The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Effect of Biotic Elicitors on Tropan Alkaloids Production in Hairy Roots Culture of Datura (*Datura innoxia*)

Ahmad Sharifi[1], Mahboobeh Yazdi[2], Sara Khosravinia[3], Asma Zahedi[4], Mahdiyeh Kharrazi[5], Azadeh Khadem[6]✉

1. Horticulture Biotechnology Research Group, Department of Industrial Biotechnology, Khorasan Razavi branch of Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran. E-mail: ahmadsharifi66@yahoo.com
2. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. E-mail: mahboobehyazdi@yahoo.com
3. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. E-mail: khosravinia.sara@yahoo.com
4. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. E-mail: az.zahedi@yahoo.com
5. Horticulture Biotechnology Research Group, Department of Industrial Biotechnology, Khorasan Razavi branch of Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran. E-mail: ma_kh230@yahoo.com
6. Corresponding Author, Horticulture Biotechnology Research Group, Department of Industrial Biotechnology, Khorasan Razavi branch of Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran. E-mail: azadeh.khadem@jdm.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 21 November 2023

Received in revised form: 7 July 2024

Accepted: 12 July 2023

Published online: Atumn 2024

Keywords:

Datura,

Elicitor,

Hairy Root,

Hyoscyamine,

Scopolamine.

ABSTRACT

Hairy root culture of medicinal plants is a promising method for producing herbal medicinal compounds. This study focused on *Datura innoxia*, a plant known for its use in treating various diseases, with the goal of cultivating its hairy roots to produce the alkaloids hyoscyamine and scopolamine. In addition, the research aimed to explore the potential for enhancing the production of these medicinal compounds using biotic elicitors, including methyl jasmonate, yeast extract, and salicylic acid. The investigation into the effects of these different elicitors on the growth rate and alkaloid production in Datura hairy roots yielded significant findings. Treatment with methyl jasmonate did not alter the growth rate of the hairy roots but resulted in a 30% increase in alkaloid production compared to the control. On the other hand, yeast extract treatment did not change alkaloid production after 48 hours. However, the application of salicylic acid led to a notable increase in alkaloid levels. Overall, the results demonstrated that the use of elicitors is a crucial approach to enhance alkaloid production in hairy root cultures. These findings suggest that application of various elicitors in hairy root culture can be an effective strategy for maximizing the production of valuable medicinal compounds. Thus, using biotic elicitors like methyl jasmonate and salicylic acid offers a viable method to boost the yield of important alkaloids in *Datura innoxia*, making hairy root culture a highly effective tool in the production of medicinal plant compounds.

Cite this article: Sharifi, A., Yazdi, M., Khosravinia, S., Zahedi, A., Kharrazi, M. & Khadem, A. (2024). Effect of Biotic Elicitors on Tropan Alkaloids Production in Hairy Roots Culture of Datura (*Datura innoxia*). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (3), 425-438. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.368336.2133

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.368336.2133

Extended Abstract

Introduction

Hairy root culture, a promising technique in plant biotechnology, has garnered significant interest in recent years for producing herbal medicinal compounds. Datura, known for its therapeutic potential in treating various diseases, particularly cancer and digestive system issues, was the focus of this research. This study aimed to

optimize the cultivation conditions of *Datura innoxia* hairy roots to enhance the production of the alkaloids hyoscyamine and scopolamine.

Material and Methods

To conduct this experiment, *Datura innoxia* seeds were first surface-sterilized and cultivated in MS medium. Leaf explants from sterile seedlings were then co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* strains A4, 15834, and MSU in LB liquid medium. Induced roots, approximately 2 to 3 cm in length, were excised and transferred to B5 liquid medium on a shaker at 90 rpm in the dark. After two months, the rate and stability of root growth were assessed. The bacterial species were confirmed by amplifying the *rol*C gene, located in the T-DNA region of the hairy root-inducing plasmid, using PCR with specific primers. The effects of different elicitors—methyl jasmonate, salicylic acid, and yeast extract—on the growth and alkaloid production were investigated. Preliminary identification of tropane alkaloids in the samples was done using Dragendorff reagent. The alkaloid content in each sample was carefully measured using spectrophotometry. To enhance accuracy in quantifying alkaloids across different treatments, HPLC analysis was also performed on the samples with the highest alkaloid content.

Result and Discussion

The study on the effect of methyl jasmonate on the growth rate and alkaloid production revealed that methyl jasmonate effectively enhanced alkaloid production, increasing it by 30% compared to the control. Salicylic acid and yeast extract did not significantly affect the growth rate of hairy roots, as there was no substantial difference in the dry weight of hairy roots across treatments. However, alkaloid production varied significantly between treatments. Yeast extract did not change alkaloid content after 48 hours compared to the control. In contrast, salicylic acid treatment resulted in a significant increase in alkaloid content after 48 hours. These findings indicate that elicitors can influence tropane alkaloid production in *Datura* hairy roots, but their effectiveness depends on optimization alongside other environmental factors. Additionally, HPLC analysis showed a significant increase in hyoscyamine content with methyl jasmonate treatment, whereas the increase in scopolamine was not significant.

Conclusion

The results of this experiment demonstrated that adding an elicitor as a stimulating factor enhances tropane alkaloid production in *Datura* hairy roots. Specifically, methyl jasmonate increased alkaloid production by 30% compared to the control treatment.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۳

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

اثر محرک‌های زیستی بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های مویین گیاه داتوره (*Datura innoxia*)

احمد شریفی[۱] | محبوبه یزدی[۲] | سارا خسروی نیا [۳]| اسما زاهدی[۴]| سیده مهدیه خرازی[۵]| آزاده خادم[۶]✉

۱.گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه: ahmadsharifi66@yahoo.com

۲. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: mahboobehyazdi@yahoo.com

۳. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: khosravinia.sara@yahoo.com

۴. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: az.zahedi@yahoo.com

۵. گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه: ma_kh230@yahoo.com

۶. نویسنده مسئول، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه:azadeh.khadem@jdm.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۲

تاریخ انتشار: پاییز ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:

اسکوپولامین، داتوره، ریشه مویین، محرک، هیوسیامین.

چکیده

یکی از روش‌هایی که به منظور تولید ترکیبات دارویی گیاهی مورد توجه قرار گرفته است، کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی است. گیاه داتوره (*Datura innoxia*) از گذشته تا کنون در درمان بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. بدین منظور پژوهش حاضر با هدف کشت ریشه‌های مویین داتوره به منظور تولید آلکالوئیدهای تروپانی شامل هیوسیامین و اسکوپولامین و بررسی امکان افزایش تولید این ترکیبات دارویی بوسیله کاربرد محرک‌های زیستی متیل جاسمونات، عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید انجام شد. بررسی اثر محرک‌های مختلف بر میزان رشد و تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین نشان داد که تیمار ریشه‌های مویین با محرک متیل جاسمونات در میزان رشد آنها تغییری ایجاد نکرد اما سبب افزایش ۳۰ درصدی میزان تولید آلکالوئیدها نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین میزان تولید آلکالوئیدها در تیمار ریشه‌های مویین با محرک عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت نسبت به شاهد تغییری نداشت اما کاربرد محرک سالیسیلیک اسید موجب افزایش چشمگیر میزان تولید هیوسیامین در ریشه‌های مویین شد. در مجموع این نتایج بیانگر آن است که کاربرد محرک‌های زیستی یکی از راهکارهای مهم به منظور افزایش میزان تولید ترکیبات آلکالوئیدی در کشت ریشه‌های مویین است. همچنین،کشت ریشه‌های مویین همراه با استفاده از محرک‌های مختلف می‌تواند به عنوان ابزاری مؤثر جهت تولید حداکثری ترکیبات دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

استناد: شریفی، احمد؛ یزدی، محبوبه؛ خسروی نیا، سارا؛ زاهدی، اسما؛ خرازی، سیده مهدیه و خادم، آزاده (۱۴۰۳). اثر محرک‌های زیستی بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه‌های مویین گیاه داتوره (*Datura innoxia*). *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۳)، ۴۳۸-۴۲۵. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.368336.2133

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.368336.2133

مقدمه

داتوره گیاهی یکساله از تیره سیب‌زمینی ، با ساقه‌ای استوانه‌ای شکل، برگ‌های متناوب وگل‌های شیپوری شکل است. میوهٔ آن کپسول بیضی شکل و خاردار است. بذرها به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای است. داتوره بیش از ۵۰ نوع تروپان آلکالوئید تولید می‌کند و به همین دلیل یکی از گیاهان دارویی ارزشمند با استفاده‌های متعدد در طب سنتی به‌شمار می‌رود. ترکیبات مؤثره این گیاه دارای آثار پاراسمپاتیک (مشابه دستگاه عصبی) و بیهوش‌کنندگی هستند، ازاین‌رو از برخی از آن‌ها مانند هیوسیامین در ایست قلبی و کندکاری سینوس‌های قلب و قبل از بیهوشی برای کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد استفاده می‌شود. اسکوپولامین به عنوان مهم‌ترین ترکیب دارویی شناخته شده در این گیاه در درمان سرطان و کاهش اسپاسم عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش استفاده می‌شود (Nourazar, 2017).

گیاهان دارویی در طول دوره رشدی خود با تغییرات گسترده شرایط محیطی مواجه هستند. از آن‌جاکه ارتباط تنگاتنگی میان این تغییرات و عوامل متعدد ژنتیکی و بیوشیمیایی وجود دارد، لذا اثر هریک از این تغییرات بر میزان رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه آن متفاوت خواهد بود. بنابراین، دستیابی به راهکارهایی به‌منظور جلوگیری از نوسانات محیطی در طول رشد گیاه، به‌عبارت دیگر پرورش گیاه در شرایط محیطی کنترل‌شده، کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه تولیدشده را افزایش خواهد داد (Figueiredo *et al*., 2008). در میان فناوری‌های نوین به منظور افزایش تولید داروهای گیاهی، کشت ریشه‌های مویین با استفاده از ناقل طبیعی*Agrobacterium rhizogenes*، رویکردی نسبتا جدید در بیوتکنولوژی گیاهی و در شرایط آزمایشگاهی است و در سال‌های اخیر به منظور تولید ترکیبات دارویی گیاهی توجه رو به افزایشی داشته است. گیاه داتوره دارای دو گونه دارویی بسیار مهم *Datura stramonium* و *Datura innoxia*[1] بوده که از گذشته تا کنون در درمان بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان و مشکلات سیستم گوارشی مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو، این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط تولید آلکالوئیدهای تروپانی شامل هیوسیامین و اسکوپولامین در کشت ریشه‌های مویین گیاه داتوره و افزایش میزان تولید این آلکالوئیدها با کاربرد تیمارهای مختلف محرک‌های زیستی انجام شد.

پیشینه پژوهش

امروزه فن‌آوری کشت بافت به‌دلیل دارا بودن مزایای مهمی همچون افزایش میزان تولید و تولید پایه‌های عاری از ویروس، راهکاری مؤثر در راستای تکثیر و اصلاح گیاهان اقتصادی شناخته شده است. این فن‌آوری در گیاهان دارویی نیز به عنوان روشی برای تولید انواع متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، داروهای ضد سرطان، تانن‌ها و رزین‌ها مورد توجه است (Bourgaud *et al*., 2001). در این میان کشت ریشه‌های مویین، رویکرد مؤثر علم بیوتکنولوژی گیاهی در شرایط آزمایشگاهی است. کاربرد ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آنها است. ریشه‌های مویین بر خلاف سلول‌های موجود در کالوس و سوسپانسیون سلولی کاملا تمایز یافته بوده و عمدتا توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاه مادری را دارا می‌باشند (Hamill & Lidgett. 2020; *Liu et al*., 1999). با این حال معرفی کشت ریشه‌های مویین به عنوان روشی اقتصادی در جهت تولید ترکیبات دارویی، نیازمند توسعه روش‌هایی جهت افزایش بازده تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین است. تاکنون شیوه‌های متعددی برای افزایش بازده تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت توسعه یافته است که نشان می‌دهد افزایش تولید ترکیبات دارویی در شرایط کشت بافت نیز تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف قرار می‌گیرد. به‌عبارت دیگر حداکثر تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت نیازمند دست‌ورزی عوامل محیطی، بهینه‌سازی محیط کشت، افزودن پیش ماده‌ها و کاربرد محرک‌ها است (Mulabagal & Tsay, 2004). در پژوهش‌های پیشین نیز افزایش عملکرد تولید آلکالوئیدهای تروپانی بدنبال کاربرد محرک‌های زیستی مانند متیل

1*Datura innoxia*

جاسمونات و اسید سالیسیک گزارش شده است (Kang *et al*., 2004). همچنین Ghadermazi *et al*., (2017) گزارش کردند که القای محرک اسید سالیسیلیک، محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه‌های مویین تراریخته گیاه داتوره (*D.innoxia*) را افزایش داد ، به‌طوری که محرک سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سبب افزایش ۴/۳ برابری محتوای هیوسیامین در ریشه‌های مویین تراریخته نسبت به نمونه شاهد شد. علاوه‌بر این، در یک بررسی تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین گیاه شابیزک تحت تأثیر غلظت‌های غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به نمونه شاهد به طور چشمگیری افزایش یافت (Kheradmand Prouch *et al*., 2017).

با توجه به اهمیت دارویی گیاه داتوره و مزایای قابل توجه کشت ریشه‌های مویین در تولید انبوه ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی، به‌نظر می‌رسد که بهینه‌سازی تولید و شرایط رشد ریشه‌های مویین گیاه داتوره راهکاری مؤثر در زمینه افزایش تولید آلکالوئیدهای دارویی مهم مانند هیوسیامین و اسکوپولامین در این گیاه باشد. از این رو، این تحقیق با هدف بررسی امکان افزایش عملکرد تولید ترکیبات دارویی هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخته گیاه *D. innoxia* از طریق کاربرد محرک‌های زیستی انجام شد.

روش‌شناسی پژوهش

تهیه مواد گیاهی و تولید گیاهچه استریل جهت تهیه ریزنمونه

بذرهای گونهٔ *D. innoxia* از عرصه طبیعی شهرستان تفت استان یزد جمع‌آوری شد و در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد توسط کارشناسان گیاه‌شناسی آن پژوهشکده تعیین گونه شد. بذرها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، ابتدا بذرها سه ساعت جهت نرم شدن پوسته در آب خیسانده شدند سپس به مدت ۱ دقیقه با الکل ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد تیمار شدند. به دنبال آن بذرها سه مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل و درزیر هود استریل شسته شدند. بذرها در محیط کشت MS حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار (pH= ۵/۷) کشت شدند. سپس بذرها به منظور جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس منتقل شدند.

القای ریشه‌های مویین

به منظور هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگ گیاهچه‌های استریل، از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A4، 15834، و MSU در محیط کشت مایع LB استفاده شد. باکتری‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از رشد در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۱۰ دور در دقیقه (OD=1) با استفاده از سانتریفوژ رسوب داده شده و به محیط کشت MS دارای ۵۰ گرم در لیتر ساکارز با حجمی برابر با محیط کشت قبلی منتقل شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با OD معادل ۰/۸ تا ۱ به منظور هم‌کشتی استفاده شد. جهت هم‌کشتی، ریزنمونه‌های برگی استریل با استفاده از سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری و به روش نیشتر زدن با سوسپانسیون باکتری تلقیح شده و به صورت وارونه درون پتری‌های حاوی محیط کشت B5 جامد دارای ۷ گرم در لیتر آگار به همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکارز قرار گرفتند. عمل نیشتر زدن بیشتر در رگبرگ‌های اصلی انجام شد. سپس نمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و چرخه نوری ۱۶:۸ (تاریکی:روشنایی) منتقل شدند. پس از گذشت دو تا سه روز از زمان تلقیح به منظور حذف کامل باکتری، نمونه‌ها به محیط کشت مشابه حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. ریشه‌های القایی با طولی حدود دو تا سه سانتی‌متر قطع و به محیط کشت مایع B5 با pH=۵/۵ انتقال و بر روی شیکر با ۹۰ دور در دقیقه در تاریکی قرار داده شدند تا ضمن هوادهی به درون محیط کشت ، از تجمع مواد

۱*Atropa belladonna*

مضر ترشح شده در اطراف ریشه‌ها نیز جلوگیری شود. حدود دو ماه پس از رشد در این محیط، میزان و ثبات رشد ریشه‌ها بررسی شد (Khatodia & Biswas, 2014).

تأیید ماهیت تراریختی ریشه های مویین از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

تأیید گونه باکتری‌ها از طریق تکثیر ژن *rol*C به عنوان یکی از ژن‌های واقع در ناحیه T-DNA پلاسمید القاکننده ریشه مویین با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۱). شرایط دمایی PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۸ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ درجه سلسیوس ، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) بود. به منظور اطمینان یافتن از عدم حضور باکتری به همراه ریشه‌های مویین و تکثیر ژن *rol*C واقع در پلاسمید آن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن *virC* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن انجام شد (جدول ۱). واسرشت اولیه واکنش فوق در ۹۸ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ درجه سلسیوس ، ۳۰ ثانیه در ۶۶ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) صورت گرفت. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و پس از آشکارسازی باندها توسط دستگاه Gel document، حضور باند ۶۱۲ جفت بازی مربوط به ژن *rol*C و قطعه ۶۶۸ جفت بازی مربوط به ژن *vir*C بررسی شد (Moshtaghi, 2003)

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR جهت تأیید تراریخت بودن ریشه‌های مویین

ژن‌ها	توالی آغازگرها	دمای اتصال (سلسیوس)
rol C	Forward: 5'-CTCCTGACATCA AACTCGTC-3'	۵۲/۹
	Reverse: 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'	۵۳/۲
virC	Forward: 5'-CTCATCAGGCACGCTTG-3'	۵۱/۸
	Reverse: 5'-GCGGATGCTTCAAATGG-3'	۵۰/۱

افزودن محرک به کشت ریشه‌های مویین

جهت بررسی اثر محرک‌های مختلف بر رشد و تولید آلکالوئیدها، ابتدا ریشه‌های مویین درون محیط کشت مایع B5 به مدت ۳ هفته قرار گرفتند تا بیوماس کافی جهت اعمال تیمار و انجام آزمایشات به‌دست آید. طی این مدت، واکشت ریشه‌های مویین نیز انجام شد. با گذشت ۳ هفته از شروع کشت، تیمارهای مختلف به‌صورت زیر اعمال شد.

آزمایش اول با هدف بررسی اثر متیل جاسمونات انجام شد. با توجه به نتایج آزمایش‌های قبلی و گزارش‌های ارائه شده (Biondi *et al*., 2000)، ریشه‌ها به مدت ۷۲ ساعت با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات تیمار شده و سپس اثر آن بر رشد و میزان تولید آلکالوئید بررسی شد. آزمایش دوم نیز به منظور بررسی اثر سالیسیلیک اسید (SA) و عصاره مخمر انجام شد، به‌طوری‌که با گذشت ۳ هفته از شروع کشت، محرک سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی‌مولار و عصاره مخمر با غلظت یک گرم در لیتر به مدت ۴۸ ساعت به محیط کشت ریشه‌های مویین اضافه شد (Samet *et al*., 2012).

استخراج آلکالوئیدهای تروپانی

به منظور استخراج آلکالوئیدهای تروپانی،۵۰ میلی‌گرم از بافت ریشه‌های مویین در ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. سپس دو مرتبه بصورت پیاپی با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به میزان ۷۵۰ میکرولیتر شستشو داده شد. به مجموع فاز حلال جدا شده، ۵۰۰ میکرولیتر آمونیاک به همراه یک میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس نمونه با

۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز بالایی که شامل کلروفرم بود جدا شده و به آن ۴۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال اضافه شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، فاز اسیدی جدا شده و آنالیز مقدار ترکیبات مؤثره روی آن انجام شد (Berkov & Pavlov, 2004).

شناسایی مقدماتی آلکالوئیدهای تروپانی

به منظور شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی در نمونه‌ها از معرف رنگی Dragendorff استفاده شد. در صورت وجود آلکالوئیدهای تروپانی در نمونه‌ها، این ترکیبات با معرف Dragendorff واکنش داده و موجب تولید رسوب نارنجی رنگ خواهد شد. حضور و یا عدم حضور آلکالوئیدها بر اساس مشاهده رسوب ثبت شد (Kitamura *et al*., 1992).

شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

برای بررسی دقیق مقدار ترکیبات آلکالوئیدی در هر یک از نمونه‌ها، از سنجش اسپکتروفتومتری استفاده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف دو ترکیب اسکوپولامین و آتروپین مطابق جدول زیر تهیه شد (جدول ۲). در این آزمایش از استوک‌های ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسکوپولامین بوتیل کلراید و محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آتروپین شرکت سینا دارو استفاده شد.

جدول ۲. نحوه تهیه غلظت‌های مختلف از استاندارد

رقت‌های مختلف از استاندارد (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	**۱۰**	**۸**	**۶**	**۴**	**۲**	**۱**	**۰/۴**	**۰/۲**	**۰**
استوک ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) اسکوپولامین و آتروپین (میکرولیتر)	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۲/۵	۱	۰/۵	۰
HCl ۰/۱ نرمال (میکرولیتر)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۲/۵	۲۴	۲۴/۵	۲۵

به منظور شناسایی ترکیبات آلکالوئیدی، ۲۵ میکرولیتر از هریک از غلظت‌های مختلف محلول استاندارد جدا شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول Dragendorff رقیق به آن‌ها اضافه شد. سپس محلول‌های استاندارد کاملا مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. ۴۰ میکرولیتر اسید هیدروکلریک ۰/۱ نرمال به ۴۰ میکرولیتر از فاز بالایی محلول اضافه شده و بعد از مخلوط کردن در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانش گردید. نمونه‌های استاندارد در دو تکرار و نمونه‌های اصلی در ۳ تکرار انجام شد.

به منظور مقایسه نسبی نمونه‌ها از لحاظ میزان حضور آلکالوئیدها، پس از اضافه کردن معرف Dragendorff به نمونه‌ها و تشکیل رسوب نارنجی رنگ، فاز بالایی نمونه‌ها جدا شده و توسط دستگاه نانودراپ در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانش انجام شد. با توجه به اینکه آلکالوئیدها با ترکیبات موجود در معرف Dragendorff واکنش می‌دهند، فاز بالایی از رنگ کمتری برخوردار است. در نتیجه هر چه میزان آلکالوئیدهای موجود در نمونه کمتر باشد، عدد حاصل از خوانش نانودراپ بزرگتر خواهد بود (Kitamura *et al*., 1992).

اندازه گیری آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین با استفاده از آنالیز HPLC

به منظور افزایش دقت بررسی مقدار آلکالوئیدها در تیمارهای مختلف، برای نمونه‌های که دارای بیشترین مقدار آلکالوئید بودند، آنالیز HPLC نیز با استفاده از دستگاه مدل Technologies 1260 Infinity II Agilent انجام شد. از هر نمونه ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد و با فاز متحرک استونیتریل ۲۰ درصد و KH_2PO_4 ۵۰ میلی مولار (pH=3) و سرعت جریان

۱/۵ میلی لیتر در دقیقه از ستون ZORBAX-Eclipse plus C18 با ابعاد ۴/۶ ×۱۰ سانتی‌مترعبور داده شد و آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در طول موج ۲۱۰ نانومتر شناسایی شدند (Bahmanzadegan *et al*., 2009).

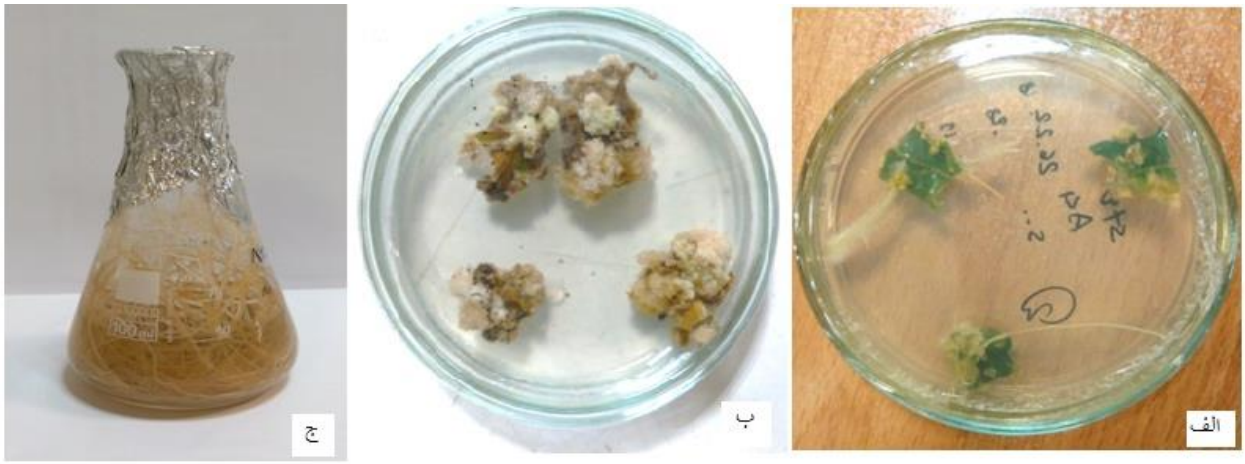
آنالیز آماری

تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری JMP نسخه ۸ و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد. همچنین، رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel انجام شد.

یافته‌های پژوهش

تولید ریشه‌های مویین تراریخته و تأیید تراریختگی آنها

دو هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ گیاهچه‌های استریل با سویه‌های A4 و MSU، ریشه‌های مویین از محل تلقیح ظاهر شدند. میزان القای ریشه از طریق هم‌کشتی با این دو سویه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته و حدود ۲۵ درصد از ریزنمونه‌ها را شامل شد. این در حالی است که مشاهدات حاصل از همکشتی نشان داد درصد ریشه دهی سویه ATCC 15834 بسیار کم و حدود ۴/۷۵ درصد بود، از سوی دیگر ریزنمونه های تلقیح شده با این سویه باکتری بسیار کالوسی شدند. ظهور ریشه‌های مویین تا حدود دو ماه پس از هم‌کشتی ادامه داشته و ریشه‌های القایی حالت کرکی و ظاهری منشعب داشتند. شکل ۱ نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه‌های مختلف باکتری *A.rhizogenes* را نشان می‌دهد.

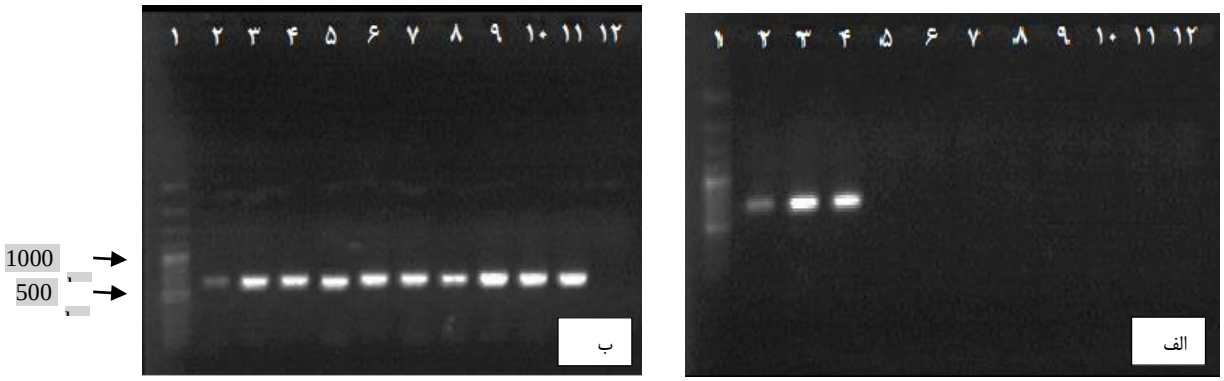


شکل ۱. نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های برگ با باکتری *A.rhizogenes* الف) سویه A4، ب) سویه ATCC 15834، ج) ریشه‌های مویین تراریخته پس از گذشت دو ماه از رشد درون محیط کشت مایع B5. (منبع: یافته‌های تحقیق)

هنگامی که اندازه ریشه های مویین ظاهر شده به حدود ۵ تا ۷ سانتی‌متر رسید این ریشه‌ها قطع شده و به محیط کشت مایع B5 انتقال یافتند. حجم ریشه‌های مویین تراریخته پس از یک ماه رشد درون محیط کشت مایع B5 به مقدار قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۱) و امکان بررسی ثبات و میزان رشد را فراهم آورد.

جهت تأیید تراریخته بودن ریشه‌های مویین، تکثیر اختصاصی ژن *rolC* با استفاده از واکنش PCR بر روی DNA استخراجی از ریشه‌های القایی انجام شد و مشاهده باند مربوط به این ژن نشان داد که انتقال ناحیه T-DNA به ژنوم ریشه‌های مویین موفقیت‌آمیز بوده و کلون ریشه مورد نظر از ماهیت تراریختی برخوردار است (شکل ۲). همچنین، با استفاده از انجام

واکنش PCR ژن *vir* و عدم مشاهده باند مربوط به این ژن، مشخص شد که ریشه‌های مویین دارای آلودگی باکتریایی نبوده و ناحیه T-DNA درون ژنوم ریشه‌های مویین تلفیق یافته است (شکل ۲).



شکل ۲. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *vir*C و *rol*C در ریشه‌های مویین تراریخته احتمالی. الف) ۱: سایز مارکر، ۲تا ۴: قطعه ۶۶۸ جفت بازی مربوط به ژن *vir*C در سویه‌های باکتری مورد استفاده، ۵ تا ۱۱: عدم تکثیر ژن *vir*C در DNAی استخراجی از ریشه‌های مویین، ۱۲: عدم تکثیر ژن *vir*C در شاهد حاوی آب مقطر. ب) ۱: سایز مارکر، ۲ تا ۴: قطعه ۶۱۲ جفت بازی مربوط به ژن *rol*C در سه سویه باکتری مورد استفاده، ۵ تا ۱۱: تکثیر ژن *rol*C در DNA استخراجی از ریشه‌های مویین، ۱۲: عدم تکثیر ژن *rol*C در شاهد حاوی آب مقطر. (منبع: یافته‌های تحقیق)

تأثیر محرک متیل جاسمونات بر رشد و تولید آلکالوئیدهای موجود در ریشه‌های مویین

بررسی اثر محرک متیل جاسمونات بر میزان رشد و تولید آلکالوئیدها نشان داد که کاربرد متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در افزایش میزان تولید ترکیبات آلکالوئیدی مؤثر است. به طوری که اعمال این تیمار موجب افزایش تولید آلکالوئیدها به میزان ۳۰ درصد نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۳).

جدول ۳. اثر کاربرد متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر بر میزان رشد و تولید آلکالوئید در ریشه‌های مویین

تیمارهای محرک	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	درصد آلکالوئید
متیل جاسمونات	۲/۴۸ ± ۰/۲۴	۰/۱۸ ± ۰/۰۱	۰/۷۳ ±۰/۰۴ *
شاهد	۲/۷۵ ± ۰/۵۵	۰/۱۹ ± ۰/۰۳	۰/۵۵ ± ۰/۰۴*
۴۸ ساعت سالیسیلیک اسید	۲/۰۷۹ ± ۰/۳۵ a	۰/۱۵۶ ± ۰/۰۳ a	۱/۵۶ ± ۰/۳ a
۴۸ ساعت عصاره مخمر	۲/۲۰۶ ± ۰/۵۴ a	۰/۱۶ ± ۰/۰۴ a	۱/۱۴ ±۰/۱۹ b
شاهد (فاقد محرک)	۲/۳۳۷ ±۰/۱۹ a	۰/۱۷۶ ±۰/۰۱ a	۱/۰۶ ± ۰/۱۱ b

* نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

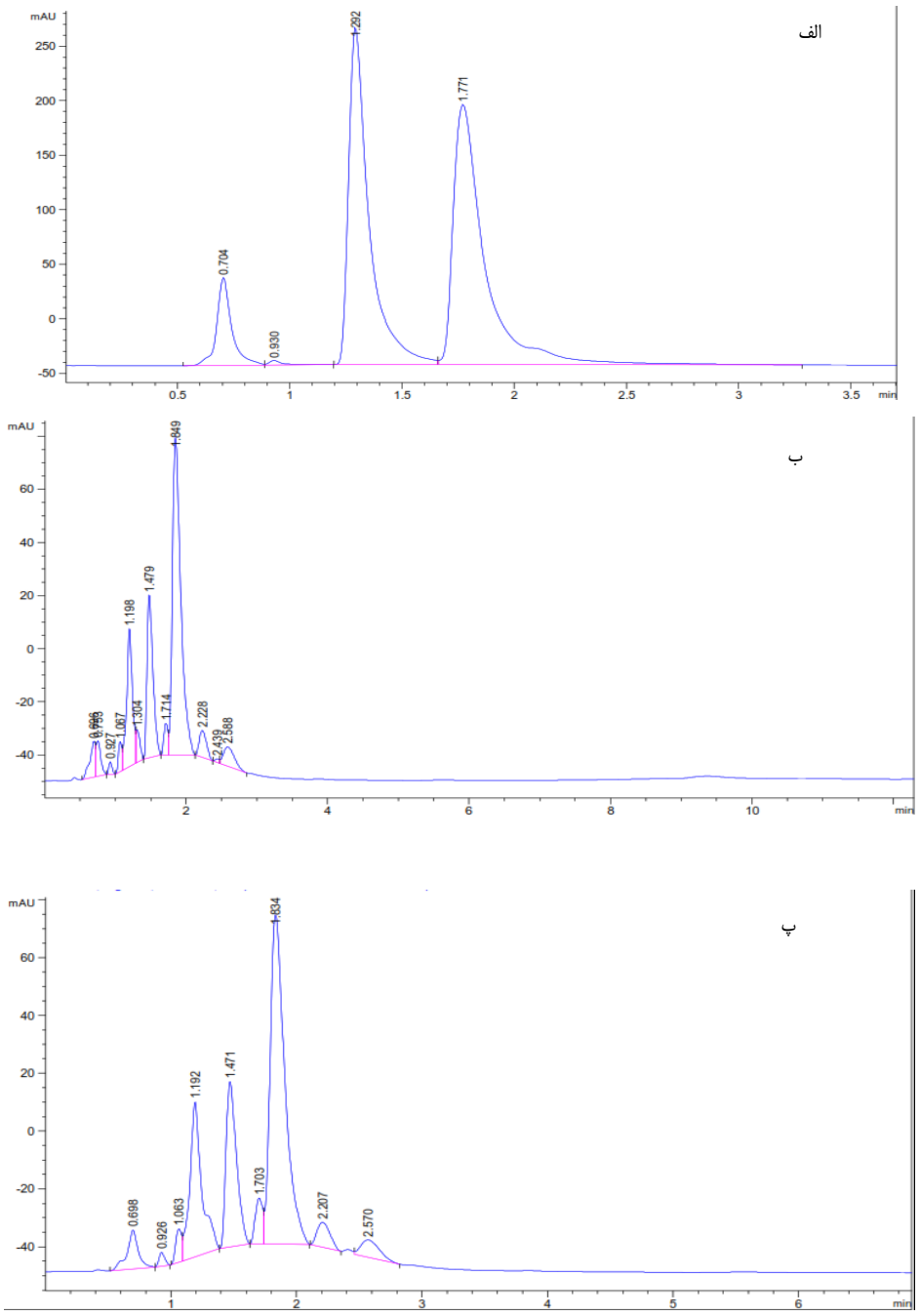
اثر محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر بر رشد و تولید آلکالوئیدهای موجود در ریشه‌های مویین

نتایج نشان داد که کاربرد محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر بر میزان رشد ریشه‌های مویین مؤثر نبود، به‌طوری که بین وزن خشک ریشه‌های مویین تیمارهای مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳).

بر خلاف میزان رشد ریشه‌های مویین، میزان تولید ترکیبات آلکالوئیدی در تیمارهای آزمایش تفاوت معنی‌داری داشت، به طوری که پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان اعمال تیمار سالیسیلیک اسید، مقدار آلکالوئید ۵۰ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۴).

اندازه‌گیری آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین توسط آنالیز HPLC

بر اساس نتایج حاصل از طیف جذبی آنالیز HPLC، منحنی استاندارد ترکیبات اسکوپولامین و هیوسیامین به ترتیب در دقیقه‌های ۱/۲۹ و ۱/۷۷ قابل مشاهده بود (شکل ۳).



شکل ۳. منحنی مربوط به طیف جذبی ترکیبات اسکوپولامین و هیوسیامین با استفاده از آنالیز HPLC. الف) استاندارد ترکیبات اسکوپولامین (دقیقه ۱/۲۹۲) و هیوسیامین (دقیقه ۱/۷۷۱)، ب) ریشه‌های مویین تیمار شده با متیل جاسمونات، پ) ریشه‌های مویین تیمار شده با سالیسیلیک اسید. (منبع: یافته‌های تحقیق)

نتایج HPLC نشان داد که مقدار آلکالوئید هیوسیامین در تیمار متیل جاسمونات نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشت (جدول ۴).

جدول ۴. درصد آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین در ریشه های مویین شاهد و تحت تیمار محرک‌های مختلف در داتوره

نمونه	میانگین درصد هیوسیامین
شاهد آزمایش متیل جاسمونات	۰/۲۷۵ ± ۰/۰۴ bc
متیل جاسمونات	۰/۳۶۲ ± ۰/۰۴ a
شاهد آزمایش سالیسیک اسید	۰/۲۴۰ ± ۰/۰۱ c
یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید	۰/۲۰۵ ± ۰/۰۰۸ c

بحث

ریشه‌های مویین تراریخته‌ای که در نتیجه تلقیح با باکتری به دست آمدند دارای ویژگی‌هایی همچون سرعت رشد بالا، ظاهری کرک مانند و منشعب و قادر به تولید کالوس بودند.تولید کالوس در این ریشه به دلیل وجود یک منبع داخلی از هورمون اکسین می‌باشد (Srivastava & Srivastava, 2007). در صورتی که ریشه‌های طبیعی در مقایسه با ریشه‌های مویین تراریخته از رشد و میزان انشعابات کمتری برخوردار بودند. نتایج نشان داد که ریشه‌های مویین از نظر نحوه رشد و خصوصیات مورفولوژیکی بدون تغییر باقی ماندند. ثبات رشدی ریشه‌های مویین گیاه داتوره در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (Farsi *et al*., 2005).

جاسمونات‌ها بطور طبیعی در مسیر انتقال پیام تنش‌های زیستی مانند وقوع زخم و یا حمله آفات و عوامل بیماری‌زا نقش دارند. در پی انتقال پیام تنش، گیاه سازوکار دفاعی خود مانند تولید متابولیت‌های ثانویه را فعال می‌سازد. به عبارتی دیگر، مسیر انتقال پیام از طریق جاسمونات‌ها، پیش‌نیاز بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان است، در نتیجه کاربرد خارجی این ترکیبات می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را به میزان بیشتری تحت تأثیر قرار دهد (Zhao *et al*., 2005). در یک تحقیق افزایش ۱/۵ برابری تولید ترکیبات اسکوپولامین و هیوسیامین از طریق افزودن محرک متیل جاسمونات به محیط کشت مایع ریشه‌های مویین داتوره (*Datura stramonium*) گزارش شد (*Sun et al., 2013*). گزارش‌های متعددی مبنی بر کاربرد جاسمونات‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. در بررسی اثر کاربرد دو محرک متیل جاسمونات (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و بنزوبیادیازول (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در کشت سوسپانسیون سلولی اسطوخودوس[1] به منظور تولید رزمارینیک اسید حداکثر مقدار تولید رزمارینیک اسید ۱۲ ساعت پس از افزودن ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌دست آمد که میزان تولید را تقریبا ۲/۴ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (Georgiev *et al*., 2007). همچنین، بررسی تأثیر محرک متیل جاسمونات (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) در تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه مویین گیاه شابیزک[2] نشان داد که تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های تحت تیمار این محرک در غلظت ۳۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش چشمگیری داشته است (Kheradmand Prouch *et al*., 2017).

نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد محرک‌ها در تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین گیاه داتوره مؤثر بوده است، اما نیاز است نوع و غلظت محرک و مدت زمان القای آن در کنار سایر عوامل محیطی دیگر بهینه‌سازی شود. در تحقیقی اثر غلظت‌های مختلف محرک‌های عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید در تجمع اسکوپولامین و هیوسیامین در ریشه‌های گیاه *D. metel* مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، ریشه‌های القا شده از ریزنمونه برگی به مدت ۴ هفته تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ گرم بر لیتر) و سالیسیلیک اسید (۰، ۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکرومول) قرار گرفتند.

1 *Lavandula vera*
2 *Atropa belladonna*

طبق نتایج این تحقیق، با افزایش غلظت محرک‌ها، تولید آلکالوئیدها افزایش یافت، بطوری‌که بیشترین مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین در تیمار ۵۰۰ میکرومول سالیسیلیک اسید (به ترتیب ۴/۳۵ و ۰/۲۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و در تیمار ۰/۷۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر (به ترتیب ۳/۱۷ و ۰/۱۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک) تولید شد. با افزایش غلظت عصاره مخمر تا ۰/۵ گرم بر لیتر شاخص رشدی و میزان تجمع آلکالوئید تروپان افزایش یافت، اما در غلظت ۰/۷۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر شاخص رشد کاهش و میزان تجمع آلکالوئید تروپان افزایش یافت. در میان غلظت‌های مختلف محرک‌هایی که استفاده شد، غلظت ۰/۷۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر بیشترین میزان تجمع اسکوپولامین و هیوسیامین را داشت که تقریبا ۲/۲ برابر بیش از این مقدار در تیمار شاهد بود (Ajungla *et al*., 2009).

کاربرد سالیسیلیک اسید در ریشه‌های مویین *Hyoscyamus reticulatus* L. شاخص رشد را در مقایسه با تیمار شاهد به مقدار اندکی کاهش داد اما میزان تجمع آلکالوئید تروپان را در ریشه افزایش داد. بیشترین میزان تجمع اسکوپولامین و هیوسیامین در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیک بود که حدود ۴ تا ۵/۵ برابر بیشتر از تیمار شاهد بود. پاسخ مثبت ریشه‌های کشت شده به محرک ممکن است به این دلیل باشد که این محرک‌ها به ویژه سالیسیلیک اسید به عنوان یک سیگنال کلیدی درونی در فعال‌سازی یک سری از پاسخ‌های دفاعی در گیاه مؤثر بوده است به‌طوری که گیاه در این شرایط توانایی تولید پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن را در گیاه، حتی بدون حضور پاتوژن دارا است (Moharrami *et al*., 2017).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که محرک‌های مختلف در تولید آلکالوئیدها از طریق کشت ریشه مویین گیاه داتوره تأثیر بسزایی دارند. به‌طوری‌که محرک متیل جاسمونات باعث افزایش ۳۰ درصدی میزان تولید آلکالوئیدها نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین، میزان تولید آلکالوئیدها در تیمار ریشه‌های مویین با محرک سالیسیلیک اسید به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش ۵۰ درصدی تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین شد. علاوه بر آن، بدلیل اثرات گسترده محرک‌ها بر مسیرهای زیستی مختلف در گیاهان، لازم است انواع محرک‌ها در کشت ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گیرد تا با انتخاب محرک مناسب، امکان افزایش تولید ترکیبات دارویی را در ریشه‌های مویین فراهم آورد.

منابع

خردمند پروچ، مریم.؛ شهریاری احمدی، فرج الله و مشتاقی، نسرین. (۱۳۹۶). تاثیر محرک متیل جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین تراریخت گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۹ (۳)، ۶۱-۷۴.

فارسی، محمد؛ مشتاقی، نسرین؛ شهریاری احمدی، فرج الله؛ گردان، حمید رضا و رئیسی، محمود. (۱۳۸۴). بررسی ثبات رشد و میزان آلکالوئیدهای ریشه های مویین تراریخت در گیاه داتوره. *علوم و صنایع کشاورزی*، ۱۹ (۲)، ۴۷-۵۶.

قادرمزی، سمیه؛ توحیدفر، مسعود و میری، سید مهدی. (۱۳۹۵). تولید ریشه‌های مویین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه دارویی تاتوره (*Datura innoxia* L.) و بررسی اثر محرک‌های زیستی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر محتوای آتروپین و اسکوپولامین. *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۱۶ (۱)، ۱۴۱-۱۵۶.

مشتاقی، نسرین. (۱۳۸۲). تولید ریشه مویین با استفاده از Agrobacterium rhizogenes در گیاه Datura stramonium و مقایسه میزان و ثبات رشد با ریشه‌های نرمال. (پایان نامه کارشناسی ارشد، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد).

نورآذر، مهرداد (۱۳۹۶). تاثیرات ترکیبات مختلف هورمونی و برخی القاکننده‌ها بر متابولیت‌های ثانویه در کالوس گیاه داتوره Datura metel. (پایان نامه کارشناسی ارشد، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی).

REFERENCES

Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B., & Nikam, T. D. (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.

Bahmanzadegan, J. A., Sefidkon, F., & Sonboli, A. (2009). Determination of hyoscyamine and scopolamine in four Hyoscyamus species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(1), 65-70.

Berkov, S., & Pavlov, A. (2004). A rapid densitometric method for the analysis of hyoscyamine and scopolamine in solanaceous plants and their transformed root cultures. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15(3), 141-145. https://doi.org/10.1002/pca.756.

Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K. M., Eeva, M., Agostani, S., & Bagni, N. (2000). Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Reports*, 19, 691-697. https://doi.org/10.1007/s002999900178.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3.

Farsi, M., Moshtaghi, N., Shahriari, F., Gordan, S., & Raeisi, M. (2005). Investigating on growth stability and alkaloids content of transformed hairy roots in *Datura stramonium*. *Agricultural Sciences and Technology*, 19(2), 47-56 (In Persian).

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226. https://doi.org/10.1002/ffj.1875.

Georgiev, M. I., Kuzeva, S. L., Pavlov, A. I., Kovacheva, E. G., & Ilieva, M. P. (2007). Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 301-304. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9214-5.

Ghadermazi, S., Tohidfar, M., & Miri, S. M. (2017). 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. *Journal of Medicinal Plant*, 16(1), 141-156. (In Persian).

Hamill, J. D., & Lidgett, A. J. (2020). Hairy root cultures-opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In: Doran, P.M., editor. *Hairy Roots*. CRC Press. 2-30. https://doi.org/10.1201/9780367810610.

Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y., & Dong, J. (2014). Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The Scientific World Journal*, 2014, 843764. https://doi.org/10.1155/2014/843764.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K., & 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. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.022.

Khatodia, S., & Biswas, K. (2014). A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using Agrobacterium rhizogenes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(5), 625-633.

Kheradmand Prouch, M., Shahriari Ahmadi, F., & Moshtaghi, N. (2017). The effect of methyljasmonate elicitor on tropan alkaloid production in hairy roots of *Atropa belladonna*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 9(3), 61-74. (In Persian).

Kitamura, Y., Sato, M., & Miura, H. (1992). Differences of atropine esterase activity between intact roots and cultured roots of various tropane alkaloid-producing plants. *Phytochemistry*, *31*(4), 1191-1194. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80258-G.

Liu, C. Z., Wang, Y. C., Zhao, B., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H. C., & Li, G. F. (1999). Development

of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35, 271-274. https://doi.org/10.1007/s11627-999-0091-0.

Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A., & Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, 104-111. https://doi.org/10.1007/s11627-017-9802-0.

Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48. https://doi.org/10.6703/IJASE.2004.2.(1).29.

Nourazar, M. (2017). *Effects of Different Hormonal Combinations and Elicitors on Secondary Metabolites in Callus of Datura metel* (M.Sc. dissertation, Mohaghegh Ardabili University, Ardabili). (In Persian).

Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (2000). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7, 95-99.

Samet, A. E., Piri, K., Kayhanfar, M., & Hasanloo, T. (2012). Influence of jasmonic acids, yeast extract and salicylic acid on growth and accumulation of hyosciamine and scopolamine in hairy root cultures of *Atropa belladonna* L. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(4), 403-409.

Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 29-43. https://doi.org/10.1080/07388550601173918.

Sun, J. W., Zhang, H., Wang, F. Y., Sun, Y. M., & Sun, M. (2013). Effects of methyl jasmonate on accumulation and release of main tropane alkaloids in liquid cultures of *Datura stramonium* hairy root. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 38(11), 1712-1718.

Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.