بررسی ثبات رشد و میزان آلکالوئید ریشه‌های مویین تراریخت در گیاه داتوره

محمد فارسی - نسرین مشتاقی - فرج ا... شهریاری - حمیدرضا گردان- محمود رئیسی[1]

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۲/۳

چکیده

متابولیتهای ثانویه نقش مهمی در سازگاری گیاهان با محیط اطراف بر عهده دارند و از طرف دیگر منبع مهمی از مواد دارویی فعال نظیر آلکالوئیدها هستند. بیشتر مواد شیمیایی گیاهی از منابع طبیعی بدست می‌آیند، معذالک از مهمترین روشها برای افزایش تولید چنین ترکیباتی استفاده از انواع روشهای کشت بافت می‌باشد. متابولیتهای ثانویه بیشتر در ریشه گیاهان ساخته شده و به برگها منتقل می‌شوند. بنابراین با استفاده از کشت ریشه های مویین به صورت مصنوعی می‌توان به تولید انبوه آنها پرداخت. بدین منظور ریزنمونه‌های برگ و ساقه داتوره *Datura stramonium* در محیط کشت B_5 توسط *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 تلقیح و ریشه‌های مویین تراریخت بدست آمدند. ریشه‌های حاصل به محیط کشت مایع B_5 جهت رشد منتقل گردیدند و ثبات رشد ریشه های مویین تراریخت در مقایسه با رشد ریشه های معمولی در یک طرح آزمایشی کاملاً تصادفی بررسی گردید. ماهیت تراریخت ریشه های مویین از طریق واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژنهای *rolB* و *rolC* از T-DNA آگروباکتریوم، در ریشه های مویین مورد تایید قرار گرفت. جهت اندازه گیری میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین نیز از HPLC استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که مقدار رشد ریشه‌های مویین تراریخت تقریباً سه برابر بیشتر از رشد ریشه‌های معمولی بود. ریشه‌های مویین تراریخت همچنین از ثبات رشد بیشتری در مقایسه با ریشه‌های معمولی برخوردار بودند. نتایج مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین تراریخت و معمولی با استفاده از HPLC نشان داد که میزان این مواد تغییر معنی‌داری نکرده است. بنابراین حضور بخشی از پلاسمید Ri آگروباکتریوم باعث افزایش سه برابر تولید ریشه و در نتیجه سه برابر شدن مقدار تولید آلکالوئید در ریشه های مویین تراریخت شده است.

واژه‌های کلیدی: ریشه مویین تراریخت ، آگروباکتریوم ریزوجنز، متابولیتهای ثانویه، داتوره، آلکالوئید.

مقدمه

مدت مدیدی است که بشر از مواد دارویی گیاهی برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کند و در این بین مواد آلکالوئیدی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. کاهش رویشگاههای طبیعی و افزایش هزینه‌های آزمایشگاهی در سنتز شیمیایی مواد دارویی باعث شده که استفاده از تکنیکهای کشت سلولی و بهبود آن با دست‌ورزیهای ژنتیکی، روشی مناسب در جهت تولید مواد دارویی اقتصادی و تولید انبوه این ترکیبات مد نظر قرار گیرد. تلاش برای بدست آوردن متابولیتهای ثانویه از طریق کشت سلولی از دهه ۱۹۵۰ با کار بر روی سلولهای رویشی توتون آغاز گردید (۱). مزیتهای تولید متابولیتهای ثانویه از طریق کشت بافت، کنترل بهینه شرایط کشت، افزودن پیش‌سازهای مورد نیاز برای افزایش راندمان و تولید متابولیتهای ثانویه خاص می‌باشد. بهترین سیستم مطالعه شده در تولید مواد دارویی، بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان از

۱- به ترتیب دانشیار، دانشجوی دکتری، استادیاردانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و اعضای هیات علمی پژوهشکده جهاد دانشگاهی مشهد.

جمله اسکوپولامین و هیوسیامین می‌باشد، که از نظر دارویی بسیار مهم هستند. گیاهان خانواده سولاناسه از قبیل آتروپا، داتوره، هیوسیاموس و اسکوپولیا منابع تجارتی این آلکالوئیدها، می‌باشند که در ریشه این گیاهان سنتز می‌شوند و به دنبال آن انتقال و تجمع این ترکیبات در برگها به وقوع می‌پیوندد (۱۶).

گیاه داتوره (*Datura stramonium*) به لحاظ تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین از خواص درمانی متعددی نظیر اثرات ضد تشنج، رفع آسم، دردهای عصبی، نقرس، سرفه، بی‌اختیاری دفع ادرار، رفع سوءهاضمه‌های مسلولین، سوختگیها و درد چشم برخوردار بوده (۱۲) ولی سنتز شیمیایی این ترکیبات پیچیده و میزان تولید آنها به صورت طبیعی کم می‌باشد و استخراج آنها هزینه‌های زیاد در بردارد. تلاشهای زیادی به منظور تولید آلکالوئیدهای تروپان به روش کشت سلولها، کالوس و ریشه‌های معمولی این گیاهان انجام گرفته است، با این وجود محتوای این آلکالوئیدها در کالوسهای تمایز نیافته و سوسپانسیونهای سلولی کمتر از گیاهان اصلی بوده است (۵).

از آنجا که آلکالوئیدها در ریشه گیاه سنتز می شوند، یک روش جدید برای افزایش تولید آلکالوئیدها، تراریخت نمودن گیاه با استفاده از سیستم وکتور طبیعی آگروباکتریوم(*Agrobacterium Rhizogenes*) که باکتری خاکزی گرم منفی و مولد بیماری ریشه مویین در گیاهان می‌باشد. ریشه‌های مویینی که بدین طریق تغییر ژنتیکی می‌یابند، یک سیستم امید بخشی را برای تولید چنین ترکیباتی فراهم می‌نمایند. ریشه‌های مویین سریع‌الرشد می‌باشند و در ژنتیک و پایداری بیوسنتزی مواد آلکالوئیدی بی‌نظیر هستند و رشد سریع آنها یک مزیت مهم می‌باشد و می‌توانند به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیتهای ثانویه با ارزش باشند، علاوه بر این ریشه‌های تراریخت ثبات ژنتیکی خود را در طول واکشتهای بعدی حفظ می‌کنند (۱ و ۲).

ژنوتیپ ریشه‌های مویین در نتیجه ورود ناحیه T-DNA از پلاسمید Ri آگروباکترویوم ریزوجنز به داخل ژنوم هسته تغییر می‌کند. در این سویه دو ناحیه از T-DNA وجود دارد که شامل مرز راست TR-DNA و مرز چپ TL-DNA می‌باشند (۸). ریشه‌های تراریخت از طریق بیان ژنهای موجود در TL-DNA ایجاد می‌شوند، در حالیکه ژنهای موجود بر روی TR-DNA یک نقش غیر ضروری و اضافی را در تشکیل ریشه تراریخت ایفا می‌کنند (۳). حداقل سه ژن بر روی TL-DNA (*rol*A , *rol*B, *rol*C) در تحریک و تولید این ریشه‌ها دخالت دارند (۱۶). این سه ژن یک نقش تشدید کننده در تولید ریشه مویین دارا می‌باشند. اخیراً گزارش شده است که پلی پپتید *roLC* فعالیت آنزیمی نشان می‌دهد و قادر به هیدرولیز کردن سیتوکینین N وگلوکوزید D می‌باشد، بنابراین هورمون فعال را از سایر بخشهای غیر فعال، آزاد می‌کند. پلی پپتید *roLB* یک β گلوکوزیداز است که قادر به هیدرولیز کردن ایندوکسیل - گلوکوزید می‌باشد و محتوای ایندول استیک اسید (تنها اکسین طبیعی) را در بافت افزایش می‌دهد (۱۵).

امروزه برای تعیین مقدار اکثر آلکالوئیدها از روش HPLC استفاده می‌شود. محققین توانسته‌اند با کمک این روش مقدار و نوع مواد موجود در عصاره های گیاهی را تشخیص دهند. در این روش ابتدا دستگاه بر اساس ماده خالص استاندارد تنظیم گردیده و یک منحنی ترسیم می‌شود. بعد از این مرحله اگر عصاره به داخل دستگاه تزریق شود می‌توان یک منحنی نیز برای ماده موجود در عصاره بدست آورد که از طریق مقایسه غلظت استانداردها و سطح زیر منحنی می‌توان به مقدار آلکالوئید موجود در عصاره دست یافت. معمولاً مقدار آلکالوئید در ریشه‌ها برحسب میلی‌گرم آلکالوئید در هر گرم وزن خشک ریشه بیان می‌شود (۱۳).

هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان افزایش تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخت با استفاده از آگروباکتریوم (*A. rhizogenes*) در گیاه داتوره (*D. stramonium*) بود. برای این منظور مقدار و ثبات رشد و همچنین میزان آلکالوئیدها در ریشه‌های تراریخت و ریشه های معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری و مواد گیاهی- باکتری مورد استفاده در این تحقیق *A. rhizogenes* سویه A_4 بود (۸). برای تولید ریشه‌های مویین تراریخت در گیاه داتوره از کشت ۴۸ ساعته سویه آگروپین آگروباکتریوم ریزوجنز نژاد A_4 در محیط YMB (Yeast Maltose Broth) (جدول۱) استفاده شد. محیط کشتی که برای رشد باکتری استفاده گردید یک محیط کشت ترکیبی جامد بود که برای اکثر باکتریها قابل استفاده است، اما برای اینکه فقط همین نوع باکتری رشد نماید به محیط کشت باکتری، آنتی بیوتیک ریفامپیسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اضافه گردید تا از رشد سایر باکتریها جلوگیری شود.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت YMB مورد استفاده

ترکیب مورد استفاده	مقدار (میلی گرم بر لیتر)
$K_2HPO_4.3H_2O$	۶۵۵
$MgSO_4.7H_2O$	۲۰۰
NaCl	۱۰۰
D. mannitol	۱۰۰۰
Yeast extract	۴۰۰
Agar	۷۰۰۰

تولید گیاهچهٔ استریل- بذور داتوره مورد استفاده قبل از کاشت به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و پس از شستشو به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار داده شدند و در مرحلهٔ نهایی بذور با آب مقطر استریل، ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردیدند. محیط کشت مورد استفاده برای کشت بذور یک محیط ساده شامل ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار به همراه آب مقطر بود. بذور جوانه زده به داخل ارلنهای حاوی محیط کشت B_5 (۴) منتقل گردیدند. این ظروف در اتاق کشت، با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ °C قرار گرفتند تا گیاهچه‌های چهار هفته‌ای تولید شوند (۱۱).

تلقیح ریزنمونه‌ها و تولید ریشه مویین - برگها و گره‌ها از گیاهچه‌های استریل ۴ هفته‌ای با کمک اسکالپل جدا شده و ساقه‌ها نیز به قطعات ۱ سانتی‌متری برش داده شدند. برگها از قسمت پشت در داخل ظروف پتری قرار گرفتند و رگبرگها، یک انتهای قطعات ساقه و همچنین نقاط گره با نوک سرنگ آغشته به سوسپانسیون باکتری، زخمی گردیدند. نمونه‌های تلقیح شده در درون ظروف پتری حاوی محیط کشت جامد B_5 قرار داده شدند. ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌های تلقیح شده به اتاقک رشد با شرایط ۱ °C ±۲۳ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. به منظور حذف باکتریهای زنده موجود در محیط از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. زمانیکه طول ریشه‌ها به حدود۲ الی ۳ سانتیمتری رسید،آنهارا قطع کرده و به درون ارلنهای۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع B_5 با pH =۵/۵ منتقل شدند. ارلنها توسط فویل آلومینیومی پیچیده شده تا ریشه‌ها درون تاریکی رشد نمایند و سپس ارلنها بر روی شیکر با ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شدند تا در ضمن اینکه هوادهی به درون محیط کشت انجام می‌شود، از تجمع مواد مضر ترشح شده در اطراف ریشه‌ها جلوگیری شود (۱۲).

یک طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ۶ تیمار مختلف با سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای این طرح شامل ۵ کلون مختلف ریشه مویین تراریخت، که از ریزنمونه های جداگانه منشا گرفته بودند و یک کلون ریشه معمولی بود. میزان رشد تیمارها در سه ماه متوالی اندازه‌گیری شد تا میزان و ثبات رشد ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های معمولی بررسی شود. از هر تیمار ۲۰ عدد نوک ریشه دو سانتیمتری به درون یک ارلن۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع B_5 منتقل شد. ارلنها پس از پوشیده شدن توسط فویل آلومینیومی بر روی شیکر با۹۰ دور در دقیقه منتقل گردیدند.

بررسی ماهیت تراریختی- به منظور تأیید ماهیت تراریخت ریشه‌های مویین از آنالیز PCR استفاده گردید. از جمله ژنهایی که از طریق T-DNA آگروباکتریوم وارد ژنوم سلولهای ریشه می‌شوند، ژنهای *npt*II، *rol*C، *rol*B و *rol*A (۸) می‌باشند که با در دست داشتن پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه‌ای داخلی از هر یک از این

ژنها، می‌توان از تراریخت شدن ریشه‌های مویین اطمینان حاصل کرد. بدین منظور ابتدا DNAی ریشه‌های مویین به روش دلاپورتا استخراج گردید (۵) و سپس طبیعت تغییریافته ریشه‌های مویین توسط ظهور ژنهای *rol*B و *rol*C در ژنوم گیاهی از طریق PCR بررسی گردید. پرایمرهایی که برای تکثیر ژن *rol*C استفاده گردید شامل توالیهای:

5′-CTCCTGACATCAAACTCGTC-3′
5′-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3′

و پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی که برای تکثیر ژن *rol*B استفاده گردید شامل توالیهای زیر بود (۸):

5′-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3′
5′-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3′

بیست وپنج میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۶۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱میکرولیتر از هر پرایمر الیگونوکلئوتید با غلظت pmol/l ۱۰، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP ها باغلظت۱۰ میکرومولار، یک واحد از تک‌پلی‌مراز و ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X ویژه PCR ، ۱ میکرو لیتر از MgCl2 با غلظت ۵۰ میلی‌مولار بود (۸). مواد لازم برای PCR و پرایمرهای مورد استفاده از شرکت سیناژن در تهران تهیه و واکنش PCR تحت شرایط زیر انجام شد:

دناتوره شدن اولیه DNA در °C ۹۴ به مدت۳ دقیقه و دناتوره شدن در ۳۴ سیکل در °C ۹۴ و به مدت ۱ دقیقه انجام گردید. مرحلهٔ اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای °C ۵۳/۵ به مدت ۱ دقیقه و مرحلهٔ آخر یا مرحلهٔ گسترش در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و مرحلهٔ گسترش نهایی در °C ۷۲ به مدت ۶ دقیقه انجام شد (۸). دستگاه ترموسایکلر مورد استفاده Biometra بود. پنج میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TBE نیم درصد قرار گرفت. این ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در زیر اشعه UV با دستگاه Gel document مشاهده گردید.. سایز مارکر (Gene Ruler ™ 100bp DNA Ladder Plus) نیز در این آزمایش استفاده شد و با برنامه Lab Work اندازه باندهای تکثیر یافته از این دو ژن تعیین گردید.

علاوه بر این، استخراج DNA از آگروباکتریوم نیز صورت گرفت تا به نوعی تکثیر ژن *rol*B و*rol*C نیز در باکتری انجام شود. بدین منظور از کشت ۴۸ ساعته باکتری درون محیط مایع YMB استفاده گردید تا DNA ژنومی باکتری به روش استفاده از کیت Diatom prep ساخت شرکت Biokom در روسیه استخراج شود.

استخراج آلکالوئید- به منظور استخراج آلکالوئید، ۵۰ میلی‌گرم پودر خشک ریشه از هر نمونه در هشت میلی‌لیتر محلول "هیدروکسید آمونیوم (NH_4OH)، متانول (MeOH)،کلروفرم ($CHCl_3$) " به ترتیب به نسبت ۱۵:۵:۱ به مدت ۶ ساعت خیسانده شد و در فواصل زمانی یک ساعت با استفاده از ورتکس همزده شد. پس از خالی نمودن حلال، افزودن محلول استخراج به حجم ۵ میلی لیتر وخیساندن مجدد به مدت ۲۰ دقیقه همراه با همزدن صورت گرفت. این عمل دو مرتبه تکرار گردید و مجموعه محلول استخراج حاوی عصاره گیاهی با استفاده از فیلتر پنبه‌ای صاف شد و در لوله های آزمایش ۲۰ سانتیمتری در دمای °C ۲۷ و شرایط تاریکی برای خشک شدن قرار داده شد (۱۳).

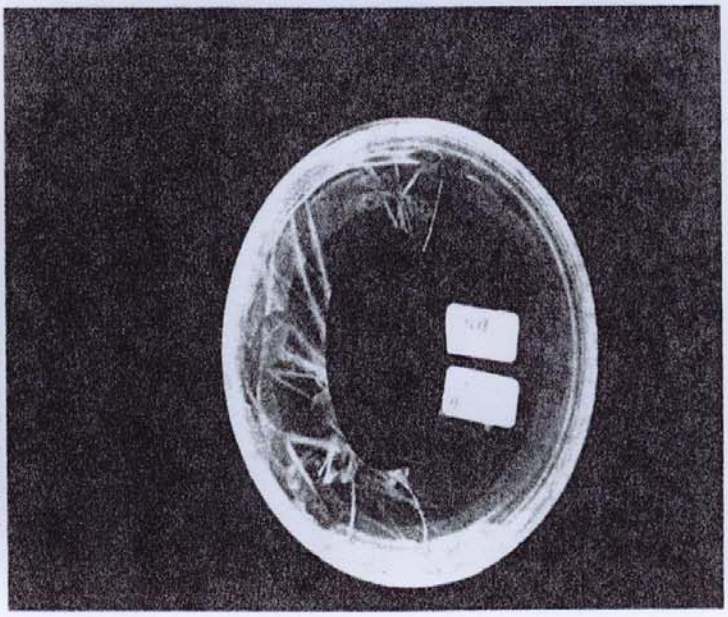
آزمایش HPLC - برای آنالیز ترکیبات با استفاده از دستگاه HPLC ، از ستون (4.6 i.d. * 250mm) 120 T-TOSOH ODS و از محلول SDS ۱۰میلی مولار – استونیتریل (MeCN- 10mM SDS) به نسبت ۳ : ۲ بعنوان فاز متحرک استفاده شد. تنظیم pH فاز متحرک با استفاده از H_3PO_3 یک درصد به میزان ۳/۳ صورت گرفت. پودر خشک استخراج شده از هر نمونه، در یک میلی‌لیتر فاز متحرک با استفاده از ورتکس و سونیکاسیون حل گردیده و۲۰ میکرولیتر از هر نمونه به دستگاه تزریق گردید. از اشعه ماورای بنفش با طول موج حدود ۲۱۵ nm برای سنجش آلکالوئیدها استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرکml/Min ۱/۱ بود. دو محلول پایه استاندارد جداگانه با غلظتهای mg/l ۱۲/۵ برای اسکوپولامین و mg/l ۲۵برای هیوسیامین تهیه شد. دو محلول استاندارد مذکور به ترتیب به عنوان شاهد برای

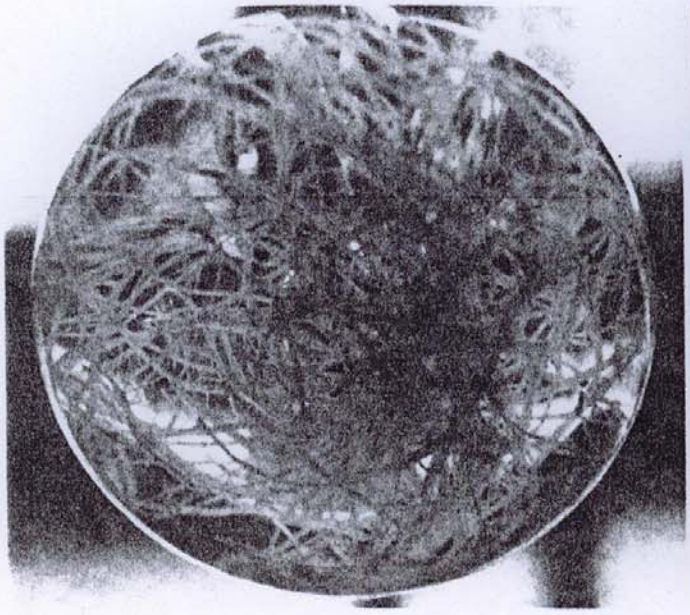
مقادیر ۰/۵ mg اسکوپولامین و ۱ mg هیوسیامین در یک گرم پودر ریشه تهیه گردیدند و از هر محلول پایه استاندارد نیز مقدار ۲۰ µl تزریق گردید. محاسبه مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین در هر یک از نمونه‌ها با مقایسه سطح زیر منحنی هر یک از آلکالوئیدها برای هر نمونه با سطح زیر منحنی نمونه استاندارد صورت گرفت (۱۳). آزمایش HPLC این طرح در شرکت مرجعان خاتم در تهران انجام گردید.

نتایج و بحث

تولید ریشه مویین و مورفولوژی ریشه ها - ریشه‌های مویین تقریباً دو هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ، گره و ساقه‌ها با آگروباکتریوم ریزوجنز نژاد A4 از محل تلقیح شروع به ظاهر شدن نمودند. شکل۱- الف محل خروج ریشه‌های مویین را از محل تلقیح ریز نمونه‌ها نشان می‌دهد. زمانیکه اندازه ریشه‌های ظاهر شده به حدود یک سانتی متر رسید، این ریشه‌ها قطع گردیده و به درون محیط کشت مایع B_5 انتقال یافتند (شکل ۱- ب).

ریشه‌های مویین تراریخت که در اثر تلقیح با باکتری به دست آمدند، سرعت رشد بالا، ظاهری کرک مانند و منشعب داشته و قادر به تولید کالوس نیز بودند که علت اصلی آن وجود یک منبع داخلی از هورمون اکسین در این ریشه‌ها می‌باشد، در صورتیکه ریشه‌های مویین معمولی به دلیل فقدان منبع داخلی از این هورمون در مقایسه با ریشه‌های مویین تراریخت از رشد کمتری برخوردار بوده ومیزان انشعابات این ریشه‌ها کمتر بود و در نتیجه کالوسی تولید نکردند (۱۰).





شکل۱- :الف- خروج ریشه‌های مویین از مکان تلقیح ریزنمونه با آگروباکتریوم

ب: کلون ریشه مویین تثبیت شده در محیط کشت مایع یک ماه پس از کشت از شروع کشت

بررسی میزان و ثبات رشد ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های مویین معمولی- ریشه‌های مویین تراریخت از سرعت رشد بالایی برخوردار بودند و پس از انتقال به درون محیط کشت مایع به سرعت منشعب شده و حجم زیادی از ریشه‌های مویین تراریخت در طی یک الی دو ماه اول پس از شروع رشد بدست آمد. تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان رشد ریشه‌های مویین تراریخت در ماههای مختلف پس از رشد وجودنداشت. یعنی با گذشت زمان، سرعت رشد آنها کاهش نیافت که این دلیل بر ثبات رشد ریشه‌های مویین تراریخت در طول زمان می‌باشد. نتایج به دست آمده از ریشه‌های مویین معمولی نیز نشان داد که اولاً این ریشه‌ها از لحاظ

مورفولوژی با ریشه‌های مویین تراریخت اختلاف دارند و دیگر اینکه بررسی تجزیه واریانس رشد ریشه‌های مویین معمولی در طی سه ماه متوالی حاکی از کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌های مویین معمولی در طول زمان بود ($P < ۰/۰۰۰۱$) (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که رشد ریشه‌های مویین معمولی باریشه‌های مویین‌تراریخت تفاوت معنی‌داری دارد ($P<۰/۰۵$). میزان رشد ریشه‌های معمولی کمتر از ریشه‌های مویین تراریخت بوده و برخی ازکلونهای ریشه مویین تراریخت در طی مدت آزمایش، حدود ۳ الی ۴ برابر ریشه‌های معمولی رشد نمودند (جدول ۲).

جدول ۲ - میزان رشد ریشه مویین (mg/dish) در زمان های مختلف پس از شروع کشت در ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های مویین معمولی.

نوع ریشه مویین	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم	P value
تراریخت	۶۹	۷۲	۶۵/۹	۰/۸۰۹۲
معمولی	۲۸/۴۸	۲۰/۶	۱۸/۸	۰/۰۰۰۱

این نتایج، منطبق بر نتایج بدست آمده از آزمایشهای پالازون و همکاران در سال ۱۹۹۵ می‌باشد (۱۱). افزایش رشد در ریشه‌های مویین تراریخت موید این حقیقت است که حضور بخش T-DNA از پلاسمید Ri آگروباکتریوم ریزوجنز در ژنوم سلولهای تراریخت داتوره، باعث تحریک رشد شده ودر نتیجه مقدار آلکالوئید را افزایش می‌دهد (۱۲).

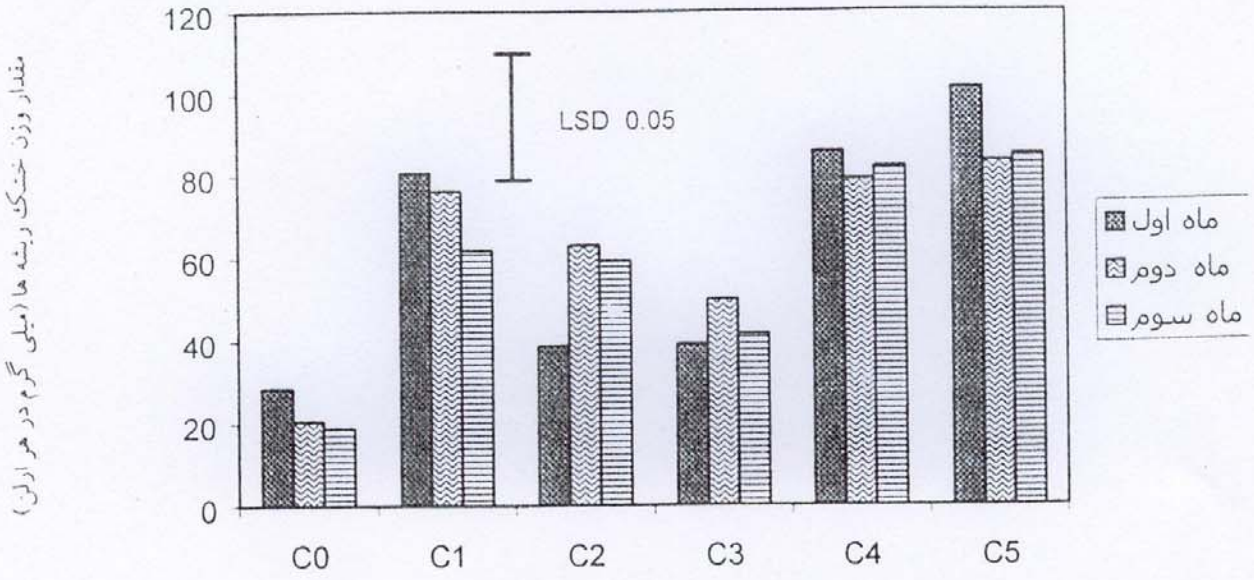
اگرچه در مجموع ریشه‌های تراریخت از ثبات رشد بالایی در طی این سه ماه برخوردار بودند و میزان رشد آنها بیشتر از ریشه‌های معمولی بود، اما در بین کلونهای ریشه مویین نیز سرعت رشد متفاوتی مشاهده گردید. برخی از کلونها سریع‌الرشد بوده و تا حدود ۱۰۰ میلی‌گرم در هر ارلن در ماه رشد نمودند در حالیکه برخی از کلونها از رشد کمتری بر خوردار بوده و رشد آنها از ۵۵ میلی‌گرم در ماه تجاوز ننمود (نمودار شکل۲).

تایید ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده ازآنالیز PCR - در ریشه‌های مویین تراریخت، دو باند اختصاصی مربوط به دو ژن *rol*B و *rol*C تکثیر یافت. بنابر نتایج بدست آمده اندازه ژن *rol*C تکثیر یافته۶۱۲ bp و اندازه ژن *rol*B تکثیر یافته برابر ۴۳۰ bp می‌باشد. در صورتیکه انجام PCR با همین پرایمرها و DNA سلولهای ریشه مویین معمولی هیچ باندی تولید نکرد، بنابراین حضور T-DNA باکتری در سلولهای ریشه مویین تایید گردید.

مقایسه میزان و ثبات تولید آلکالوئید در ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های مویین معمولی- بر اساس محلولهای استاندارد تزریق شده، (Retention time) Rt (زمان نگهداری) معادل ۱۹ دقیقه برای هیوسیامین و Rt معادل ۱۵ دقیقه برای اسکوپولامین مشاهده گردید. در اکثر تحقیقاتی که توسط برخی از محققین گزارش شده است تفاوت معنی‌داری بین میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین درون ریشه‌های مویین معمولی و ریشه‌های مویین تراریخت وجود ندارد (۹). نتایج مقایسات میانگین میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین برحسب میلی‌گرم آلکالوئید بر گرم وزن خشک ریشه حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های مویین معمولی می‌باشد (نمودار شکل۴).

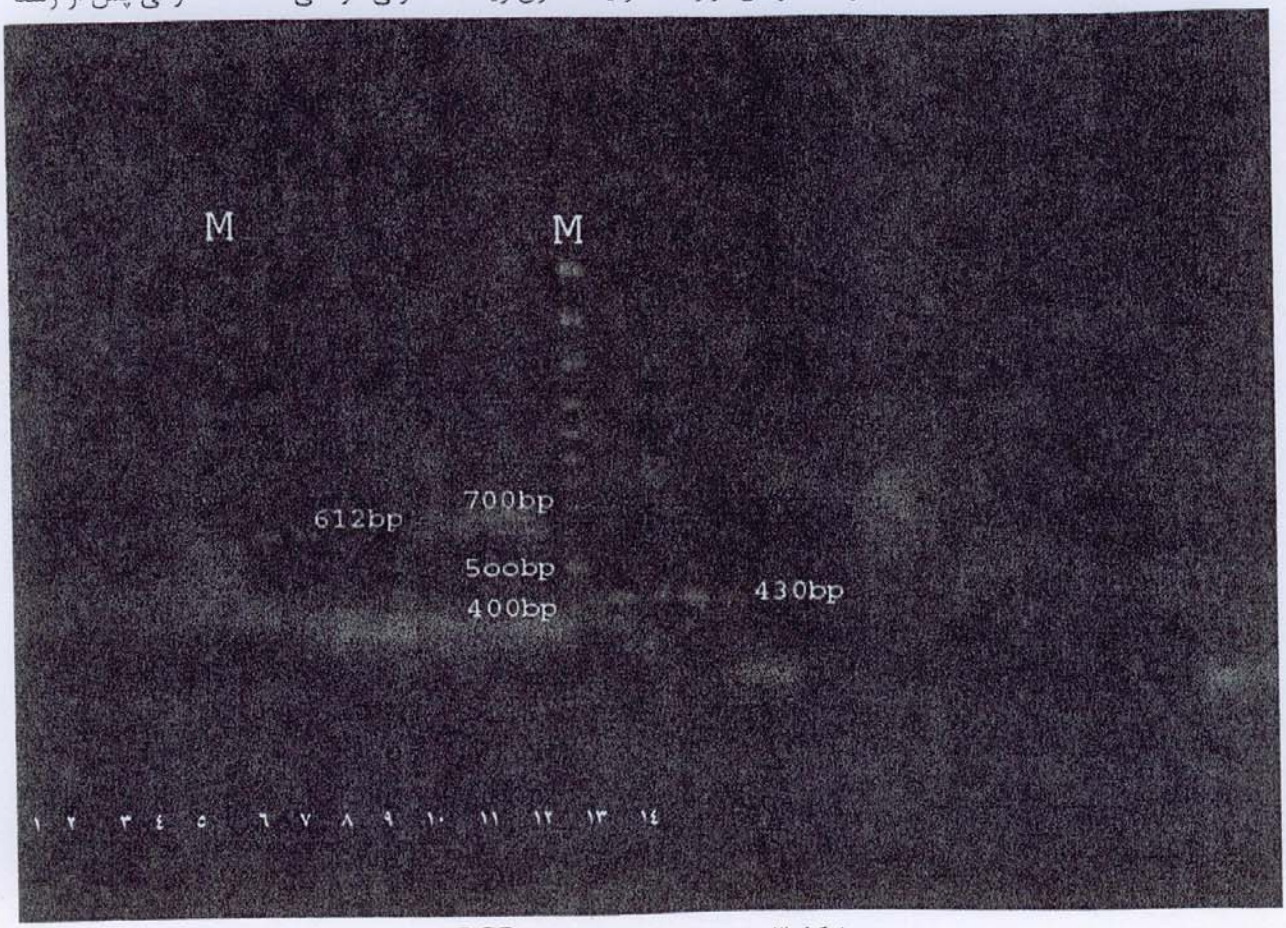
حداکثر مقدار هیوسیامین مشاهده شده در یک کلون ریشه مویین تراریخت ۵/۱ mg/g و در ریشه مویین معمولی ۶/۶ mg/g بود و حداکثر مقدار اسکوپولامین مشاهده شده در یک کلون ریشه مویین تراریخت ۱/۴۲ mg/g و در ریشه مویین معمولی ۱/۵۳ mg/g بود. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین میزان تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های مویین معمولی وجود نداشت ولی بیشترین مقدار تولید مربوط به ریشه‌های مویین معمولی بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که

حضور بخشی از پلاسمید Ri آگروباکتریوم ریزوجنز در ژنوم سلولهای ریشه تاثیر معنی‌داری بر روی میزان تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین نداشته است. در تحقیقی که مویانو دز سال ۱۹۹۹ بر روی داتوره (۱۰) و جانگ و همکاران وی در سال ۱۹۸۷ بر روی گیاه آتروپا انجام دادند نتایج مشابهی بدست آمد (۷).



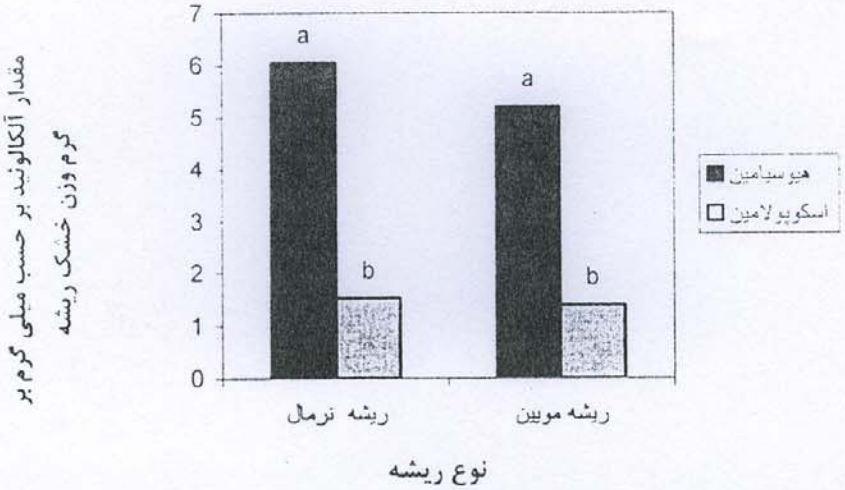
کلون ریشه معمولی C0 و کلونهای مختلف ریشه مویین تراریخت C1 تا C5

شکل ۲- میزان رشد کلونهای مختلف ریشه مویین تراریخت و یک کلون ریشه معمولی در طی سه ماه متوالی پس از رشد



شکل ۳- تصویر نتایج حاصل از PCR

چاهک او ۱۰ مربوط به سایر مارکر می‌باشد و باند موجود در چاهک ۲و۳، ژن تکثیر یافته *rolC* مربوط به آگروباکتریوم ریزوجنز نژاد A4 می باشد و باندهای موجود در چاهکهای ۶ تا ۹ مربوط به ژن *rolC* تکثیر یافته در نمونه‌های ریشه مویین تراریخت می‌باشند. باندهای موجود در چاهکهای (۱۱ و ۱۲) و (۱۳ و ۱۴) به ترتیب مربوط به ژن تکثیر یافته *rolB* در باکتری A4 و ریشه‌های مویین تراریخت می‌باشند و ریشه‌های مویین معمولی هیچ باندی را در چاهک شماره ۵ نشان ندادند. در ضمن نمونه‌ای که در چاهک شماره ۴ قرار دارد یک شاهد منفی می‌باشد که تمام شرایط PCR را به غیر از DNA دارد و عدم وجود باند تکثیر یافته در آن نشان دهنده عدم وجود آلودگی در حین کار می‌باشد.



شکل ۴- مقایسه میانگین (آزمون t) مقدار آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه های مویین و ریشه معمولی بطور جداگانه

مقایسه رشد ریشه‌های مویین در طی ماههای مختلف پس از رشد، نشان داد که میزان رشد ریشه‌های مویین تراریخت در طی ماههای مختلف پس از کشت ثابت می ماند. همین نتیجه نیز برای میزان تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخت در ماههای مختلف پس از کشت مشاهده گردید. به این نحو که مقدار تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در طی سه ماه مختلف پس از کشت تغییری نکرد. این نتیجه مطابق با نتیجه‌ای است که پالازون در سال ۱۹۹۵ بر روی ریشه‌های مویین تراریخت داتوره (۱۱) و سیکولی و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی ریشه های مویین هیوسیاموس بدست آوردند (۱۴).

ترکیبات موجود در محیط کشت و عوامل فیزیکی نظیر نور، دما و pH نیز از جمله عوامل تاثیر گذار بر میزان رشد ریشه‌های مویین و تولید آلکالوئید می‌باشند. ترکیبات محیط کشت B_5 مناسب‌ترین نوع محیط کشت برای رشد ریشه‌های مویین در گیاه داتوره شناخته شده است و تغییر در ترکیب این محیط کشت می‌تواند باعث افزایش یا کاهش میزان رشد و تولید آلکالوئید در ریشه‌های مویین این گیاه شود (۱۴). از آنجا که میزان تولید آلکالوئید در ریشه‌های مویین تراریخت اختلاف آماری معنی‌داری با ریشه‌های معمولی نداشت ولی به علت افزایش میزان رشد و ثبات تولید آلکالوئید، می‌توان اینگونه اظهار داشت که مقدار تولید آلکالوئید در ریشه های مویین تراریخت نسبت به ریشه های مویین معمولی افزایش می‌یابد. در صورت استفاده از ریشه‌های مویین در تولید آلکالوئیدها در بیورآکتورها، ثبات رشد ریشه‌ها و عدم کاهش میزان آلکالوئید دو ویژگی لازم و ضروری می باشند که در ریشه های مویین تراریخت وجود دارند.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی واحد مشهد که بودجه این پژوهش را تامین نمودند و از مسئولین آزمایشگاه جهاد دانشگاهی و دانشکده کشاورزی مشهد به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و همچنین از دانشکده داروسازی مشهد و تهران برای تامین پودر خالص آلکالوئید تشکر می‌شود.

منابع

1. Archana, G. and M.L. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: Recent trends applications: a review. Biotec. Adv. 18: 1-22.
2. Byrne, M.C., Koplow, J, David, C., Tempe, J. and M.D. Chilton. 1983. Structure of T-DNA in root transformed by Agrobacterium rhizogenes. J. Appl. Genet. 2:201-209.
3. Carderelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone, I and P. Castantino. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol. Genet. 209: 475-480.
4. Collin, H.A. and S. Edwards. 1998. Plant Cell Culture. *Bios Scientific Publishers*.
5. Dellaporta, S.L., Wood, J. and J.B. Hicks (1983). A plant DNA mini-preparation Version II. Plant Mol. Biol. Reptr. 1: 19-21.
6. Hiraoka, N and M. Tabata. 1974. Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of Datura innoxia. Phytochem. 13:1671-1675.
7. Jung, G. .and D. Tepfer. 1987. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production. in *Atropa belladona* and *Calystegi sepium* roots grown *in vitro*. Plant Sci. 50:145-151.
8. Krolicka, A., Stabisewska, I., Bielaeski, K., Malinski, E., Szafranek, J. and E. Ljkowska. 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Sci. 160:259-264.
9. Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R.M., Bagni, N. and M.T. Pinol. 2002. Alkaolid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures over-expressing the *pmt* gene. Phytochem. 59: 697-702.
10. Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfil, M., Morales, C. and M.T. Pinol. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in solanaceae plants. Phytochem. 52:1287-1299.
11. Palazon, J., Altabella, T., Cusido, R.M., Ribo, M. and M.T. Pinol. 1995. Growth and tropane alkaloid production in *Agrobacterium* transformed roots and derived callus of *Datura*. Biologia Planta. 37: 161-168.
12. Pinol, M.T., Palazon, J., Cusido, R.M. and M. Serrano. 1996. Effect of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on growth and hyoscyamine production in *Datura stramonium* root culture. Botanica.Acta. 109: 133-138.
13. Pinol, M.T., Palazon, J. and M. Serrano. 1984. Growth and nicotine content of tobacco callus cultures without organogenesis. Plant Sci. Lett. 36: 219-226.
14. Sikuli, N.N. and K. Demeyer. 1997. Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by hairy roots of *Datura stramonium*. Plant Cel. Tis. & Org. Cul. 47: 261-267.
15. Spena, A., Estruch, J.J., Prinsen, E., Nacken, W., Van Onckelen, H. and H. Sommer. 1992. Anther specific expression of the *rol*B gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development and whole flower growth. *Theor.* Appl. Genet. 84:520-527.
16. Waller, G.R. and E.K. Nowacki. 1977. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press. New York.

Investigation on growth stability and alkaloid content of transformed hairy roots in *Datura stramonium*

M .Farsi -N.Moshtaghi- F. Shahriari -H. Gordan-M. Raeisi[1]

Abstract

Secondary metabolites have an important role in adaptation of plants to their environment and are the main sources of pharmaceutical materials such as alkaloids. Many of these compounds are produced through chemical synthesis for many years, while most of them obtained from natural resources due to their complicated structures. Production of secondary metabolites via tissue culture has some advantages over traditional methods. Alkaloids are first synthesized in roots and then transported to shoots and leaves. Hairy root cultures could be employed artificially to produce these metabolites. Hairy roots could be induced using *Agrobacterium rhizogenes*. In this research, explants of leaves and shoots of *Datura. stramonium* were inoculated with *A .rhizogenes* strain A4 in B5 medium. The nature of transgenic hairy roots was examined using PCR with specific primers for *rol*B and *rol*C of T-DNA. Growth and rate of alkaloids of transformed hairy roots were compared with normal ones using a completely randomized design. Rates of hyoscyamine and scopolamine alkaloids were measured through HPLC machine. The results indicated that the growth of transformed hairy roots was stable over time and their yield was more than three folds of that of normal ones. The results of HPLC showed that the rates of alkaloids did not change in transformed hairy roots compared to those of normal hairy roots. As a result, it is concluded that the presence of Ri plasmid in transformed hairy roots increases the content of hyoscyamine and scopolamine alkaloids.

Key words: Transformed hairy roots, Agrobacterium rhizogenes, secondary metabolites, datura, alkaloids.

1 - Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and Education and Research Center of Jahade Deneshgahi, respectively.