بررسی تغییر میزان آلکالوییدهای تروپان در مراحل مختلف رشد گیاه *Hyoscyamus reticulatus* L. در شرایط طبیعی و تاثیر تغییر عناصر و قند بر بیوسنتز این آلکالوییدها در کشت بافت آن

فیروزه چلبیان[1*]، احمد مجد[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

*آدرس مکاتبه: میدان قدس، ابتدای خیابان دربند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۲۷۱۰۱۹۵ (۰۲۱)، نمابر: ۲۷۰۰۱۰۳ (۰۲۱)

پست الکترونیک: chalabian1969@ yahoo.com

چکیده

گیاه *Hyoscyamus reticulatus* L. از تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) گیاهی دارویی است که از نظر وجود آلکالوییدهای تروپان اهمیت به‌سزایی دارد. در این پژوهش وجود آلکالوییدهای تروپان در مراحل مختلف رشد در گیاه *H. reticulates* L. با استفاده از دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت. قسمت‌های مختلفی از گیاه در مرحله رشد رویشی (ریشه و برگ)، در زمان دو برگی، پنج برگی و ده برگی، در مرحله پیش گل‌دهی (ریشه، ساقه و برگ)، در مرحله اوج گل‌دهی (ریشه، ساقه، برگ و گل) و مرحله میوه‌دهی (ریشه، ساقه، برگ و بذر) برداشت شد و مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اندام ریشه، بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین در مرحله رویشی با ده برگ روزتی وجود دارد. در ساقه، بیشترین مقدار آلکالوییدهای تروپان در مرحله اوج ابتدای گل‌دهی است. در اندام برگ، بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین در مرحله گل‌دهی می‌باشد. در مرحله زایشی، گل، بیشترین مقدار اسکوپولامین و هیوسیامین را دارد. در مرحله میوه‌دهی، دانه‌های سبز و نارس نسبت به دانه‌های بالغ و قهوه‌ای رنگ، مقدار بیشتری هیوسیامین و اسکوپولامین دارند. در کلیه مراحل بررسی شده، میزان تولید هیوسیامین بیشتر از اسکوپولامین است. کشت در شیشه گیاه *H. reticulates* L. در محیط کشت پایه B5 دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 6- BAP انجام شد. مقدار ساکارز، کلسیم، نیترات و فسفات بر میزان تولید آلکالوییدهای تروپان مورد آزمایش قرار گرفت.

گل‌واژگان: تیره سیب‌زمینی، هیوسیاموس، هیوسیاموس رتیکولاتوس، کشت بافت گیاه هیوسیاموس، آلکالوییدهای تروپان، هیوسیامین، اسکوپولامین

مقدمه

هیوسیامین و اسکوپولامین، دو آلکالویید اصلی تروپان در گیاهان خانواده سیب‌زمینی هستند. این آلکالوییدها بر روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک عمل می‌کنند [۷، ٦]. چندین گیاه از تیره سیب‌زمینی به عنوان منبع غنی این آلکالوییدها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آلکالوییدها اساساً در ریشه‌های گیاه سنتز می‌شوند [۷،۳]. بنابراین کشت ریشه‌ها، آلکالوییدهای بیشتری را حتی نسبت به گیاهان والد می‌تواند تولید کند [۹]. گیاه *H. reticulates* L. از تیره سیب‌زمینی از نظر وجود آلکالوییدهای تروپان حایز اهمیت است. Hashimoto و Yamada گفته‌اند ریشه‌های کشت شده در شیشه in vitro در بیوسنتز آلکالوییدها فعال هستند و به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات بیوسنتزی آلکالوییدهای تروپان مورد استفاده قرار می‌گیرند [٥]. تحقیق برای بازدهی بالاتری از تولید اسکوپولامین و هیوسیامین در سیستم‌های کشت در شیشه به آزمایش متغیرهای بسیاری نظیر تاثیر فیتوهورمون‌های برون‌زاد، تغییر ماکروالمان‌ها، میکروالمان‌ها، قند و غیره هدایت می‌شود. Christen. و همکاران در سال ۱۹۹۲ با تغییر مقدار ساکارز، نیترات و کلسیم در ریشه‌های کشت شده گیاه *Hyoscyamus albus* گفته‌اند که افزایش غلظت ساکارز، کاهش مقدار نیترات و افزایش کلسیم در تحریک بیوسنتز آلکالوییدهای تروپان در این گیاه نقش دارند [۱]. در این مطالعه، ما میزان تغییر آلکالوییدهای تروپان را در مراحل مختلف رشد و نیز اثرات مواد غذایی نظیر نیترات، فسفات، کلسیم و قندها بر رشد ریشه و تولید آلکالوییدها در کشت بافت مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

دانه‌های گیاه *H. reticulatus* با اسید ژیبرلیک (۲۵۰ mg/l)، به مدت ۱۲ ساعت تیمار و دانه‌ها تحت شرایط طبیعی در گلدان در اوایل بهار در واحد علوم و تحقیقات مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی کشت شدند و بخش‌های مختلف گیاهان شامل ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها و دانه‌ها در مراحل مختلف رشد رویشی (دو، پنج و ده برگی)، پیش‌گل‌دهی، اوج گل‌دهی و میوه‌دهی برداشت شده، خشک و پودر گشتند. همچنین دانه‌های تحت تیمار اسید ژیبرلیک، در زیر دستگاه هود استریل (لامینار) ضدعفونی شده (اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ٦ درصد به مدت ۲۰ دقیقه) و بعد از شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت B5 بدون هورمون، کشت شدند. جدا کشت‌ها از ریشه، محور زیر لپه و برگ از دانه رست‌های سترون جدا شده و به عنوان شاهد بر روی محیط کشت B5 دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP -6 کشت شدند. همچنین جدا کشت‌ها بر روی محیط کشت B5 با غلظت‌های متفاوت از نیترات، کلسیم، فسفات و قند کشت شدند. بعد از تشکیل کالوس و باز تمایز ریشه‌ها، ریشه‌ها برای تعیین مقدار آلکالوییدهای تروپان، مورد استفاده قرار گرفتند.

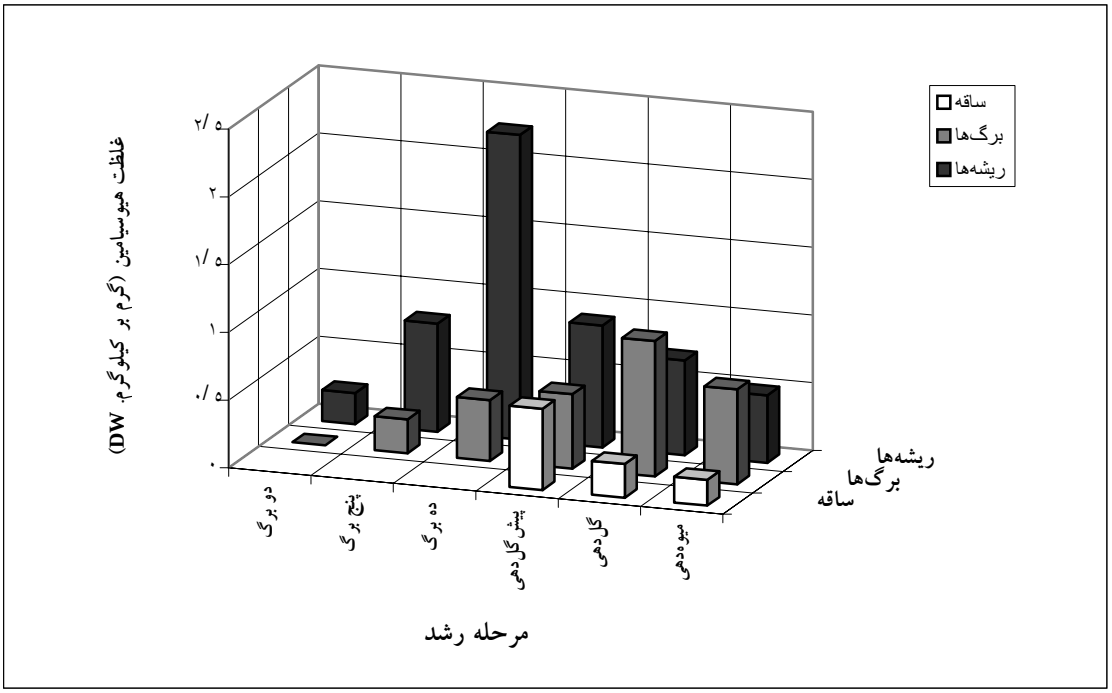
استخراج و آنالیز آلکالوییدهای تروپان: پس از خشک کردن نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های حاصل از کشت در شیشه به ترتیب (در سایه و ٢٤ ساعت در حرارت ٦٠ درجه سانتی‌گراد)، نمونه‌ها را آسیاب کرده و پس از گذراندن از الک پودر یکنواختی از نمونه‌ها تهیه کردیم. برای هر نمونه، ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه را در ٥ میلی‌لیتر فاز متحرک قرار دادیم. فاز متحرک شامل بافر فسفات (pH= ۲/٥ و ۱/۱٥ mM) – استونیتریل [٦٥:۳٥] دارای ۱۷/٥ mM، SDS، می‌باشد. سپس نمونه‌ها را در ۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ کردیم، ٥ میلی‌لیتر از فاز متحرک را به باقی‌مانده اضافه نمودیم و برای یک ساعت در حرارت ٥٠ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. پس از سانتریفوژ کردن، سطح رویی را صاف کردیم (صافی

۰/۴۵ میکرون) و به میزان ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق نمودیم. در استخراج آلکالوییید از ستون RPC18 (۱۵۰ × ۴/۶ mm) به میزان جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده کردیم. دستگاه HPLC با دو استاندارد اسکوپولامین هیدروکلرید (R_1 = ۱۳/۷) و آتروپین سولفات (R_2 = ۱۸/۵) تنظیم شد.

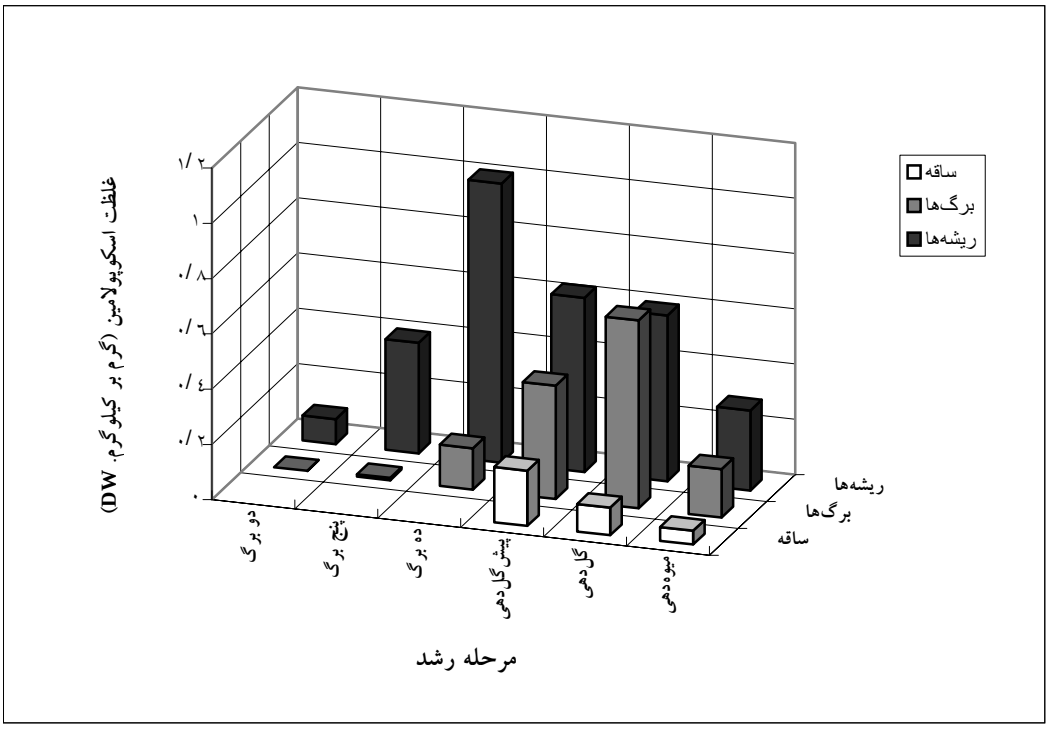
نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آلکالوییدها در مراحل مختلف رشد رویشی گیاه *H. reticulatus* نشان داد که در ریشه‌ها، بالاترین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین در مرحله رویشی با تشکیل ده برگ روزتی وجود دارد. در این مرحله، ریشه دارای ساختار پسین است. در مرحله پیش گل‌دهی، ساقه‌ها دارای بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین هستند. در این مرحله ساقه‌ها سبز و نرم هستند و از نظر ساختار تشریحی مغز کامل است. در برگ‌ها، بیشترین مقدار آلکالوییدهای تروپان در مرحلهٔ اوج گل‌دهی دیده می‌شود. در مرحله زایشی، گل‌ها دارای بیشترین مقدار آلکالوییدهای تروپان هستند. در مرحله میوه‌دهی، دانه‌های سبز و نارس نسبت به دانه‌های بالغ و قهوه‌ای رنگ، بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین را نشان دادند (نمودار شماره ۱ و ۲).

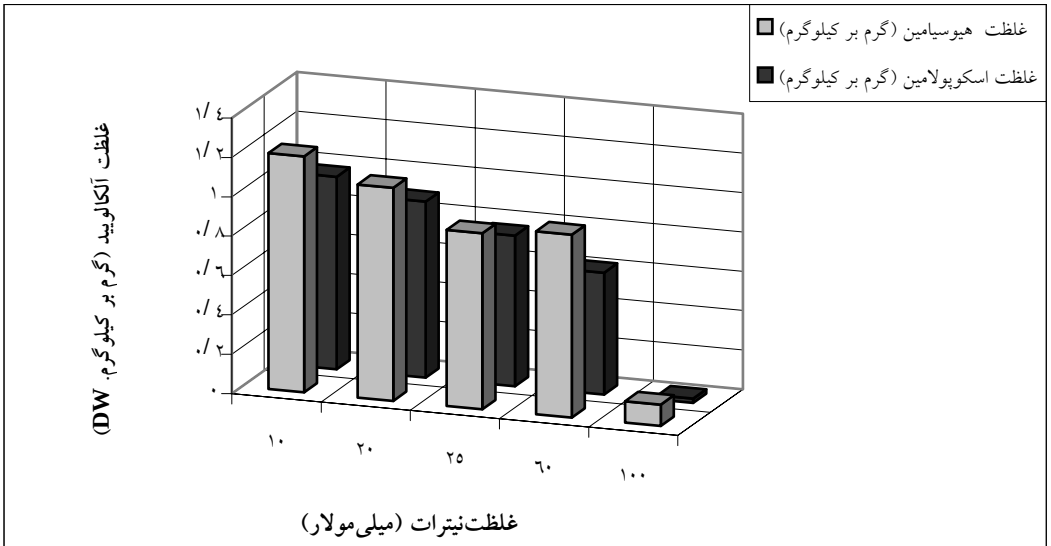
نتایج حاصل از کشت در شیشه نشان داد که با افزایش غلظت نیترات در محیط کشت (۱۰، ۲۰، ۲۵، ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار)، میزان آلکالوییدهای تروپان در ریشه‌ها کاهش می‌یابد و غلظت بهینه نیترات برای بالاترین مقدار آلکالوییدها، ۱۰ mM است. بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که افزایش غلظت نیترات، رشد و تمایز ریشه را افزایش می‌دهد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۱-تغییر میزان هیوسیامین در مراحل مختلف رشد گیاه *H. reticulates*



نمودار شماره ۲- تغییر میزان اسکوپولامین در مراحل مختلف رشد گیاه *H. reticulates*



غلظت نیترات (میلی‌مولار)	۱۰	۲۰	۲۵	۶۰	۱۰۰
غلظت هیوسیامین (گرم بر کیلوگرم)	۱/ ۱۹۹	۱/ ۰۸۳	۰/ ۸۹۵	۰/ ۹۳	۰/ ۱۰۹
غلظت اسکوپولامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/ ۹۷۹	۰/ ۸۹۵	۰/ ۷۶۵	۰/ ۶۲	۰/ ۰۲۲

نمودار شماره ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات بر روی تولید آلکالوییدهای تروپان در گیاه *H. reticulatus*

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فسفات (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) نشان داد که با افزایش غلظت فسفات، تولید آلکالوییدهای تروپان کاهش می‌یابد. غلظت بهینه فسفات برای تولید هیوسیامین و اسکوپولامین ۰/۵ میلی‌مولار است (نمودار شماره ٤).

اثر غلظت‌های مختلف کلسیم (۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار) نشان داد که افزایش غلظت کلسیم، تولید هیوسیامین و اسکوپولامین را در *H. reticulatus* افزایش می‌دهد و غلظت بهینه mM ۲ است. بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که با افزایش غلظت کلسیم، تمایز و رشد ریشه افزایش یافته است (نمودار شماره ٥).

بررسی تاثیر ساکارز در کشت نشان داد که در غلظت‌های مختلف قند (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر)، مقدار آلکالوییدهای تروپان متفاوت است (نمودار شماره ٦). ما مشاهده کردیم که با افزایش غلظت ساکارز نسبت به شاهد، میزان آلکالوییدها افزایش می‌یابد. ماکزیمم مقدار در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز است. افزایش غلظت ساکارز، بیوماس و میزان تمایز ریشه‌ها را افزایش می‌دهد. بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که در محیط‌های کشتی با غلظت بالاتر ساکارز، تمایز و رشد ریشه بیشتر است و ریشه‌ها ضخیم‌تر هستند.

بحث

با توجه به بخش نتایج، مشخص گردید که در مرحله رویشی، ریشه‌ها دارای بالاترین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین هستند (گیاه دارای برگهای روزتی است) در مرحله پیش‌گل‌دهی، ساقه‌ها و در مرحله اوج گل‌دهی، گل‌ها دارای بیشترین مقدار آلکالوییدهای تروپان می‌باشند. در مرحله میوه‌دهی، دانه‌های سبز و نارس نسبت به دانه‌های قهوه‌ای رنگ و بالغ بیشترین مقدار آلکالوییدها را نشان دادند.

با توجه به فرآیند تغییر آلکالوییدهای تروپان در ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها و دانه‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با تشکیل بخش‌های هوایی (ساقه‌های گل‌دهنده)، انتقال آلکالوییدها ریشه‌ها به ساقه و برگ‌ها صورت می‌گیرد و میزان آلکالوییدها در ریشه کاهش می‌یابد. در مرحله گل‌دهی، آلکالوییدهای تروپان در بخش‌های هوایی نیز سنتز می‌شوند، بنابراین گل‌ها دارای بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین هستند. در مرحله میوه‌دهی، گیاه بالغ است، سنتز آلکالوییدهای تروپان در ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ‌ها کاهش یافته است. دانه‌های سبز و نارس دارای بیشترین میزان آلکالوییدها هستند این افزایش سبب حفظ دانه‌ها در مقابل کرم‌ها، حشرات، شته‌ها، میکروارگانیسم‌ها و جانوران دانه‌خوار می‌گردد. با بلوغ دانه‌ها و افزایش بیوماس، میزان آلکالوییدها در دانه‌های قهوه‌ای و بالغ کاهش می‌یابد. در بلوغ، دانه‌ها سفت هستند و نیازی به حفاظت توسط آلکالوییدها ندارند، در نتیجه سنتز آلکالوییدها کاهش می‌یابد. علت کاهش آلکالوییدهای تروپان را در این مرحله می‌توان به علت پیرشدن گیاه و کاهش مراکز بیوسنتز آلکالوییدها و نیز تغییر مسیرهای متابولیسمی ذکر کرد.

در هر سه مرحله، *H. reticulatus* هیوسیامین بیشتری را نسبت به اسکوپولامین تولید می‌کند که این نتیجه با تحقیقات Jonkova, در سال ۱۹۹۲ همسو می‌باشد [۲].

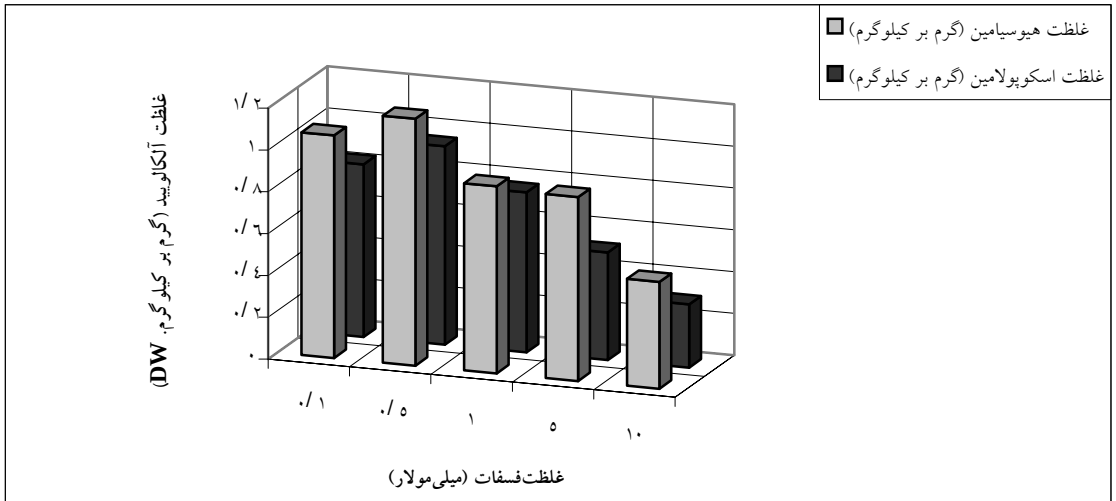
در بخش نتایج از کشت بافت، مشخص گردید با افزایش غلظت نیترات، میزان آلکالوییدهای تروپان در ریشه‌های حاصل از کشت کاهش می‌یابد و در مقابل رشد ریشه‌ها تحریک می‌شود. نتایج مشابه به وسیله Christen و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی *H. albus* به دست آمده است [۱]. همچنین Woo و همکاران بیان داشتند که با کاهش غلظت نیترات در *H. niger*، تولید اسکوپولامین افزایش می‌یابد، که در توافق با نتایج ما است [۹]. Nussbaumer در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که افزایش غلظت نیترات در کشت ریشه، به‌طور شاخصی رشد ریشه را افزایش می‌دهد [٥]. افزایش غلظت نیترات، موجب افزایش

در بیوماس و محدودیت سنتز آلکالوییدهای تروپان می‌شود. پیش‌سازهای آمینواسید برای متابولیسم اولیه استفاده می‌شوند و پیش‌سازهای مشترک برای تولید بیوماس مورد استفاده قرار می‌گیرند و عوامل محرک افزایش بیوماس مانند افزایش غلظت نیترات به کاهش غلظت آلکالوییدها منتج می‌شود. هنگامی که ریشه به یک حد ثابتی می‌رسد غلظت آلکالوییدهای تروپان افزایش می‌یابد [۸].

غلظت فسفات در محیط کشت بر رشد ریشه و میزان آلکالوییدهای تروپان تاثیر دارد. در سال ۱۹۹۵، Woo و همکاران گزارش کردند که محدودیت ذخیره فسفات در ریشه‌های کشت شده، مقدار اسکوپولامین را افزایش می‌دهد. آنها بیان داشتند که غلظت‌های فسفات تاثیری بر میزان رشد ریشه ندارد [۹] که در توافق با نتایج ما نیست، ما مشاهده کردیم که با افزایش غلظت فسفات میزان رشد و تمایز ریشه افزایش می‌یابد.

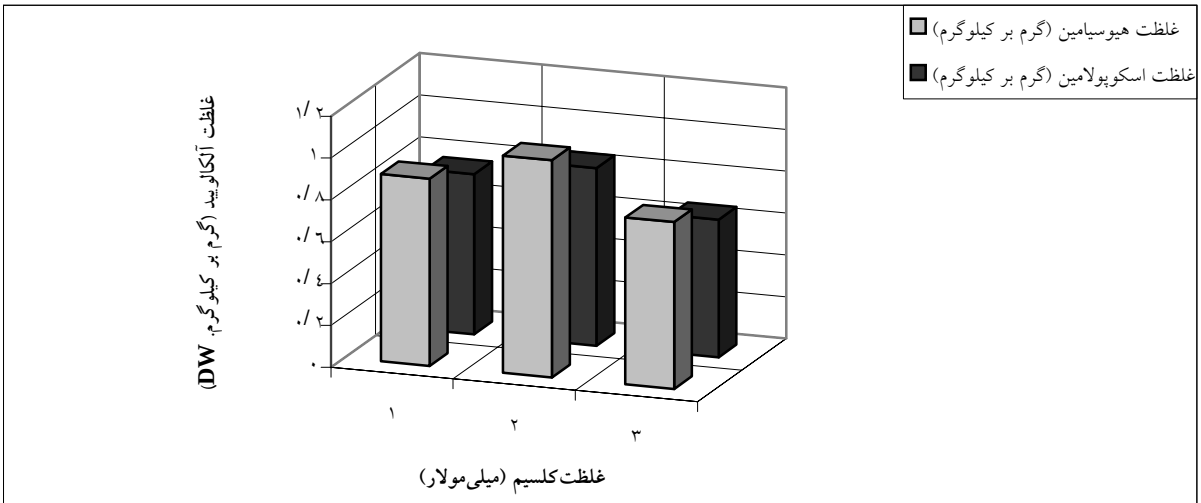
با توجه به بررسی تاثیر کلسیم بر رشد و تمایز ریشه و نیز میزان آلکالوییدهای تروپان نتایج نشان داد که افزایش غلظت کلسیم محرک رشد و تمایز ریشه است و همچنین میزان آلکالوییدها با افزایش کلسیم در محیط کشت افزایش می‌یابد. اثرات مشابهی توسط Christen و همکاران بر روی *H. albus* گزارش شده است [۱]. به نظر می‌رسد که اثر غلظت کلسیم بر روی میزان تمایز و تجمع آلکالوییدها در واکوئل موجب افزایش مقدار آلکالوییدهای تروپان می‌شود. Lee و همکاران در سال ۱۹۹۸ بیان داشتند که آلکالوییدهای تروپان در واکوئل تجمع می‌یابند [٤]. سلول‌های منطقه طویل شدن در ریشه برای رشدشان به غلظت‌های بالای کلسیم نیاز دارند. کلسیم همچنین در تنظیم متابولیسم مخازن اسیدهای آمینه (پیش‌سازهای آلکالوییدی) و تنظیم فعالیت آنزیمی، دخالت دارد.

با افزایش میزان ساکارز، میزان آلکالوییدهای تروپان و نیز رشد ریشه افزایش یافته و ریشه‌ها قطورتر هستند. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط Woo و همکاران همسو است [۹].



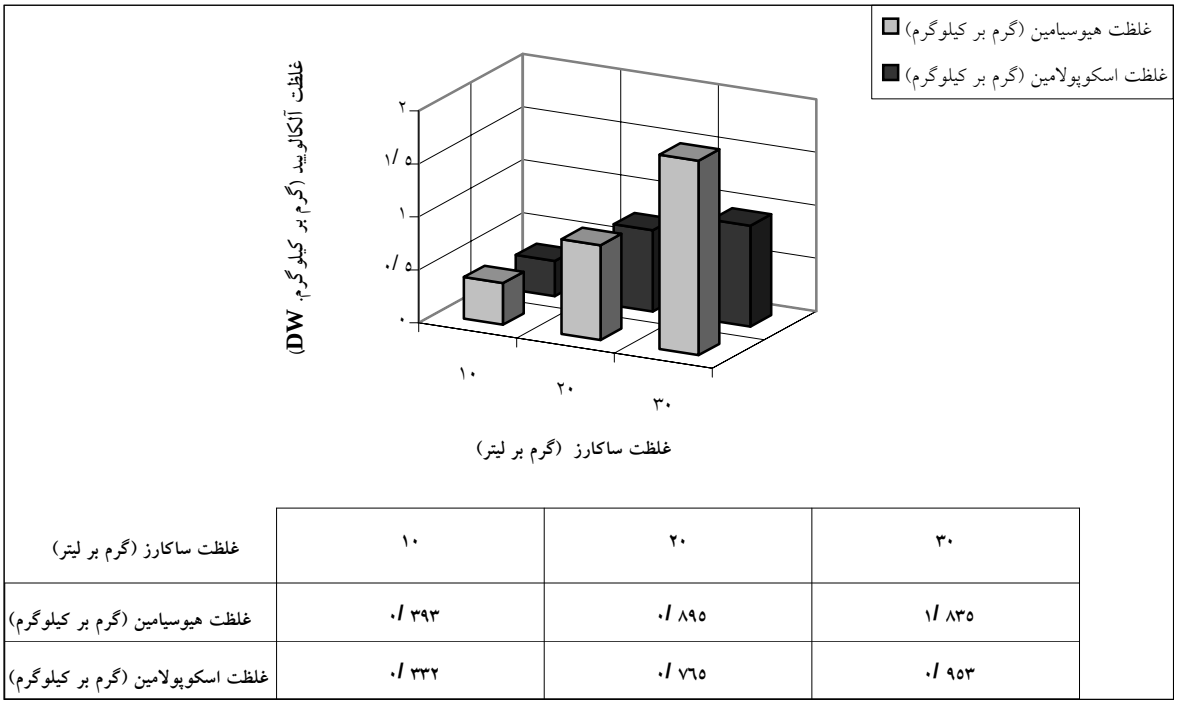
غلظت فسفات (میلی‌مولار)	۰/۱	۰/۵	۱	۵	۱۰
غلظت هیوسیامین (گرم بر کیلوگرم)	۱/۰۶۵	۱/۱۸۱	۰/۸۹۵	۰/۸۸	۰/۵۱۱
غلظت اسکوپولامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/۸۲۶	۰/۹۴۹	۰/۷۶۵	۰/۵۱۵	۰/۳۰۳

نمودار شماره ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف فسفات بر روی تولید آلکالوییدهای تروپان در گیاه *H. reticulatus*



غلظت کلسیم (میلی‌مولار)	۱	۲	۳
غلظت هیوسیامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/ ۸۹۵	۱/ ۰۳۸	۰/ ۷۹۷
غلظت اسکوپولامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/ ۷۶۵	۰/ ۸۴۹	۰/ ۶۵۸

نمودار شماره ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف کلسیم بر روی تولید آلکالوییدهای تروپان در گیاه *H. reticulates*



غلظت ساکارز (گرم بر لیتر)	۱۰	۲۰	۳۰
غلظت هیوسیامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/ ۳۹۳	۰/ ۸۹۵	۱/ ۸۳۵
غلظت اسکوپولامین (گرم بر کیلوگرم)	۰/ ۳۳۲	۰/ ۷۶۵	۰/ ۹۵۳

نمودار شماره ۶- تاثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر روی تولید آلکالوییدهای تروپان در گیاه *H. reticulatus*

منابع

1. Christen, P, Aoki T and Shimomura K. Characteristics of growth and tropane alkaloids production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with Agrobacterium rhizogenes A. *Plant cell reporets* 1992; 11: 597- 600.

2. Jonkova I. Alkaloids production of *Hyoscyamus reticulauts* plant and transformed root culture clone. *Biotechnology and biotechnological equipment* 1992; 6: 50-52.

3. Klan Z. Influence of period of vegetative and development of plant on the alkaloidal content of *Hyoscyamus niger*. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 1931; 20: 1163-75.

4. Lee KT, Yamakawa T, kodama T and Shimamura K. Effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of Belladonna. *Photochemistry* 1998; 49: 2343-47.

5. Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T and Yamada Y. Molecular cloning of Hyoscyamine 6β- Hyolroxylase, a 2- oxoglutarate-dependent Dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. of Biological chemistry* 1991; 266: 9460- 64.

6. Nussbaumer P, Kapetanidis I and Christen Ph. Hairy roots of Datura candida XD. aurea: effect of calture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant cell reports* 1998; 17: 405-9.

7. Nyman S, Soderman A and Simola LK. Metabolism of Arginine and Ornithin in suspension- caltured cells and Aseptic roots of intact plants of *Atropa belladonna*. *J. of experimental Botany* 1993; 44: 869- 77.

8. Pitta Alvarez SI and Giulietti M. Effects of gibberellin GA7 on kinetics of growth and tropane alkaloid accumulation in hairy roots Brugmansia condida. *In vitro cell. Dev. Biol-plant.* 1997; 33: 153- 74.

9. Woo SH, Park JM and Yang JW. Introduction of branch roots by cutting method in *Hyoscyamus niger* root culture. *Plant cell, tissue and organ culture* 1997; 48: 131-4.

10. Woo SH, Park JM and Yang JW. Production of scopolamine by normal root culture of *Hyoscyamus niger*. *Biotechnology letters* 1995; 17(9): 921-929.