مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJRFPBGR.2023.360647.1427
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۲۷۷-۲۶۳ (۱۴۰۱) شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.2.7.3

تأثیر محرک اسیدسالیسیلیک بر میزان زیست‌توده و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی ریشه‌های مویین گیاه شابیزک (*Atropa belladonna* L.)

بهنام کارجو[۱] و محمد فتاحی[۲*]

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

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

پست‌الکترونیک: mo.fattahi@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

چکیده

تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و غیرممکن است. با توجه به اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آنها در گیاهان دارویی، راهکارهایی مانند کشت ریشه‌های مویین و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی برای افزایش این متابولیت‌ها پیشنهاد شده است. تجمع تروپان آلکالوئید آتروپین در شابیزک (*Atropa belladonna* L.) اهمیت زیادی در صنعت داروسازی دارد. در این پژوهش، با استفاده از سویه A7 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*)، ریشه مویین تراریخت در گیاه شابیزک تولید شد. تراریختی ریشه‌های مویین به‌وسیله آزمون PCR مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون PCR صحت تکثیر قطعه bp780 برای ژن rolB را در ریشه‌های مویین تراریخت نشان داد. در ادامه این تحقیق، اثر غلظت‌های مختلف (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار) اسیدسالیسیلیک در دو زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بر میزان تولید آتروپین، میزان رشد گیاه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین شابیزک بررسی شد. داده‌های جمع‌آوری شده به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه واریانس شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت اسیدسالیسیلیک بر کلیه صفات معنی‌دار بود ($P<0.01$). اثر زمان بر میزان آتروپین و آسکوربات پراکسیداز و اثر متقابل تیمار در زمان بر میزان آتروپین، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز معنی‌دار بود ($P<0.01, 0.05$). نتایج نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک به‌طورکلی موجب کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌های مویین در مقایسه با کشت‌های شاهد شد و کمترین میزان وزن تر و خشک ریشه‌های مویین (۲/۷۹ و ۰/۱۴۸ گرم) در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک در مقایسه با شاهد (۶/۷۶ و ۰/۲۷۳گرم) بدست آمد. بااین‌حال، براساس آنالیز GC/MS، بیشترین میزان آتروپین (۱۱ برابر بیشتر از شاهد) در تیمار ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک در مدت زمان ۲۴ ساعت بدست آمد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاگول پراکسیداز، به ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میکرومولار اسیدسالیسیلیک به مدت ۲۴ ساعت و بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک در مقایسه با شاهد بدست آمد. براساس نتایج، چنین استنباط می‌شود که محرک اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های پایین، برای علامت‌رسانی سلول مفید بوده و باعث تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه شده اما در غلظت‌های بالا، موجب اختلال در رشد ریشه‌های مویین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، آلکالوئید، الیسیتور، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ریشه مویین

مقدمه

گیاه شابیزک (*Atropa belladonna* L.) متعلق به خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) است و یکی از منابع اصلی تولید آلکالوئیدهای تروپانی محسوب می‌شود. جنس آتروپا حاوی ۴ گونه *Atropa belladonna* L، *Atropa acuminate* Royle، *Atropa baetica* Wilk و *Atropa pallidiflora* Schonb-Tem است که در منطقه مدیترانه، جنوب اروپا و آسیا پراکنده هستند (Maqbool *et al*., 2014). یکی از آلکالوئیدهای تروپانی مهم در شابیزک آتروپین می‌باشد که دارای خواص بازکننده مردمک چشم، آنتی کولینرژیک، ضد اسپاسم، ضد تشنج، تسکین‌دهنده درد و آرام‌بخش است. همچنین در درمان بیماری‌های پارکینسون، پادزهر مارگزیدگی، دردهای معده و رفع التهاب ناشی از سوختگی استفاده می‌شود (Zarei *et al*., 2020; Rani & Prasad, 2013). یکی از روش‌های متداول تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در ریشه ساخته می‌شوند تلقیح ریزنمونه به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) 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 باکتری‌های محرک رشد، افزایش رشد و انشعابات ریشه را باعث می‌شود (Abdala *et al*., 2003). سرعت رشد بالا، انشعابات فراوان، نگهداری آسان در محیط عاری از هورمون‌های گیاهی، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی از مزایای کشت ریشه‌های مویین است (Xo *et al*., 2009). اما در بیشتر مواقع، تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش، نیاز به محرک‌های زیستی و غیرزیستی برای تولید دارد. الیسیتورها علاوه بر پاسخ‌های دفاعی، توانایی القای تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند تروپان آلکالوئیدها را به عهده دارند (Kai *et al*., 2012). استفاده از محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی یک راهبرد مؤثر و مفید برای افزایش تولید و انباشت متابولیت‌های باارزش دارویی می‌باشد که با کاهش زمان لازم برای به دست آوردن غلظت‌های بالایی از این ترکیبات و افزایش سرعت تولید آنها همراه است (Cai *et al*., 2012). محرک‌های زیستی و غیرزیستی با تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و انتقال واکوئلی متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Farag *et al*., 2017). محرک‌های مختلف می‌توانند با ایجاد تنش اکسیداتیو منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، القای مسیرهای انتقال علامت و در نهایت تولید متابولیت‌های ثانویه شوند (Kamalipourazad *et al*., 2016).

اسیدسالیسیلیک (۲-هیدروکسی بنزوئیک اسید) مولکول علامت‌رسان است که بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک مهم گیاه مانند رشد، تمایز و متابولیسم را تنظیم می‌کند (Lui *et al*., 2018). این ترکیب فنلی قادر است با تحریک بیان ژن‌ها در فعال‌سازی بسیاری از سازوکارهای دفاعی در گیاه نقش کلیدی ایفا کند.

نظر به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و غیرممکن است و نیز به دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آنها در گیاهان دارویی، راهکارهایی مانند کشت ریشه‌های مویین و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود ببخشد. بنابراین در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر آلکالوئید آتروپین، میزان زیست‌توده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین گیاه شابیزک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

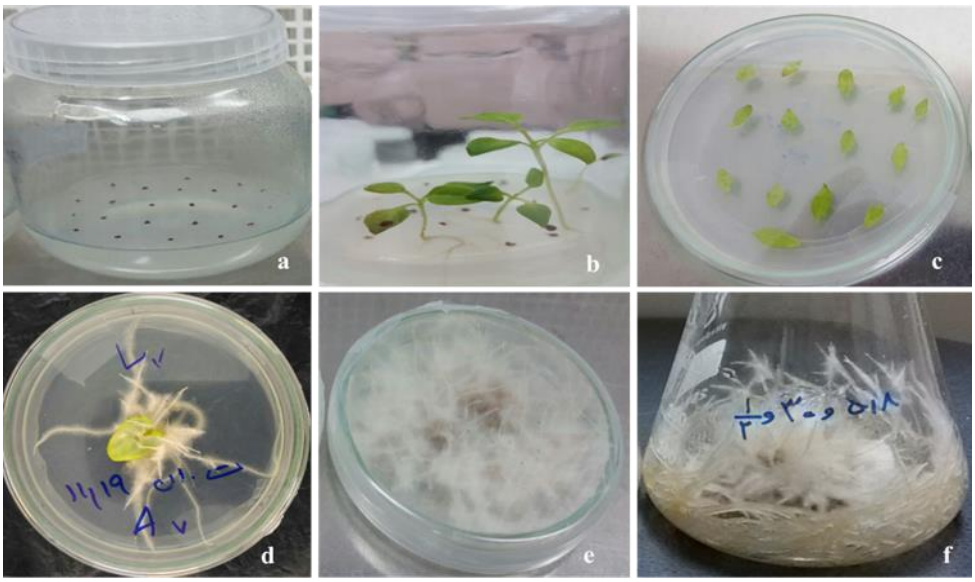
تهیه مواد گیاهی

بذرهای گیاه شابیزک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به‌منظور تسریع جوانه‌زنی و شکست خواب، ابتدا بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب خیس شدند، سپس بلافاصله بذرها را در کیسه پلاستیکی قرار داده و به‌مدت ۱ ماه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی مدت، بذرها با اسیدسولفوریک ۵۰ درصد به مدت ۲ دقیقه تیمار شدند، بذرهای تیمار شده، در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و به‌مدت ۱۰

دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضدعفونی گردیدند. درنهایت، بذرها پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت شدند (شکل ۱–a) و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه‌زنی نگهداری شدند. سه هفته پس از کشت بذرها جوانه‌زنی انجام شد (شکل ۱–b).

القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی شابیزک

به‌منظور القای ریشه‌های مویین در شابیزک از سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز به روش تزریقی استفاده شد. به‌منظور آماده‌سازی باکتری برای انجام تلقیح، باکتری در محیط کشت LB جامد کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در روش تزریقی، ریزنمونه‌های کوتیلیدونی یک‌هفته‌ای تهیه و با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به باکتری در LB جامد در بخش پشتی ریزنمونه‌های کوتیلیدونی زخم‌هایی ایجاد شد (شکل ۱– c). سپس ریزنمونه‌های تلقیح شده بر روی محیط کشت MS جامد حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت، در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. آنگاه به‌منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به‌وسیله آب مقطر استریل حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر شستشو و به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. ۲ هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌ها، به‌تدریج ریشه‌های مویین ظاهر شدند (شکل ۱– d).



شکل ۱– القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی شابیزک: a) کشت بذرهای شابیزک در محیط کشت MS جامد، b) گیاهچه‌های یک‌هفته‌ای رشد کرده در محیط MS، c) تلقیح کوتیلدون‌های جداشده از گیاهچه‌های مادری استریل شابیزک با سویه A7 اگروباکتریوم رایزوژنز، d) انتقال ریزنمونه ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین مجزا در محیط MS جامد، e) توسعه رشد ریشه‌های مویین در محیط MS جامد، f) ریشه‌های مویین رشد کرده در محیط MS 1/2 مایع

Figure 1. Induction of hairy roots in *A. belladonna* cotyledon explants: a) seed sowing in solid MS culture medium, b) One-week-old seedlings grown in MS, c) Inoculation of cotyledons isolated from sterile mother plants of *A. belladonna* with A7 strain of *Agrobacterium rhizogenes* d) Transplantation of rooted explants as single and separate lines in solid MS, e) Growth development of hairy roots in solid MS, f) Hairy roots grown in liquid MS 1/2

بعد از گذشت یک هفته، برای افزایش رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به‌صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردیدند (شکل ۱- e). زیر کشت ریزنمونه‌ها در محیط جدید هر هفته یکبار انجام شد. در هر مرحله از زیر کشت، غلظت آنتی‌بیوتیک به نصف کاهش داده می‌شد. عمل زیر کشت چهار بار انجام گردید. از میان ۲۰ لاین ریشه مویین القاء شده، یک لاین پر رشد برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب و در محیط MS ۱/۲ مایع کشت گردید (شکل ۱- f).

اعمال محرک اسیدسالیسیلیک

برای انجام این آزمایش محیط کشت‌های MS ۱/۲ مایع (۳ درصد ساکارز pH=۵/۸) حاوی غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک تهیه گردید. ۱ گرم از ریشه‌های مویین داخل هر یک از ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS ۱/۲ مایع حاوی غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک، در ۳ تکرار منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۱۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های مویین از محیط کشت MS ۱/۲ مایع حاوی محرک، خارج و به محیط کشت MS ۱/۲ مایع عاری از محرک انتقال یافتند. پس از گذشت دو هفته، ریشه‌های مویین برداشت و بعد از شستشو با آب مقطر و حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها به‌وسیله کاغذ صافی، وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. سپس ریشه‌های مویین به مدت ۲ روز در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد هوا خشک شده و وزن خشک آنها ثبت گردید.

استخراج آلکالوئید آتروپین

استخراج آلکالوئیدها به روش Kamada و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های مویین خشک‌شده و پودر گردید و داخل ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس کلروفرم، متانول و آمونیاک ۲۵ درصد، به نسبت ۱۵: ۵: ۱ به نمونه‌های گیاهی اضافه‌شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد التراسونیک شدند. آنگاه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد، محلول حاوی پودر ریشه مویین پس از عبور از صافی و دو مرتبه شستشوی کاغذ صافی با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم، برای تبخیر فاز کلروفرمی از دستگاه روتاری اواپراتور (تبخیرکننده دوار) استفاده گردید. به عصاره باقی‌مانده و خشک‌شده ته بالن، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ نرمال اضافه و کاملاً به هم زده شد. در مرحله بعد، با ریختن مخلوط به‌دست‌آمده داخل قیف دکانتور دو فاز تشکیل شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها به یک بشر منتقل و pH آن به‌وسیله آمونیاک ۲۵ درصد روی یخ تا ۱۰ تنظیم گردید. محلول قلیایی به داخل قیف دکانتور ریخته شد و آلکالوئیدها یک‌مرتبه توسط ۲ میلی‌لیتر و دومرتبه توسط ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئید به‌دست‌آمده پس از افزودن سولفات سدیم خشک به‌منظور حذف آب موجود، از صافی عبور داده‌شده و کاغذ صافی توسط ۲-۱ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. محلول صاف‌شده به‌وسیله روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و ماده جامد به‌دست‌آمده که آلکالوئید کل نامیده می‌شود در ۲-۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد.

آنالیز آلکالوئید آتروپین به روش GC/MS

به‌منظور جداسازی و شناسایی آتروپین از دستگاه کروماتوگرافی گازی Hewlett -Packard (HP, Palo Alto, CA, 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 شد. دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و انرژی

یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

بدین منظور، DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه غیرتراریخت حاصل از جوانه‌زنی بذرهای کشت‌شده به روش CTAB (Khan *et al*.,2007) استخراج شد. به‌منظور تأیید حضور ژن *rol* B اگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های مویین شابیزک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گردید و توالی آغازگرهای ذیل برای تکثیر قطعات 780 bp ژن *rol* B استفاده شدند.

Forward primer: 5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3'

Reverse primer: 5' TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3'

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه عصاره گیاهی جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد. طبق این روش، حدود ۰/۲ گرم بافت تر ریشه مویین توزین و به داخل هاون سرد روی یخ منتقل گردید، سپس به میزان پنج برابر آن بافر (Tris-HCl) ۵۰ میلی‌لیتر با pH= ۷/۵ برحسب میلی‌لیتر اضافه و به‌طور کامل ساییده شد. هموژنات به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی از رسوب با دقت جداشده و برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6): مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌لیتر (pH=۷)، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت کاتالاز از ضریب خاموشی ($36.6\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد (Aebi.1984).

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX; EC 1.11.1.7): مخلوط واکنش شامل ۱/۴ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌لیتر (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲۲ میلی‌لیتر، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰۰ میلی‌لیتر و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌صورت افزایش در جذب، طی ۱ دقیقه در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز از ضریب خاموشی ($26.6\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده شد (Roy *et al*.1996).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX; EC1.11.1.11.): مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌لیتر (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌صورت کاهش در جذب، طی ۱ دقیقه در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی ($2.8\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) استفاده گردید (Nakano and Asada.1981).

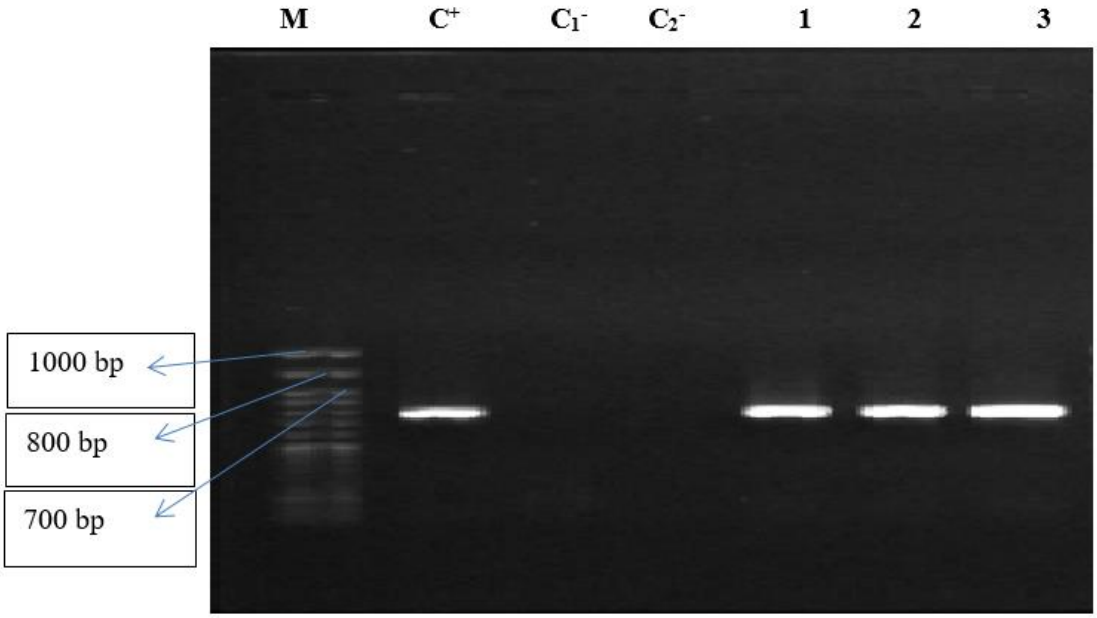
تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین شابیزک

نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد 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 هم‌اندازه قطعه تکثیرشده در نمونه کنترل مثبت (اگروباکتریوم) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه (کنترل منفی) هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نشد. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol* B در ریشه‌های مویین شابیزک بود (شکل ۲).



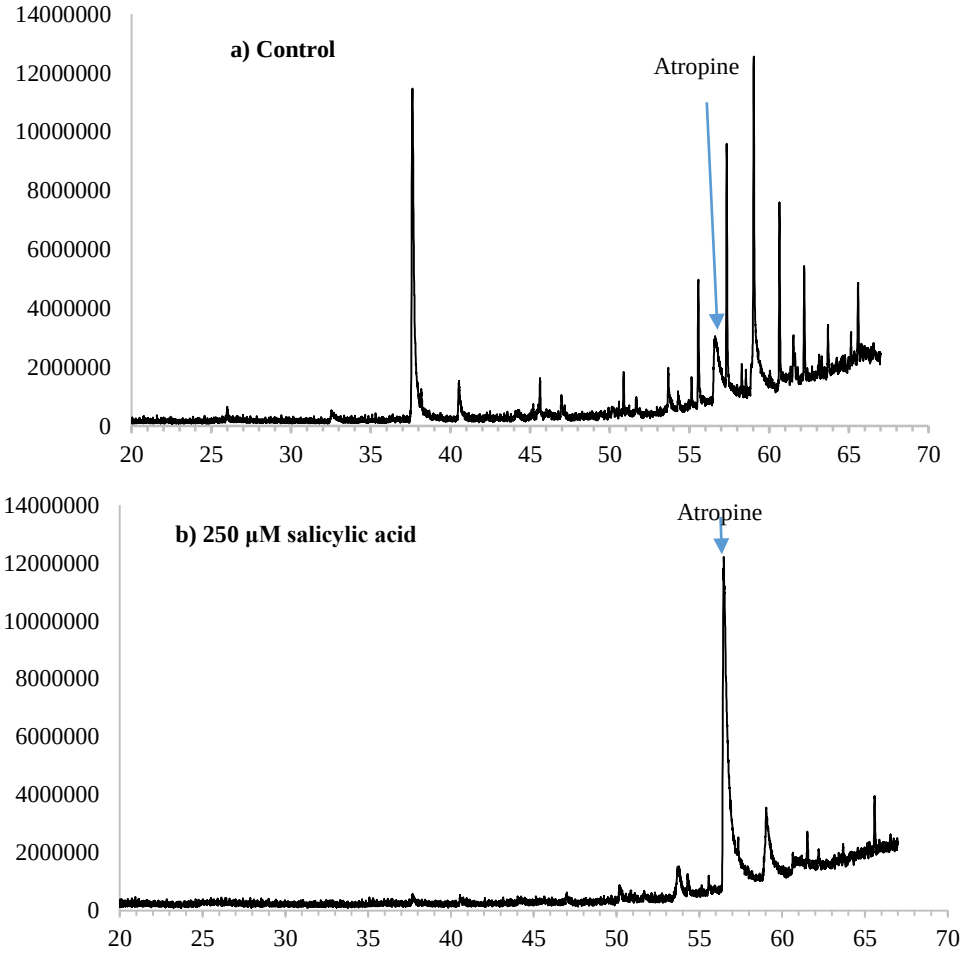
شکل ۲- آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تأیید حضور ژن **rol B** در ریشه‌های تراریخت شابیزک: **M)**: **DNA** مارکر **1kb (Fermentase)**، **C^+**: باکتری اگروباکتریوم سویه **A7** به‌عنوان کنترل مثبت، **C_1^-)**: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی اول، **C_2^-)**: واکنش **PCR** بدون الگوی **DNA** به‌عنوان کنترل منفی دوم، لاین‌های **1,2,3)**: ریشه‌های مویین القاشده در ریزنمونه‌های کوتیلدونی یک‌هفته‌ای توسط سویه **A7** اگروباکتریوم رایزوژنز.

Figure 2. Polymerase chain reaction analysis to confirm the presence of rol B gene in *A. belladonna* transgenic roots. M): 1kb DNA marker (Fermentase), C^+): Agrobacterium strain A7 as a positive control, $C1^-$): non-transgenic control roots as the first negative control, $C2^-$): PCR reaction without DNA template as the second negative control, lanes 1 to 3): Hairy roots induced in one-week-old cotyledon explants by *Agrobacterium rhizogenes* strain A7.

تأثیر اسیدسالیسلیک بر تولید آتروپین درکشت ریشه‌های مویین شابیزک

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای متقابل غلظت در زمان تیمار با اسیدسالیسیلیک بر تولید آتروپین در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). بیشترین میزان تولید آتروپین در اثر تیمار ریشه‌های مویین با اسیدسالیسیلیک به ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار (۷۵/۰۸ درصد) و ۱۲۵ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار (۶۵/۴۲ درصد) به‌دست آمد که این دو تیمار با هم اختلاف معنی‌داری داشتند

که نسبت به شاهد (۶/۸۸ درصد) به ترتیب حدود ۱۱ و ۹/۵ برابر افزایش نشان دادند (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳- کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز **GC/MS** نمونه‌های ریشه مویین تیمار شده با اسیدسالیسیلیک: **a**) کروماتوگرام ریشه‌های مویین شاهد، **b**) کروماتوگرام ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک به مدت ۲۴ ساعت

Figure 2. Chromatograms obtained from GC/MS analysis of hair root samples treated with salicylic acid: a) Chromatogram of control hair roots b) Chromatogram of hairy roots treated with 250 µM concentration of salicylic acid for 24 hours.

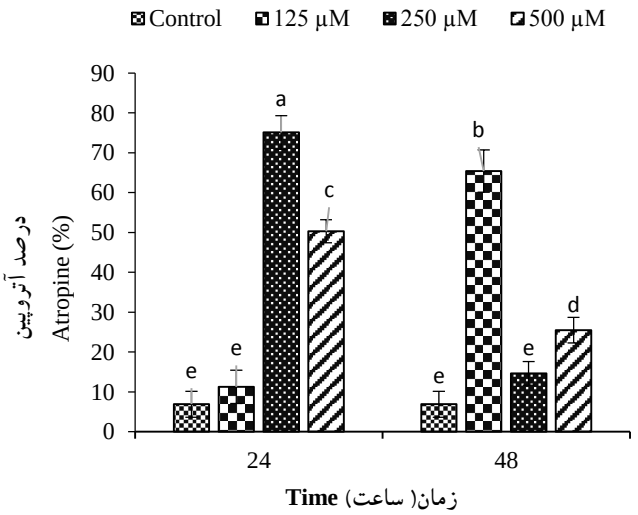
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و زمان تیمار با اسیدسالیسیلیک بر تولید آتروپین، میزان رشد گیاه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین تراریخت گیاه شابیزک

Table 1- The results of variance analysis of the effect of salicylic acid concentration and time of treatment of on atropine production, growth of hairy roots and antioxidant enzymes activities in hairy roots of *A. belladonna*

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	MS میانگین مربعات					
		آتروپین Atropine)	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	کاتالاز Catalase	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
غلظت اسیدسالیسیلیک (A) Concentration	3	1741.67**	15.876**	0.0160**	368.65**	533.70**	13.29**
زمان تیمار (B) Time	1	362.47**	0.082ns	0.0013ns	25.64ns	32.20ns	4.86*
اثر متقابل (A×B) Interaction (A×B)	3	3472.38**	0.487 ns	0.0084ns	30.07*	166.60**	2.86ns
اشتباه آزمایشی Error	16	5.92	0.430	0.0009	5.99	6.82	0.89
ضریب تغییرات (درصد)	CV%	7.61	13.60	14.21	16.63	13.72	21.45

ns، *، **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at 5 and 1% probability level, respectively



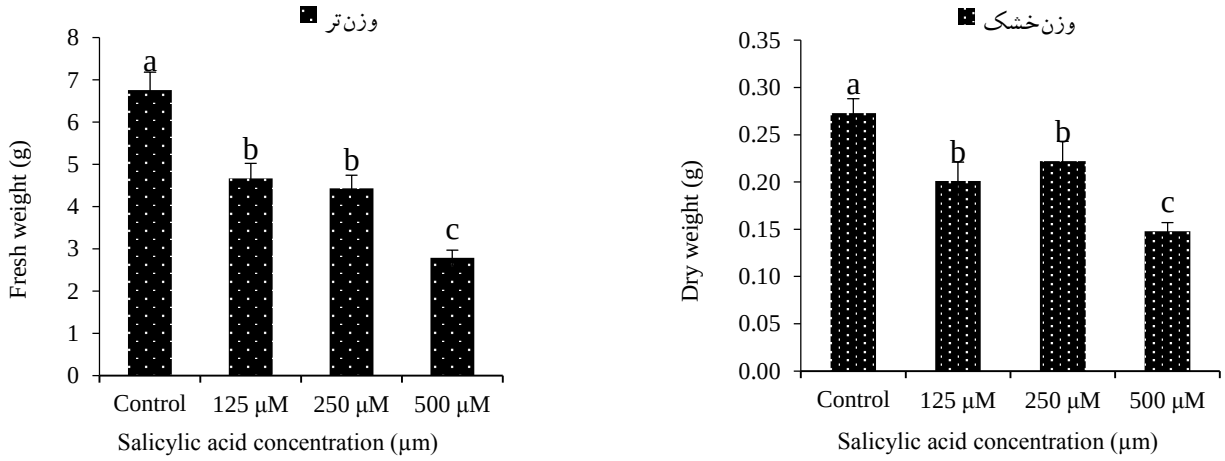
شکل ۴- مقایسه میانگین اثرهای متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با اسیدسالیسیلیک بر میزان تولید آتروپین در ریشه‌های مویین شابیزک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن است.

Figure 4. Means of salicylic acid concentration by time interaction effect on the amount of atropine production in hairy roots of *A.belladonna.* Means with the same letter are not significantly different at (P< 0.01) by Duncan test.

تأثیر محرک اسیدسالیسیلیک بر رشد ریشه‌های مویین شابیزک

نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین شابیزک نشان داد که سطوح مختلف غلظت اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین شابیزک اثر معنی‌داری ($P< 0.01$) داشت. اثر اصلی زمان و اثر متقابل غلظت در زمان، معنی‌دار نبود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین نشان داد که با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک، وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به‌طوری‌که کمترین و بیشترین وزن تر (۲/۷۹ گرم و ۶/۷۶ گرم) و وزن خشک (۰/۱۴۸ گرم و ۰/۲۷۳ گرم) ریشه‌های مویین، به ترتیب در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک و شاهد بدست آمد (شکل ۵).

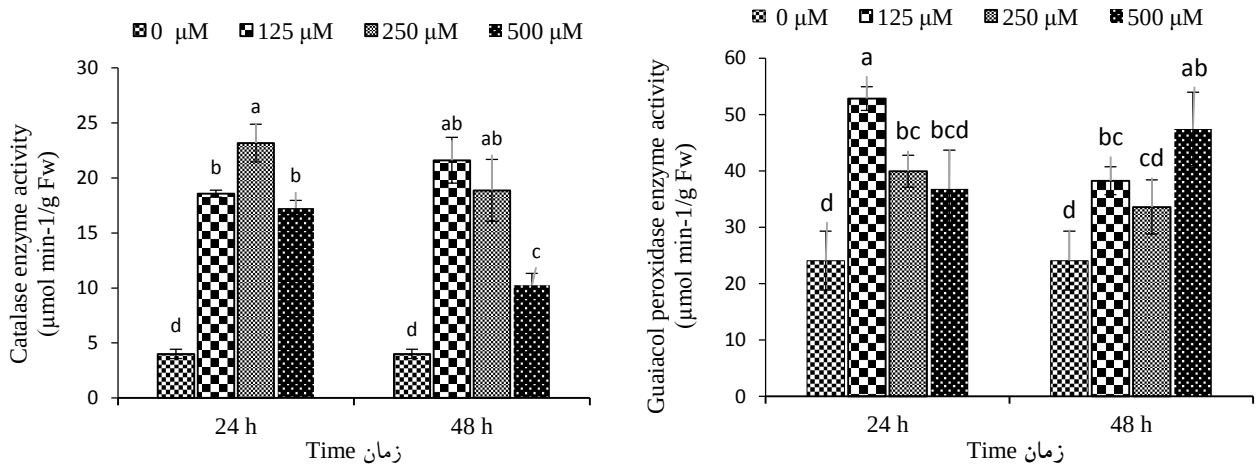


شکل ۵- میانگین اثر ساده غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین شابیزک
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن است.

Figure 5. Means of the main effect of salicylic acid concentrations on the fresh and dry weight of hairy roots of *A. belladonna*. Means with the same letter are not significantly different at (P< 0.01) by Duncan test.

تأثیر محرک اسیدسالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین شابیزک

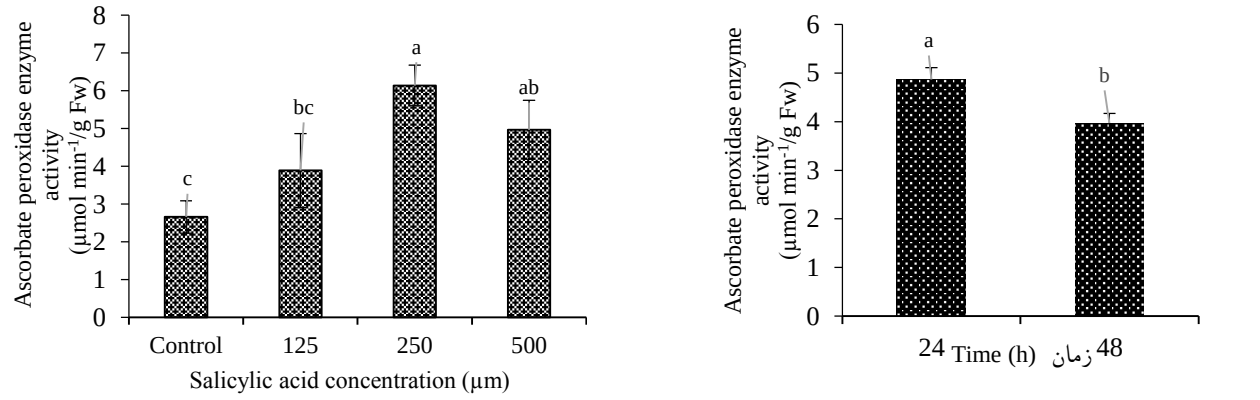
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای متقابل غلظت در زمان تیمار اسیدسالیسیلیک، در میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری بود. همچنین اثر اصلی زمان بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاگول پراکسیداز، به ترتیب در اثر تیمار ریشه‌های مویین با غلظت ۲۵۰ و ۱۲۵ میکرومولار اسیدسالیسیلیک به مدت ۲۴ ساعت تیمار به‌دست آمد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین در مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاگول پراکسیداز، به ترتیب در غلظت ۱۲۵ و ۵۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک به‌دست آمد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶). بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به ترتیب مربوط به غلظت ۲۵۰ میکرومولار و شاهد بود که با هم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۷). در مقایسه مدت زمان‌های تیمار اسیدسالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، نتایج نشان داد که تیمار ۲۴ ساعت در مقایسه با مدت زمان ۴۸ ساعت به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را افزایش داد (شکل ۷).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثرهای متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با اسیدسالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (نمودار چپ) و گایاکول پراکسیداز (نمودار راست) در ریشه‌های مویین شابیزک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ (گایاکول پراکسیداز) و ۵ (کاتالاز) درصد آزمون دانکن است.

Figure 6. Means of salicylic acid concentration by time of treatment interaction on the Catalase (left Fig) and Guaiacol peroxidase enzymes activities (right Fig) in hairy roots of *A. belladonna*. Means with the same letter are not significantly different, Guaiacol peroxidase (P< 0.01) and Catalase (P< 0.05) by Duncan test.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت اسیدسالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (نمودار چپ) و اثر اصلی مدت زمان تیمار بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (نمودار راست) حاصل از ریشه‌های مویین شابیزک

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ (غلظت) و ۵ (زمان) درصد آزمون دانکن است.

Figure 7. Means of the main effect of salicylic acid concentration on ascorbate peroxidase enzyme activity (left Fig) and means of the main effect of time of treatment on the activity of the ascorbate peroxidase enzyme (right Fig) in the hairy roots of *A. belladonna*. Means with the same letter are not significantly different, concentration (P< 0.01) and time (P< 0.05) by Duncan test.

بحث

در این پژوهش، اثر محرک اسیدسالیسیلیک بر میزان تولید آلکالوئید آتروپین، شاخص رشد (وزن تر و خشک) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین گیاه شابیزک بررسی شد. محرک‌های غیرزیستی، سیگنال‌های کلیدی درونی هستند که در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی

گیاهان نقش دارند. این محرک‌ها برای فعال کردن متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند و این فعالیت را با اثر بر روی فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهند (Ajungla *et al*., 2009) . اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک محرک درونی سبب سنتز آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند ۱-۳- بتا کلوکوناز و لیپوکسیژناز (آنزیم اصلی مسیر بیوسنتزی جاسکونیک‌اسید و مسیرهای پی‌درپی سیگنالی وابسته به یون کلسیم و MAP کینازها) می‌شود. درواقع اسیدسالیسیلیک شرایط تنشی را در گیاه القاء کرده و به‌عنوان سیگنال درونی در پاسخ به استرس‌های زنده و غیرزنده عمل کرده و سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود و بخشی از راهکار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب می‌گردد (Samadi *et al*., 2015). محرک اسیدسالیسیلیک احتمالاً در میزان فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی مانند پوترسین N-متیل ترانسفراز (PMT) و تروپینون ردوکتاز ۱ (TR-I) مؤثر بوده و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، بیان ژن‌های pmt و tr-1 را تحت تأثیر قرار داده و موجب افزایش میزان تولید آلکالوئید آتروپین شده است (Kang *et al*., 2004). عوامل مختلفی مانند غلظت محرک، سن کشت، زمان افزودن محرک به محیط کشت و مدت زمانی که محیط کشت در معرض محرک قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Vasconsuelo & Boland, 2007). افزایش غلظت محرک بیش‌ازحد معمول، نه‌تنها افزایش متابولیت را دربرندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی (احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن مربوطه) تولید متابولیت‌ها را کم یا متوقف می‌سازد. Wen و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که استفاده از اسیدسالیسیلیک به‌عنوان محرک خارجی بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی ازجمله ژن‌های مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدها را افزایش می‌دهد. این عوامل، فاکتور بسیار مهم در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند. بنابراین برای به دست آوردن حداکثر مقدار تروپان آلکالوئیدها، نیاز به بهینه کردن این فاکتورها است. همان‌طور که نتایج این پژوهش نشان داد، در کشت ریشه‌های مویین حاصل از گیاه *Atropa belladonna*، بیشترین مقدار آتروپین در غلظت ۲۵۰ میکرومولار و گذشت زمانی ۲۴ ساعت تیماردهی مشاهده شد. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک محرک غیرزیستی، نقش مؤثری در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف در کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارد، مانند آتروپین و اسکوپولامین در *Datura metel* L (Ajungla *et al*., 2009)، آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در *Papaver armeniacum* L. (Naeini *et al*., 2021)، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید در *Salvia miltiorrhiza* (Shuncang *et al*., 2015)، سیلی‌مارین در *Silybum marianum* (Khalili *et al*., 2009) ، کلیسیریک‌اسید در *Glycyrrhiza uralensis* (Li *et al*., 2016)، آرتمیزنین در *Artemisia annua* L. (Pu *et al*., 2009)، ویتانولید در *Withania samnifera* L. (Sivanandhan *et al*., 2016)، تولید Rhinacanthin D, N در کشت *Rhinacanthus nasutus* (Cheruvathur & Tomas, 2014)، به‌طوری‌که نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه با نتایج تحقیقات ذکرشده مطابقت دارد.

در این تحقیق، تیمار با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید منجر به کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در مقایسه با کشت‌های شاهد گردید. بازدارندگی در رشد ریشه می‌تواند ناشی از اثر مستقیم اسیدسالیسیلیک در پاسخ کلی به استرس‌های بیرونی باشد. همان‌طور که در نتایج مشاهده شد غلظت‌های پایین الیسیتور تأثیر معنی‌داری بر میزان رشد ریشه‌های مویین نداشت. Kangو همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های بالای اسیدسالیسیلیک تأثیر منفی بر رشد ریشه‌های مویین *Scopolia parviflora* دارد. اسیدسالیسیلیک می‌تواند متابولیسم اولیه را کاهش و متابولیسم ثانویه را افزایش بدهد. رابطه معکوس بین تولید زیست‌توده و تولید متابولیت ثانویه ممکن است درنتیجه الیسیته کردن باشد (Parsa & Zeinali, 2016). همچنین

مشخص شده است که اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های بالا باعث ایجاد تنش و نیز آسیب شدید بافت ریشه شده و منجر به کاهش یا عدم رشد و کاهش متابولیسم سلول می‌گردد (Ahmadian *et al*., 2010). اسیدسالیسیلیک از طریق تحریک تولید نیتریک اکسید رشد ریشه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که غلظت بالای نیتریک اکسید با آسیب به DNA و غشاهای سلولی و در نهایت مرگ سلول‌ها و اختلال در انتقال قطبی اکسین باعث کاهش رشد ریشه‌های مویین می‌شود (Asghari, 2015). در این راستا Kai و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تیمار ریشه‌های مویین *Anisodus acutangulus* به مدت ۹۶ ساعت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک اثر منفی بر روی رشد ریشه‌های مویین دارد و موجب عدم رشد ریشه و قهوه‌ای شدن آن می‌شود. آنان دلیل این تأثیر منفی را تجمع تروپان آلکالوئیدها در محیط کشت معرفی کرده و بیان کردند که این عامل می‌تواند موجب صدمه زدن به ریشه مویین شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک زیست‌توده، ریشه‌های مویین کاهش یافت که با نتایج حاصل از Chaichana و همکاران (۲۰۱۲) در کشت ریشه‌های مویین گونه Stemona و گزارش Chotikadachanarong و همکاران (۲۰۱۱) در کشت ریشه‌های مویین *Stamina curtisii* مطابقت دارد. همچنین کاربرد اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های مختلف باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، گایاکول‌پراکسیداز (GPX) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) شد. به نظر می‌رسد که این افزایش فعالیت به‌عنوان یک پاسخ دفاعی برای به حداقل رساندن تولید و اثرهای مخرب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌ها باشد (Taghizadeh *et al*., 2019). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سازوکاری برای کنترل سطح مولکول‌های ROS بوده و مانع از تخریب سلول‌ها و مرگ آنها می‌شود. همچنین سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه با تنظیم سطح مولکول علامت‌رسان H_2O_2 می‌تواند در القای مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه نقش داشته باشد (Bavi *et al*., 2022). اسیدسالیسیلیک نقش کلیدی در رشد و نمو و پاسخ دفاعی گیاه ایفا کرده و در برخی از سیستم‌های انتقال سیگنال که موجب القاء آنزیم‌های خاص می‌شود درگیر می‌باشد (Chen *et al*., 2006). تحت شرایط تنش این تعادل به‌هم‌خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. حضور این گونه‌های فعال اکسیژن برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مانند غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Laspina *et al*., 2005). کاهش تنش اکسیداتیو و آسیب غشایی، در پاسخ به تیمار اسیدسالیسیلیک ممکن است مربوط به القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که سلول‌ها را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌نماید. هنگامی که اسیدسالیسیلیک در غلظت و زمان مناسب به‌کاربرده می‌شود موجب یک تنش اکسیداتیو موقت و گذرا در سلول‌های گیاهی شده که به‌عنوان یک فرایند مقاوم‌سازی عمل می‌نماید و موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول می‌گردد (Hayat *et al*., 2007; Horvath *et al*., 2007).

طبق نتایج این پژوهش، اسیدسالیسیلیک موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد که با نتایج حاصل از Khalili و همکاران (۲۰۱۰) در کشت ریشه‌های مویین گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) و Li و همکاران (۲۰۱۶) در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Glycyrrhiza uralensis* مطابقت دارد. بر اساس نتایج این پژوهش اسیدسالیسیلیک منجر به افزایش قابل توجه آتروپین و کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌های مویین در شابیزک گردید. به‌طوری‌که در غلظت ۲۵۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار بیشترین تولید آتروپین (۷۵/۰۸ درصد) حاصل شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های پایین برای علامت‌رسانی سلول مفید بوده و در غلظت‌های بالا، موجب اختلال در رشد ریشه‌های مویین می‌شود. همچنین اسیدسالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اثرهای مخرب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌ها را به حداقل برساند. بنابراین، الیسیتور اسیدسالیسیلیک می‌تواند به عنوان تیماری مناسب برای

استخراج آلکالوئیدهای مورد نظر در سیستم‌های کشت ریشه‌های مویین گیاهان خانواده سیب‌زمینی استفاده شود.

منابع مورداستفاده:

- 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.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in enzymology, 105, 121-126.
- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H., 2010. Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. Iranian Journal of Plant Biology, 2(3): 63-76.
- Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B. and 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(3): 317-322.
- Asghari, M., 2015. New (Non-Classic) Plant Hormones and Growth Regulators. Urmia University, Urmia, Iran, 352p. (In Persian).
- Bavi, K., Khavari-Nejad, R.A., Najafi, F. and Ghanati, F., 2022. Stimulation of phenolic compounds production in Zataria multiflora Boiss. Cell suspension culture through salicylic acid elicitation. Journal of Plant Research, 34(4): 806-817. (In Persian).
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D. and Smetanska, I., 2012. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of Vitis vinifera. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(3): 401-409.
- Chaichana, N. and Dheeranupattana, S., 2012. Effects of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Alkaloid Production from in vitro Culture of Stemona sp. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2(3): 146.
- Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M. and Huang, W. D., 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Postharvest Biology and Technology, 40(1): 64-72.
- Cheruvathur, M. K. and Thomas, T. D. 2014. Effect of plant growth regulators and elicitors on rhinacanthin accumulation in hairy root cultures of Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 118(1): 169-177.
- Chotikadachanarong, K., Dheeranupattana, S., Jatisatienr, C., Wangkarn, S., Mungkornasawakul, P., Pyne, S. G. and Sastraruji, T., 2011. Influence of Salicylic Acid on Alkaloid Production by Root Cultures of Stemona curtisii Hook. F. Journal of Biological Sciences, 3(4): 322-325.
- Farag, M.A., Al-Mahdy, D.A., Meyer, A., Westphal, H. and Wessjohann, L.A., 2017. Metabolomics reveals biotic and abiotic elicitor effects on the soft coral Sarcophyton ehrenbergi terpenoid content. Scientific reports, 7(1): 1-11.
- Hayat, S., Ali, B. and Ahmad, A., 2007. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In Salicylic acid: A plant hormone (pp. 1-14). Springer Netherlands.
- Horvath, E., Szalai, G. and Janda, T., 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation 26: 290-300.
- 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.
- Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H. Z., Behmanesh, M., and Chashmi, N. A., 2016. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in Scrophularia striata Boiss. Cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry, 107: 374-384.
- 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.
- Khalili, M., Hasanloo, T., Kazemi Tabar, S.K. and Rahnama, H., 2009. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of Silybum marianum. Cell Biology International, 33: 988-994.
- Khalili, M., Hasanloo, T., Kazemi Tabar, S.K. and Sepehrifar, R., 2010. Effect of salicylic acid on antioxidant activity in milk thistle hairy root cultures. Journal of Medicinal Plants, 35: 51-60
- Khan, S., Qureshi, M. I., Alam, T. and Abdin, M. Z., 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of

Hedw. Chemosphere, 32(12): 2305-2315.
– Samadi, S., Ghasemnajad, A. and Alizadeh, M., 2015. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (Cynara scolymus L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Journal of Plant Production Research, 21(4): 135-148.
– Shuncang, Z., Hongyan, L., Xiao, L., Yan, Y., Pengguo, X., Yanyan, J. and Zongsuo, L., 2015. Enhanced production of phenolic acids in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures by combing the RNAi-mediated silencing of chalcone synthase gene with salicylic acid treatment. Biochemical Engineering Journal, 103: 185–192.
– Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. and Manickavasagam, M., 2016. Elicitation Approaches for Withanolide Production in Hairy Root Culture of Withania somnifera (L.) Dunal. Biotechnology of Plant Secondary Metabolism: Methods and Protocols, 1-18.
– Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., and Ghanati, F., 2019. Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in Dracocephalum polychaetum Bornm. Cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic field elicitation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 136(3), 489-498.
– Teixeira da Silva, J.A., 2006. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Global Science Books, Ltd: London, 646p.
– Vasconsuelo, A. and Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172(5): 861-875.
– Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D., 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science, 169(5): 928-934.
– Xo, H., Park, J., Kim, Y., Park, N., Lee, S., Park, S. 2009. Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of Angelica gigas Nakai. Journal of Medicinal Plants Research, 3: 978-981.
– Zarei, B., Taghipour, Z. and Kahrizi, D., 2020. Effect of Growth Regulators on In Vitro Callogenesis and Regeneration of *Atropa Belladonna*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 27(2): 231-239. (In Persian).
Biotechnology, 6(3): 175p.
– Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P., 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science, 169(2): 323-330.
– Li, J., Wang, J., Li, J., Li, J., Liu, S. and Gao, W., 2016. Salicylic acid induces the change in the adventitious root of Glycyrrhiza uralensis Fisch: bioactive compounds and antioxidant enzymes. Research on Chemical Intermediates, 42(2): 1503-1519.
– Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shangguan, X. C., Peng, D. Y., Lu, T., and Lin, P., 2018. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in Gardenia jasminoides cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 134(1): 79-93.
– Maqbool, F., Singh, S., Kaloo, Z. A. and Jan, M., 2014. Medicinal importance of Genus Atropa Royle-A review. International Journal of Advanced Research, 2(2): 48-54.
– Naeini, M. S., Naghavi, M. R., Bihamta, M. R., Sabokdast, M. and Salehi, M., 2021. Production of some benzylisoquinoline alkaloids in Papaver armeniacum L. hairy root cultures elicited with salicylic acid and methyl jasmonate. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 57(2), 261-271.
– Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22(5): 867-880.
– Parsa, M. and Zeinali, A., 2016. Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of Hyoscyamus niger L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(4): 655-666. (In Persian).
– Pu, G. B., Ma, D. M., Chen, J. L., Ma, L. Q., Wang, H., Li, G. F. and Liu, B. Y., 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in Artemisia annua L. Plant Cell Reports, 28(7), 1127-1135.
– Rani, A. and Prassad, M. P., 2013. Studies on the Organogenesis of *Atropa Belladonna* in In-vitro Conditions. International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research, 4(5): 457-464.
– Roy, S., Sen, C. K. and Hänninen, O., 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using ‘moss bags’: Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in Fontinalis antipyretica

Effect of salicylic acid stimulant on the biomass content and some biochemical characteristics of deadly nightshade (*Atropa belladonna* L.) hairy roots

B. Karjo [1] and M. Fattahi [2*]

1- M.Sc. Graduated. Dept. Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Dept. Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran, Email: mo.fattahi@urmia.ac.ir

Received: 21.11.2022 Accepted: 11.03.2023

Abstract

The rapid and mass production of secondary metabolites through chemical methods is mostly expensive, difficult, or impossible. Considering the economic importance of these metabolites and their small production in medicinal plants, some methods such as the cultivation of hairy roots and the use of biotic and abiotic stimuli have been suggested to increase these metabolites. The accumulation of the tropane alkaloid atropine in *Atropa belladonna* L. is of great importance in the pharmaceutical industry. In this research, transgenic hairy roots of *A. belladonna* was produced using an A7 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. The transformation of hairy roots was confirmed by PCR test. The results of the PCR test showed the correctness of the amplification of the bp780 fragment for the *rolB* gene in hairy roots. In addition, the effect of different concentrations (0, 125, 250, and 500 µM) of salicylic acid in two times of 24 and 48 hours on the amount of atropine content, the plant growth rate and the activity of antioxidant enzymes of *A. belladonna* hairy roots was investigated. The data statistically analyzed using factorial experiment based on a completely random design with three replications. The results of the analysis of variance showed significant effect of salicylic acid on all the traits ($P<0.01$). The effect of time was significant for the amount of atropine and ascorbate peroxidase (APX). The salicylic acid by time interaction effects were significant for the amount of atropine, catalase (CAT), and guaiacol peroxidase (GPX) ($P<0.01$, 0.05). The results showed that by increasing salicylic acid concentrations the growth of hairy roots significantly decrease compared to the control and the lowest values of fresh and dry weight of the hairy roots (2.79 and 0.148 g) were obtained in 500 µM of salicylic acid compared to the control (6.76 and 0.273 g). However, based on GC/MS analysis, the highest amount of atropine (11 times more than the control) was obtained in the 250 µM salicylic acid in a period of 24 hours. The highest catalase and guaiacol peroxidase activities were obtained at concentrations of 250 and 125µM salicylic acid for 24 hours, respectively. The highest level of ascorbate peroxidase enzyme activity was obtained at the concentration of 250 µM salicylic acid compared to the control. It was concluded that the salicylic acid stimulant at low concentrations is useful for cell signaling and stimulating the production of secondary metabolites, but at high concentrations, it disrupts the growth of hairy roots.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, alkaloid, elicitor, antioxidant enzymes, hairy root