

بررسی تأثیر پرتو فرابنفش B بر میزان تولید آتروپین و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین گیاه شایبک (*Atropa belladonna L.*)

بهنام کارجو اجیرلو و محمد فتاحی*

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۰

چکیده

شایبک (*Atropa belladonna L.*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی خانواده سبب زمینی است که به واسطه داشتن تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین دارای اهمیت می‌باشد. استفاده از کشت ریشه مویین به علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان منبعی پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید. اثرات ناشی از کاهش لایه ازن و افزایش اشعه فرابنفش امروزه توسط بسیاری از محققان مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، اثر سطوح مختلف پرتو فرابنفش B بر تولید آتروپین و فعالیت برخی آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در کشت ریشه‌های مویین گیاه شایبک مورد مطالعه قرار گرفت. پرتو UV-B به مدت ۳ روز و هر بار به مدت‌های ۴، ۸ و ۱۲ دقیقه که به ترتیب ۱۳، ۲۶ و ۳۹ کیلوژول بر متر مربع بود اعمال گردید. نتایج نشان داد که با افزایش پرتو UV-B وزن تر ریشه‌های مویین کاهش یافت. این پرتو میزان تولید آتروپین را در مقایسه با ریشه‌های مویین شاهد افزایش داد به طوری که بیشترین میزان آتروپین در انرژی ۲۶ کیلوژول بر متر مربع به دست آمد. همچنین پرتو UV-B فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گاباکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در مقایسه با ریشه‌های مویین شاهد به طور معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد افزایش داد. طبق نتایج به دست آمده از این آزمایش، تیمار با پرتو UV-B می‌تواند یکی از مؤثرترین روشها برای افزایش میزان تولید آتروپین و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین گیاه شایبک باشد.

واژه‌های کلیدی: آتروپین، آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی، پرتو UV-B، شایبک، ریشه‌های مویین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۲۴۳۲۳۶، پست الکترونیکی: mo.fattahi@urmia.ac.ir

مقدمه

گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای و کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام می‌باشد (۲۸). از آنجایی که محل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ریشه است، دست‌ورزی گیاهان حاوی این دسته از ترکیبات با استفاده از آگروباکتیریوم رایزورتنز، در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۵). پرتوهای فرابنفش ۸ تا ۹ درصد طیف خورشید را شامل می‌شوند و

شایبک (*Atropa belladonna L.*) گیاهی است از خانواده سبب زمینی (Solanacea) که مهمترین منبع تجاری تروپان آلکالوئیدهایی مانند آتروپین و اسکوپولامین محسوب می‌شود و به دلیل اثرات گشاد کردن مردمک چشم، ضد اسپاسم، آنتی‌کولینرژیک، آرام بخش و مسکن از آن در صنعت داروسازی استفاده می‌شود (۱۹). کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ

دارد، و ریشه‌های گیاه منبع غنی از این ماده هستند لذا از گیاه شایبک در این تحقیق استفاده گردید.

مواد و روشها

کشت گیاه: بذرهای گیاه شایبک در پاییز ۱۳۹۴ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور تسریع جوانه زنی و شکست خواب، بذرها ابتدا به مدت ۱ ماه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس با اسید سولفوریک ۵۰ درصد به مدت ۲ دقیقه تیمار گردیدند. بذور تیمار شده، در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضدعفونی شدند. در نهایت، پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت گردیده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القای ریشه موین: به منظور القای ریشه‌های موین در شایبک از سویه A7 آگروباکتریوم رایزوزنز به روش تزریقی استفاده شد. در روش تزریقی، ریزنمونه‌های کوتیلدونی یک هفته‌ای تهیه و با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به باکتری در LB جامد در بخش پستی ریزنمونه‌های کوتیلدونی، زخم‌هایی ایجاد شد. سپس ریزنمونه‌های تلقیح شده بر روی محیط کشت MS حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت کشت توام، ریز نمونه‌ها با آب مقطر استریل حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم به مدت ۵ دقیقه شستشو قرار داده شده و در نهایت بر روی محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و فاقد تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند. هر یک هفته یکبار واكشت ریزنمونه‌ها انجام می‌گرفت و در هر دوره واكشت، غلظت سفوتاکسیم به میزان ۵۰ درصد کاهش داده شد تا در نهایت

به سه باند (UV-A ۳۲۰-۴۰۰nm)، (UV-B ۲۸۰-۳۲۰nm) و (UV-C ۲۰۰-۲۸۰nm) تقسیم می‌گردند که به دلیل داشتن طول موج پایین نسبت به نور مرئی دارای انرژی زیادی برای نفوذ به بافتها می‌باشند. در میان موجودات زنده، گیاهان به دلیل نیاز اجتناب ناپذیرشان به نور برای انجام فتوسنتز، بیشتر تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش قرار می‌گیرند و آسیب پذیرتر هستند (۳). کاهش لایه ازن منجر به افزایش تابش اشعه فرابنفش به سطح زمین شده است (۲۰). پاسخ گیاهان به اشعه UV به گونه گیاهی، رقم کشاورزی، مراحل رشد و نمو، وضعیت رشد و میزان نور UV بستگی دارد (۱۶). بر اساس بررسی نتایج مقالات متعدد در زمینه با تأثیر مؤثر اشعه UV-B بر تولید ترکیبات مختلف و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی، از این اشعه در آزمایش خود استفاده گردید. اشعه UV-B باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که بسیار فعال بوده و می‌تواند با ماکرومولکولهای حیاتی مثل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات سلولی واکنش داده و اعمال طبیعی سلول را مختل کنند (۲۳، ۲۱ و ۲). اشعه ماوراء بنفش پاسخ‌های حفاظتی در گیاهان تولید نموده و از طریق حذف رادیکالهای آزاد، اثرات UV-B را در داخل بافت‌های گیاهی کاهش می‌دهد (۷). در گیاهان ساز و کارهای دفاعی، شامل ساز و کارهای آنزیمی و غیر آنزیمی تکامل یافته است که آنها را در مقابل این پرتو حفاظت می‌کند (۱۰). مکانیسم‌های آنزیمی شامل فعالیت آنزیمهای سوپراکسیداز دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، گلوکاتیتون، ردوکتاز و غیره هستند (۱۷). در حفاظت غیر آنزیمی نیز تولید آنتی‌اکسیدانهای غیر آنزیمی، نظیر آسکوربات اسید، کارتنوئیدها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و آلکالوئیدها افزایش می‌یابد (۱۵). در این تحقیق اثر تابش اشعه UV-B بر میزان رشد ریشه موین، تولید آتروپین و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موین گیاه شایبک مورد مطالعه قرار گرفت. به دلیل اینکه آتروپین یک ترکیب ارزشمند بوده و در صنایع داروسازی بیشترین کاربرد را

از محیط کشت حذف گردید. در نهایت ریشه‌های القاء شده از ریزنمونه‌ها جدا و برای رشد بیشتر در محیط کشت MS جامد بدون تنظیم کننده رشد کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند.

آنالیز PCR: برای تایید مولکولی ریشه‌های موئین، استخراج DNA از ریشه‌های موئین به دست آمده در محیط جامد و ریشه حاصل از ریزنمونه تلقیح نیافته (به عنوان شاهد) به روش CTAB (۱۳) انجام گرفت. ۰/۵ گرم از بافت ریشه‌های موئین حاصل از القاء ریزنمونه‌های کوتیلدونی شایبک با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوزنز و نیز بافت ریشه‌ی غیر تراریخت حاصل از جوانه‌زنی بذور کشت شده، با استفاده از نیتروژن مایع در داخل هاون چینی کوبیده شد و پودر حاصل به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج CTAB به ویال‌ها اضافه و توسط ورتکس یکنواخت گردید. پس از افزودن ۳ میکرولیتر آنزیم RNAase به ویال‌ها، مجدداً توسط ورتکس مخلوط شدند و به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه، در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از بن ماری خارج و به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم - ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به نمونه‌ها اضافه و حدود ۱۰ دقیقه به صورت سر و ته کردن مخلوط گردید، تا زمانی که رنگ محلول حاصل به سفید شیری تغییر رنگ دهد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی حاصل برداشته شده و به ویال‌های جدید منتقل و هم حجم مایع رویی برداشت شده (۶۰۰ میکرولیتر)، ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و ۰/۱ حجم مایع رویی استات سدیم ۳ مولار، به درون ویال‌ها اضافه کرده و پس از چند بار سر و ته کردن ویال‌ها مشاهده‌ی کلاف DNA در داخل ویال‌ها، به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی

سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعدی، ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از خارج کردن مایع رویی، ویال حاوی رسوب DNA توسط اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از تبخیر اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE به رسوب حاصل اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید تا رسوب DNA در بافر TE به طور کامل حل شود. سپس محلول DNA حاصل، جهت استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (T80 PG Instruments, UK) و همچنین روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. جهت تایید وضعیت تراریختی ریشه‌های موئین احتمالی، از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol B* استفاده شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCACCGA-3'

(آغازگر مستقیم) و

5'-TTAGGCTTCTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3'

(آغازگر معکوس). برنامه PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Cycloer Veriti® 60-Well Thermal انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه ژل داگ مدل Gel Logic 212 (Carestream Health) Pro، آمریکا) مورد مشاهده و عکس برداری قرار گرفتند.

را از محیط مایع ۱/۲MS خارج کرده و پس از آبیگری توسط کاغذ صافی وزن آنها اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد و برای تعیین وزن خشک ریشه‌های مویین، ریشه‌ها به مدت ۲ روز در هوای آزاد اتاق نگهداری شدند. سپس وزن نمونه‌های خشک شده اندازه‌گیری و ثبت گردید. نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتال حساس با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند و وزن بر اساس گرم گزارش گردید.

استخراج آلکالوئید آتروپین: استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های مویین خشک شده و پودر گردید و داخل ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شدند. سپس کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵ درصد، به نسبت ۱۵:۵:۱ به نمونه‌های گیاهی اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد التراسونیک شدند. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد، پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی لیتر کلروفرم، برای تبخیر فاز کلروفرمی از دستگاه روتاری اوپراتور (تبخیر کننده دوار) استفاده گردید. به عصاره باقی‌مانده و خشک شده ته بالن، ۵ میلی لیتر کلروفرم و ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال اضافه کاملاً به هم زده شد (اسیدی کردن محیط باعث می‌شود آلکالوئیدها به شکل نمکی و باردار درآمده و در اثر استخراج مایع - مایع به فاز آبی منتقل شوند). در مرحله بعد، با ریختن مخلوط به دست آمده داخل قیف دکانتور دو فاز تشکیل شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها به یک بشر منتقل شد و pH آن روی یخ و به وسیله آمونیاک ۲۵ درصد تا ۱۰ تنظیم گردید (افزودن آمونیاک به محلول باعث می‌شود محیط قلیایی شود و آلکالوئیدها به شکل باز آزاد درآمده و در اثر استخراج مایع - مایع به فاز کلروفرمی منتقل شوند). محلول قلیایی به داخل قیف دکانتور ریخته شد و آلکالوئیدها یک مرتبه توسط ۲ میلی لیتر و دو مرتبه توسط ۱ میلی لیتر کلروفرم استخراج شدند. فاز کلروفرمی

اعمال تیمار: پس از رشد مناسب ریشه‌ها در محیط کشت جامد و تایید تراریختی آنها بوسیله PCR، بهترین لاین از نظر میزان رشدی (انشعابات بیشتر در محیط جامد) انتخاب و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی اثر UV-B (توسط یک لامپ ۲۰ وات، HITAGH 1 و مدت زمان تیمار ۴، ۸ و ۱۲ دقیقه (براساس بررسی مقالات متعدد (۳۰، ۳۵ و ۱۲) و ارزیابی اولیه از این میزان شدت نور استفاده گردید) که طبق فرمول $J=P \times T$ ، P : توان لامپ، T : زمان تیمار، مساحت اتاقک مجهز به نور-UV-B: ۰/۳۶ متر مربع و شدت لامپ: ۲۰ وات) به ترتیب معادل ۱۳، ۲۶ و ۳۹ کیلوژول بر متر مربع می باشد، شدت نور از طریق UV لایت متر و نورسنج دیجیتال مدل LUTRON به دست آمد و مقدار کل آن از طریق ساعات نور UV محاسبه گردید. ۲ گرم از ریشه‌های موئین به ارلن مایرهای توری‌دار که حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت 1/2 MS مایع بودند در زیر هود لامینار انتقال داده شد و یک هفته پس از هم وزن کردن ریشه‌ها شروع به اعمال تیمار UV-B شد که این تیمار با ۳ تکرار و در ۳ سطح: ۱۳، ۲۶ و ۳۹ کیلوژول بر متر مربع به صورت یک روز در میان به مدت یک هفته در اتاقک تعبیه شده انجام گردید. ارلن مایرهای حاوی محیط کشت پس از اعمال تیمار به مدت دو هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی و با دور ۱۱۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از ۲ هفته، ریشه‌ها از محیط کشت مایع خارج شده و پس از حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها توسط کاغذ صافی، وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌های موئین به مدت ۲ روز در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، هوا - خشک شده و وزن خشک آنها ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری و در نهایت پس از استخراج آلکالوئیدها، آنالیزهای بیوشیمیایی به روش GC-MS انجام شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه‌های مویین: به منظور تعیین وزن تر و خشک ریشه‌ها، پس از اعمال تیمار نمونه‌ها

گردید سپس ۱ میلی‌لیتر بافر (Tris-HCl) ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵ به آن اضافه و توسط دسته هاون به طور کامل ساییده شد تا یک عصاره کاملاً همگن به دست آمد. هم‌وزنات حاصل به ویالهای تمیز منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در پایان محلول رویی از رسوب با دقت جدا شده و به ویالهای تمیز منتقل گردید. عصاره خام حاصل برای سنجش فعالیت آنزیمهای کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6): مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت کاتالاز از ضریب خاموشی ($36.6 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد (۱).

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX; EC 1.11.1.7): مخلوط واکنش شامل ۱/۴ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲۲ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به صورت افزایش در جذب، طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز از ضریب خاموشی ($26.6 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد (۲۲).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX; EC 1.11.1.11): مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم آسکوربات

به دست آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک به منظور حذف آب موجود، از صافی عبور داده شده و کاغذ صافی توسط ۱ الی ۲ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول صاف شده به وسیله روتاری اوپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و ماده جامد به دست آمده که آلکالوئید کل نامیده می‌شود در ۲-۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد. در نهایت محلول به دست آمده جهت انجام آنالیز بیوشیمیایی داخل ویالهای کوچک ریخته شد (۱۱).

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره: برای شناسایی ترکیبهای عصاره از دستگاه گاز کروماتوگرافی GC و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مستقر در آزمایشگاه پژوهشکده زیست فناوری پردیس دانشگاه ارومیه استفاده شد. ۰/۵ میکرولیتر از نمونه به دستگاه GC تزریق شده و درصد ترکیبهای تشکیل دهنده هر عصاره محاسبه گردید. و چون بیشترین ترکیب تشکیل دهنده هر عصاره آتروپین بود و از طرف دیگر نیز هدف مطالعه در این تحقیق سنجش میزان آتروپین بود.

مشخصات دستگاه GC/MS: از گاز کروماتوگراف متصل شده به طیف‌سنج جرمی مدل تراسی مجهز به ستون HP-5 MS به طول ۳۰ متر \times ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه شروع و بعد تا دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در نهایت به ۲۸۰ درجه سلسیوس رسانده شد بطوری‌که هر دقیقه، ۴ درجه به دما افزوده می‌شد و در نهایت در دمای ۲۸۰ درجه، که در هر دقیقه ۵ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده می‌شد، به مدت ۱۰ دقیقه نگهداشته و تنظیم شد. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه حرکت می‌کرد. انرژی یونیزاسیون نیز ۷۰ الکترون ولت بود.

سنجش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی: ۰/۲ گرم بافت تر ریشه موپین وزن و به داخل هاون سرد روی یخ منتقل

طوری که کمترین وزن تر ریشه‌های مویین (۷/۷۵ گرم) در انرژی ۳۹ کیلوژول بر متر مربع، و بیشترین وزن تر در نمونه شاهد (۱۰/۱۶ گرم) به دست آمد. تیمار UV-B تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه‌های مویین نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر نور UV-B بر رشد ریشه‌های

میانگین مربعات		میانگین شایبیک	
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
UV-B	۳	۴/۴۸۰ ^{**}	۰/۰۰۵۶ ^{ns}
اشتباه	۸	۰/۴۴۱	۰/۰۰۱۶
تجزیه واریانس			
تغییرات		۷/۳۰	۱۰/۲۱
(درصد)			

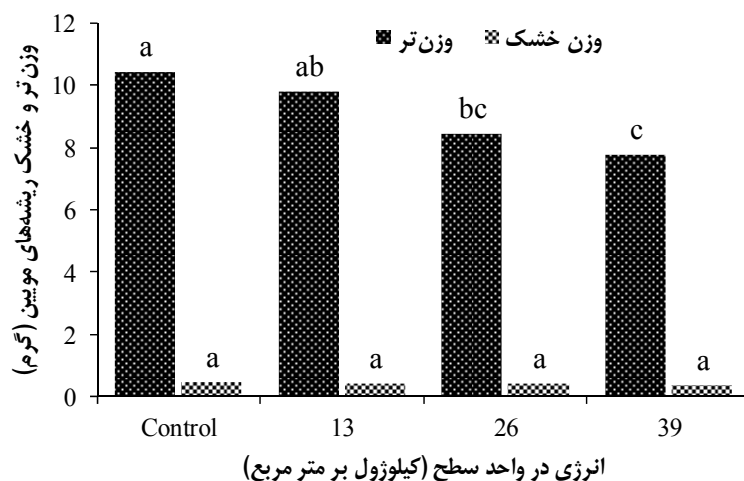
^{**} و ^{ns}: به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

پراکسیداز به صورت کاهش در جذب، طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی ($2.8 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده گردید (۱۸)

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. داده‌های حاصل در نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج

تأثیر اشعه UV-B بر رشد ریشه‌های مویین: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین تأثیر سطوح مختلف UV-B بر میزان رشد و وزن تر ریشه‌های مویین وجود داشت (جدول ۱). طبق (شکل ۱) با افزایش میزان انرژی در واحد سطح، وزن تر (میزان رشد) ریشه‌های مویین کاهش یافته است به



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف UV-B بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین شایبیک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف اشعه UV-B تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان تولید آتروپین داشت، به طوری که حداکثر میزان

تأثیر اشعه UV-B بر تولید آتروپین در ریشه‌های مویین شایبیک: نتایج تجزیه واریانس سطوح مختلف UV-B بر میزان تولید آلکالوئید آتروپین در جدول ۲ نشان داده شده

میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین شایبک در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سطوح مختلف نور UV-B، در سطح احتمال ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز داشت. به طوری که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، به ترتیب در انرژی ۳۹ کیلوژول بر متر مربع و ریشه‌های شاهد مشاهده گردید (شکل ۳). همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، در انرژی ۲۶ کیلوژول بر متر مربع و کمترین میزان آن در ریشه‌های مویین شاهد مشاهده گردید (شکل ۴). در حالی که بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شدت ۱۳ کیلوژول بر متر مربع و کمترین میزان آن، در ریشه‌های مویین شاهد به دست آمد (شکل ۵). بنابراین سطوح مختلف نور UV-B، میزان فعالیت هر سه آنزیم مذکور را در مقایسه با ریشه‌های مویین شاهد افزایش داده است.

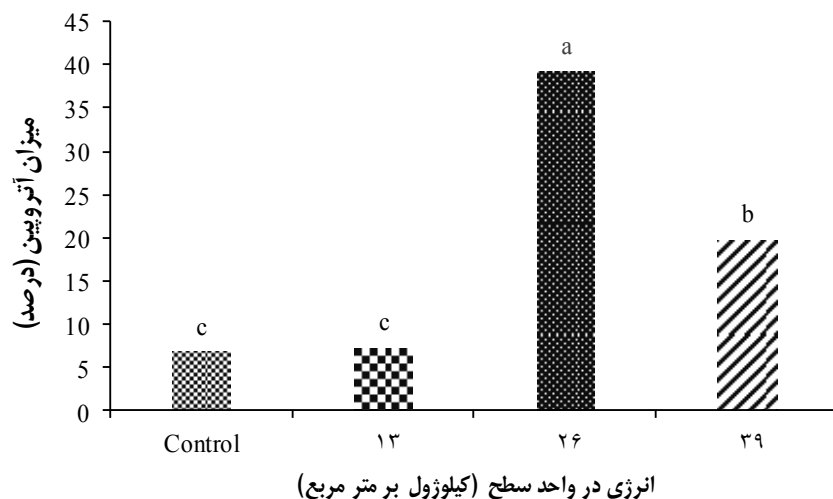
تولید آتروپین (۳۹/۲۶ درصد) در اثر تیمار ریشه‌های مویین با انرژی ۲۶ کیلوژول بر متر مربع اشعه UV-B به دست آمد که نسبت به ریشه‌های مویین شاهد (۶/۸۸ درصد) حدود ۵/۷ برابر افزایش نشان داد و حداقل میزان تولید آتروپین مربوط به ریشه‌های مویین شاهد بود (شکل ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف اشعه UV-B بر تولید آلکالوئید آتروپین در ریشه‌های مویین شایبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان آتروپین	میانگین مربعات
UV-B	۳	۶۸۹/۷۲**	
اشتباه آزمایشی	۸	۲/۸۲	
ضریب تغییرات (درصد)		۹/۱۵	

** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

تأثیر اشعه UV-B بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی: نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف نور UV-B بر

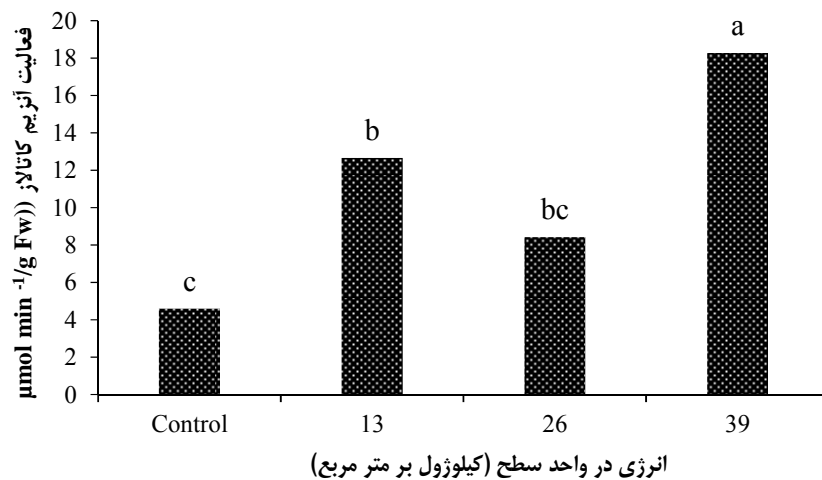


شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف اشعه UV-B بر میزان تولید آلکالوئید آتروپین در ریشه‌های مویین شایبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد.

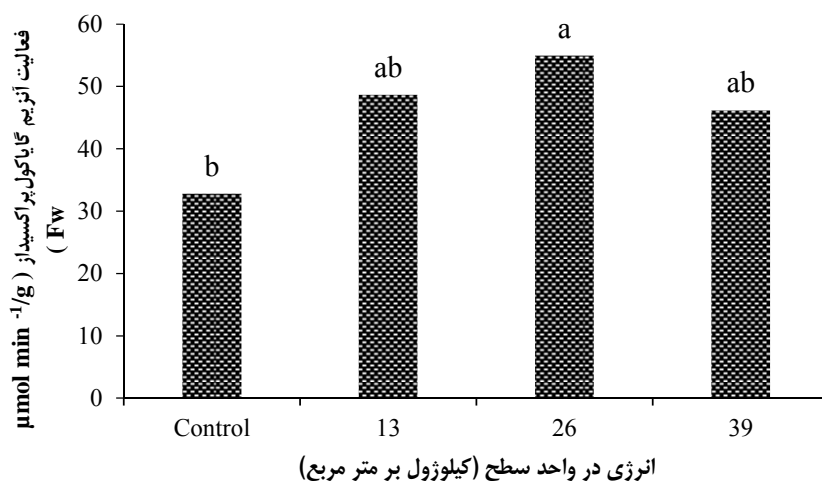
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف نور UV-B بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین شایبک

میانگین مربعات				منابع تغییرات
آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز	درجه آزادی	
۴۱/۹۶**	۲۶۱/۳۴**	۱۰۳/۱۹**	۳	UV-B
۲/۴۵	۲۲/۱۹	۲/۵۵	۸	اشتباه آزمایشی
۱۶/۲۷	۱۰/۳۱	۱۴/۵۲		ضریب تغییرات (درصد)

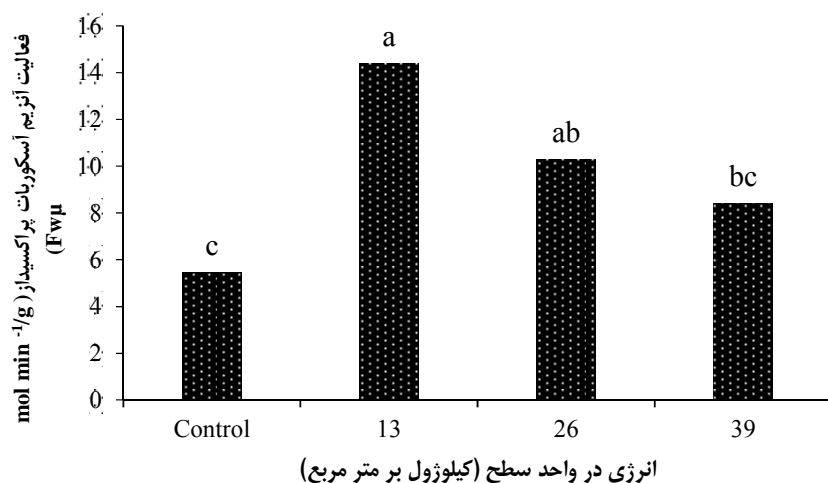
** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف UV-B بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌های مویین شایبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



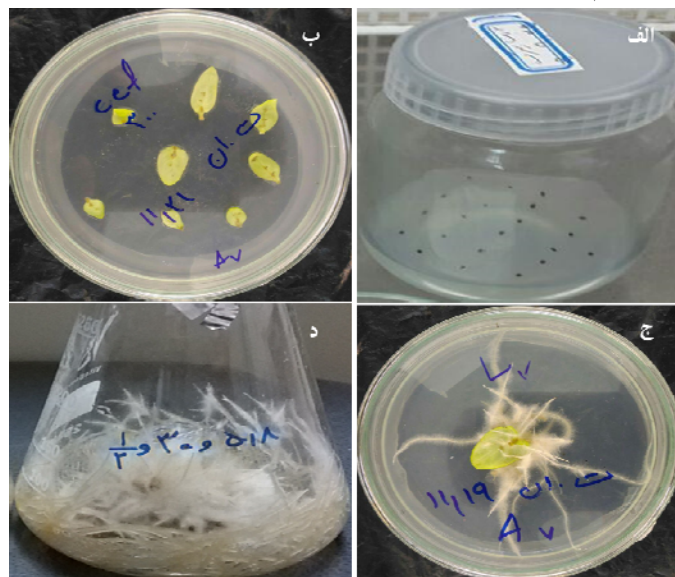
شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف UV-B بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ریشه‌های مویین شایبک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف UV-B بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریشه‌های موین شایبیک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

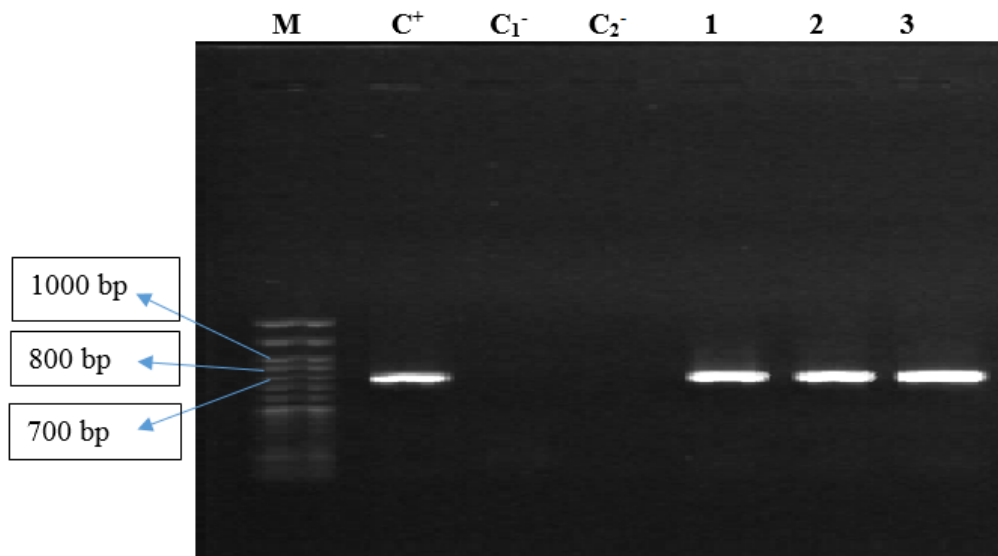
تواند حاکی از تراریخت شدن ریزنمونه‌های گیاهی باشد (شکل ۷). همچنین ریشه‌های موین تولید شده از نظر مورفولوژی خصوصیتی از قبیل رشد سریع، انشعابات فرعی زیاد در محیط فاقد هورمون را از خود بروز دادند و براحتی از ریشه‌های معمولی قابل تشخیص بودند.

تایید تراریختی ریشه‌های موین: پس از القای ریشه موین از کوتیلدون گیاه شایبیک برای تایید تراریختی آن از PCR استفاده گردید (شکل ۶ الف تا د). واکنش زنجیره ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rol B* منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۷۸۰ bp گردید که وجود باندهای درخشان از ژن *rol B* در ژنوم ریشه‌های موین می‌



شکل ۶- القای ریشه موین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی گیاه شایبیک

الف) بذور شایبیک کشت شده در محیط MS جامد (ب) ریزنمونه‌های کوتیلدونی تلقیح شده با سویه A7 آگروباکتریوم ریزوژن (ج) ظهور ریشه‌های موین از ریزنمونه کوتیلدونی (د) رشد ریشه‌های موین در محیط مایع 1/2MS



شکل ۷ - آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تایید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های تراریخت شایبک. M: DNA مارکر 1kb (Fermentase), C⁺: باکتری آگروباکتریوم سویه A7 به عنوان کنترل مثبت، C₁⁻: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی اول، C₂⁻: واکنش PCR بدون الگوی DNA به عنوان کنترل منفی دوم، لاین ۱ تا ۳: ریشه‌های موبین القا شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای توسط سویه A7 آگروباکتریوم رایزوزنز.

بحث

پاسخهای دفاعی و شرکت در انتقال درون‌سلولی و برون‌سلولی بافت‌های گیاهی، تأثیر خود را اعمال می‌کنند (۸). مطالعات نشان داده است که پرتوهای فرابنفش باعث فعالیت آنزیم PAL می‌شود، که آنزیم کلیدی بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است که عمل اصلی آن دامینه کردن L- فنیل آلانین و تولید ترانس سینامیک اسید است که به عنوان پیش ماده در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مختلف می‌باشد (۳۱). به طور کلی، اشعه UV-B می‌تواند از طریق آسیب رساندن به DNA، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فعال کردن مسیرهای سیگنال‌دهی در گیاه و القای بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای مختلف بیوسنتزی، باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شود (۲۴ و ۳۳). Wang و همکاران تولید تانیشیون و کریپتوتانیشیون را در کشت ریشه‌های موبین گیاه *Salvia miltiorrhiza* تحت تیمار UV-B بررسی کردند. نتایج نشان داد که سطوح مختلف UV-B تولید هردو ماده را افزایش داده است (۳۰). برای تایید تاریختگی باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز با انتقال قطعه T-DNA حاوی ژن ریشه زایی به سلولهای گیاهی آنها را تراریخت می‌نماید

علت اصلی کاهش وزن تر این است که اشعه UV-B از تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند. کاهش تقسیم سلولی به دلیل اکسیداسیون توپولین‌ها تحت تأثیر اشعه UV است که باعث تأخیر در تشکیل میکروتوبول‌ها و کاهش میزان تقسیم می‌شود و همچنین اشعه UV مانع از رونویسی پروتئین‌های هیستون شده و بدین طریق مانع تقسیم سلولی می‌گردد (۱۰). یکی از دلایل کاهش رشد ریشه در تیمار با UV-B نیز، اختلال در بیوسنتز و انتقال تنظیم‌کننده‌های رشد مانند IAA می‌باشد که این اختلال در انتقال هورمون‌ها رشد طولی ریشه را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (۹). مطالعات زیادی نشان داده است که UV-B از طریق کاهش فتوسنتز، کاهش سنتز پروتئین، اختلال در عمل کلروپلاست و آسیب به DNA، باعث کاهش رشد و نمو و کاهش بیوماس می‌شود (۶).

در پژوهش حاضر، سطوح مختلف اشعه UV-B به عنوان یک محرک غیرزیستی، میزان تولید آتروپین را به طور موثری تحت تأثیر قرار داد. محرکها عمدتاً با القای

اکسیدان‌ها مکانیسم‌های حفاظتی خاصی دارند که مولکولها و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان از آن جمله می‌باشند. آنتی‌اکسیدانها به ۳ گروه کلی تقسیم‌بندی می‌شوند: ترکیبات غشائی و محلول در چربی مثل آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها، ترکیبات قابل حل در آب مثل آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانینها و آنزیمهای نظیر سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون رداکتاز. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، یکی از جاروب‌کننده‌های اصلی O_2^- می‌باشد و عمل آنزیمی آن منجر به تولید H_2O_2 و O_2 می‌گردد. کاتالاز نیز یکی از انواع پراکسیدازها است که شکستن H_2O_2 را کاتالیز می‌نماید. کاتالاز که ظاهراً در کلروپلاست وجود ندارد H_2O_2 را به آب و مولکول O_2 می‌شکند درحالی‌که پراکسیدازها، H_2O_2 را با اکسید نمودن یک سوبسترای همراه نظیر ترکیبات فنلی و یا سایر آنتی‌اکسیدانها نظیر آسکوربات تجزیه می‌کنند (۲۴ و ۳۲).

Agrawal و Takshak بیوماس کل، تولید ترکیبات آلکالوئیدی و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی را در گیاه *Coleus forskohlii* تحت تأثیر اشعه UV-B مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که سطوح مختلف UV-B میزان بیوماس کل را کاهش اما میزان تولید ترکیبات آلکالوئیدی و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده است (۲۶). مطالعات نشان داده است که تراریختی توسط آگروباکتریوم سبب افزایش آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی و فعال شدن سیستم‌های دفاعی می‌شود. افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی ممکن است به دلیل تحریک برخی از ژنهای مربوط به دفاع در برابر عوامل خارجی همانند ویروسها یا ویروئیدها باشد (۲۹).

در مطالعه حاضر که میزان آتروپین در تیمار UV-B با شدت ۲۶ کیلو ژول بر متر مربع باعث افزایش میزان آتروپین در عصاره گردید که نسبت به گیاه شاهد به ۸ برابر رسیده بود و ۴۰ درصد مقدار عصاره را تشکیل می‌داد. گرچه نورفرانفش باعث ایجاد تنش در گیاه شد و افزایش فعالیت

(۲۷). در مطالعه حاضر تراریختی ریزنمونه کوتیلدون گیاه شایبک و ایجاد ریشه‌های موین با آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A7 با انتقال ژن *rol* صورت گرفت. اگرچه رشد پلاژیوتریپیک (ورین‌گرا، سوگرانی به صورت انشعابات افقی) سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت فاقد هورمون، معرف ریشه‌های موین مورد مطالعه بود (۱۴). با توجه به اینکه ریشه‌های موین در واکشت‌های مختلف در محیط کشت جامد و همچنین در محیط کشت مایع بدون آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم فاقد هر گونه آلودگی آگروباکتریوم بودند، لذا احتمال حضور باکتری در فضاها بین سلولی تقریباً صفر بود. با این حال بررسی ماهیت تراریخته آنها توسط تکنیک PCR انجام شد و تکثیر قطعه ۷۸۰ جفت بازی مربوط به ژن *rolB* بیانگر تراریخت بودن گیاهان مورد نظر بود. اخیراً مشخص شده است که ژنهای *rol* نقش فعال‌کنندگی در تولید متابولیت‌های ثانویه در خانواده‌های مختلف از جمله سولاناسه داشته به نحوی که در بعضی موارد، تأثیر فعال‌کنندگی یک تک ژن *rol* برای غلبه بر کمبود تولید متابولیت‌های ثانویه در سلولهای گیاهی کشت شده کافی بوده است (۳۲).

اشعه UV-B به طور موقت باعث تحریک تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود، ولی بلافاصله پس از برقراری مقاومت القایی و ارسال هشدارهای لازم برای برقراری مقاومت سیستمیک، خود به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی را در سلولهای گیاهی فعال و باعث حذف رادیکالهای آزاد می‌شود (۲۵). اشعه UV-B منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) شده و در نتیجه باعث سنتز سینامیک اسید و فعال شدن مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌گردد که از طریق افزایش میزان ترکیبات فنلی باعث حذف رادیکالهای آزاد می‌شود (۴). اشعه UV-B پاسخ‌های حفاظتی (فعال کردن آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی) در داخل گیاهان تولید نموده و از طریق حذف رادیکالهای آزاد اکسیژن بافتهای گیاهی را محافظت می‌نماید (۷). گیاهان برای مقابله با این

در سطح آزمایشگاهی چشم انداز خوبی برای مطالعات تجاری این ماده از طریق کشت ریشه موپین ترسیم نماید.

آنزیمهای آنتی اکسیدانی گواه این حقیقت است ولی با افزایش چندین برابری آتروپین باعث شد که نتایج حاضر

منابع

- 1- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 105: 121-126.
- 2- Bischof, K., Peralta, G., Kräbs, G., Van De Poll, W.H., Pérez-Lloréns, J.L. and Breeman, A.M. 2002. Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of Ulva communities from southern Spain. Journal of experimental botany. 53(379): 2411-2421.
- 3- Booi-James, I.S., Dube, S.K., Jansen, M.A., Edelman, M. and Mattoo, A.K. 2000. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis mutants* altered in phenolic metabolism. Plant Physiology. 124(3): 1275-1284.
- 4- Chang, A., Lim, M.H., Lee, S.W., Robb, E.J. and Nazar, R.N. 2008. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. Journal of Biological Chemistry. 283(48): 33591-33601.
- 5- Dechaux, C. and Boitel-Conti, M. 2005. A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 47(1): 101-107.
- 6- Frohnmeyer, H. and Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. Plant physiology. 133(4): 1420-1428.
- 7- Giordano, C.V., Mori, T., Sala, O.E., Scopel, A.L., Caldwell, M.M. and Ballaré, C.L. 2003. Functional acclimation to solar UV-B radiation in *Gunnera magellanica*, a native plant species of southernmost Patagonia. Plant, Cell & Environment. 26(12): 2027-2036.
- 8- Goel, M.K., Mehrotra, S. and Kukreja, A.K. 2011. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. Applied biochemistry and biotechnology. 165(5-6): 1342-1355.
- 9- Hassan, I.A., Basahi, J.M. and Kadi, M.W. 2012. Physiological and biochemical impairment in bean plants due to supplementary ultraviolet radiation and water stress. Possible protective roles of secondary metabolites. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 6: 552- 563.
- 10- Hopkins, L., Bond, M.A. and Tobin, A.K. 2002. Ultraviolet-B radiation reduces the rates of cell division and elongation in the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L. Cv Maris Huntsman). Plant, Cell and Environment. 25(5): 617-624.
- 11- 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.
- 12- Kang, H.M. and Saltveit, M.E. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum. 115(4): 571-576.
- 13- Khan, S., Qureshi, M.I., Alam, T. and Abdin, M.Z. 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.
- 14- Króllicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafrank, J. and Łojkowska, E. 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science, 160(2), 259-264.
- 15- Landry, L.G., Chapple, C.C. and Last, R.L. 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. Plant physiology. 109(4): 1159-1166.
- 16- Liu, Q., Callaghan, T.V. and Zuo, Y. 2004. Effects of elevated solar UV-B radiation from ozone depletion on terrestrial ecosystems. Journal of Mountain science. 1(3): 276-288.
- 17- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science. 7(9): 405-410.
- 18- 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.
- 19- Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L. and Mirjalili, M.H. 2008. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules. 13(8): 1722-1742.
- 20- Paul, N.D. and Gwynn-Jones, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. Trends in Ecology & Evolution. 18(1): 48-55.
- 21- Rao, M.V., Paliyath, G. and Ormrod, D.P. 1996. Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant physiology. 110(1): 125-136.
- 22- Roy, S., Sen, C.K. and Hänninen, O. 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere. 32(12): 2305-2315.
- 23- Santos, I., Almeida, J. and Salema, R. 1999. The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves. Canadian journal of botany. 77(1): 70-76.

- 24-Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M.A.K., Zrenner, R., Winkler, J. B. and Krumbein, A. 2012. UV-B-induced secondary plant metabolites-potential benefits for plant and human health. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31(3): 229-240.
- 25-Takshak, S. and Agrawal, S.B. 2014. Effect of ultraviolet-B radiation on biomass production, lipid peroxidation, reactive oxygen species, and antioxidants in *Withania somnifera*. *Biologia plantarum*. 58(2):328-334.
- 26-Takshak, S. and Agrawal, S. B. (2015). Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 124-138.
- 27-Tomilov, A., Tomilova, N. and Yoder, J.I. 2007. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic-plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. *Planta*, 225: 1059-1071.
- 28-Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2: 243-253.
- 29-Victor and. Zhuravlev, Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene on rhabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures, *Planta Med*. 2005. 221: 471-478.
- 30-Wang, C. H., Zheng, L. P., Tian, H. and Wang, J. W. 2016. Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 93-100.
- 31-Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y. and Tan, R.X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*. 15(4): 351-358.
- 32-Yang, C., Chen, M., Zeng, L., Zhang, L., Liu, X., Lan, X. and Liao, Z. 2011. Improvement of Tropane alkaloids production in hairy root cultures of '*Atropa belladonna*' by overexpressing pmt and h6h genes. *Plant omics*, 4(1), 29-33.
- 33-Zhang, W.J. and Björn, L.O. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*. 80(4): 207-218.

Study on UV-B irradiation impact on atropine content and antioxidant enzymes activity in *Atropa (Atropa belladonna L.)* plant hairy roots

Karjo AjirluB. and Fattahi M.

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

Abstract

Atropa Belladonna L. is the most important medicinal plant of Solanaceae family, due to important commercial sources of atropine and scopolamine as tropane alkaloids. Applications of hairy root cultures is advised because of their special properties such as fast growth, short doubling time, ease of maintenance, and ability to synthesize and continuous production of a range of chemical compounds. Effects of ozone depletion and UV irradiation have been studied by most of investigators. In the present study, the effect of different levels of UV-B irradiation were studied on atropine production and activity of some antioxidant enzymes. UV-B irradiation during 3 days were treated for 4, 8 and 12 min that was equal with 13, 26 and 39 kJ/m^2 respectively. Results showed that increase of UV-B leading to decrease hairy roots dry weight. This irradiation increased atropine content in comparison of control treat and the highest were recorded in 26 kJ/m^2 . Activity of antioxidant enzymes including catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase was also elevated in treated hairy roots rather than of the control at 0.01% of probability. Based on obtained results in this work UV-B irradiation can be considered as one of useful methods for Atropine and antioxidant enzymes in *A. belladonna* hairy roots.

Keywords: Atropine, antioxidant enzymes, UV-B irradiation, *Atropa*, hairy roots