دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.110930.2051
جلد ۳۳، شماره ۶، صفحه ۱۰۸۴-۱۰۷۲ (۱۳۹۶)

تأثیر متیل جاسمونات بر رشد ریشه، خصوصیات بیوشیمیایی و بیان ژن هیوسیامین ٦- بتا-هیدروکسیلاز در ریشه موئین گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

اسدالله نوروزی[۱]، بهمن حسینی[۲*]، مراد جعفری[۳] و منوچهر فرجامی‌نژاد[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) سرشار از آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشد که به‌طور وسیع در داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) متیل جاسمونات و مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بر میزان رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان آلکالوئیدهای تروپانی و میزان بیان ژن هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (h6h) در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. بررسی میزان رشد در نمونه‌های شاهد و تیمار شده، نشان داد که میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین با شیب ملایمی در نمونه‌های تهییج شده رو به کاهش می‌باشد. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار با متیل جاسمونات (غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، تأثیرات معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوبات پراکسیداز داشت. همچنین مدت زمان تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) متیل جاسمونات به‌استثناء آنزیم آسکوربات پراکسیداز، تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت هر دو آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز نشان داد. نتایج آنالیز GC/MS نشان داد که در تیمار با متیل جاسمونات بیشترین میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین (۲۱/۹٪ و ۱۳/۹۶٪) به‌ترتیب در اثر تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۴۸ و ۲۴ ساعت بدست آمد، که ۱/۶ و ۱/۲۵ برابر بیشتر نسبت به تیمار شاهد (به‌ترتیب ۱۳/۶۷٪ و ۱۱/۱۳٪) بوده است. سطح بیان ژن هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز با روش RT-PCR نیمه کمّی بررسی شد. نتایج نشان داد در تیمار متیل جاسمونات بیشترین میزان بیان ژن h6h (۶ برابر بیشتر نسبت به شاهد) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد. براساس نتایج، چنین استنباط می‌شود که محرک متیل جاسمونات احتمالاً به‌دلیل تحریک بیان ژن‌های مؤثر در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی، در افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، اسکوربات پراکسیداز، ریشه مویین، هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز، آلکالوئیدهای تروپانی.

مقدمه

بذرالبنج مشبک با نام علمی (*Hyoscyamus reticulatus* L.) گیاهی از راسته Solanales، تیره سیب‌زمینی، جنس هیوسیاموس و گونه رتیکولاتوس است. در نواحی مختلفی از ایران مانند تهران، آذربایجان و اراک پراکنش آن گزارش شده‌است. این گیاه سرشار از ترکیب های آلکالوئیدی می باشد. گروهی از آلکالوئیدها، به نام آلکالوئیدهای تروپانی به طور عمده در گیاهان تیره سیب‌زمینی یافت می‌شوند (Dialmaghani *et al.*, 2006). تروپان آلکالوئیدهای موجود در این گیاهان دارای خواص ضد اسپاسم، آنتی‌کولینرژیک (anticholinergic)، آرام‌بخش و ضد درد می‌باشد (Oto *et al.*, 2013). بیشترین آلکالوئیدهای آن را هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین تشکیل می دهد. گزارش شده است که آلکالوئید اصلی گیاه بذرالبنج مشبک، هیوسیامین ($C_{17}H_{23}NO_3$) در حدود ۰/۰۳۳٪ تا ۰/۰۵۶٪ وزن خشک و پس از آن اسکوپولامین ($C_{12}H_{21}NO_4$) در حدود ۰/۰۱۱٪ تا ۰/۰۱۵٪ وزن خشک می باشد که میزان این آلکالوئیدها به سن گیاه و شرایط رشدی آن بستگی دارد (Ionkova, 2002). اسکوپولامین ارزشمندترین آلکالوئید تروپانی می‌باشد و تقاضای جهانی آن حدود ۱۰ برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیزه آن (آتروپین) است (Hashimmoto & Yamada, 1994). هیوسیامین با هیدروکسیلاسیون توسط آنزیم هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (H6H) به ۶-بتا-هیدروکسی هیوسیامین (آنیزودامین) تبدیل و آنیزودامین دوباره توسط فعالیت اپوکسیداسیون آنزیم H6H به اسکوپولامین تبدیل می‌شود (Facchini, 2001؛ Cardillo *et al.*, 2008). در نهایت اسکوپولامین طی یک واکنش اکسیداسیون احیاء هیدروکسیله شده و به آنیزودین تبدیل می‌گردد (Kai *et al.*, 2011). یکی از روش‌های متداول تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در ریشه ساخته می‌شوند تلقیح ریزنمونه با *Agrobacterim rhizogene* است (Teixeira da Silva, 2006). آگروباکتریوم رایزوژنز یک باکتری گرم منفی و خاکزی است که با انتقال ژن مولد اکسین به گیاه میزبان با تولید مقدار زیاد اکسین IAA نسبت به سایر باکتری های محرک رشد، افزایش رشد و انشعابات ریشه را باعث می شود. جاسمونات ها به‌عنوان یک خانواده جدید از هورمون‌های گیاهی نقش مهمی را در تنظیم فرایند رشد و نمو گیاه دارند (Abdala *et al.*, 2003). استفاده از محرک‌های مختلف باعث ایجاد تغییرات مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغییر بیان ژن‌ها می‌گردد. در اغلب مطالعات انجام شده، کاربرد محرک ها باعث کاهش وزن تر و خشک سلولها و ریشه ها می شود. متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در تمشک می‌شود که شامل سوپراکسید دیسموتات، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و مونو دی هیدروآسکوربات ردوکتاز می‌باشد (Ghasemnezhad & Javaherdashti, 2008). جاسمونات ها در تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه فعال می‌باشند. کاربرد خارجی اسید جاسمونیک سبب تجمع پاکلی‌تاکسول و تاکسان‌های مربوطه در تاکسوس (Taxus) می‌شود. در پروانش و سینچونا، تحریک ریشه های مویین با غلظت های مختلف متیل جاسمونات سبب تجمع آلکالوئیدها می‌گردد (Creelman *et al.*, 1997).

از آنجا که هیوسیامین و آسکوپولامین ازجمله آلکالوئیدهای اصلی و با ارزش گیاه بذرالبنج مشبک به حساب می‌آیند و هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز (h6h) به‌عنوان ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند، این پژوهش با هدف بررسی افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی تحت تأثیر محرک غیرزیستی متیل جاسمونات در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با محرک، در ریشه موئین گیاه بذرالبنج مشبک و آنالیز بیان ژن درگیر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین-۶-بتا-هیدروکسیلاز تحت تأثیر انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این مطالعه در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی و آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام گردید. بذرهای گیاه بذرالبنج مشبک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور شکستن خواب فیزیولوژیکی از تیمار اسید جیبرلیک استفاده گردید. ضدعفونی سطحی با استفاده از اتانول ۷۰٪، هیپوکلرید سدیم ۱۰٪ و سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. کشت بذرها در داخل شیشه‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS تکمیل شده با ۳٪ ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۷٪ آگار انجام گردید. بذرهای کشت شده در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القای ریشه موئین از ریزنمونه کوتیلدون

تک کلون‌های سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز داخل فالکون‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. کوتیلدون دو هفته‌ای به مدت ۳ دقیقه درون سوسپانسیون باکتری (OD_{600} nm = 0.5) غوطه‌ور شد. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد منتقل و به‌مدت ۴۸ ساعت، داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲ روز باکتری‌ها حذف و به محیط کشت MS جامد حاوی سفوتاکسم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردید. برای افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هریک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسم منتقل شدند. در هر بار عمل واکشت، میزان غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط کشت کاهش یافت و در نهایت به‌طور کامل حذف گردید. برای تأیید ادغام ژن rolB به داخل ژنوم ریشه‌های موئین، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ژن rolB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن شامل آغازگر رفت F5′-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3′، آغازگر برگشت 5′R-TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3′) استفاده گردید (Habibi *et al.*, 2015).

تهییج ریشه‌های موئین توسط محرک متیل جاسمونات

پس از انتخاب لاین L45 به‌عنوان لاین ریشه موئین پر رشد، ۲ گرم از ریشه‌های موئین ۱۰ روزه داخل هریک از ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (Duchefa-Netherlands) (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار)، در ۳ تکرار منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین از محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف محرک متیل جاسمونات خارج و به محیط کشت MS مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، عمل برداشت ریشه‌های موئین برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنالیز بیوشیمیایی آلکالوئیدها به روش GC-MS و در نهایت میزان بیان ژن دخیل در مسیر تولید آلکالوئیدها (h6h) با استفاده از Semi-Quantitative RT-PCR مطالعه گردید.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک

ریشه‌های موئین برداشت شده از محیط کشت پس از شستشو با آب مقطر استریل و خشک شدن توسط کاغذ صافی استریل برای اندازه‌گیری وزن تر مورد استفاده قرار گرفت. وزن خشک ریشه‌های موئین نیز با استفاده از دستگاه فریز درایر اندازه‌گیری شد.

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

برای تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت

آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با اندازه‌گیری میزان تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، با استفاده از روش Maehly و Chance (۱۹۵۹) انجام گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز (کاهش پراکسید هیدروژن) به‌صورت 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 (ضریب جذب مولی) (۴۳/۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام گردید. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌صورت افزایش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز از ضریب خاموشی (۲۶/۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Chen و Asada (۱۹۸۹) با اندکی تغییر انجام شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (اکسیداسیون آسکوربات) به‌صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی (۲/۸ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد.

استخراج و آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی به روش GC/MS

استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییر انجام شد. به‌منظور جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین از دستگاه گروماتوگراف گازی (HP, Palo Alto, CA, Hewlett-Packard (USA، مدل HP 7890A GC و کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی Hewlett-Packard، مدل 5975C، مجهز به ستون موئینه HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، با ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ استفاده گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان ژن با تکنیک RT-PCR نیمه کمّی

استخراج RNA از نمونه های ریشه موئین با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. حدود ۴۰۰ نانوگرم از RNA به‌منظور ساخت cDNA از کیت PrimeScriptTM RT reagent Kit (TAKARA، ژاپن) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. در پایان، cDNA تولید شده با RNAase تیمار شد و به نسبت ۱:۵۰ با استفاده از آب مقطر استریل رقیق شد و بعد به‌عنوان الگو برای پژوهش‌های بعدی استفاده شد. در این راستا از تکنیک RT-PCR نیمه کمّی برای مطالعه بیان ژن h6h با آغازگر Fh6h (5'-TGGCTACTTTTGTGTCGAACTGG-3') و آغازگر Rh6h (5'- CTTGGGTCTGGGCATGGTG-3') به‌عنوان ژن اصلی و آغازگر 18SF (5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3') و آغازگر 18SR (5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3') به عنوان ژن کنترل مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR پس از افزودن پنج میکرولیتر بافر بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱٪ قرار گرفت. به منظور آنالیز نتایج RT-PCR از نرم‌افزار Pixcavator6.0 استفاده شد. این نرم‌افزار پس از اسکن ژل، شدت باندهای ژن اصلی در هر نمونه را براساس شدت باندهای ژن کنترل داخلی (18s) نمونه مربوطه نرمال‌سازی کرده و چگالی نسبی تصحیح شده برای هر نمونه را محاسبه می‌کند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

آزمایش‌های مربوط به هر پارامتر شامل رشد ریشه‌های موئین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنالیز GC-MC آلکالوئیدهای تروپانی و آنالیز بیان ژن به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید و بعد از اطمینان از توزیع نرمال باقیمانده‌ها، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمایش و نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

القاء و تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

ریشه‌های موئین از محل زخم ریزنمونه کوتیلدون دو هفته‌ای پس از تلقیح با سویه A7 باکتری اگروباکتریوم تولید شدند. پس از ۴ مرحله واکشت در محیط کشت پایه MS جامد حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ و کاهش غلظت به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مراحل آخر، باکتری‌ها به‌طور کامل حذف شدند. نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه ۷۸۰bp مربوط به ژن rol B را در ریشه‌های حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد که هم اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (اگروباکتریوم) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (کنترل منفی)، هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نشد.

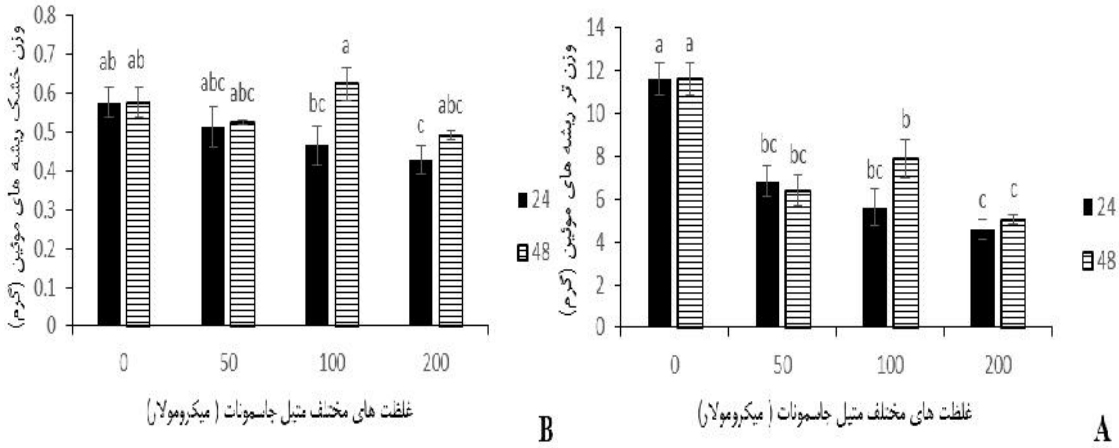
تأثیر محرک متیل جاسمونات بر وزن تر و خشک ریشه‌های موئین

نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده و اثر متقابل غلظت تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت تیمار در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک داشت (جدول ۱). در صورتی‌که زمان‌های مختلف تیمار تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین تیمار شده نشان نداد. طبق نتایج بدست آمده، سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار در سطح احتمال ۵٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر و خشک ریشه‌های موئین تیمار شده داشت. حداکثر وزن تر (۱۳/۲ گرم) و وزن خشک (۰/۶۶ گرم) در تیمار شاهد و حداقل وزن تر (۳/۸۴ گرم) و خشک (۰/۳۶۴ گرم) در غلظت ۲۰۰ میکرومولار، در مدت ۲۴ ساعت تیمار مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر وزن تر، وزن خشک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

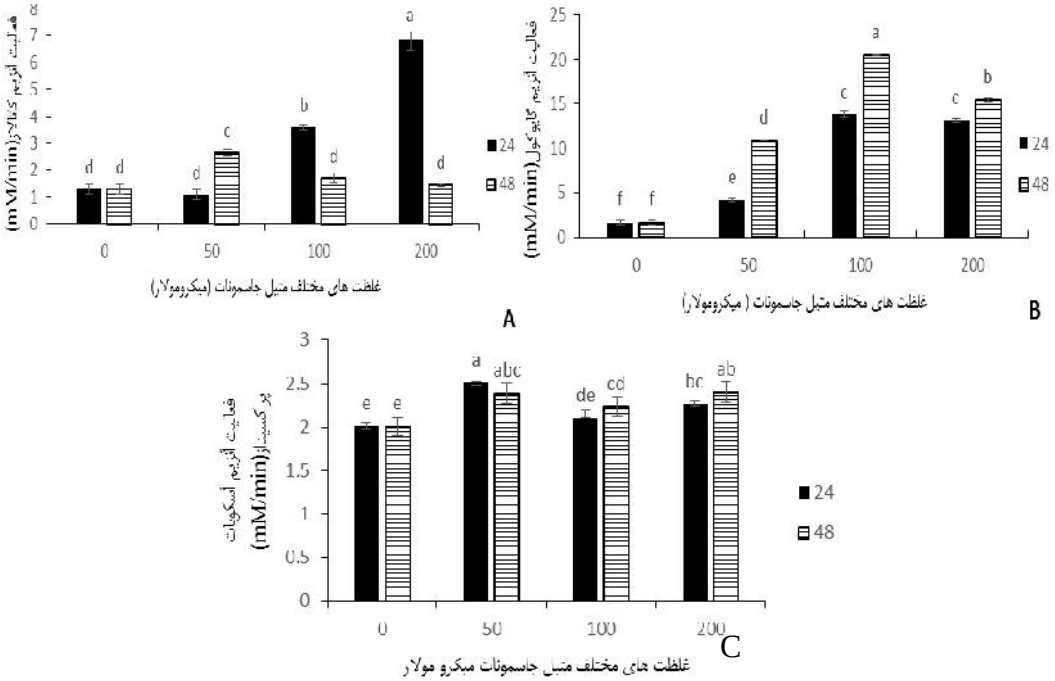
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	فعالیت گایاکول پراکسیداز (mM/min)	فعالیت کاتالاز (mM/min)	فعالیت آسکوربات پروکسیداز (mM/min)
متیل جاسمونات (a)	۳	۵۰/۵۲**	۰/۰۱۴۸*	۲۹۲/۹۹**	۹/۰۲**	۰/۲۱**
زمان تیمار (b)	۱	۲/۰۱۸ ns	۰/۰۲۰*	۹۲/۸۹**	۱۱/۹۹**	۰/۰۰۸ ns
اثر متقابل (a×b)	۳	۲۲/۸۵**	۰/۰۱۲*	۱۶/۷۵**	۱۳/۲۵**	۰/۰۲*
اشتباه آزمایشی	۱۶	۲	۰/۰۰۵	۰/۲۴۷	۰/۱۴	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۸/۹۸	۱۴/۳۰	۴/۹	۱۵/۱۲	۳/۶۳

**، * و ns: به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر وزن تر (A) و خشک (B) ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های (A): کاتالاز و (B): گایاکول پراکسیداز (C): آسکوربات پراکسیداز ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ آزمون دانکن می‌باشد.

تأثیر متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده و اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت و زمان تیمار، در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و

گایاکول پراکسیداز داشت (جدول ۱). بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، به‌ترتیب در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۲–A، B). در صورتی‌که نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده سطوح غلظت و اثر متقابل غلظت و زمان تیمار به‌ترتیب در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشت، به‌گونه‌ای که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۲–C).

تأثیر متیل جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات نشان داد که سطوح مختلف غلظت، در سطح احتمال ۱٪ به‌طور معنی‌داری تولید هیوسیامین و اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار داد، در صورتی که اثر زمان در میزان تولید اسکوپولامین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد ولی در میزان تولید هیوسیامین تأثیر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

بیشترین میزان هیوسیامین (۲۱/۹۰٪) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد که میزان تولید آن را نسبت به ریشه‌های موئین شاهد (۱۳/۶۷٪) حدود ۱/۶ برابر افزایش داد و حداقل میزان هیوسیامین (۰/۲٪) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و به‌مدت ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۳–B). همچنین بیشترین میزان اسکوپولامین (۱۳/۹۶) در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد که تولید آن ۱/۲۵ برابر نسبت به ریشه‌های موئین شاهد (۱۱/۱۳) افزایش یافت و کمترین میزان اسکوپولامین (۰/۷۹٪) تحت تأثیر تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در زمان ۴۸ ساعت تیمار مشاهده شد (شکل ۳–A).

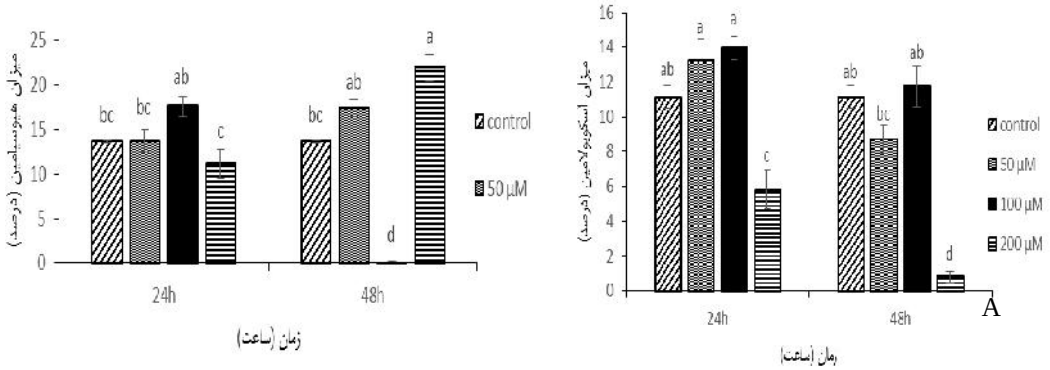
تأثیر متیل جاسمونات بر سطح رونوشت ژن h6h

تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، مدت زمان و اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری ($P<0/01$) وجود دارد. براساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میزان بیان ژن h6h در اثر تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت بدست آمد که میزان تولید آن را نسبت به ریشه‌های موئین شاهد تیمار نشده، حدود ۶/۳ برابر افزایش داد و حداقل میزان بیان ژن h6h نیز در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در مدت ۲۴ ساعت بدست آمد.

جدول ۲– تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با محرک متیل جاسمونات بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان هیوسیامین (٪)	میزان اسکوپولامین (٪)
متیل جاسمونات (**a**)	۳	۶۹/۰۸**	۱۰۹/۴۱**
زمان تیمار (**b**)	۱	۳/۲۲ ns	۵۲**
اثر متقابل (**a×b**)	۳	۲۱۴/۰۱**	۸/۰۸*
اشتباه آزمایشی	۱۶	۴/۳۵	۳/۰۶
ضریب تغییرات (**CV**٪)		۱۵/۲۹	۱۸/۲۸

**، * و ns: به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

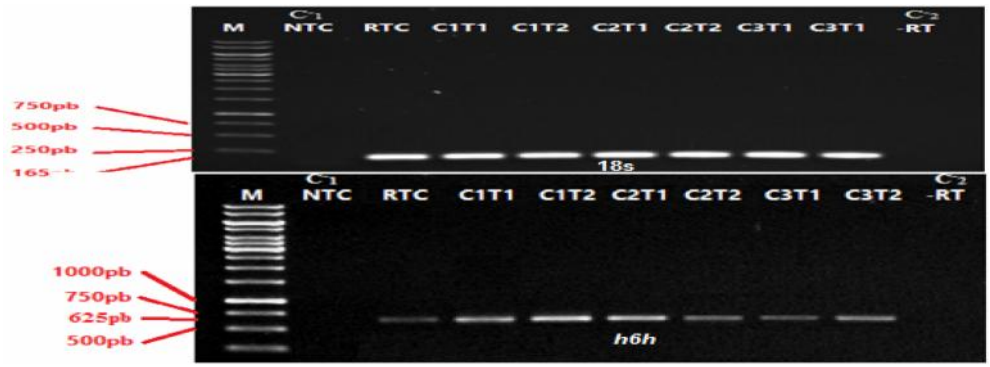


شکل ۳- مقایسه میانگین درصد اسکوپولامین (A) و هیوسیامین (B)

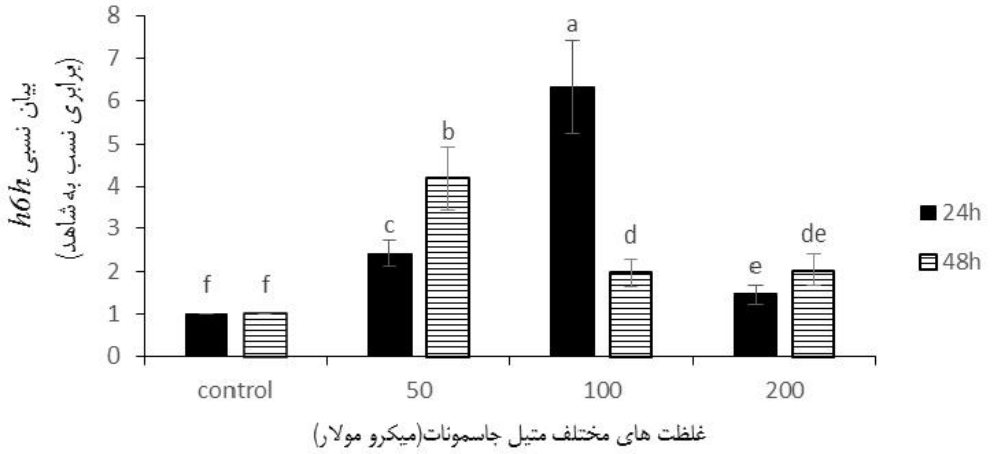
در سطوح مختلف متیل جاسمونات در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت

حروف مشترک در هر زمان به‌طور جداگانه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

با توجه به اینکه در نمونه‌های تیمار شده باند مورد انتظار ۶۲۵bp تکثیر شد. در نمونه کنترل C^-_1 (NTC) که مربوط به واکنش بدون الگو cDNA می‌باشد، باندی تکثیر نشد که نشان‌دهنده صحت انجام واکنش PCR باشد. همچنین در نمونه کنترل C^-_2 (-RT) که مربوط به واکنش بدون آنزیم می‌باشد نیز هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد که این عمل نشان‌دهنده عدم آلودگی نمونه‌های مورد بررسی با DNA ژنومی می‌باشد (شکل ۴). بنابراین نتایج نشان داد که بیان ژن *h6h* در سطح ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات با افزایش زمان تیمار افزایش داشته است ولی در سطح ۱۰۰ میکرومولار با افزایش زمان، کاهش معنی‌داری مشاهده شد و با افزایش دو برابری غلظت متیل جاسمونات (۲۰۰ میکرو مولار) بیان ژن کاهش معنی‌داری نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن h6h در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در مدت ۲۴ ساعت مشاهده گردید (شکل ۵).



شکل ۴- آنالیز RT-PCR بر میزان بیان ژن h6h تحت تأثیر غلظت (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) متیل جاسمونات در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک؛ M) 1kb DNA Ladder، NTC و RT- کنترل منفی، C1R1، C1R2، C2R1، C2R2، C3R1، C3T2 نمونه‌های تیمار شده در غلظت (C) و زمان‌های (T) مختلف متیل جاسمونات، 18s کنترل داخلی

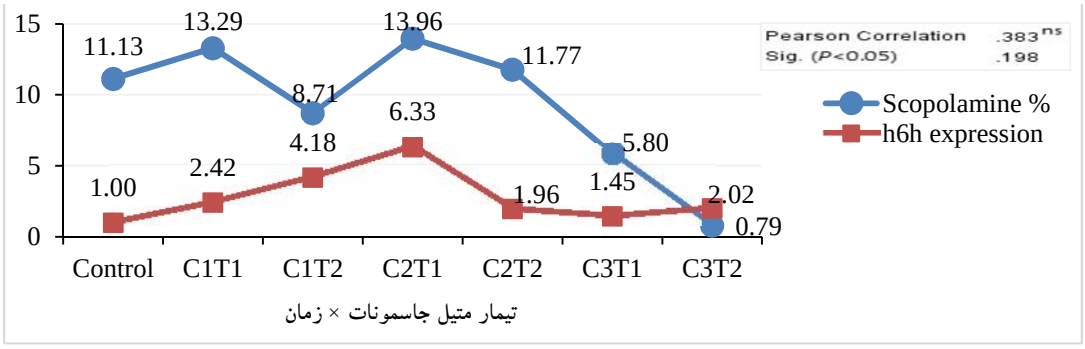


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت و مدت زمان تیمار متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن h6h در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ارتباط تجمع اسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن h6h تحت تیمار متیل جاسمونات

آنالیز همبستگی تجمع اسکوپولامین با میزان بیان ژن h6h تحت تأثیر متیل جاسمونات نشان داد اگرچه بین تجمع اسکوپولامین و میزان بیان ژن h6h ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($P<۰/۰۵$)، اما الگوی تجمع اسکوپولامین تحت تأثیر متیل جاسمونات (به‌استثنای غلظت ۵۰ میکرومولار در مدت ۴۸ ساعت) روند تقریباً مشابه با روند بیان ژن نشان داد (شکل ۶).



شکل ۶- ارتباط میزان تجمع اسکوپولامین با میزان بیان نسبی ژن h6h تحت تیمار متیل جاسمونات (C1=50µM, C2= 100µM, C3= 200µM) طی دو زمان مختلف (T1= 12h, T2= 48h)

ضریب همبستگی پیرسون بین دو متغیر توسط نرم‌افزار SPSS v. 21 محاسبه شده است.

ns، غیرمعنی‌دار بودن ضریب همبستگی بین دو متغیر در سطح احتمال ۵٪ را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌ها نشان داد که با افزایش غلظت محرک، میزان تولید ریشه مویین کاهش می‌یابد. گزارش شده که اختصاص کربن بیشتر در ساختار مواد آلی مؤثر در تنظیم اسمزی، همانند پرولین می‌تواند باعث کاهش رشد شود (Javanmardy *et al.*, 2010). از

دیگر دلایل کاهش رشد ریشه‌های موئین پس از تیمار با متیل جاسمونات، افزایش بیان ژن pmt در متابولیسم پلی‌آمین و قرار گرفتن پوتریسین به‌عنوان سوبسترای ژن pmt می‌باشد (Sato *et al*., 2001). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Zhao و همکاران (۲۰۱۰) در کشت سلولی *Salvia miltiorrhiza* و Hong و همکاران (۲۰۱۲) در کشت ریشه‌های بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) مطابقت دارد. کاهش فعالیت آنزیم گایاکول در طی ۱۲ ساعت اولیه نسبت به ۴۸ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات ممکن است به‌دلیل تولید ROS باشد که در سیگنال‌دهی دفاعی نقش بسزایی دارد. البته تأخیر در افزایش فعالیت گایاکول احتمالاً به‌دلیل بازگشت این آنزیم به متابولیسم طبیعی خود می‌باشد (Soares *et al*., 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش نیز احتمالاً به علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن می‌باشد که با نتایج تحقیقات در گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) مطابقت دارد (Ghorbanpur *et al*., 2015). همچنین در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، تیمار متیل جاسمونات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز را افزایش داد (Jung, 2004). از آنجا که H_2O_2 سوبسترای کاتالاز می‌باشد، می‌توان فرض کرد که بخشی از افزایش فعالیت کاتالاز به‌دلیل تولید H_2O_2 در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و یا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز است. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در زمان دوم بیشتر به دلیل تجمع بیش از حد H_2O_2 بوده و خود یک راهکار مناسب برای جلوگیری از هضم کامل کاتالاز می‌باشد (Chamnongpol *et al*., 1998). نتایج حاصل از این پژوهش در مورد آنزیم آسکوبات پراکسیداز با نتایج گیاه آرابیدوپسیس مطابقت دارد (Jung, 2004). نتایج این پژوهش نشان داد با وجود اینکه زمان تیمار متیل جاسمونات تأثیر محسوسی در میزان تولید آلکالوئید هیوسیامین ندارد ولی اثر غلظت در میزان هیوسیامین تأثیر معنی‌داری نشان داد، به‌گونه‌ای که حداکثر درصد هیوسیامین در غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت بعد تیمار با متیل جاسمونات مشاهده گردید که این امر احتمالاً به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های اورنیتین دکربوکسیلاز و آرژینین دکربوکسیلاز که موجب افزایش ترکیب‌های ابتدای مسیر مانند پوتریسین و متیل پوترسین و به‌دنبال آن افزایش ترکیب‌های ادامه مسیر به‌ویژه هیوسیامین و اسکوپولامین باشد (Biondi *et al*., 2000). در مورد میزان درصد اسکوپولامین مشاهده شد که بیشترین میزان اسکوپولامین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار و زمان ۲۴ ساعت می‌باشد. برخلاف هیوسیامین، درصد آسکوپولامین در بیشتر غلظت‌های متیل جاسمونات در زمان‌های ۲۴ ساعت بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد که یکی از دلایل مهم آن می‌تواند به فعالیت بالای آنزیم H6H در زمان‌های پایین‌تر تیمار با محرک متیل جاسمونات مربوط باشد (Kai *et al*., 2012). علاوه‌براین، محرک متیل جاسمونات به‌دلیل تحریک مسیر فنیل‌آلانین که یکی از شاخه‌های جانبی در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشد، می‌تواند باعث تولید فنیل لاکتات و تروپان در این مسیر شده و تولید آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه اسکوپولامین را تحت تأثیر قرار دهد (Zabetakis *et al*., 1999). نتایج مشابهی توسط متیل جاسمونات در تولید آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه موئین *Scopolia parviflora* گزارش شده‌است که منجر به افزایش عملکرد آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه تولید اسکوپولامین شده است (Kang *et al*., 2004). در گیاه بذرالبنج (*H. niger*) نیز همین محرک موجب افزایش میزان اسکوپولامین و موجب تحریک فعالیت ژن‌های تولیدکننده اسکوپولامین مثل h6h شده است (Zhang *et al*., 2007). البته بیان بالای ژن h6h نسبت به دیگر ژن‌های درگیر در مسیر تولید اسکوپولامین در گیاه *Atropa baetica* تحت تأثیر محرک متیل جاسمونات تنها دلیل قاطع بر افزایش عملکرد بالای اسکوپولامین نمی‌باشد. احتمالاً به‌دلیل افزایش عوامل

مختلفی همانند فعال‌سازی مسیر مختلف و یا اثر متقابل بین مسیر پیام‌رسان‌های مختلف و یا فعال‌سازی مستقیم ژن باشد (Li *et al*., 2004). کاهش میزان بیان ژن در غلظت‌های بالاتر، احتمالاً به علت اثر سمّیت متیل جاسمونات و اختلال در تنظیم بالادستی ژن‌های درگیر در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Castiglione *et al*., 2011). تجمع آنزیم H6H در اثر افزایش بیان ژن h6h موجب راه‌اندازی آخرین مرحله مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی می‌شود. متیل جاسمونات نقش مهمی در فرایند انتقال پیام سلولی داشته و منجر به تنظیم ژن‌های دفاعی در گیاه می‌شود (Gundlach *et al*., 1992). بنابراین به نظر می‌رسد متیل جاسمونات به‌عنوان یک ترکیب علامت‌رسان کلیدی در فرایند تحریک بیان ژن h6h و در نهایت تولید آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه اسکوپولامین دخیل باشد. نتایج نشان داد که فعالیت بالای ژن h6h یک اثر مثبتی در تولید آلکالوئیدهای تروپانی به‌ویژه اسکوپولامین دارد. دلیل احتمالی عدم همبستگی بالا بین میزان تولید اسکوپولامین و میزان بیان ژن مربوطه در غلظت ۵۰ میکرومولار در مدت ۴۸ ساعت، امکان تغییر در میزان بیان ژن‌های دیگر درگیر در مسیر تولید آلکالوئیدهای تروپانی است. از سوی دیگر با توجه به عدم افزایش قابل توجه اسکوپولامین در مقایسه با استیل‌سالیسیلیک اسید، به نظر می‌رسد متیل جاسمونات عامل مؤثری در تنظیم بالادستی متابولیت مورد نظر نباشد (Castiglione *et al*., 2011).

منابع مورد استفاده

- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G. and Alemano, S., 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. Plant Growth Regulation, 40(1), 21-27.
- Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K.M., Eeva, M., Agostani, S. and Bagni, N., 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. Plant Cell Reports, 19(7): 691-697.
- Cardillo, A.B., Talou, J.R. and Giulietti, A.M., 2008. Expression of *Brugmansia candida* hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst. Microbial Cell Factories, 7: 17.
- Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Geri, C. and Cremonini, R., 2011. The effects of nano-TiO_2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. Journal of Nanoparticle Research, 13(6): 2443-2449.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H.J.R., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W., 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 5818-5823.
- Chen, G.X. and Asada, K., 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant and Cell Physiology, 30(7): 987-998.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E., 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. The Plant Cell, 9(7): 1211-1223.
- Dialmaghani, K., Kharvari-Nejad, R., Fahimi, H. and Hekmat- shoar, H., 2006. Extraction and determination of tropan alkaloids, hyoscyamine and scopolamine, from different parts of *Hyoscyamus pusillus* L. in different stages of plant growth. Iranaian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 22(1): 1-10.
- Facchini, P.J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Biology, 52(1): 29-66.
- Ghasemnezhad, M. and Javaherdashti, M., 2008. Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality and postharvest life of raspberry fruit. Caspian Journal of Environmental Sciences, 6(1): 73-78.
- Ghorbanpour, M., Hatami M. and Hatami, M., 2015. Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. Acta Agriculturae Slovenica, 105(1): 23-32.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in

Physiologia Plantarum, 115(4): 571-576.
- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. and Choi, M.S., 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science, 166(3): 745-751.
- Li, J., Brader, G. and Palva, E.T., 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. The Plant Cell, 16(2): 319-331.
- Maehly, A.C. and Chance, B., 1959. The assay catalase and peroxidase: 357-425. In: Gilck, D., (Ed.). Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publishers, New York, 470p.
- Oto, A., Sethi, I., Karczmar, G., McNichols, R., Ivancevic, M.K., Stadler, W.M., Watson, S. and Eggener, S., 2013. MR imaging-guided focal laser ablation for prostate cancer: phase I trial. Radiology, 267(3): 932-940.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K.I., Choi, K.B., Morishige, T., Fujimoto, H. and Yamada, Y., 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(1): 367-372.
- Soares, A.M.D.S., Souza, T.F.D., Jacinto, T., and Machado, O.L.T., 2010. Effect of methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H_2O_2 in *Ricinus communis* leaves. Brazilian Journal of Plant Physiology, 22(3): 151-158.
- Teixeira da Silva, J.A., 2006. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Global Science Books, Ltd: London, 646p.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smith, B.N., 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 121(5): 453-461.
- Zabetakis, I., Edwards, R. and O'Hagan, D., 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. Phytochemistry, 50(1): 53-56.
- Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W. and Tang, K., 2007. Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. Planta, 225(4): 887-896.

elicitor-induced plant cell cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(6): 2389-2393.
- Habibi, P., Piri, K., Deljo, A., Moghadam, Y.A. and Ghiasvand, T., 2015. Increasing Scopolamine content in Hairy Roots of *Atropa belladonna* using Bioreactor. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58(2): 166-174.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y., 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. Annual Review of Plant Biology, 45(1): 257-285.
- Hong, M.L.K., Bhatt, A.R.V.I.N.D., Ping, N. and Keng, C.L., 2012. Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Romanian Biotechnological Letters, 17(3): 7340-7350.
- Ionkova, I., 2002. In vitro culture and the production of secondary metabolites in *Hyoscyamus reticulatus* L.: 75-94. In: Nagata, T. and Ebizuka, Y., (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry (Vol. 51): Medicinal and Aromatic Plants XII. Springer, 348p.
- Javanmardy, S.H., Fotot, R. and Saba, J., 2010. The relationship between of soluble carbohydrates and proline with osmotic adjustment and the role of osmotic adjustment under drought stress in wheat yield. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Sciences, 53: 65-72.
- Jung, S., 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Journal of Plant physiology and Biochemistry, 42: 231-255.
- Kai, G., Liu, Y., Wang, X., Yang, S., Fu, X., Luo, X. and Liao, P., 2011. Functional identification of hyoscyamine 6 β-hydroxylase from *Anisodus acutangulus* and overproduction of scopolamine in genetically-engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 33(7): 1361-1365.
- Kai, G., Yang, S., Zhang, Y., Luo, X., Fu, X., Zhang, A. and Xiao, J., 2012. Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. Molecular Biology Reports, 39(2): 1721-1729.
- 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.
- 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.

Effects of methyl jasmonate on root growth, biochemical characteristics and h6h gene expression in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots

A. Norozi[1], B. Hosseini[2*], M. Jafari[3] and M. Farjaminezhad[4]

1- M.Sc. Student, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4- Medicinal Plants Research Center, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Received: June 2017 Revised: November 2017 Accepted: December 2017

Abstract

Henabne (*Hyoscyamus reticulatus* L.) is a rich source of tropane alkaloids including hyoscyamine (Hyos) and scopolamine (SCP), widely used in pharmaceutical field. The aim of the present study was to assess the effect of different concentrations (0, 50, 100 and 200 µM) of methyl jasmonate (MeJA) at two different times of exposure (24 and 48 h) on growth, antioxidant enzymes activity, tropane alkaloids content, and the expression level of hyoscyamine-6-beta-hydroxylase (*h6h*) gene in *H. reticulatus* hairy root cultures. The results showed that MeJA at high concentration (200 µM) led to the decline of fresh and dry weight of hairy roots. Catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) activities were significantly increased by MeJA, especially at 200 µM in elicited hairy roots. As well, CAT and GPX activities, but not of APX, were also affected by exposure time of MeJA. According to the GC/MS analysis, the highest percentage of SCP (13.96%) and Hyos (21.9%) were respectively obtained when hairy roots were exposed to MeJA at concentrations of 100 and 200 µM for 48 and 24 h, which were, respectively, 1.6- and 1.25-fold higher than those in the control roots. According to the results of semi-quantitative RT-PCR analysis, the highest expression of *h6h* gene (6-fold higher than in the control) was obtained after 24 h exposure to 100 µM MeJA. These results indicate that MeJA, due to stimulation of the expression of key genes involved in the biosynthetic pathway of tropane alkaloids, could be used as an effective elicitor for increased production of Hyos and SCP.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, ascorbate peroxidase, hairy root, hyoscyamine-6-beta-hydroxylase, tropane alkaloeids.