نمونه‌های حاصل از برگ حدود ۵ برابر بیشتر مشاهده شد.

جدول شماره ۲- بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار محتوای آتروپین و اسکوپولامین (mg/ml)

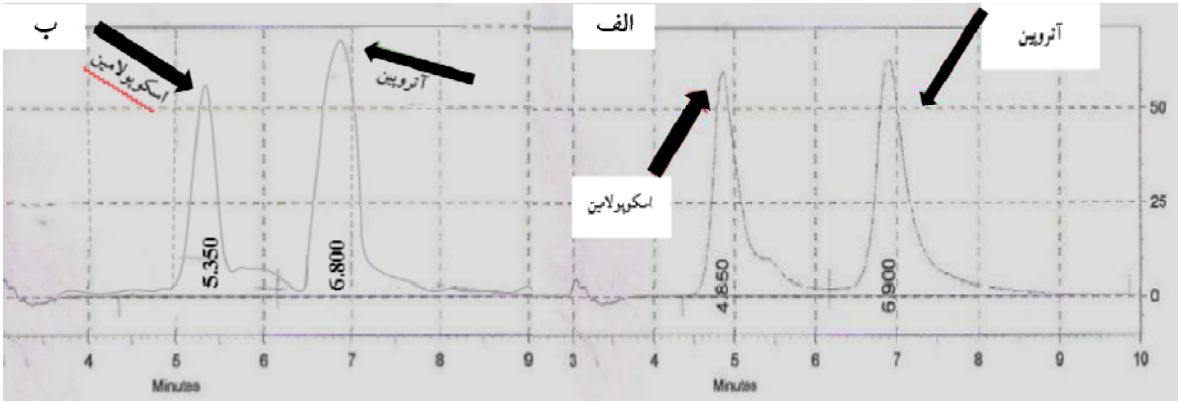
شماره آزمایش	ریزنمونه	سویه	Atropine 0.1 mM	Atropine 0.01 mM	Scopolamine 0.01 mM	Scopolamine 0.1 mM
1	Leaf	A_4	0.044	0.040	0.050	0.048
2	Leaf	A_4	0.060	0.032	0.064	0.048
3	Leaf	A_7	0.038	0.030	0.046	0.030
4	Leaf	A_7	0.038	0.033	0.044	0.040
5	Leaf	A_4	0.043	0.040	0.053	0.050
6	Cotyledon	A_7	0.023	0.011	0.046	0.040
7	Cotyledon	A_7	0.051	0.053	0.066	0.060
8	Cotyledon	A_7	0.050	0.043	0.053	0.031
9	Cotyledon	A_4	0.046	0.047	0.035	0.022



شکل شماره ۲- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین ناشی از ریشه مویین تراریخت حاصل از برگ در تیمار سالیسیلیک اسید. افزایش میزان آتروپین در نمونه تیمار شده و شاهد

الف- نمونه شاهد، پیک زمان بازداری آتروپین ۷ دقیقه و اسکوپولامین ۴/۹۰ دقیقه، ب- نمونه تحت تیمار، پیک زمان بازداری آتروپین ۸/۸۰ دقیقه و اسکوپولامین ۷/۶۰ دقیقه

شکل شماره ۳- ریشه مویین تراریخته حاصل از گیاه تاتوره تماشایی در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۱) و ریشه مویین تراریخته در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۲). الف- توده ریشه مویین تراریخته رشد یافته. ب- توده ریشه مویین تراریخته رشد یافته.



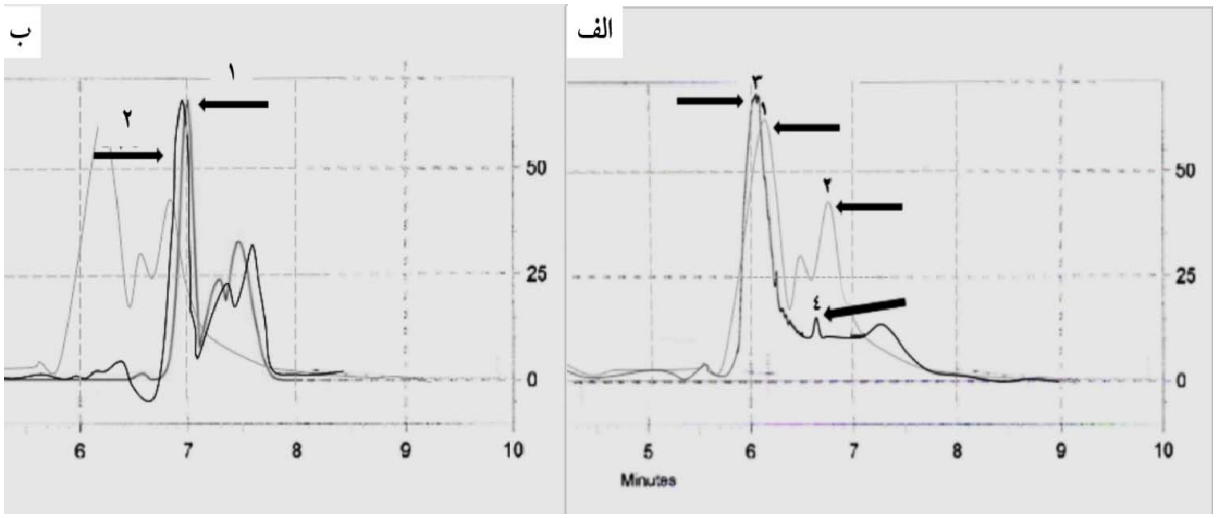
شکل شماره ۴- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین ناشی از ریشه مویین تراریخته گیاه تاتوره تماشایی حاصل از کوتیلدون در تیمار سالیسیلیک اسید. افزایش میزان اسکوپولامین در نمونه تیمار شده و شاهد

الف- نمونه شاهد، پیک زمان بازداری آتروپین ۶/۹۰دقیقه و اسکوپولامین ۴/۸۵ دقیقه، ب- نمونه تحت تیمار، پیک زمان بازداری آتروپین ۶/۸۰ دقیقه و اسکوپولامین ۵/۳۵ دقیقه

بررسی اثر متیل جاسمونات بر تولید متابولیت‌های ثانویه

نتایج حاصل از بررسی آلکالوئیدها توسط HPLC کاهش تولید این آلکالوئیدها را با استفاده از متیل جاسمونات نشان داد. همچنین سطوح مختلف متیل جاسمونات بر محتوای آتروپین تأثیری نداشت و فقط محتوای اسکوپولامین موجود در نمونه کوتیلدون کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد از خود نشان داده است (شکل شماره ۵).

نتایج به طور کلی نشان دادند که پس از گذشت ۲۳-۲۰ روز اولین علائم رشد ریشه‌های مویین در ریز نمونه‌های برگ و کوتیلدون در روش درشت تزریقی مشاهده شد. بیشترین درصد تراریختی ریز نمونه‌ها به ترتیب مربوط به برگ در سویه A_4 و کوتیلدون در سویه A_7 بود. در روش غوطه‌وری پایین‌ترین درصد تراریختگی ریشه‌های مویین مشاهده شد و اغلب ریز نمونه‌ها تولید ریشه نا به‌جا نمودند (۸۹/۹ درصد). استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید نیز سبب افزایش محتوای تروپان آلکالوئیدها شد به نحوی که در بین ریشه‌های مویین تراریخت بالاترین میزان آتروپین در ریز نمونه برگ در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و بیشترین میزان اسکوپولامین در ریشه مویین تراریخت حاصل از ریز نمونه کوتیلدون در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. تیمار متیل جاسمونات نیز در تمام غلظت‌ها سبب کاهش محتوای آلکالوئیدها و همچنین کاهش رشد ریشه‌های مویین تراریخته شد.



شکل شماره ۵- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین حاصل از ریشه مویین تراریخته کوتیلدون گیاه تاتوره تماشایی (الف) و برگ (ب) در تیمار متیل جاسمونات. کاهش محتوای اسکوپولامین در غلظت ۱۰۰ میکرو مول نسبت به نمونه شاهد

الف- ۱: پیک زمان بازداری آتروپین در نمونه شاهد ۶/۲۰ دقیقه، ۲: پیک زمان بازداری اسکوپولامین در نمونه شاهد ۶/۷۶ دقیقه، ۳: پیک زمان بازداری آتروپین در نمونه تحت تیمار ۶/۱۸ دقیقه، ۴: پیک زمان بازداری اسکوپولامین در نمونه تحت تیمار ۶/۵۷ دقیقه.

ب- ۱: پیک زمان بازداری آتروپین در نمونه شاهد ۷ دقیقه و ۲: پیک زمان بازداری آتروپین در نمونه تحت تیمار ۶/۹۸ دقیقه

بحث

به طور کلی عوامل متعددی می‌توانند بر روی درصد تراریختگی ریشه‌های مویین توسط اگروباکتریوم در گونه‌های مختلف گیاهان نقش مؤثری داشته باشند. انتخاب برترین محیط کشت با غلظت‌های معینی از تنظیم‌کننده‌های رشد، نژاد (سویه) اگروباکتریوم و حتی غلظت آن، روش‌های انتقال ژن به گیاه، سن و نوع ریزنمونه همگی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار در افزایش تراریختگی ریشه‌های مویین و افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه آنها می‌باشند. در این تحقیق از تیمارهای مختلف جوانه‌زنی بذر، سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، ریزنمونه، الیسیتور و روش‌های مختلف تلقیح در جهت افزایش آلکالوئیدها بر روی ژنوتیپ جدید (تا بحال کار نشده است) استفاده شده است. در بررسی‌های صورت گرفته توسط چارت وود (Chartwood) [۱۸] و همکاران (۱۹۹۰)، گزارش کردند که برای دست‌یابی به بالاترین محتوای تروپان آلکالوئیدها، کشت بافت‌های سازمان یافته حائز اهمیت است. آنها معتقد بودند که بین تمایز بافت‌های ریشه و بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ارتباط مستقیمی وجود دارد. بنابراین، کشت درون شیشه‌ای را به عنوان یک سیستم بیوتکنولوژی مناسب جهت افزایش بازده محتوای تروپان آلکالوئیدها اعلام نمودند. لذا محیط MS به دلیل دارا بودن انواع ویتامین‌ها و هورمون‌ها برای جوانه‌زنی بذور می‌تواند مؤثر باشد [۱۹]. همان طور که خاتودیا (Khatodia) و همکاران [۲۰] نیز در پژوهش خود بر روی چند گیاه خانواده سولاناسه، اعلام کردند که به منظور تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه از کشت ریشه‌های مویین تراریخته نوع و غلظت عناصر محیط کشت در بالا بردن بازده تولید حائز اهمیت است. بر اساس پژوهش‌های قبلی، پوسته اولیه بذر عامل بازدارنده جوانه‌زنی بذور تاتوره تماشایی است [۲۱]. در این پژوهش نیز حضور پوسته بذر عامل اصلی در کاهش قدرت جوانه زنی بذرها بود و تیمار خراش ناحیه خروج جنین (قطع سر جنین) به عنوان کاربردی‌ترین تیمار جهت شکست دوره خواب بذور معرفی شد. البته باید به این نکته نیز اشاره کرد که علت عدم جوانه‌زنی بذور تاتوره تماشایی تنها وجود پوسته سخت بذر نیست بلکه عوامل بازدارنده دیگری نیز می‌تواند مانع از جوانه زنی بذرها شوند [۲۲]. بنابراین با القای برخی تیمارها و شناسایی نوع خواب بذر می‌توان درصد جوانه‌زنی را بالا برد.

سویه‌های باکتری و ریزنمونه از جمله فاکتورهای مهمی هستند که می‌توانند القای ریشه‌های مویین تراریخته را تحت تأثیر قرار دهند. در این مطالعه نیز نتایج نشان داد که ریزنمونه برگ و به دنبال آن کوتیلدون برای تهیه ریزنمونه و القای ریشه مویین مناسب بوده که این امر به دلیل بالا بودن سرعت تقسیم سلولی در این نواحی است. در واقع ریشه‌های مویین به دلیل ادغام شدن قطعه T-DNA از پلاسمید Ri قابلیت تقسیم و رشد سریع را بدون حضور تنظیم‌کننده‌های رشد کسب می‌نمایند. لذا توانایی رشد نامحدود خود را در کشت‌های متوالی حفظ می‌کنند [۲۴، ۲۳]. در پژوهش نادریان [۲۵] و همکاران (۱۳۹۳) که به بررسی تأثیر سویه‌های باکتری *A. rhizogenes* در گیاه تاتوره تماشایی پرداختند، نشان داد سویه A_4 با ۸۶/۶۶ درصد بیشترین درصد تراریختگی را داراست. در پژوهش حاضر درصد تراریختگی سویه مذکور ۸۹/۶۶ درصد گزارش شد. در مطالعات انجام گرفته توسط فارسی [۲۶] و همکاران (۱۳۸۳) بر روی گیاه *D. stramonium* اختلاف معنی‌داری در تولید ریشه‌های مویین تراریخته بین دو سویه A_4 و LBA9402 مشاهده شد. به گونه‌ای که سویه A_4 حدود ۴ برابر بیشتر از سویه دیگر تولید ریشه مویین کردند. در این پژوهش نیز سویه مذکور حدود ۵ برابر بیشتر از سویه ۱۵۸۳۴ تولید ریشه مویین تراریخته نمود. به طوری که تمام ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح این سویه دارای بالاترین محتوای تروپان آلکالوئیدها بودند. نتایج تحقیقات Khatodia و همکاران [۲۰] نیز بر روی چند گیاه از خانواده سولاناسه که به بررسی ترکیبات ثانویه مهم آنها در ریشه‌های مویین تراریخته با استفاده از نژادهای A_4 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوژنز پرداخته بودند حاکی از افزایش معنی‌دار این ترکیبات در ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه A_4 و کاهش این ترکیبات توسط سویه ۱۵۸۳۴ شده است. مشابه این نتایج نیز در

تحقیقات دهقان (Dehghan) و همکاران و خِلیفی (Khelifi) و همکاران [۲۷] نیز مشاهده شده است. Khelifi در بررسی-های خود بر روی چند گونه مختلف از گیاه تاتوره اعلام کردند که، تمامی لاین‌های انتخابی از گونه تاتوره تماشایی پاسخ مثبتی نسبت به نژادهای اگروباکتریوم از خود بروز داده-اند و بیشترین درصد تراریختگی مربوط به سویه A_4 و گونه *Datura innoxia* است.

روش‌های آلوده‌سازی ریز نمونه‌ها جهت القای ریشه مویین نیز از دیگر فاکتورهای مهم جهت دستیابی به ریشه مویین تراریخته با کیفیت بالاست. نتایج حاصل در این مطالعه نشان داد که روش درشت تزریقی نسبت به روش غوطه‌وری از اهمیت بیشتری چه از نظر زمانی و چه از نظر تولید ریشه مویین تراریخته برخوردار است. از طرف دیگر سویه‌های باکتری در روش درشت تزریقی نیز عکس‌العمل بهتری از خود بروز دادند به طوری که مدت زمان ظهور اولین علائم ریشه مویین در این روش در بازه زمانی ۲۰-۲۳ روز بود، درحالی که در روش غوطه‌وری این زمان در حدود ۴۵-۵۰ روز اتفاق افتاد. در حقیقت چون در روش تزریق سطح کمتری از نمونه زخم می‌شود و نسبت به روش غوطه‌وری ریز نمونه کمتر در معرض حمله باکتری قرار می‌گیرد روش مناسبی جهت القای ریشه مویین محسوب می‌شود. Khatodia و همکاران نیز جهت القای ریشه‌های مویین تراریخته در گیاه *Solanum xanthocarpum*، مشاهده کردند که روش درشت تزریقی منجر به افزایش پاسخ ۷۵ درصد در محل زخم شده است. این در حالی بود که مدت زمان ظهور اولین ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی در بازه زمانی ۱۲ روز گزارش شد. نتایج پژوهش Jenifer و همکاران [۲۸] که به بررسی القای ریشه-های مویین در گیاه تاجریزی پرداخته بودند نشان داد، ریشه-های مویینی که حاصل از قطعات جدا کشت برگ بودند و با روش درشت تزریقی تلقیح شده بودند، ظرف مدت ۵ روز پس از تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز قادر به تولید لاین‌های تراریخته پر رشد بودند. از طرف دیگر در نتایج سلیمانی [۲۹] و همکاران (۱۳۹۱) بر روی گیاه دارویی باباآدم مشخص شد، روش تزریق با سرنگ بهترین روش جهت القای ریشه مویین است. آنها بر این باور بودند که تا زمانی که از گیاهچه کامل برای القای ریشه مویین به روش درشت تزریقی استفاده نمودند، توانایی گیاه در حفظ بنیه آن و تکثیر سلولی بیشتر شد. همچنین خروج ریشه‌های مویین در منطقه زخمی شده با سوزن سرنگ انسولین در ناحیه ساقه و ریز نمونه‌های برگ چندین گیاه نظیر *Silybum marianum* به منظور القای ریشه مویین تراریخته گزارش شده است [۳۰].

عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض الیستور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی تأثیر می‌گذارد [۳۱]. اما آنچه بیشترین تأثیر را در نتایج این تحقیق نشان داد غلظت الیسیتور مورد استفاده بود که نقشی کلیدی در افزایش متابولیت‌های ثانویه از خود نشان داد. اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های تراریخته تیمار شده با سالیسیلیک اسید نشان داد که در غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید مقدار آلکالوئیدها به شدت کاهش می‌یابد. نتایج LEE [۳۲] و همکاران (۲۰۰۱) بر روی گیاه شابیزک نشان داد که غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید موجب کاهش آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین می‌شود. این نتیجه در واقع نشان‌دهنده آن است که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها را مختل می‌کند (شریفی، ۱۳۸۹) [۳۳]. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیشترین مقدار آتروپین در نمونه ریشه مویین حاصل از برگ در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و بیشترین مقدار اسکوپولامین در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار در نمونه ریشه مویین حاصل از کوتیلدون بوده است. نتایج فوق با نتایج تحقیق شریفی و همکاران (۱۳۸۹) [۳۳] بر روی گیاه شابیزک مطابقت دارد. همچنین پراکاش (Prakash) [۳۴] و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات اثر سالیسیلیک اسید بر روی ریشه مویین *Azadira chtaindica* افزایش تولید ترکیبات مؤثره را در این گیاه مشاهده کردند. در مطالعات ماندِ (Manthe) [۳۵] و همکاران (۱۹۹۲) روی ریشه‌های مویین *Vicia faba* کاهش قابل توجه رشد ریشه و ایجاد سمیت بر اثر تیمار با غلظت‌های بالای ۳/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

نتایج مربوط به اثر متیل جاسمونات نیز حاکی از کاهش مقدار آتروپین و اسکوپولامین در غلظت‌های بالای این تیمار دارد. شبانی [۳۶] و همکاران (۲۰۰۹) کاهش وزن خشک ریشه و افزایش متابولیت ثانویه در نتیجه تیمار گیاهچه‌های شیرین‌بیان با متیل جاسمونات عنوان کردند که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارد، زیرا هرچه میزان غلظت متیل جاسمونات در نمونه‌های تحت تیمار افزایش یافت از میزان محتوای تروپان آلکالوئیدها کاسته شد. تحقیقات تکمیل‌کننده‌ای لازم است تا حد توان گیاه تاتوره تماشایی را در برخورد با غلظت‌های بالاتر متیل جاسمونات، مشخص کند. در واقع اثرات مختلف یک محرک هورمونی با غلظت‌های متفاوت بر روی محتوای ماده مؤثره یک گیاه را می‌توان به تفاوت در مسیرهای بیوسنتزی آنها نسبت داد. همچنین اثرات این محرک‌ها می‌تواند به عوامل متعددی نظیر غلظت الیسیتور، مدت زمان القای الیسیتور، ژنوتیپ گیاه و... بستگی داشته باشد (خدایاری و همکاران، ۱۳۹۳) [۳۸، ۳۷].

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد نوع ریزنمونه، نژاد-های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز و روش‌های آلوده‌سازی ریزنمونه‌ها جهت القای ریشه مویین تراریخته و دستیابی به بالاترین محتوای تروپان آلکالوئیدها از فاکتورهای اصلی در کشت ریشه مویین تراریخته در گیاه تاتوره تماشایی به شمار می‌رود. از طرف دیگر با توجه به اثرات افزایشی برخی محرک‌های هورمونی به نظر می‌رسد استفاده از این محرک‌ها (الیسیتورهای زیستی) و ترکیبات فعال آنها روش مناسبی به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت بافت می-باشد.

منابع

1. Mahmoodzadeh A, Nojvan M and Bagheri Z. Effects of different treatments on breaking of dormancy and seed germination of *Datura stramonium* L. *IJBIO*. WINTER 2006; 18 (4): 341-9.

2. Bebawi F.F, Eplee R.E and Norris R.S. Effects of seed size and weight on witch weed (*Striga asiatica*) seed germination emergence and host - parasitization. *WS*. 1989; 32: 202 - 5.

3. Živkovic S, Giba Z, Grubisic D and Konjevic R. The Counteracting effect of potassium cyanide in sodium Azide-inhibited germination of paulownia tomentosa steud. *Ar.B.S*. Belgrade, 2005; 57 (1): 29-34.

4. Vepoorte R and Niessen WMA. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of alkaloids. *Phytochem*. 1984; 5: 217 - 32.

5. Hosseini N, Nejad Ebrahimi S, Salehi P, Asghari B and Ahmadi M. Simultaneous determination of atropine and scopolamine in different parts of Hyoscyamus arachnoideus Pojark plants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *JOMP* Research. August, 2011; 5 (15): 3552 - 57.

6. Mazid M, Khan TA and Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *B&M* 2011; 3 (2): 232 - 49.

7. Chalabian F and Majd A. Research of change of tropane alkaloids quantities in different stages of growth of *Hyoscyamus reticulatus* L. in natural condition and assessment of suger and elements changes on biosynthesis of these alkaloids in In vitro. *J. Med. Plants* 2004; 3: 39 - 46.

8. Yamada Y and Hashimoto T. Production of tropane alkaloids in cultured cells of Hyoscyamus niger. *P. Cell. Re*. 1982; 1: 101 - 103.

9. Kumar R, Singh S and Singh O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and perspectives, *J. Ind. M. B.* 2008; 35: 377 - 91.

10. Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Genetic diversity and disease control in *Datura innoxia*. *Nature* Aug 2000; 406 (6797): 718 - 22.

11. Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C. and Giulietti A.M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzime and Microbial Technology* 26 (in press). 2000; 73: 1101 - 6.

12. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C. and Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol*. 2000; 7: 95 - 99.

13. Boualem H and Lakhdar K. Study of biomass growth kinetic's and hyoscyamine accumulation in hairy roots of three species of Datura. *Wulf. J*. Apr 2013; 20: 356 - 362.

14. Khatodia S and Biswas K. A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using Agrobacterium rhizogenes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014; 3 (5): 625 - 33.

15. Porebski S, Bailey LG and Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *P. Mol. Bio*. 1997; Reporter 15: 8 - 15.

16. Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL. Determination of Optimum Maturity Stage for *Ocimum sanctum* L. Grown under Different Growing Systems in Terms of Therapeutically Active Secondary Metabolites. *N.P.F.P*. 1999; 2 (4): 159-162.

17. Campa C, Ballester JF, Doulbeau S, Dussert S, Hamon S and Noirot M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chem.* 2004; 88: 39 - 43.

18. Chartwood l, Toppel G, Witte L, Riebesehl B, Borstel KV and Hartmann T. Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing Senecio species. *P. Cell. Re*. 1987; 6: 135 - 9.

19. Toppel G, Witte L, Riebesehl B, Borstel KV and Hartmann T. Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing Senecio species. *P. Cell. Re*. 1987; 6: 135 - 41.

20. Khatodia S and Biswas K. A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2014; 3 (5): 625 - 33.

21. Kondo T. Promotion of hard - seed germination in lotus corniculatus var japonica for use in amenity grasslands. *S. Sci. A. Tech*. 1993; 21: 611 - 19.

22. Baskin C. C and Baskin J. M. Seed ecology, dormancy and germination. A modern synthesis. *Amer. J. Botany* 1999; 86: 903 - 5.

23. Sevon N, Hiltunen R and Oksman Caldentey KM. Somaclonal variation in Agrobacterium transformed roots and protoplast-derived hairy root clones of Hyoscyamus muticus. *P. Med*. 1998; 64: 37 - 41.

24. Crozier A, Ashihara H and Clifford MN (Eds). Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing. 2006; 160: 85 - 92.

25. Naderian P, Moshtaghi N, Bagheri A, Shafaroodi S. The effect of *Agrobacterium rhizogenes* strain on hairy roots culture in *Datura innoxia*. Sec. N. Conf. O. M. P. September 2015; Shahid mofateh University. Hamedan, Iran.

26. Moshtaghi N, Shahriari F, Farsi M, Gordan H and Raeisi M. Investigation of the effect of calcium and potassium ions on transformed hairy roots in *Datura stramonium*. 4th. N. Conf. O. Bio. August 2006; Kerman. Iran.

27. Khelifi L., Zarouri B., Amdoun R., Harfi B., Morsli A. and Khelifi-Slaoui M. Effects of Elicitation and Permeabilization on Hyoscyamine Content in *Datura stramonium* Hairy Roots. *A in En Bio*. 2011; 5 (2): 329 - 34.

28. Jenifer U., Francina Cecilia K. and Ravindhran R. 2012. *In vitro* adventitious root and hairy root cultures in *Boerhaavia diffusa L*. *IJOCR*. 2012; 4 (1): 65 - 7.

29. Soleimani T., Keyhanfar M., Piri KH. And Hasanloo T. Hairy root induction in burdock (*Arctium lapaa* L.). *JOMP*. December 2012; 11 (44): 176 - 84.

30. Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR and Sepehrifar R. Silimarin production on hairy roots systems in S*ilybum marianum* (L.) Gaertn. Oral presentation. 3re Cong. O. M. P. 2007; Shahed University. Tehran. 24 - 25 Oct, Iran.

31. Wink M. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second edition. Inc. New Delhi, India. 2010, pp: 20-30.

32. Lee K., Hirano H., Yamakawa T., Kodama T., Igarashi Y. and Shimomura K. Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. *J. O. Bio. Sci. & Bioen.* 2001; 91 (6): 586 - 9.

33. Ahmadian N, Mozafar Sharif Ch, Karimi Farah and Rahnama H. Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. *IR. J.O. P. BIO*. Spring 2010; 2 (1): (SEQUENCE 3).

34. Prakash G., Ashok K., Srivastava M and Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Bio. Ch. Eng. J*. 2008; 40: 218 - 26.

35. Manthe B., Schulz M. and Schnabl H. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L. evidence for salicylic acid metabolization. *J. O. Che. Eco*. 1992; 18: 1525 - 39.

36. Shirazi Z, Piri KHz, Mirzaie Asl A, Hasanloo T and Ghiasvand T. The effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on production amount of Glycyrrhizin and Isoliquiritigenin in hairy roots of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *IJOB*. 2014; (Text in Persian) 440 - 449.

37. Ziegler J. and Facchini P. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Re. O. P. Bio.* 2008; 59: 735 - 69.

38. Khodaiari M, Omidi M, Boshehri A, Yazdani D, Naghavi M, Kadkhoda Z. Effect of a biotic elicitor and nano elicitor on some alkaloids production in *Papaver somniferum* L. *IR. J. O. A. Sci.* 2015; 45: 578 - 34.

The Production of Hairy Roots from (*Datura innoxia* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* and Effects of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Biological Elicitors on Atropine and Scopolamine Content

Ghadermazi S (M.Sc. Student)[1], Masoud Tohidfar M (Ph.D.)[2*], Miri SM (Ph.D.)[1]

1- Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Energy and New Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Energy and New Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
Tel: +98-21-29903244, Fax: +98-21-22431964
Email: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

Abstract

Background: Using *Agrobacterium rhizogenes* due to create hairy roots, is a useful method to increase secondary metabolites many plants.

Objective: Purpose of this research is to transgenic hairy roots culture, in order to produce secondary metabolites in *Datura innoxia*.

Methods: Explants leaf and cotyledon of *Datura innoxia* were inoculated for two months with A7, A4 and 15834 strains of *Agrobacterium rhizogenes*; Furthermore injection and Immersion methods were used in this scrutiny. The presence of T-DNA in transgenic hairy roots were confirmed by PCR. Transgenic hairy roots in liquid medium of 1/2MS were cultured. In order to induct elicitors, methyl jasmonate in tow densities of 50µM and 100µM, and salicylic acid in three densities of 1mM, 0.1mM and 0.01 mM were used randomly three times. Atropine and scopolamine content of transgenic hairy roots were examined by HPLC.

Results: The highest and lowest rate of transgenic hairy roots production was respectively related to the strains of A4 and 15834. Best explants for inoculation, leaf with A4 strain and cotyledon with A7 strain, were reported. With highest production rate of hairy roots, Simple deposit using a syringes method was recognized as the best method of inoculation. The effect of salicylic acid at a density of 0.1 mM increases the content of atropine concentrations. Also the results showed that usage of Methyl jasmonate at higher doses (100 µM) reduces the content of atropine and scopolamine.

Conclusion: *A. rhizogenes* as an appropriate method to produce hairy roots and elicitors the best treatment for increase alkaloids.

Keywords: *Datura innoxia*, Atropine, Elicitors, Hairy roots Scopolamine