

تولید و انتشار آلکالوئیدهای تروپان از گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.) در شرایط هیدروپونیک

Production and Release of Tropane Alkaloids from Deadly Nighshade (*Atropa belladonna* L.) in Hydroponic Condition

سید شریف سادات^۱، خسرو پیری^{۲*}، محمود اثنی عشری^۳، منصور غلامی^۴ و پیمان صالحی^۵

چکیده

گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.) از جمله گیاهانی است که به طور وسیع در طب سنتی ایران استفاده می شود. کاربرد تکنیک هیدروپونیک برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در داتوره با موفقیت انجام شده است. به منظور کاربرد این تکنیک در شاهبیزک، ابتدا این گیاهان قبل از اضافه نمودن توین ۲۰ در شرایط هیدروپونیک کشت شدند. پس از ۳۰ روز از رشد، گیاهچه ها به محیط های رشد هیدروپونیک محتوی غلظت های مختلف از توین ۲۰ انتقال یافتند. در تیمار توین ۷ درصد بیش ترین میزان آلکالوئیدهای تروپان در محلول غذایی انتشار یافت در حالی که کم ترین مقدار در تیمار شاهد (بدون توین ۲۰) مشاهده گردید. بعد از اعمال تیمارها همه گیاهان نمونه توانستند پس از شستشوی ریشه آن ها با آب شهری به رشد خود ادامه دهند. نتایج این پژوهش نشان داد که در استفاده از روش هیدروپونیک جهت انتشار متابولیت های ثانویه گیاه شاهبیزک از طریق ریشه در محلول هیدروپونیک، اثر مثبت کاربرد توین ۲۰ تا میزان ۷ درصد قابل انتظار می باشد.

واژه های کلیدی: شاهبیزک *Atropa belladonna* L، هیدروپونیک، توین ۲۰، آلکالوئید تروپان

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا

۳ و ۴. دانشیاران، گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا

۵. استاد گروه شیمی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی

* نویسنده مسوول Email: khpiri@gmail.com

طبق نتایج به دست آمده از تحقیقات درون شیشه‌ای، پرورش گیاهان دارویی در شرایط هیدروپونیک برای تولید و انتشار متابولیت‌های ثانویه به درون محلول غذایی در محیط ریشه امکان‌پذیر است و نتایج به دست آمده از گیاهان مختلف موید این موضوع است. در این پژوهش امکان بهبود انتشار آلکالوئید تروپان به درون محلول غذایی در شرایط کشت هیدروپونیک گیاه شاهبیزک به عنوان تکنیک جدید برای تولید متابولیت ثانویه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت گیاهان

بذرهای شاهبیزک از باغ گیاهان دارویی ابن سینا در همدان تهیه و سپس در گلدان‌هایی به ترکیب خاکی پرلایت و خاک مرغوب کشت گردید. نگهداری گلاهان در گلخانه و با شرایط دمایی ۲۳ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب و با شدت نور ۳۰۰ فوت کندل انجام گرفت.

آزمایش‌ها

گیاهان کشت شده در خاک پس از رسیدن به مرحله ۵ برگی با میانگین وزن ۱/۳ گرم به محیط هیدروپونیک انتقال یافتند. محیط مذکور شامل ظروف پلاستیکی به حجم ۷۵۰ میلی لیتر که حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محلول غذایی موراشیک و اسکوک (درشت مغذی‌ها، ریز مغذی‌ها و ترکیب-های آهن بدون اضافه کردن قند و ویتامین‌ها با pH ۵/۸) بود. اکسیژن لازم برای ریشه‌ها از طریق هوای حاصل از پمپ هوا تامین شده و برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها گلدان‌ها با پلاستیک‌های مشکی پوشیده شدند. گیاهان به مدت ۳۰ روز در این محیط نگهداری شدند. دو روز برای سازگاری بیشتر، گیاهچه‌ها فقط در آب بودند. بعد از این مدت محلول غذایی به‌طور تصادفی که حاوی ۷۵۰ میلی لیتر توین ۲۰ و یک گرم اسید آمینه ال-فنیل آلانین و اورنیتین در لیتر بود جایگزین گردید. در طول تیمارهای نفوذ پذیری، هوا برای جلوگیری از کف کردن قطع گردید. بعد از ۲۴ ساعت از تیمار محیط کشت با فیلترهای ۰/۴ میکرون فیلتر شد و سپس از نظر وجود الکوئیدهای تروپان آنالیز شدند. هم‌چنین گیاهانی که در محیط هیدروپونیک و محیط خاک بودند خشک و برای آنالیز آلکوئیدهای آن‌ها به آزمایشگاه انتقال یافتند.

استفاده از گیاهان دارویی به‌خاطر تولید متابولیت‌های ثانویه در جهان رو به افزایش است. کیفیت و ارزش گیاهان دارویی با ویژگی‌های ژنتیکی، بیوماس بالا، و غلظت بیشتر متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها مشخص می‌شود (آفرین^۱ و همکاران، ۱۹۹۷). این ترکیبات ثانویه ممکن است با کشت کل گیاه یا با استفاده از کشت سلول، بافت و یا اندام‌ها در بیورآکتور به دست آید (گونتیر^۲ و همکاران، ۲۰۰۳). محدودیت این کار هزینه زیاد، رشد کم اکثر بافت‌های کشت شده، میزان کم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با شرایط طبیعی گیاهان، انتشار ضعیف متابولیت از سلول یا بافت (ویدر^۳ و همکاران، ۱۹۹۱) و هزینه بالا برای ایجاد شرایط استریل در هنگام تلقیح بیورآکتورها (گونتیر و همکاران، ۲۰۰۲) می‌باشد. برای تولید این متابولیت‌ها به روش‌های مهندسی (کشت بافت و سلول و ...) میزان تولید باید حداقل برابر و یا حتی بیشتر از مقدار تولید شده توسط گیاهان کشت شده در طبیعت باشد (نوری قبلانی، ۱۳۷۱) که از جمله این روش‌ها اضافه کردن پیش ماده متابولیت ثانویه به محیط کشت و به‌گزینی نژادهای پر محصول کشت‌های سلولی (تاباتا^۴ و همکاران، ۱۹۷۸) می‌باشد. به‌نظر می‌رسد با پیشرفت‌های صورت گرفته، فقط تعداد بسیار کمی از ترکیبات که بسیار گران‌قیمت و نادرند را بتوان به‌صورت تجاری و صنعتی تولید کرد (گونتیر و همکاران، ۲۰۰۳). اغلب روش‌ها در مقیاس تجاری پر هزینه هستند چون به شرایط استریل در هنگام تلقیح بیورآکتورها نیازمند است (گونتیر و همکاران، ۲۰۰۳). به‌عنوان مثال آلکالوئیدهای تروپان با کشت ریشه مویی در بیورآکتور تولید می‌شوند (بویتل کونتی و همکاران، ۱۹۹۵)، اما اغلب این آلکالوئیدهای تروپان در درون بیوماس می‌مانند که افزایش نفوذ پذیری ریشه با توین ۲۰ می‌تواند باعث انتشار این آلکالوئیدها به محیط کشت سلول، بدون از دست دادن توانایی سلول شود. (بویتل کونتی و همکاران، ۱۹۹۵). هم‌چنین این ماده (توین ۲۰) باعث افزایش ورود پیش ماده‌ها به سلول و در نتیجه افزایش کل تولید می‌شود. (بویتل^۵ و همکاران، ۱۹۹۷). بنابراین روش‌های جدید برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی توسعه یافتند (گونتیر و همکاران، ۲۰۰۳).

1. Fawzia Afreen *et al.*
7. Gontier *et al.*
3. Weather *et al.*
4. Tabata *et al.*

آلکالوئیدهای انتشار یافته در سطح ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱).

کمترین مقدار آلکالوئیدهای تروپان در محلول غذایی در تیمار شاهد و بیشترین مقدار نیز در تیمار ۷ درصد توین ۲۰ مشاهده گردید. به طور کلی با افزایش غلظت توین ۲۰ سطح آلکالوئیدهای تروپان در محلول بالا رفت (شکل ۱).

توین ۲۰ یک نفوذپذیر کننده سلول گیاهی است که با حل کردن پروتئینهای غشای سولل باعث افزایش نفوذ پذیری سلول می‌گردد. گونتیر و همکاران (2008) نشان دادند که فارماکومارین تحت تیمارهای نفوذپذیری مناسب می‌تواند از ریشه سرخدار (روتا) به محلول غذایی انتشار یابد. افزایش در مقدار توین ۲۰ باعث افزایش آلکالوئیدهای تروپان در محلول غذایی گردید. توین ۲۰ یک نفوذ کننده مناسب می‌باشد زیرا در مقتدیر مساوی، توین ۲۰ از نفوذ پذیر کننده تیپل^۵ که یکی از قدیمی‌ترین پاک کننده‌ها می‌باشد موثرتر بوده است (گونتیر و همکاران 2002).

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که با افزایش غلظت توین ۲۰ در محلول غذایی نفوذ پذیری ریشه بیشتر شده و در نتیجه آلکالوئید تروپان بیشتری وارد محلول می‌شود.

آلکالوئیدهای تروپان در گیاه

مقایسه گیاهان در شرایط هیدروپونیک با شرایط خاک: در این پژوهش کل اندام‌های گیاهان کشت شده در شرایط خاک با گیاهان کشت شده در شرایط هیدروپونیک از نظر میزان آلکالوئیدهای تروپان مقایسه شدند. نتایج نشان داد که مقدار آلکالوئیدهای تروپان در گیاهان کشت شده در شرایط هیدروپونیک بسیار بیشتر از محیط خاک بود (۲/۴ میلی‌گرم بر لیتر در برابر ۱/۴۶ میلی‌گرم بر لیتر) و هم‌چنین مقدار اسکوپلامین در محیط هیدروپونیک نسبت به خاک بسیار زیادتر و تقریباً ۹ برابر اندازه گیری شد. (شکل ۲).

نتایج حاکی از افزایش آلکالوئیدهای تروپان در محیط هیدروپونیک در گیاه شاهبیزک می‌باشد (شکل ۲). به نظر می‌رسد محیط هیدروپونیک به دلیل کامل بودن این محیط از لحاظ تمام عناصر غذایی، رشد سریع گیاه و در اختیار قرار گرفتن عناصری در دسترس گیاه که به‌عنوان پیش ماده تولید متابولیت ثانویه استفاده می‌شوند، باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه در گیاه می‌شود. نتایج حاصل از تحقیق *ترین* و همکاران (2006) نیز نشان داده است که محیط هیدروپونیک به‌عنوان تکنیکی برای تولید متابولیت ثانویه به-

استخراج آلکالوئیدهای تروپان

پس از برداشت نمونه‌های آبی ۲۰ میکرولیتر از آن به طور مستقیم به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تزریق شد. نمونه‌های آلکالوئیدهای نمونه‌های گیاهی نیز پس از خشک شدن (در سایه و دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد) طبق روش *Kamada*^۱ و همکاران (1968) استخراج گردید. در نهایت پس از گذرانیدن از صافی (۴۰/ میکرون) مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تزریق گردید.

آنالیز آلکالوئیدها

مواد شیمیایی اسکوپلامین و هیوسیامین برای استاندارد از شرکت سیگما^۲ و توین ۲۰ از شرکت مرک^۳ تهیه گردید.

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا: آلکالوئیدها به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا شرکت کانویر^۴ آلمان سنجش شدند. فاز ساکن ستون C18 OSD بود. حلال شستشو شامل آب، استونیتریل و اسید فرمیک بود. از تشخیص دهنده UV استفاده گردید. کالیبراسیون با دو استاندارد اسکوپلامین و آتروپین سولفات انجام گردید.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱، ۳، ۵ و ۷ درصد توین ۲۰ بود که به محلول‌های غذایی هیدروپونیک اضافه شد. هر واحد آزمایش شامل دو ظرف پلاستیکی، هر یک محتوی یک بوته شاهبیزک بود. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

آلکالوئیدهای تروپان در محلول غذایی

اثر توین ۲۰ روی ۴۵ گیاه شاهبیزک که در شرایط هیدروپونیک کشت شده بودند بررسی و نیز غلظت آلکالوئیدهای تروپان در محلول غذایی تعیین گردیدند. اختلاف اثر غلظت‌های مختلف توین ۲۰ روی میزان

1. Kamada
2. Sigma
3. Merck
4. Knaugr

5. Teepol

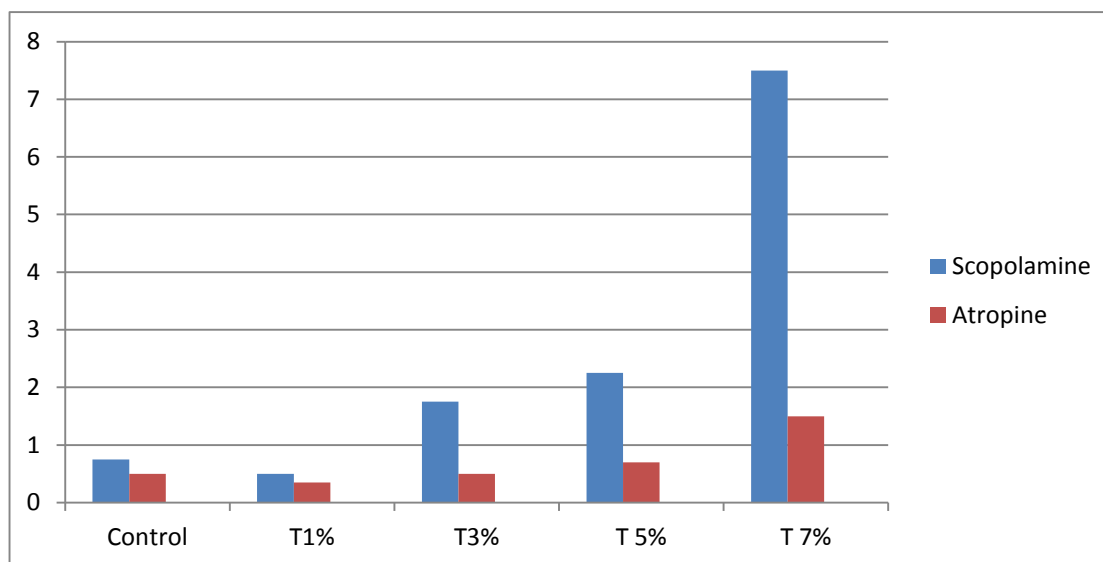
تولید و انتشار آلکالوئیدهای تروپان از گیاه شاهبیزک در شرایط ... کار رود. هم‌چنین گونیتیر و همکاران (2003) و هیلینگ و همکاران (2007) نشان دادند که استفاده از محیط هیدروپونیک باعث رشد متعادل از نظر جذب عناصر و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در محیط هیدروپونیک مقدار آلکالوئیدهای تروپان در گیاه شاهبیزک تا

۵/۲ برابر افزایش یافت (مقدار ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر از آلکالوئیدهای تروپان برای محیط هیدروپونیک در برابر ۰/۴۶ میلی‌گرم در گرم برای محیط خاک).

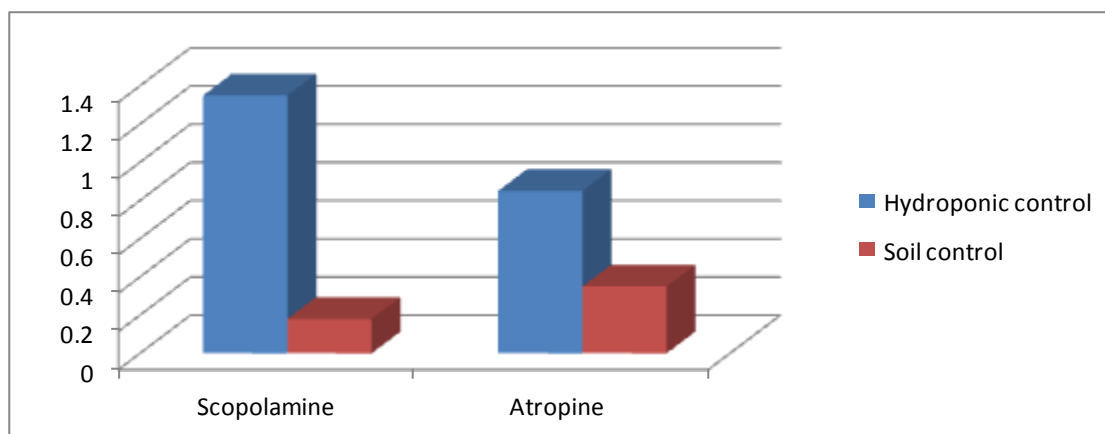
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف توین ۲۰ روی انتشار مقدار آلکالوئیدهای تروپان از ریشه شاهبیزک در محلول غذایی

Table 1: Analysis of variance in different concentrations of Tween 20 on release of Tropane Alkaloid from *Atropa. bladdona* roots in to the nutrient solution

| Mean square میانگین مربعات | | Degrees of freedom درجه آزادی | Source of Variation منبع تغییرات |
|-------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Atropine | Scopolamine | | |
| 1.004 | 24.41 | 4 | Treatment تیمار |
| 0.06 | 6.15 | 10 | Error خطا |
| 42.54 | 8.72 | - | Coefficient of variation |



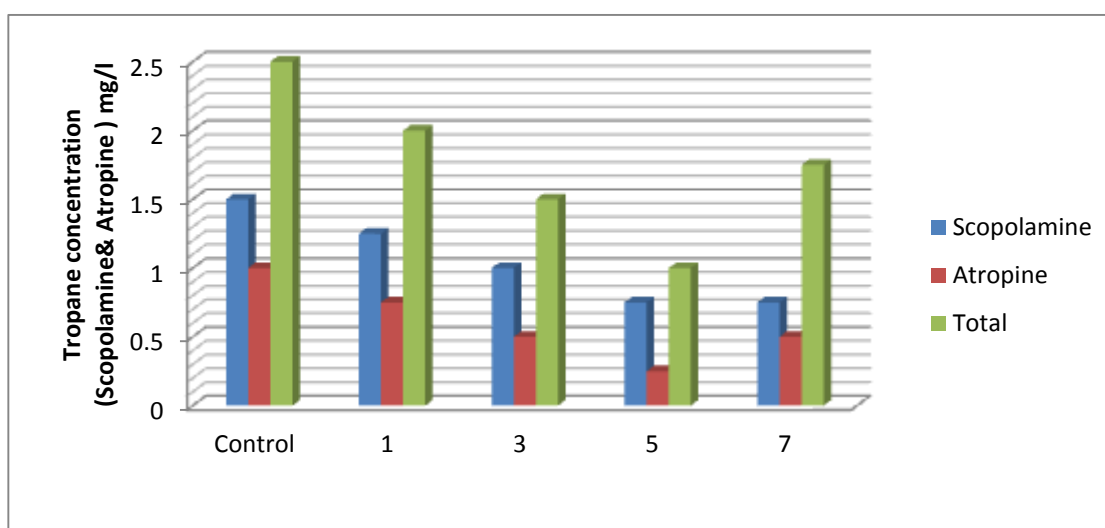
شکل ۱: تاثیر تیمارهای مختلف توین ۲۰ بر مقدار آلکالوئیدهای تروپان (اسکوپلامین و اتروپین)
Figure 1: Effect of different treatment of Tween 20 on Tropane alkaloids production (Scopolamine & Atropine)



شکل ۲: مقایسه آلکالوئیدهای تروپان کشت شده در محیط خاک با محیط کشت هیدروپونیک (میلی گرم بر لیتر)
Figure 2: Comparison of Tropane Alkaloid production in soil and Hydroponic culture conditions (mg/l)

ترکیبات در خود گیاه باقی می ماند مطابقت دارد . به طور مثال در گیاه *Ruta graveolus* نشان داده شد که فاراکومارین به طور طبیعی از گیاه از طریق ریشه وارد محیط هیدروپونیک شده و با یک نفوذ پذیر کننده غشا سلولی این انتشار افزایش یافته و مقدار آن در گیاه کاهش می یابد. آلکالوئیدهای تروپان به طور معمول در ریشه گیاه سنتز شده و به اندام های هوایی منتقل می شوند و این موضوع ممکن است با این توضیح که وقتی ریشه نفوذ پذیر شود آلکالوئیدهای تروپان ریشه بیشتر به سمت محلول گرایش می یابند و با توجه به قرار گرفتن ریشه در محلول این انتقال سریع تر صورت می گیرد و مقدار زیادی از آلکالوئیدهای تروپان از گیاه به محلول غذایی انتشار می یابد، توجیه شود.

آلکالوئیدهای گروه تروپان گیاهان رشد یافته در شرایط هیدروپونیک: مقدار آلکالوئیدها در مجموعه اندام های گیاهان کشت شده در محیط هیدروپونیک که تحت تاثیر تیمارهای مختلف توین ۲۰ قرار گرفتند مشخص گردید. استفاده از توین ۲۰ به طور معنی داری باعث کاهش مقدار آلکالوئیدهای تروپان در بافت های گیاهان رشد یافته در شرایط هیدروپونیک شد و بیش ترین مقدار آلکالوئیدهای تروپان در تیمار شاهد اندازه گیری شد. در بقیه تیمارها با افزایش درصد توین ۲۰ مقدار آلکالوئیدهای تروپان در اندام های گیاهان کاهش یافت. (شکل ۳) این نتایج با مشاهدات گونیترو و همکاران (2008) که بیان داشتند گیاهان قرار گرفته تحت تاثیر نفوذ پذیر کننده مقادیری از متابولیت های ثانویه خود را به محیط انتشار می دهند و در نتیجه مقدار کمتری از این



شکل ۳: اثر توین بر مقدار آلکالوئیدهای تروپان در گیاهان کشت شده در شرایط هیدروپونیک
Figure 3: Effect of Tween on Tropane Alkaloid production on plants cultured in Hydroponic condition

تولید و انتشار آلکالوئیدهای تروپان از گیاه شاهبیزک در شرایط ...

در این تحقیق مشخص گردید که متابولیت‌های ثانویه (آلکالوئیدهای تروپان) گیاه شاهبیزک در شرایط هیدروپونیک با استفاده از نفوذپذیری ریشه می‌توانند به محیط کشت انتشار یابند. شرایط هیدروپونیک تاثیر مثبتی روی تولید آلکالوئیدهای تروپان داشت و همچنین پیش ماده آلکالوئید تروپان روی مقدار آلکالوئیدهای تروپان تاثیر قوی داشت. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه، به نظر می‌رسد که با بکارگیری تکنیک هیدروپونیک و با استفاده از پیش تیمارهای مختلف از مواد ضروری (اسیدآمین‌های مناسب) بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد نظر برای دیگر

گیاهان دارویی نیز می‌تواند بررسی شود. از آنجا که در گلخانه‌های هیدروپونیک به‌طور تجاری امکان کشت محصولات زیادی وجود دارد، احتمالاً کشت گیاهان دارویی در شرایط هیدروپونیک برای تولید متابولیت ثانویه در مقیاس تجاری عملی می‌باشد. با در نظر گرفتن اینکه در شرایط مزرعه، درون شیشه‌ای و بیورآکتور به‌خاطر برخی مشکلات، تولید متابولیت‌های ثانویه دچار مشکل می‌شود، بکارگیری سیستم‌های هیدروپونیک با استفاده از فناوری‌های جدید می‌تواند راه حل‌های ارزشمندی ارائه دهد.

منابع

نوی قنبلانی، قدیر. ۱۳۷۱. تجربیاتی در زمینه کشت بافت‌های گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه تبریز.

- Aichison, P. A., Maclead, A. J. and Yeoman, M. M. 1997. Growth Patterns in tissue (Callus) Cultures. In Plant tissue and Cell Culture, ed. H.E, Street. PP, 267-306 Oxford: Blackwell scientific publications.
- Bootel- Conti, M., Laberrche, J. C., Gontier, E. and Sangwan- Norreel, B. 1995. Culture de racines transformées de *Datura innoxia* Mill en bioreacteur: comparaison de 3 types de prpce'de's. CR. Acad. Sc.III-vie 318:593-598.
- Boitel, M., Gontier, E., Assaf, C., Laberche, J. C. and Sangwan, B. 1997. Procède de production de metabolites primaires et secondaires a partir d'organes vegetaux cultives *in vitro*. Patent no FR²: 758-653.
- Fawzia Afreen, S. M. A. Zobayed, Toyoki Kozai (Spectral quality) and UV-B, 2005. Stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhizia uralensis* in hydroponic and pot system) plant physiology and Biochemistry 1074-1081 .
- Gontier, E., Clement, A., Tran, T. L. M., Gravot, A., Lievre, K., Guckert, A. and Bourgaud, F2. 2003. "Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization : a promising technique for plant secondary metabolite production" Plant Science 163:723-732.13.
- Sangwan- Norrel, Boitel – Conti, M., Gontier, E., Laberche, J. C. C. and Ducrocq, B. S. 1995. Permeabilization of *Datura innoxia* hairy roots, for release of stored tropane alkaloids. Planta Med 61:287-290.
- Tabata, M. Ogino, Y. Yoshikawa Hiraoka, N1978 "Selection of Ceell lines with higher yields of secondary products pp 13-22. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture.
- Weather, P., Cheetham, R.D., Dilorio , A. 1991. Process for extracting enhanced amounts of plant secondary metabolites with limited loss of plant viability, Patent no . US5413928.

Production and Release of Tropane Alkaloids from Deadly Nighushade (*Atropa belladonna* L.) in Hydroponic Condition

Saadat¹, S. S., Piri^{2*}, Kh., Essnaashari³, M., Gholami⁴, M. and Salehi⁵, P.

Abstract

Atropa belladonna is one of the medicinal plants used in widespread in Iranian traditional medicine. The hydroponic, method was successfully used in *Datura innoxia* to increase the secondary metabolite production. In this study. *Atropa belladonna* plants were cultivated in hydroponic condition before being permeabilized with Tween 20. After 30 days the seedlings were transferred to hydroponics, solution containing different concentrations of Tween 20. High concentration of scopolamine (9.29 mg/l) and atropine (Tropane's alkaloid) were detected in the nutrient solution containing 7% of Tween 20 while the control solutions with no Tween 20 showed lowest levels of scopolamine and atropine. After having their roots rinsed, all the plants were able to survive. These results indicated that hydroponic solutions containing up to 7% of Tween 20 could facilitate release of secondary metabolites from the roots..

Keyword: Deadly nighushade (*Atropa belladonna*), Hydroponics

1. Postgraduate student, Departement of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu- Ali Sina University

2. Associate Professor, Departement of Bitechology Bu- Ali Sina University

3 & 4. Associate Professors, Departement of Horticultural Sciences Bu- Ali Sina University

5. Professor, Departement of Phytochemistry, Shahid Beheshti University

*: Corresponding author Email: khpiri@gmail.com