

افزایش بیان ژن *h6h* و تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی بذرالبنج مشبک تهیج شده با عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم

کمال رشیدی‌اصل^۱، بهمن حسینی^۱، علی شرفی^۲ و حامد محمد پور^۲

^۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

^۲ ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دارویی

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) منبع غنی از آلکالوئیدهای تروپانی هیوسامین و اسکوپولامین می باشد. در پژوهش حاضر، ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های کوتیلدون دو هفته‌ای، گیاه بذرالبنج مشبک با استفاده از سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز تهیه شد. اثر غلظت‌های مختلف (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر میزان رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، میزان فنول کل، میزان آلکالوئیدهای تروپانی و میزان بیان ژن هیوسامین-6- بتا هیدروکسیلاز (*h6h*) در ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک بررسی گردید. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که میزان وزن تر و خشک تحت تأثیر غلظت‌های بالای محرک عصاره قارچ فوزاریوم کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین میزان فنول کل در ریشه‌های مویین تیمار شده، در مقایسه با شاهد افزایش یافت. نتایج آنالیز GC نشان داد که در تیمار قارچ فوزاریوم بیشترین میزان هیوسامین و اسکوپولامین (۲۷/۵ و ۴۰/۴۱ درصد به ترتیب) در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و زمان ۴۸ ساعت به دست آمد. نتایج آنالیز بیان RT-PCR نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در تیمار عصاره قارچ فوزاریوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۴۸ ساعت مشاهده شد. براساس این نتایج چنین استنباط می‌شود که محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم می‌تواند به عنوان محرک مؤثر جهت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله آلکالوئیدهای تروپانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، بیان ژن، اسکوپولامین، فوزاریوم گرامینه‌روم، هیوسامین-6- بتا هیدروکسیلاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۱۳۲۷۷۹۵۵۸، پست الکترونیکی: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

بذرالبنج، گیاهی یک ساله، دوساله و یا چندساله می‌باشد. رشد اولیه گونه‌های مختلف بذرالبنج بسیار کند است. هیوسامین و اسکوپولامین، از آلکالوئیدهای تروپانی بوده که در بذرالبنج تولید می‌شوند. هیوسامین و اسکوپولامین به عنوان داروهای مهارکننده اعصاب پاراسمپاتیک می‌باشند (۳۹) بیوستز تروپان آلکالوئیدها مانند هیوسامین و اسکوپولامین با تشکیل یون N- متیل پیرولینیوم از آمینواسیدهای اورنیتین و آرژنین آغاز می‌شود (۲۸). در

مسیر بیوستز تروپان آلکالوئیدهای یاد شده، آنزیم‌های بسیاری نقش دارند (۲۱ و ۲۹)، در آخرین مرحله مسیر بیوستزی تروپان آلکالوئیدها، هیوسامین توسط آنزیم هیوسامین ۶-β-هیدروکسیلاز (H6H)، هیوسامین به اسکوپولامین (هیوسین)، کاتالیز می‌شود. سنتز شیمیایی و مصنوعی این ترکیبات، پیچیده و میزان تولید آنها به طور طبیعی کم می‌باشد. بنابراین اصلاح کنندگان گیاهی سعی در استفاده از روشهای نوین فناوری زیستی جهت افزایش

کشت گیاه بذرالبنج مشبک: بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بعد از ضدعفونی با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم، بذرها در داخل محیط کشت MS (۲۵)، کشت شدند. به منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی، کوتیلدونها از گیاهچه‌های مادری استریل جدا و به مدت ۳ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی *Agrobacterium rhizogenes* سویه A7 غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد (محیط همکشتی) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت، داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

کشت ریشه‌های موین با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم: میسلیومهای رشد کرده قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم در محیط مایع آماده و عصاره سلولی قارچ، از گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. ابتدا میسلیومها در ازت مایع و با هاون خرد شده و به شکل پودر تهیه گردید. پودر حاصل در آب مقطر استریل حل و به غلظت نهایی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر رسانده شد. سوسپانسیون قارچ با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. در انتها مایع رویی برداشته و برای استریل کردن از فیلتر ۲۲ میکرونی استفاده گردید. از غلظتهای (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر) عصاره قارچ در زمانهای مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) استفاده گردید.

استخراج و آنالیز آلکالوئیدها: استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۷) انجام شد. به منظور جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین از دستگاه کروماتوگرافی گازی Helwett-Packard، مدل HP 7890A GC و کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف سنج جرمی Helwett-Packard، مدل 5975C، مجهز به ستون موئینه HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر، با ضخامت

میزان تولید آلکالوئیدها و همچنین کاهش هزینه‌های تولید این متابولیتها دارند. در طی سالهای اخیر، کشت ریشه‌های موین توسعه یافته است و منبع بالقوه و با ارزشی برای تولید متابولیتهای ثانویه می‌باشند (۸ و ۳۳). محرکهای قارچی برای ارتقای سنتز ترکیبات مهم تجاری از محیط کشت سلولهای گیاهی به صورت وسیع‌تری مورد مطالعه قرار گرفته اند. قارچهایی که معمولاً باعث پاسخهای فوق حساسیتی در سلولهای گیاهی می‌شوند، باعث فعال شدن مسیرهای دفاعی گیاهی شده و منجر به افزایش تولید فیتوآلکسین می‌شود (۹). در مطالعه‌ای دیگر، افزایش بیوسنتز لیگنین در کشت سوسپانسیون سلولی *Linum album* توسط عصاره‌های قارچی نشان داد که عصاره قارچ *Fusarium graminearum* موجب بالاترین تولید میزان پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) شد (۵). با توجه به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیتهای ثانویه از طریق روشهای شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و نیز به دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیتها و تولید اندک آنها در گیاهان دارویی، راهکارهایی مثل کشت ریشه‌های موین (۳۲)، استفاده از محرکهای زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیتها را بهبود ببخشد. به همین منظور این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر روی خصوصیات رشدی، فیتوشیمیایی و بیان ژن *h6h* انجام گردید.

مواد و روشها

آزمایشهای مربوط به کشت گیاه بذرالبنج مشبک، آنالیز خصوصیات رشدی و بیوشیمیایی در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه و آنالیز فیتوشیمیایی آلکالوئیدهای تروپانی و همچنین تحقیقات مولکولی این پژوهش نیز در آزمایشگاه مرکز علوم تحقیقات زیست فناوری پردیس دانشگاه ارومیه در سالهای ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ انجام شد.

لایه فاز ساکن ۰/۲۵ استفاده گردید. دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، میزان تزریق ۱ میکرو لیتر و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه حرارتی در دامنه ۲۸۰-۶۰ درجه با سرعت ۵ درجه بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه بود.

تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های موئین: بدین‌منظور، DNA ژنومی ریشه‌های موئین و ریشه غیر تراریخت حاصل از جوانه‌زنی بذرهای کشت شده به روش CTAB، استخراج شد (۱۹). به منظور تأیید حضور ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوزنز در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام گردید و توالی آغازگرهای:

Forward Primer: 5' - ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3'
Reverse Primer: 5' - TTAGGCTTCTTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC-3'

به منظور تکثیر قطعات ۷۸۰ ژن *rolB* مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی: استخراج عصاره گیاهی جهت سنجش فعالیت آنزیمها: ۰/۵ گرم بافت گیاهی تازه توزین و به میزان پنج برابر وزن آن بافر استخراج شامل Tris-HCL ۵۰ میلی مولار با pH: ۷.۵، $MgCl_2$ ۳ میلی مولار و EDTA ۱ میلی مولار اضافه و بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه ساییده شد تا یک عصاره کاملاً همگن به دست آمد. هموژنات حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی حاصل به عنوان عصاره خام جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی شامل آنزیمهای کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (۳۱).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6): محلولهای حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به

شرح ذیل است: ابتدا بافر فسفات سدیم (NaH_2PO_4) ۵۰ میلی مولار با اسیدیت ۷ تهیه و سپس به میزان ۲/۵ میلی لیتر از آن بافر و ۲۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳ درصد برای هر نمونه برداشته و این مواد با هم مخلوط و سپس ۲۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۱ دقیقه بررسی شد. محتوای فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (۳).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX; EC 1.11.1.7): فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا و بر اساس روش Zhang و همکاران (۴۰) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۲/۷۷ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیت ۷، ۱۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۱ درصد و ۱۰۰ میکرو لیتر گایاکول ۴ درصد بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه اندازه گیری شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX; EC 1.11.1.11): پس از آماده سازی عصاره‌های پروتئینی، برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز معرفهای زیر مورد استفاده قرار گرفت: بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ به میزان ۲ میلی لیتر، آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳ درصد به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر و آسکوربات ۵۰ میکرو مولار ۲۰۰ میکرو لیتر. کلیه مواد و محلولها در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شده و بلافاصله ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. منحنی تغییرات جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوای فعالیت آنزیم بر حسب

تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (۴۰).

استخراج عصاره گیاهی جهت سنجش میزان فنول کل:

این آزمایش براساس روش Hajimahdipour و همکاران (۱۳)، با کمی تغییر انجام گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم از ریشه موپین تر داخل هاون سرد قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه و به طور کامل ساییده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه انجام گردید. بعد ۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۱۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد داخل لوله‌های شیشه‌ای تمیز ریخته و پس از ۵ دقیقه انتظار، به آن ۹۶۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و در آخر ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس لوله‌های شیشه‌ای به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه در

تاریکی قرار گرفت. در آخر در طول موج ۷۶۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر خوانده شد. از اسید گالیک برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نهایتاً نتایج نیز بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر گزارش گردید.

آنالیز بیان ژن *h6h* : ذخیره کردن توالی ژنها از پایگاههای اطلاعاتی و طراحی آغازگر: ژن *h6h* از مهم-ترین ژنهای درگیر در مسیر تولید تروپان آلکالوئیدها در گیاه بذربالنج مشبک می‌باشد. به منظور طراحی آغازگر برای این ژن ابتدا توالی، نواحی کدکننده ژن مذکور از بانک اطلاعاتی NCBI ذخیره شد. در این تحقیق از نرم افزارهای Fast PCR برای طراحی استفاده شد. توالی آغازگرهای ژن *h6h* و 18s rRNA مطابق جدول ۱ می-باشد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک RT-PCR

ژن	توالی	دمای اتصال	طول قطعه تکثیر (bp)
<i>h6h</i>	F: TGGCTACTTTTGTGTCGAACTGG R: CTTGGGTCTGGGCATGGTG	۶۶	۶۲۵
18s rRNA	F: ATGATAACTCGACGGATCGC R: CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	۶۰	۱۶۵

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه-های ریشه موپین خشک با استفاده از محلول استخراج RNAX-plus (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. برای سنتز cDNA از RNA استخراجی با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. قبل از شروع کار تمام وسایل استریل شده و به مدت ۱۵ دقیقه زیر نور UV در داخل هود قرار گرفتند و تمام مراحل استخراج بر روی یخ انجام شد.

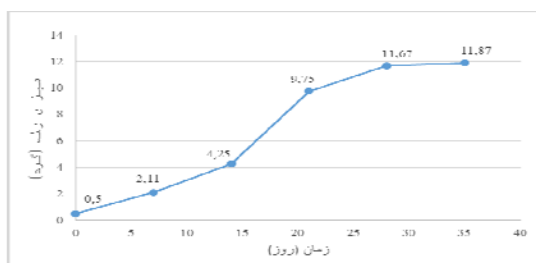
بررسی صحت ساخت cDNA و بهینه سازی دمای اتصال ژنهای مربوطه: cDNA با استفاده از آغازگرهای ژن

18s-rRNA در فرآیند PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تکثیر شد. برای انجام واکنش PCR از ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (پیشگامان)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر cDNA استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده برای ژن 18s-rRNA شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. محصولات PCR پس از افزودن ۷ میکرولیتر لودینگ بافر بر روی ژل آگارز ۱ درصد قرار گرفت و بعد از الکتروفورز ۹۰ ولت برای ۱ ساعت، عکس‌برداری انجام گرفت. برای انجام واکنش PCR ژن *h6h* از ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master

افزار Excel استفاده شد. همچنین برای آنالیز کردن نتایج RT-PCR از نرم افزار Pixcavator 6.0 استفاده شد.

نتایج

تعیین منحنی رشد ریشه‌های موین گیاه بذربالنج مشبک: قبل از اعمال تیمار مورد نظر، وضعیت رشد ۰/۵ گرم ریشه موین به مدت ۵ هفته در محیط کشت MS پایه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بعد از کشت، وزن تر سلولها شروع به افزایش کرده که این روند افزایش تا هفته سوم به صورت لگاریتمی بود. بعد از این زمان سرعت افزایش وزن کاهش یافت و در هفته پنجم روند رشدی نامحسوس شد (شکل ۱). در اواخر دوره لگاریتمی و در آستانه دوره ایستایی (روز ۲۲-۱۹ام) که در این زمان زیست توده ریشه موین به حد مناسبی رسیده بود، به عنوان زمان القای محرکها انتخاب گردید.



شکل ۱- نرخ رشد ریشه‌های موین گیاه بذربالنج مشبک در محیط کشت MS مایع در دمای ۲۵ درجه و سرعت شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه

تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر رشد ریشه‌های موین بذربالنج مشبک: نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم-گرامینه‌روم بر رشد ریشه‌های موین بذربالنج مشبک در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم-گرامینه‌روم بر رشد ریشه‌های موین بذربالنج مشبک در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد به ترتیب در وزن تر و خشک ریشه‌های موین تیمار شده معنی‌دار

Mix (پیشگامان)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده (۱:۵۰) و ۴/۵ میکرولیتر آب عاری از DNA استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده برای ژن *h6h* شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۶ درجه به مدت ۱/۵۵ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۱/۴۰ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد.

برای بررسی صحت تکثیر ژن *h6h* از واکنش کنترل منفی RT- و NTC استفاده شد.

واکنش کنترل منفی RT: این واکنش جهت تشخیص وجود آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراج شده ضروری است. در این واکنش تمام اجزای واکنش برای سنتز cDNA به جز آنزیم Reverse transcriptase مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به عدم استفاده از آنزیم نباید در این نمونه cDNA سنتز شود بنابراین در مرحله تکثیر ژن مورد مطالعه با استفاده از این cDNA نباید باندی مشاهده شود. وجود باند بیانگر وجود آلودگی DNA است.

واکنش کنترل منفی (NTC): این واکنش برای تشخیص آلودگی در اجزای واکنش ضروری است. در این واکنش تمام اجزای واکنش به جز cDNA استفاده می‌شود. فقط به جای استفاده از cDNA از آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. بنابراین در مرحله تکثیر ژن مورد مطالعه هیچ باندی نباید مشاهده شود چون وجود باند نشانگر وجود آلودگی اجزای واکنش خواهد بود.

آنالیز داده ها و محاسبات آماری: آزمایشات مربوط به هر محرک به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گردید و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید و برای رسم نمودارها از نرم

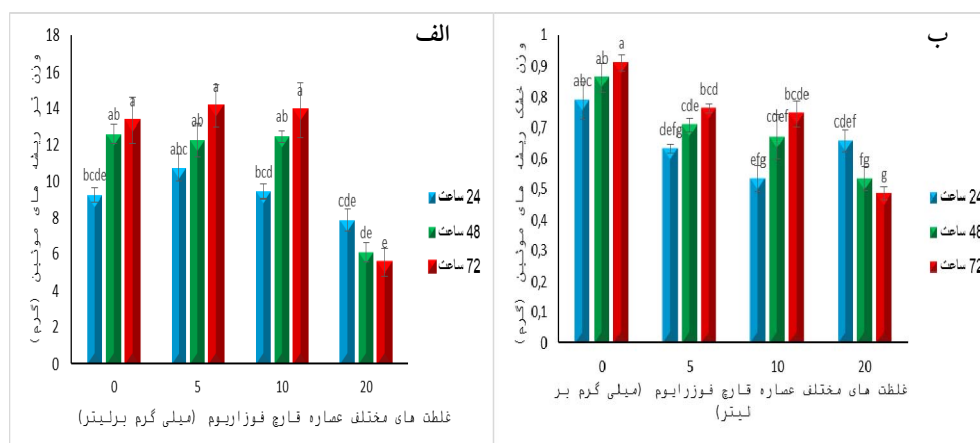
گردید. بیشترین میزان وزن تر (۱۴/۱۶ گرم) در تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر در مدت ۷۲ ساعت تیمار و کمترین میزان وزن تر (۵/۵۷) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۷۲ ساعت مشاهده گردید (شکل ۲). بیشترین میزان وزن

خشک (۰/۹۱ گرم) در تیمار شاهد و در مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت نگهداری در محیط مایع و کمترین میزان وزن خشک (۰/۴۸ گرم) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر رشد ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک

میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
غلظت تیمار (a)	۳	۶۸/۹۲**	۰/۱۳۲**
زمان تیمار (b)	۲	۱۸/۰۳**	۰/۰۱ ^{ns}
اثر متقابل (a*b)	۶	۸/۴۱**	۰/۰۱۸*
اشتباه آزمایشی	۲۴	۲/۳۵	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات (درصد)		۱۴/۴۰	۱۱/

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



شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر وزن تر (الف) و خشک (ب) ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ آزمون دانکن می‌باشد.

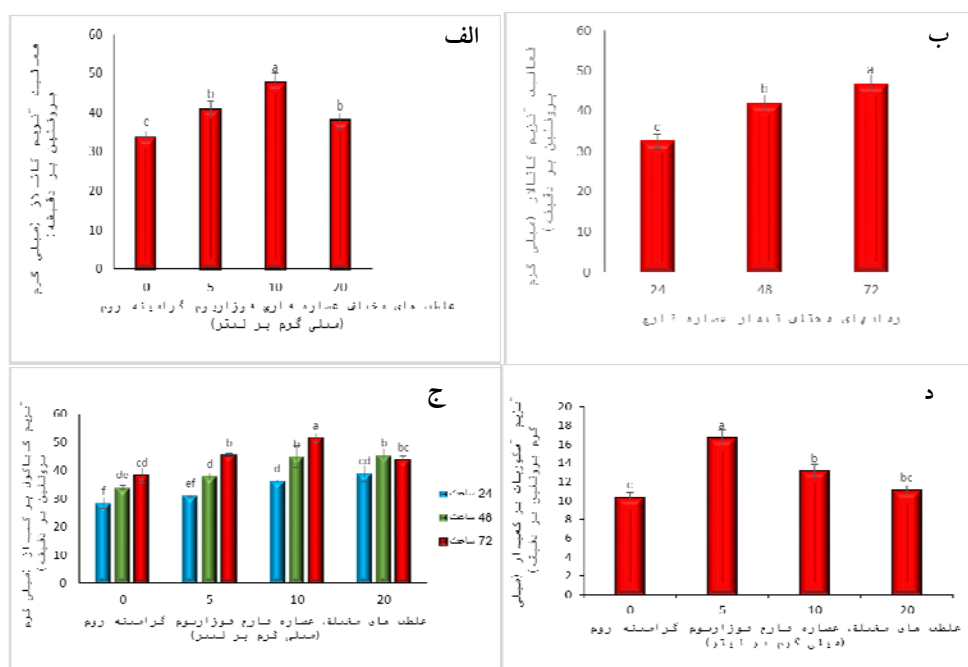
گایاکول‌پراکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. حداکثر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۱۰ میلی‌گرم عصاره قارچ، گایاکول‌پراکسیداز در غلظت ۱۰ میلی‌گرم و آسکوربات‌پراکسیداز در غلظت ۵ میلی‌گرم محرک و به ترتیب در مدت زمانهای ۲۴، ۷۲ و ۲۴ ساعت زمان تیمار ثبت گردید. حداقل میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳).

تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک: نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم فقط در آنزیمهای

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی و میزان فنول کل ریشه های موین بذربالنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	CAT (mg pro/min)	GPX (mg pro/min)	APX (mg pro/min)	فنل کل (mg GA/g FW)
غلظت تیمار (a)	۳	۳۸۹/۸۸**	۲۵۹/۸۲**	۷۲/۴۷**	۹/۸۸**
زمان تیمار (b)	۲	۷۶۲/۸۷**	۴۰۴/۳۴**	۹/۶۴ ^{ns}	۱۶/۹۸**
اثر متقابل (a*b)	۶	۱۰/۱۹ ^{ns}	۲۵/۴۷*	۱/۹۳ ^{ns}	۱/۱۸*
اشتباه آزمایشی	۲۴	۸/۵۴	۹/۵۷	۳/۰۴	۰/۴۱
ضریب تغییرات (درصد)		۷/۳۱	۷/۸۲	۱۳/۶۰	۱۰/۳۵

** و * ns به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد

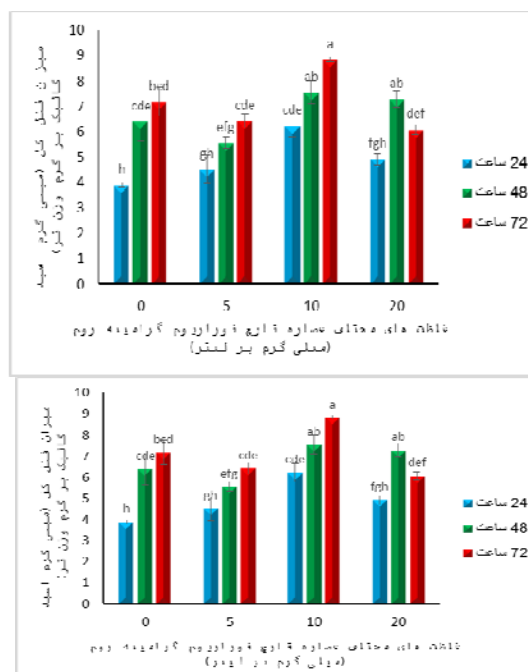


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ساده غلظت (الف) و زمان (ب) تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و مقایسه میانگین اثرات ساده و متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (ج) و آسکوربات پراکسیداز (د) ریشه‌های موین بذربالنج مشبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد

در سطح احتمال ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان فنول کل ریشه‌های موین بذربالنج نشان داد. طوری که بیشترین میزان فنول کل در تیمار ۱۰ میلی گرم بر لیتر در مدت زمان ۷۲ ساعت تیمار (۸/۸۲ میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن تر) و کمترین میزان فنول کل در تیمار شاهد در مدت

تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان فنول کل ریشه‌های موین بذربالنج مشبک: نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان فنول کل ریشه‌های موین بذربالنج مشبک در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار

زمان ۲۴ ساعت (۳/۸۸) میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر میزان فنول کل ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد.

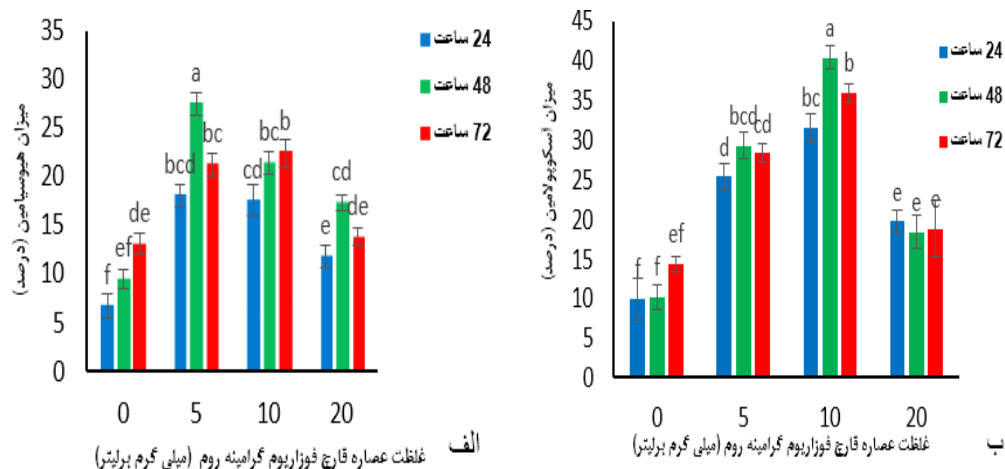
تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک: نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر تولید

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های

موئین بذربالنج مشبک

میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان هیوسیامین (درصد)	میزان آسکوپولامین (درصد)
(a) غلظت تیمار	۳	**۷۴۸/۷۳	**۵۷۰/۴۱
(b) زمان تیمار	۲	**۱۸۰/۰۹	**۱۷۴/۱۲
(a*b) اثر متقابل	۶	**۲۲/۷۶	*۳۵/۵۰
اشتباه آزمایشی	۲۴	۸/۱۰	۱۳/۱۳
ضرب تغییرات (درصد)		۱۶/۳۴	۱۶/۴۸

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



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار درصد هیوسیامین (الف) و درصد آسکوپولامین (ب) در سطوح مختلف عصاره قارچ فوزاریوم-گرامینه روم بر ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد

میزان بیان ژن $h6h$ در شاهد در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید (شکل ۷).

ارتباط تجمع آسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن $h6h$ تحت تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم: نمودار همبستگی تجمع آسکوپولامین با میزان بیان ژن $h6h$ تحت تأثیر عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم نشان داد که بین تجمع آسکوپولامین و میزان بیان ژن $h6h$ ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. الگوی تجمع آسکوپولامین تحت تأثیر عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم روند تقریباً مشابهی با روند بیان ژن نشان داد (شکل ۸).

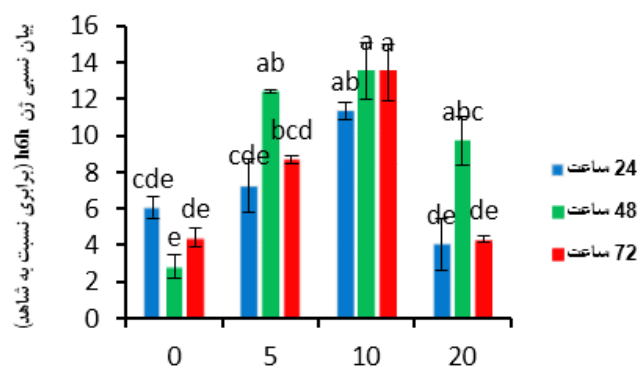
تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر سطح رونوشت ژن $h6h$: نتایج تجزیه واریانس تأثیر عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان بیان ژن $h6h$ در ریشه‌های بذرالبنج مشبک در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم نشان داد که سطوح مختلف غلظت و زمان در سطح احتمال ۵ درصد به‌طور معنی‌داری میزان بیان ژن $h6h$ را تحت تأثیر قرار داد. بیشترین میزان بیان ژن $h6h$ در تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید که میزان تولید آن نسبت به ریشه‌های مویین شاهد $4/72$ برابر افزایش یافت. کمترین

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم بر میزان بیان نسبی ژن $h6h$ در ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک

میانگین مربعات		
میزان بیان نسبی ژن	درجه آزادی	منابع تغییرات
۱۴/۱۵**	۳	(a) غلظت تیمار
۳۶/۱۶*	۲	(b) زمان تیمار
۲۶/۱۳*	۶	(a*b) اثر متقابل
۲۹/۴	۲۴	اشتباه آزمایشی
۶/۲۵		ضریب تغییرات (درصد)

*** و * ns به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

الف



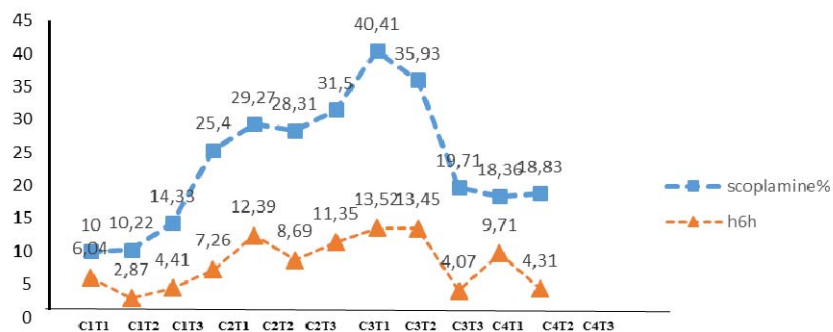
غلظت های مختلف عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم (میلی گرم برلیتر)

ب



شکل ۷- مقایسه میانگین اثرات غلظت و مدت زمان تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم بر میزان بیان ژن *h6h* در ریشه‌های مویین بذرنج مشبک (الف). حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. آنالیز RT-PCR بر میزان بیان ژن *h6h* تحت تأثیر محرک عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر و آنالیز RT-PCR بر میزان بیان ژن *18s* کنترل داخلی (ب) شاهد: C_1 ، غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر: C_2 ، غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر: C_3 ، غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر: C_4 ، T_1 : ۲۴ ساعت، T_2 : ۴۸ ساعت، T_3 : ۷۲ ساعت، واکنش کنترل منفی: NTC، واکنش کنترل منفی: RT.

Pearson Correlation= 0.867



تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم × زمان

شکل ۸- ارتباط میزان تجمع آسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن *h6h* تحت تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه روم در غلظت‌های (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر) و در زمان‌های (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت). ضریب همبستگی پیرسون بین دو متغیر معنی‌دار می‌باشد.

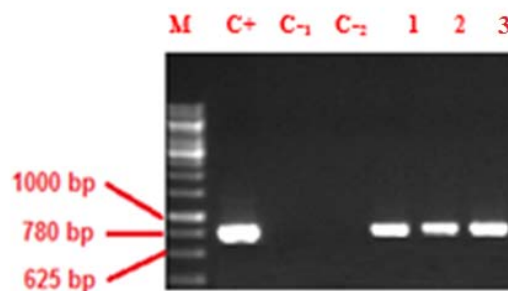
تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین: بررسی ژنهای موجود روی T-DNA باکتری آگروباکتریوم ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ریزوژن که مهم‌ترین آنها ژنهای *rolA*، *rolB* و *rolC*

قارچی وجود دارد، بنابراین به نظر می‌رسد محرکهای قارچی اثرات متنوعی بر رشد دارند.

محرکهای قارچی باعث افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه متابولیت‌هایی که در سازوکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شود (۱۸ و ۳۰). قارچها همانند گیاهان دارای دیواره سلولی می‌باشند ولی ترکیب دیواره سلولی آنها با گیاهان متفاوت است. محرکها به ترکیبات دیواره سلولی حمله می‌کنند و در پی پاسخ به پیام محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. محرکها به‌وسیله گیرنده گیاهی یا R-پروتئین شناسایی می‌شوند. شناسایی در دیواره پلاسما، آغاز سیگنال پاسخ‌دهی می‌باشد. بعد از سیگنال تحریک، گیرنده‌های گیاهی، سیگنال اجرایی‌شان را مثل نشست یونی، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال، فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئینها را به‌کار می‌گیرند و به‌وسیله مولکولهای پیام‌رسان ثانویه مثل H_2O_2 ، اسید جاسمونیک، اسید سالسیلیک، آزادکننده‌های کلسیم داخلی و تلفیق چند ژن و سرانجام بیان ژن دفاعی که همان تولید بالای متابولیت ثانویه حاصل می‌شود (۲۶ و ۲۷).

ترکیبات فنولی، مهارکننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در این رابطه مشتقات سینامیک اسید مؤثرتر از مشتقات بنزوئالت هستند. ترکیبات فنولی در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند (۲۲). آنزیم PAL که آغازکننده نخستین مرحله از مسیر بیوستری فنیل پروپانویدها می‌باشد، پل ارتباطی بین متابولیت‌های اولیه و برخی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۳۸). افزایش فعالیت PAL و دیگر آنزیمهای مسیر فنیل پروپانوییدی که منجر به افزایش ترکیبات فنولی می‌شود، از نخستین پاسخهای گیاهان در شرایط تنش می‌باشد (۳۶). مطالعات نشان می‌دهد فعالیت این آنزیم تحت تاثیر محرکهای قارچی نیز افزایش می‌یابد (۱۵). عصاره قارچ *Fusarium oxysporum* در کشت سلول تاکسوس باعث افزایش تاکسول و ترکیبات فنولی شد (۲۰). افزایش

هستند انجام داد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با کمک آغازگر اختصاصی ژن *rolB*، قطعاتی به طول ۷۸۰bp تولید کردند که حضور آنها روی ژل نشان‌دهنده وجود این توالی و در نتیجه انتقال توالی T-DNA به ژنوم سلول گیاهی می‌باشد. (شکل ۹).



شکل ۹- نمایه الکتروفوری حاصل از واکنش PCR (قطعه ۷۸۰ جفت بازی) از ژن *rolB* روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. L DNA Marker (1 kb، C+) باند تکثیر شده از DNA آگروباکتریوم سویه A7 به عنوان کنترل مثبت، C- ریشه‌های شاهد غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی اول، واکنش PCR بدون الگوی DNA به عنوان کنترل منفی دوم، لاین ۱ تا ۳ ریشه‌های موبین القاء شده در ریزنمونه-های برگ دو هفته‌ای توسط سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز

بحث

مطالعات نشان می‌دهد محرکهای قارچی می‌توانند باعث مهار رشد سلولهای گیاهی شود (۲۴). به طور مثال رشد سلولهای *Morinda elliptica* تحت تاثیر عصاره قارچ *Aspergillus niger* بیش از ۳۵ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافت (۱۱). کاهش رشد سلولی تحت تاثیر محرکهای قارچی در کشت سلول *Rhodiola sachalinesis* و *Catharanthus roseus* گزارش شده است (۱۱). این کاهش رشد سلولها، تحت تاثیر محرکهای قارچی می‌تواند به دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم ثانویه باشد (۱۰ و ۳۵). در کشت سوسپانسیون درمنه خزری هم افزودن محرکهای زیستی و غیر زیستی باعث کاهش رشد سلولها در مقایسه با شاهد گردید (۲). گزارشاتی نیز مبنی بر افزایش رشد تحت تاثیر محرکهای

ترکیبات فنولی تحت تأثیر محرکهای قارچی در کشت سلول کتان زراعی (*Linum usitatissimum*) مشاهده شده است (۱۵). با توجه به بررسی مطالعات انجام شده، نتایج مشاهده شده در این مطالعه با گزارشات سایر محققین در مورد کاربرد عصاره قارچی در افزایش میزان فنول کل مطابقت دارد.

کاربرد قارچ *Aspergillus niger* به عنوان محرک زیستی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*)، سبب افزایش تولید آکالوئیدهای وینلاستین و وینکریستین شد (۳۴). Wiktorowaka و همکاران (۳۷) گزارش کردند که تیمار کشت سلولی گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) با عصاره هموژن شده از قارچ *Trichoderma viride* موجب افزایش تولید الئونیک اسید شد. در تیمار ریشه‌های موین گیاه داتوره با عصاره *Aspergillus niger*، *Fusarium moniliforme* و *Alternaria sp*، بیشترین مقدار هیوسیامین در محیطهای حاوی عصاره میسیلیومی قارچ *A. niger* مشاهده گردید (۴). استفاده از محرک قارچی *Aspergillus niger* در افزایش آرتیمیزینین در گیاه *Artemisia annua* (۲۳)، اثر تحریکی محرک دیواره سلولی قارچ *Phytophthora cinnamoni* بر تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های موین گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) (۶)، اثر کیتوسان بر تولید رزمارینیک اسید در زرین گیاه (۱) کاربرد قارچ *Phytophthora parasitica* به عنوان محرک زیستی بر ریشه‌های موین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L) گزارش شده است (۷). با توجه به بررسی مطالعات انجام شده، نتایج مشاهده شده در این مطالعه با گزارشات سایر محققین در مورد کاربرد عصاره قارچی در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مطابقت دارد.

همان طور که ذکر شد هنگامی که گیاهان مورد تهاجم و حمله قارچها قرار می‌گیرند آنزیمهای تولید کننده

متابولیت‌های ثانویه مانند PAL بیان می‌شوند این آنزیم به نوبه خود باعث تحریک تولید هورمونهای غیر کلاسیک از جمله جاسمونات‌ها و سالیسیلات‌ها می‌شود (۱۲). این هورمون‌ها نقش سیگنال را برعهده دارند و باعث افزایش فعالیت آنزیمهای نیترات ردوکتاز می‌گردد در نتیجه بیان ژنهای *h6h* بیشتر می‌شود. فعالیت بالای ژن *h6h* یک اثر مثبت در تولید آکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه آسکوپولامین دارد. این اثر مثبت همچنین در بافتهای گیاه شابی‌زک مشاهده شده است (۱۶). نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط مستقیمی بین میزان بیان ژن *h6h* و تولید آسکوپولامین وجود دارد (شکل ۸). بنابراین می‌توان احتمال داد که تنظیمها در سطح بیان، در فعالیت آنزیم *H6H* نقش بیشتری نسبت به سایر تنظیمات دارند. همچنین می‌توان از این ژنها به عنوان عاملی کلیدی و تنظیم‌کننده مهم، در تولید تروپان آکالوئید آسکوپولامین نام برد (۱۴).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که بهترین تیمار عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم به‌منظور سنتز آکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و آسکوپولامین به ترتیب غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۴۸ ساعت می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که عصاره قارچ فوزاریوم گرامینه‌روم به‌عنوان یک محرک زیستی می‌تواند راهکار مناسبی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی محسوب شود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شده است. از ریاست پژوهشکده و کارشناسان محترم آن و همچنین معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- ۱- ایوبی، ن.، حسینی، ب. و فتاحی، م. ۱۳۹۶. اثر القایی کیتوزان و کلشی‌سین بر تولید رزمارینیک اسید در ریشه موین زرین گیاه *(Dracocephalum kotschy Boiss)*. پژوهش های سلولی و ملکولی، ۳۰ (۱): ۱-۱۳.
- ۲- صمیمی زاد، م.، جنوبی، پ.، نقوی، م.، آریاکیا، ا.، یزدانی، ب. و شاهزاده فاضلی، ا. ۱۳۹۶. بررسی اثر متیل جاسمونات، نیترات پتاسیم و موالونیک اسید بر محتوای آرتمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی درمنه خزری. پژوهش های سلولی و ملکولی، ۳۰ (۲): ۱۶۷-۱۸۱.
- 3- Aebi, H.I. and Bergmeyer, H. (1974). Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York, 2: 674-684.
- 4- Ajungla, L., Patil, P., Barmukh, R. and Nikam, T. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. Indian Journal of Biotechnology, 8: 317-322.
- 5- Bahabadi, S.E., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T. and Satake, H. (2011). Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnology Reports, 5(4): 367.
- 6- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P. and Vivanco, J. M. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiology and Biochemistry, 40(11): 983-995.
- 7- Bais, H. P., Dattatreya, B. and Ravishankar, G. (2003). Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid phase micro extraction gas chromatography-mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(8): 769-774.
- 8- Baghalian, K. and Naghdi Badi, H. (2000). Volatile oil crops; their biology, biochemistry, and production. Andarz Publication, 248.
- 9- Baldi, A., Srivastava, A. K., and Bisaria, V. S. (2009). Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures. Symbiotic Fungi, 373-380
- 10- Chen, H. and Chen, F. (2000). Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 19(7): 710-717
- 11- Chong, T.M., Abdullah, M.A., Lai, O.M., Nor'Aini, F.M. and Lajis, N.H. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. Process Biochemistry, 40(11): 3397-3405.
- 12- Dixon, R.A. and Lamb, C.J. (1990). Molecular communication in interaction between plants and microbial pathogens. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 41: 339-367.
- 13- Hajimahdipour, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M., (2009). Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plants, 4(8): 145-152.
- 14- Häkkinen, S.T., Moyano, E., Cusidó, R.M., Palazón, J., Piñol, M.T. and Oksman-Caldentey, K.M. (2005). Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 β -hydroxylase. Journal of Experimental Botany, 56(420): 2611-2618.
- 15- Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Crônier, D., Baltora-Rosset, S., Doussot, J. and Hawkins, S. (2006). Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. Planta, 223(5): 975-989.
- 16- Hashimoto, T., Yun, D.J. and Yamada, Y. (1993). Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry, 32(3): 713-718.
- 17- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports, 5(4): 239-242.
- 18- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.k. and Choi, M.S. (2004). Effects of methyl 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(3): 745-751.
- 19- Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T. and Abidin, M. (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction

- digestion. *African Journal of Biotechnology*, 6(3): 175.
- 20- Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahi, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. and Omid, Y. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 30(3): 262-269.
 - 21- Kim, Y.D., Kang, S.M., Min, J.Y., Choi, W.K., Jeong, M.J., Karigar, C.S. and Choi, M.S. (2010). Production of tropane alkaloids during de-differentiation of *Scopolia parviflora* calli. *Journal of Natural Products*, 73(2): 147-150.
 - 22- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F. and Bačkor, M. (2009). Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320(1-2): 231.
 - 23- Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88(3): 277-282.
 - 24- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites: Food and Agriculture Organization, 279-315PP.
 - 25- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with *tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
 - 26- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
 - 27- Norbert, O., Imre, B. and Zolta, S. (2008). Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. *Dyes and Pigments*, 77: 249-257.
 - 28- Patterson, S., and O'Hagan, D. (2002). Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in *Datura stramonium*; hyoscyamine is stable to in vivo oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process. *Phytochemistry*, 61(3), 323-329.
 - 29- Pramod, K.K., Singh, S. and Jayabaskaran, C. (2010). Expression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase in the root pericycle cells and accumulation of its product scopolamine in leaf and stem tissues of *Datura metel* L. *Plant Science*, 178(2): 202-206.
 - 30- Pu, G.B., Ma, D.M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H., Li, G.F. and Liu, B.Y. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*, 28(7): 1127-1135.
 - 31- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3): 613-619.
 - 32- Sharafi, A., Sohi, H.H., Mousavi, A., Azadi, P., Hosseini, B., Razavi, K. (2013). Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression of codeinone reductase in transgenic hairy roots of *Papaver bracteatum*, the Iranian poppy. *Biotechnology Letters*, 35 (3):445-453
 - 33- Sharafi, A., Hashemi Sohi, H., Sharafi, A., Azadi, P., Mousavi A. (2014). Tissue culture and regeneration of an antimalarial plant, *Artemisia sieberi* Besser. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1 (3): 15-20
 - 34- Taha, H., El-Bahr, M. and Seif-El-Nasr, M. (2009). *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* L. G. Don. IV: manipulation of some amino acids as precursors for enhanced of indole alkaloids production in suspension cultures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3137-3144.
 - 35- Wang, C., Wu, J. and Mei, X. (2001). Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4): 404-410.
 - 36- Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W. and Huang, W.D. (2008). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in *grape berry* in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, 55(1): 1-10.
 - 37- Wiktorowska, E., Długosz, M. and Janiszowska, W. (2010). Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1): 14-20.
 - 38- Yu, Z.Z., Fu, C.X., Han, Y.S., Li, Y.X. and Zhao, D.X. (2006). Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnology Letters*, 28(13): 1027-1031.
 - 39- Zayed, R. and Wink, M. (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root

cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Zeitschrift Für Naturforschung C, 59(11-12): 863-867.

40- Zhang, J., Liu, H., Sun, Y., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y. (2005). Responses of the

antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2, 4-dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19(1): 185-190.

***h6h* gene transcript enhancement and production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy root cultures elicited by *Fusarium graminearum* extract**

RashidiAsl K.,¹ Hosseini B.,¹ Sharafi A.² and Mohamadpour²

¹ Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia. I.R. of Iran.

Pharmaceutical Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Hyoscyamus reticulatus L. is a main source of tropane alkaloids, hyoscyamine and scopolamine. In the present study, hairy roots were prepared from two-weekly cultures of cotyledon transformed by A7 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. The effect of different concentrations of *Fusarium graminearum* extract (0, 5, 10 and 20 mg/L) at different exposure times (24, 48 and 72 hours) on growth rate, antioxidant enzymes activity, total phenol, tropane alkaloids contents and expression level of Hyoscyamine-6-beta-hydroxylase (*h6h*) gene were investigated. Data analysis results showed that fresh and dry weight under influence of high concentrations of *Fusarium* fungus extract was reduced. The activity of antioxidant enzymes including catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase as well as total phenol content in treated hairy roots was enhanced compared to control. GC analysis showed that the highest levels of hyoscyamine and scopolamine (27.5 and 40.41% respectively) were found in 5 and 10 mg of elicitor at 48 h exposure time. RT-PCR expression analysis results revealed that the highest expression of this gene was obtained in *Fusarium* fungus extract (10 mg/l) at 48 h exposure time. Based on these results, it is concluded that the *Fusarium graminearum* elicitor can be used as an effective stimulant for the production of secondary metabolites, including tropane alkaloids.

Key words: Antioxidant enzymes, *Fusarium graminearum*, Gene Expression, Hyoscyamine-6-beta-hydroxylase, Scopolamine