Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

اثر الیسیتورهای قارچی و مخمری بر تولید تروپان آلکالوئیدهای گیاه بذرالبنج در شرایط کشت درون شیشه¬

صالح شهابی‌وند[1*]، نفیسه لعلی[1]، احمد آقایی[1] و فرشاد درویشی[1]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

(تاریخ دریافت:۱۳۹٦/۰۳/۰۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰۸/۳)

چکیده

گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) گیاه علفی و چند ساله از خانواده سیب زمینی بوده که مانند دیگر گیاهان این خانواده نظیر شابیزک و تاتوره، بطور انحصاری تروپان آلکالوئیدهای دارویی هیوسیامین و اسکوپولامین را تولید می‌کند. این ترکیبات ارزشمند دارویی، دارای اثرات آنتی‌کولینرژیک بوده و مهارکننده رقابتی استیل کولین، ضد اسپاسم و آرام بخش می‌باشند. یکی از راهکارهای مقرون به صرفه جهت افزایش تولید ترکیبات مؤثره در گیاهان دارویی، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی می‌باشد. در این پژوهش، اثر قارچ *Piriformospora indica* و مخمر *Yarrowia lipolytica* بر میزان رشد و تولید تروپان آلکالوئیدهای دارویی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه های بذرالبنج، به‌مدت دو هفته در محیط کشت حاوی قارچ و مخمر قرار داده شدند. نتایج افزایش میزان وزن تر و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز در گیاهچه‌های تیمار شده با قارچ و مخمر نسبت به گیاهچه‌های شاهد را نشان داد. میزان هیوسیامین در اندام هوایی و میزان اسکوپولامین هم در ریشه و هم در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با قارچ اندوفیت نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش معنی‌دار یافت. همچنین میزان اسکوپولامین در ریشه و بخصوص اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با مخمر، بطور قابل توجهی در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد افزایش نشان داد. بنابراین، قارچ *P. indica* و مخمر *Y. lipolytica*، می‌توانند بعنوان الیسیتور زیستی مناسب، جهت افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه دارویی و زیست‌توده در گیاه بذرالبنج مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: اسکوپولامین، الیسیتور قارچی، آنزیم آنتی‌اکسیدان، بذرالبنج، هیوسیامین

مقدمه

بیشتر گیاهان حاوی ترکیبات مؤثره و با ارزش، به سختی کشت می‌شوند و یا به‌علت برداشت بیش از حد، در خطر انقراض هستند. علاوه بر این، سنتز شیمیایی این ترکیبات مشتق از گیاه به علت ساختار بسیار پیچیده، از لحاظ اقتصادی با صرفه نیست (Namedo, 2007). روش‌های زیست‌فناورانه مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از محرک‌ها، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (اسمعیل زاده بهابادی و شریفی، ۱۳۹۲). گیاهان و یا سلول‌های گیاهی، تحت شرایط آزمایشگاهی، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی متفاوتی

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: shahabi70@yahoo.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی (که معروف به الیسیتورها هستند) نشان می‌دهند (Radman *et al*., 2003). الیسیتور به ماده‌ای گفته می‌شود که وقتی در غلظت کم به سیستم سلول زنده وارد می‌شود، سنتز ترکیب خاصی را آغاز می‌کند یا بهبود می‌بخشد. تحریک به معنی موجب شدن یا بالا بردن سنتز متابولیت‌ها به دلیل افزودن مقدار ناچیز محرک است. الیسیتور-های زیستی، مواد دارای منشأ زیستی بوده، شامل پلی-ساکاریدهای مشتق شده از دیواره سلولی گیاهان (پکتین یا سلولز) و میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ و مخمر (کیتین یا گلوکان) و گلیکوپروتئین‌ها یا G-پروتئین‌های عملکردی بوده، به گیرنده‌ها متصل شده و از طریق فعال‌سازی یا غیرفعال‌سازی تعدادی از آنزیم‌ها یا کانال‌های یونی عمل می‌کنند (اسمعیل زاده بهابادی و شریفی، ۱۳۹۲؛ Namedo, 2007). تروپان آلکالوئیدها از قبیل هیوسیامین و اسکوپولامین، متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از گیاهان می‌باشند، که حاوی حلقه تروپان در ساختار شیمیایی‌شان هستند (O'Hagan, 2000; Ziegler and Facchini, 2008). تروپان آلکالوئیدها به طور طبیعی در اعضای گیاهان خانواده سولاناسه از قبیل بذرالبنج ، بلادون، تاتوره، شابیزک و اسکوپولیا وجود دارند و به همراه مشتقات نیمه‌سنتزی‌شان، بعنوان ترکیبات پاراسمپاتولیتیک و آنتاگونیست‌های رقابتی استیل‌کولین عمل می‌کنند. برخی از تروپان آلکالوئیدها خواص دارویی داشته و می‌توانند به عنوان آنتی‌کولینرژیک عمل کنند که عموماً بعنوان گشادکننده مردمک چشم، کنترل کننده ترشح بزاق و اسید معده، کُند کردن حرکات روده و جلوگیری از حالت تهوع مورد استفاده قرار می‌گیرند (Palazon *et al*., 2008). گونه بذرالبنج یا بنگ دانه، گیاهی از خانواده سولاناسه از جنس هیوسیاموس می‌باشد. در کتب طب سنتی به نام‌های بنج، سیکران و ماش‌عطار نیز آمده است. این گیاه محتوی تروپان آلکالوییدهای سمی از قبیل هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین (هیوسین)، می‌باشد (زمان، ۱۳۹۲). در این گونه، گیاهان جوان حاوی هیوسین زیاد و مقدار کمتری هیوسیامین دارند، در حالیکه گیاهان رسیده مقدار بیشتری هیوسیامین دارند که آلکالوئید اصلی آنها را تشکیل می‌دهد (Palazon *et al*., 2008).

جنس *Yarrowia* از قارچ‌های Ascomycota، رده Saccharomyces و خانواده Dipodascaceae می‌باشد (Gancedo and Flores, 2005). در طبیعت، سویه‌های *Y. lipolytica*، اغلب از اقلام مصرفی روزانه مانند انواع پنیر، ماست و سوسیس جداسازی می‌شوند (Nicaud, 2012). بدلیل انجام واکنش‌های تجزیه فضاگزین (هیدرولیز، اکسیداسیون، یا احیاء) و استریفیکاسیون مجدد، کاربردهای شمیایی و دارویی بسیار خوبی از جمله تولید ترپن‌ها که گروهی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند را دارا هستند (Davishi-Harzevili, 2014). تاکنون گزارشی در مورد استفاده از این مخمر در ارتباط با تغییر میزان تروپان آلکالوئیدها انجام نشده است.

قارچ *Piriformospora indica*، اندوفیت کلون‌کننده ریشه گیاهان خشکی‌زی است که از قارچ‌های Basidiomycetes بوده و در بیشتر خصوصیات مشابه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار است. بررسی‌های مولکولی برای تعیین موقعیت تاکسونومیکی براساس توالی 18s rRNA و با میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که این قارچ متعلق به خانواده جدید Sebacinaceae است (Varma and Hock, 2012). قارچ *P. indica*، باعث افزایش زیست‌توده در گیاهان زیادی از جمله غلات، گیاهان مهم اقتصادی و دارویی می‌شود و به تنهایی دارای خصوصیات مهم عملکردی مانند افزایش رشد در گیاه، محافظت گیاه، مقاومت در برابر فلزات سنگین، افزایش مقاومت گیاه علیه بیماری‌های قارچی، علف‌کش زیستی، تعدیل‌کننده ایمنی، مقاومت در برابر دما و نمک، به عنوان کود زیستی و همچنین ابزاری برای تحقیقات پایه‌ای است (Bagde *et al*., 2010). همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهان مختلفی که دارای اهمیت اقتصادی هستند را تغییر داده و رشد کلی و تولید بذر گیاهان را نیز می‌تواند افزایش دهد (Varma and Hock, 2012). تیمار قارچ اندوفیت *P. indica* باعث افزایش معنی‌دار در میزان تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین در ساقه و برگ گیاه آتروپا (*Atropa belladonna*)

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

شد (Noora *et al*., 2017).

با توجه به تنوع بالای گیاهان دارویی در کشور، توجه جدی به پژوهش در این زمینه می‌تواند نویدبخش آینده‌ای روشن در ارتباط با تولید ترکیبات دارویی باشد. بهره‌برداری پایدار از توان و ظرفیت منابع طبیعی کشور نیازمند به کارگیری روش‌های نوین علمی و سازگار با محیط‌زیست به خصوص در زمینه زیست‌فناوری است. در این تحقیق اثر دو الیسیتور زیستی *Y. lipolitica* و*P. indica* بر رشد، مقدار تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین و نیز میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در گیاه مهم و داروئی بذرالبنج در شرایط درون شیشه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی:بذرهای گیاه بذرالبنج از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای شکستن خواب بذر، بذرها تحت تأثیر تیمار اسیدسولفوریک ۵۰ درصد به‌مدت ۷۵ ثانیه قرار گرفتند. سپس بذرها به‌مدت ۲ دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه با سفیدکننده شیمیایی ۲۵ درصد که حاوی ٦ درصد هیپوکلریت سدیم بود، ضدعفونی سطحی شدند. محیط کشت مورد استفاده جهت جوانه زنی بذر گیاه بذرالبنج، محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) فاقد هورمون در نظر گرفته شد. بذرهای گیاه بذرالبنج در محیط کشت MS پس از ۲ الی ۳ هفته جوانه زدند. به منظور تکثیر و ریزازدیادی نمونه‌های گیاهی، از گیاه اولیه بذرالبنج قطعات یکسانی حاوی یگ گره و میان‌گره زیرین جدا شده و به محیط MS بدون هورمون منتقل شدند. در محیط جدید قطعات مذکور رشد کرده و ریشه و اندام هوایی تولید کردند. عمل تکثیر قطعات به طور متوسط هر دو هفته یک بار انجام شد و گیاهچه‌ها در دستگاه فیتوترون با دمای ۰/۵± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ١٦ ساعت و تاریکی ۸ ساعت نگهداری شدند. با انجام واکشت‌های متوالی، نمونه‌های گیاهی مورد نیاز جهت انجام آزمایش‌های بعدی تکثیر و تولید شدند.

تکثیر مخمر و قارچ: به منظور تکثیر مخمر *Y .lipolytica* از محیط YPG (Yeast Extract-Peptone-Glycerol) استفاده گردید که حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر ۱٪، ۲۰ گرم پپتون ۲٪، ۳۰ میلی‌لیتر گلیسرول ۳٪، ۲۰ گرم آگار ۲٪ (در حجم کل ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد. برای تکثیر مخمر در شرایط استریل، مقداری از کلنی اولیه، به صورت خطی برروی محیط جدید در پلیت‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر کشت داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۱±۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محیط مایع مخمر، بدون افزودن آگار تهیه شد و بعد از تلقیح (یک سانتی‌متر مربع از محیط جامد در ارلن ۵۰ میلی‌لیتر) در شیکر انکوباتور با دمای ۱±۲۹ درجه سانتیگراد و سرعت ۲۰۰ rpm قرار داده شد.

جهت تکثیر قارچ *P. indica* از محیط تغییر یافته آسپرژیلوس استفاده شد (Hill and kafer, 2001). این محیط دارای عناصر ماکرو، عناصر میکرو، پپتون، گلوکز، عصاره مخمر و ویتامین‌ها می‌باشد. برای تکثیر قارچ در شرایط استریل قطعه‌ای به ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر مربع از محیط جامد اولیه، جدا گردید و به طور وارونه برروی محیط جدید در پلیت‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر قرار داده شد، پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۱±۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته قرار گرفتند.

اعمال تیمارهای مخمر و قارچ بر قطعات ریز نمونه در محیط MS: نمونه‌های گیاهی تا حد امکان یک‌دست و در مرحله نموی مشابه (دو برگچه‌ای) مورد استفاده قرار گرفت. برای اعمال تیمار مخمر، به روی محیط کشت و کنار گیاهچه، ۲ میلی لیتر محیط YPG حاوی مایع مخمر اضافه شد. جهت ایجاد همزیستی قارچی، به روی محیط کشت هر یک از گیاهان قطعه‌ای از کشت جامد قارچ به قطر ۵ میلی‌متر به کمک پیپت پاستور استریل افزوده شد به‌طوریکه قارچ در نزدیکی ریشه قرار گیرد. بعد از اعمال تیمار، نمونه‌های گیاهی به مدت ۲ هفته در دستگاه فیتوترون با دمای ۰/۵± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب دوره روشنایی ١٦ ساعت و تاریکی ۸ ساعت قرار گرفتند تا رشد کرده و همزیستی برقرار شود. بعد از ۲ هفته، گیاهچه‌ها به آرامی از شیشه خارج شدند و در آب مقطر شسته شدند تا هیچ‌گونه آگار و بقایای محیط کشت بر روی آنها باقی

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

نماند سپس وزن تر ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شد. نمونه‌های گیاهی به منظور آنالیزهای بیوشیمیایی بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شده و به سرعت به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

استخراج و سنجش غلظت پروتئین محلول کل: نیم گرم وزن تر اندام هوایی یا ریشه با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی (بر روی یخ و در دمای ٤°C) ساییده شده و بر روی ماده گیاهی کاملاً پودر شده، ۵۰ mg پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) ۱٪ (w/v) و ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM (pH ۷) حاوی سدیم متابای سولفیت ۱ mM اضافه نموده و ورتکس گردید. عصاره حاصله با سرعت ۱۳۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (Esfandiari *et al.*, 2011). محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، مستقیماً جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل، فعالیت آنزیم های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) مورد استفاده قرار گرفت.

میزان پروتئین محلول کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر(Eppendorf 5810 R, Germany) اندازه‌گیری شد. آلبومین سرم گاوی (BSA) نیز جهت ترسیم منحنی استاندارد (با ضریب تبیین بالای ۹۸٪) مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم CAT، به روش Aebi (۱۹۸٤) اندازه‌گیری شد. بیست میکرولیتر از عصاره آنزیمی را به مخلوط واکنشی شامل ۲۵۰ میکرولیتر از فسفات پتاسیم به همراه ۲۵۰ میکرولیتر H_2O_2 (۷۰ میلی‌مولار) و آب مقطر افزوده و فعالیت آنزیم بدلیل مصرف پراکسید هیدروژن با کاهش جذب در طول موج ۲٤۰ nm و در فاصله زمانی ٦۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی (ε) معادل ۳۹/٤ cm^{-1} mM^{-1} در محاسبه آنزیم در نظر گرفته شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم GPX، به روش Chance and Maehly (۱۹۵۵) با اعمال برخی تغییرات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ µL بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM (pH ۷)، ۱۰۰ µL پراکسید هیدروژن ۷۰ mM محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM (pH ۷)، ۷۵۰ µL گایاکول ۱۰ mM محلول در آب دو بار تقطیر، ۱٤۰۰ µL آب مقطر و ٦۰ µL عصاره آنزیمی خام بود. فعالیت آنزیم در طول موج ٤۷۰ nm و در فاصله زمانی ٦۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی (ε) معادل ۲٦/٦ cm^{-1} mM^{-1} در محاسبه فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت آنزیم APX، به روش Chen and Asada (۱۹۸۹)، با اعمال برخی تغییرات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲۵۵۰ µL آسکوربات ۰/۵ mM محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM (pH ۷)، ٤۵۰ µL پراکسید هیدروژن ۲ mM محلول در آب دوبار تقطیر و ٦۰ µL عصاره آنزیمی خام بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ nm در فاصله زمانی ٦۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی (ε) معادل ۲/۸ cm^{-1} mM^{-1} در محاسبه فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

استخراج آلکالوئیدهای کل: ابتدا هر قسمت از نمونه گیاهی (ریشه و اندام هوایی) به طور جداگانه با نیتروژن مایع به خوبی پودر شد، سپس به ازای هر ۰/۵ گرم نمونه پودر شده، ۵۰ میلی لیتر از بافر استخراج شامل کلروفرم متانول آمونیاک ۲۵٪ (با نسبت حجمی w/w ۱:۵:۱۵) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شدند تا دیواره سلول‌ها شکسته شده و عمل استخراج بهتر انجام گردد. در ادامه، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. عصاره حاصله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ فیلتر شده و مواد باقی مانده بر روی فیلتر، ۲ بار با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شدند. عصاره فیلتر شده در دستگاه روتاری به طور کامل خشک شد. به نمونه خشک شده ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ نرمال افزوده شده و به‌وسیله ورتکس به خوبی حل شد، بخش کلروفرمی حذف شده و بر روی یخ، pH آن به کمک محلول آمونیاک ۲۸٪ بر روی عدد ۱۰ تنظیم شد. سپس آلکالوئیدها یک بار با ۲ میلی‌لیتر و دو بار با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

شده، فاز کلروفرمی حذف گردیده و پس از افزودن سولفات سدیم (Na_2SO_4) بدون آب جهت آبگیری، فیلتر شدند و باقی‌مانده با ۱-۲ میلی‌لیتر کلروفرم با درجه خلوص HPLC شستشو شد و در دستگاه روتاری کاملاً تبخیر گردید و نهایتاً در ۱-۲ میلی‌لیتر متانول با درجه خلوص HPLC حل شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت آنالیز بعدی نگهداری شد (Kamada et al., 1986).

سنجش آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): اندازه‌گیری غلظت تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین، به‌وسیله دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER آلمان، مدل Smartline و ستون C_{18} (با ابعاد ۲۵۰ mm × ٤/٦ mm) انجام گرفت. طول موج دستگاه روی ۲٥٤ nm تنظیم شده، آشکارساز مورد استفاده UV-Vis، سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی آب و متانول (۲۰: ۸۰) بوده و در هر سنجش، ۲۰ میکرولیتر عصاره تزریق شد. به منظور سنجش کمی دو ترکیب استاندارد هیوسیامین سولفات و اسکوپولامین هیدروبرومایدِ، این دو ترکیب، با سه غلظت ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر به دستگاه تزریق شده و بر اساس سطح زیر منحنی آنها نسبت به غلظت، منحنی استاندارد رسم گردید. سپس محتوای دو آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس زمان بازداری بدست آمده از ترکیبات استاندارد و سطح زیر منحنی پیک‌های مربوطه در هر نمونه، با استفاده از فرمول خط استاندارد محاسبه شد.

آنالیز آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. سه حالت حضور قارچ اندوفیت، حضور مخمر و بدون حضور قارچ و مخمر یا شاهد، به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) ($P<۰/۰۱$) انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تأثیر قارچ اندوفیت *P. indica* و مخمر *Y. lipolytica* بر رشد و تولید زیست توده در گیاهچه‌ها: جهت بررسی تأثیر قارچ *P. indica* و مخمر *Y. lipolytica* بر زیست‌توده‌ی گیاهچه‌های بذرالبنج، شاخص وزن تر اندازه‌گیری شد. جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر تیمارها بر وزن تر ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. نتایج بدست آمده نشان داد که تیمارهای *P. indica* و *Y. lipolytica* مؤثر واقع شده و باعث افزایش معنی‌دار میانگین وزن تر ریشه و اندام هوایی در گیاهچه های بذرالبنج گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

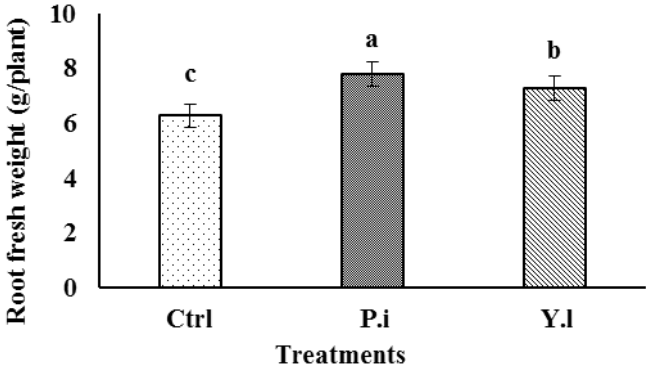
در تحقیقات انجام شده نشان داده شده است که این قارچ قادر به افزایش رشد و زیست‌توده گیاهان زیادی از جمله گیاهان دارویی *Spilanthes calva* و *Withania somnifers* می‌باشد (Perez-Campo and Dominguez, 2001). قارچ‌های مختلف از طریق تولید مواد محرک رشد با تأثیر بر ریشه، اثر مثبتی بر عملکرد گیاه میزبان می‌گذارند (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2002). نشان داده شده که *P. indica* در محیط مایع، ایندول اسید استیک (IAA) تولید می‌کند که از مهم‌ترین اکسین‌ها می‌باشد. میزان سیتوکینین تولید شده توسط *P. indica* بیشتر از میزان اکسین آن است و در گیاه تیمار شده با قارچ، میزان سیتوکینین در مقایسه با نمونه شاهد بیشتر است که باعث افزایش رشد ریشه می‌گردد (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2002). همچنین تغییر در میزان رشد می‌تواند بدلیل جذب بیشتر آب و مواد مغذی مخصوصاً فسفات، بدلیل گسترده شدن ریشه‌های تیمار شده با قارچ باشد (Lopandic *et al.*, 2006). در مورد تأثیر *Y. lipolytica*، برروی رشد گیاهان، تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. افزایش در وزن تر گیاهچه‌های تیمار شده با *P. indica* و *Y. lipolytica* نسبت به نمونه شاهد، ممکن است بدلیل تولید فیتوهورمون‌ها (هورمون-های گیاهی) باشد. تولید اکسین بر رشد ریشه و سیتوکینین بر سرعت رشد سلول‌های گیاهی اثر گذاشته که می‌تواند دلیلی بر اثرات معنی‌دار *P. indica* و *Y. lipolytica* در رشد و افزایش زیست‌توده در گیاهچه‌ها باشد.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

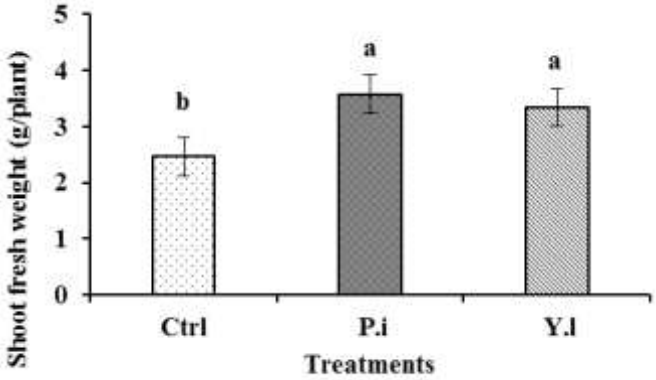
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر الیسیتورهای قارچی و مخمری بر وزن تر، میزان پروتئین و میزان فعالیت کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز گیاه بذرالبنج در شرایط کشت درون شیشه

		میانگین مربعات							
		وزن تر		مقدار پروتئین		کاتالاز		اسکوربات پراکسیداز	
منابع تغییر	درجه آزادی	ساقچه	ریشه چه	ساقچه	ریشه چه	ساقچه	ریشه چه	ساقچه	ریشه چه
تیمار	۲	۰/۸۷**	۱/۲ **	۱۵٦ **	۷ **	۳ **	۳/٤ **	۱۱/۲ **	۱/۹۲ **
اشتباه	٦	۰/۰۰۱۷	۰/۰۱۸	۳	۰/۰۸	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳٤	۰/٤	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات٪		۱٤/۱	۱۹/٤	۵/٤	۵/۱	۷/۸	۷/۱	۵/۹	۳/۹

** معنی دار در سطح احتمال آماری یک درصد



شکل ۱- اثر تیمارهای *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان وزن تر ریشه گیاهچه‌های بذرالبنج. Ctrl = شاهد، P.i=*P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.



شکل ۲- اثر تیمارهای *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان وزن تر اندام هوایی گیاهچه‌های بذرالبنج.

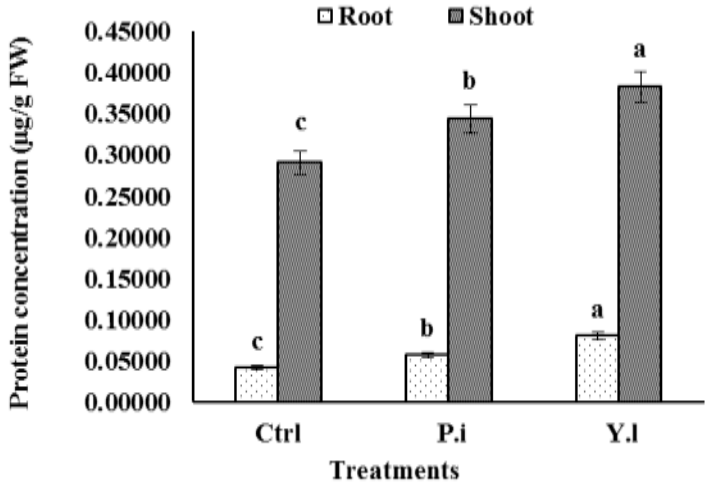
Ctrl= شاهد، P.i=*P.indica*، Y.i=*Y.lipolytica* حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر الیسیتورهای قارچی و مخمری بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز و مقدار هیوسیامین و اسکوپولامین گیاه بذرالبنج در شرایط کشت درون شیشه

		میانگین مربعات					
		گایاکول پراکسیداز		هیوسیامین		اسکوپولامین	
منابع تغییر	درجه آزادی	ساقچه	ریشه چه	ساقچه	ریشه چه	ساقچه	ریشه چه
تیمار	۲	۹/۵ **	۲/۰۱ **	۲۵۹۰۰ **	٤۷۵ **	۷۸٤۰۰ **	۹۵۲٦ **
اشتباه	٦	۰/۷	۰/۰۰۵	۲۱۷	۹/٦٦	۷۸/٦٦	٦/٦٦
ضریب تغییرات٪		۹/۳	۲/۷	۱٤/۷	۳/۱	۳/۲	۱/٦

** معنی دار در سطح احتمال آماری یک درصد



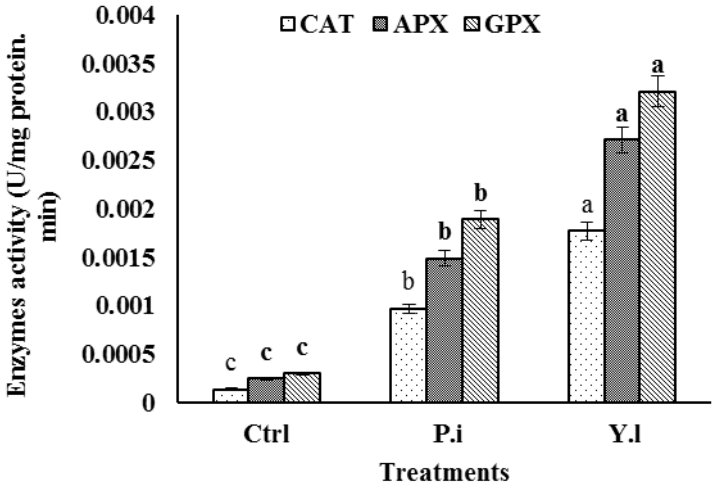
شکل ۳- اثر تیمارهای *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان پروتئین کل ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های بذرالبنج.Ctrl = شاهد، P.i= *P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica* حروف متفاوت (در هر اندام) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.

بررسی میزان پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدان: جدول‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که اثر تیمارها بر میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. شکل ۳ نشان می‌دهد که میزان پروتئین محلول کل ریشه و اندام هوایی در تیمارهای *P. indica* و *Y. lipolitica* نسبت به نمونه شاهد، افزایش معنی‌دار نشان داده و اثر مخمر در افزایش پروتئین محلول بیشتر از تأثیر قارچ اندوفیت است.

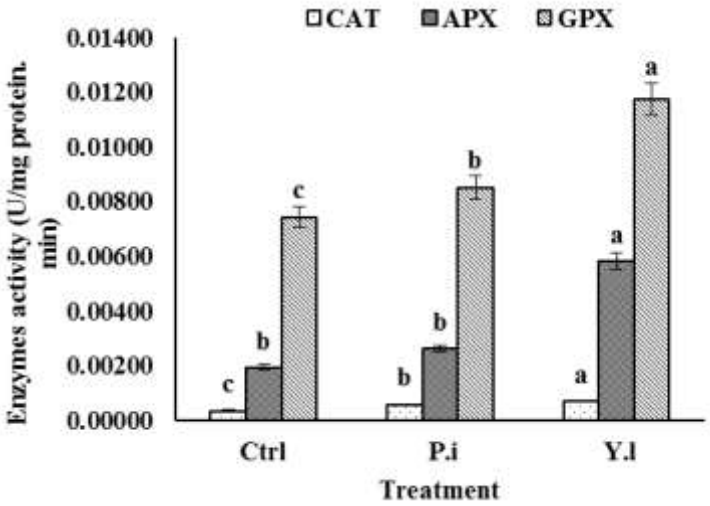
شکل‌های ٤ و ۵ فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با قارچ و مخمر را با شاهد مقایسه کرده است. هر دو تیمار باعث افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه و اندام هوایی شدند و اثر تیمار مخمر بر افزایش میزان فعالیت هر سه آنزیم بیشتر از اثر تیمار قارچ اندوفیت در ریشه و اندام هوایی بود.

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده، سبب تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) در سلول، انفجار اکسیداتیو و در نتیجه، آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. مقدار ROS در سلول، بستگی به سرعت تولید شدن آنها، سرعت واکنش آنها با مولکول‌های هدف نظیر پروتئین‌ها،

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020



شکل ٤- اثر تیمارهای *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز ریشه گیاهچه‌های بذرالبنج. Ctrl = شاهد، P.i= *P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica* حروف متفاوت (در هر صفت) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.



شکل ٥- اثر تیمارهای *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز اندام هوایی گیاهچه‌های بذرالبنج. Ctrl = شاهد، P.i= *P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica* . حروف متفاوت (در هر صفت) نشان دهنده اختلاف معنی-دار در سطح احتمال ۱٪ است.

لیپیدها یا اسیدهای نوکلئیک، سرعت تجزیه و یا خنثی شدن آنها توسط آنزیم‌های آنتی اکسیدان دارد (Mittler, 2002). گیاهان برای مقابله با ROS دارای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان هستند و در نتیجه، تولید ROS را از طریق تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مهار می‌کنند. دستگاه آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، گلوتاتیون‌ردوکتاز و آسکوربات‌پراکسیداز حفاظت علیه تأثیرات سمی ROS را بر عهده دارد (Mittler, 2002). کاتالاز آنزیم مهمی است که در پراکسی‌زوم، سیتوزول و میتوکندری سبب تبدیل به H_2O_2 و O_2 می‌شود. آسکوربات‌پراکسیداز نیز از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون در ابتدای سیکل گلوتاتیون‌آسکوربات استفاده می‌کند. آنزیم پرکسیداز هم در شکستن هیدروژن پراکسید نقش دارد و در دیواره سلولی و شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و واکوئل یافت می‌شود (Mittler, 2002; Wu *et al*., 2014).

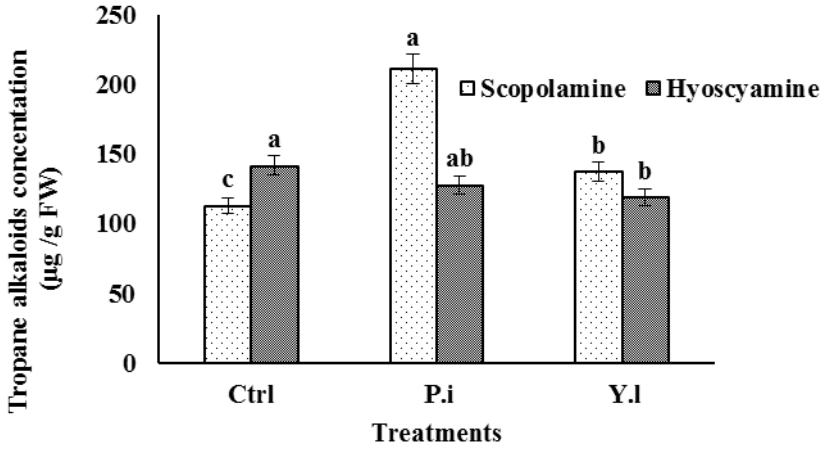
Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

مشخص شده که تیمار با قارچ اندوفیت *P. indica* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه کلم چینی (Sun *et al.*, 2010) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گیاه ذرت (Kumar *et al.*, 2009) در شرایط بدون تنش شده است. در این راستا گزارش شده که تیمار گیاه Bacopa با قارچ *P. indica* علاوه بر افزایش رشد باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در این گیاه شد که این تحریک فعالیت آنزیم‌های درگیر در واکنش‌های آنتی اکسیداتیو می‌تواند دو اثر داشته باشد: احتمالاً در پاسخ‌های دفاعی علیه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده توسط گیاه و یا در ایجاد محیط مساعد برای قارچ نقش دارد (Prasad *et al.*, 2013). تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر مخمر *Y. lypolitica* بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف انجام نشده است.

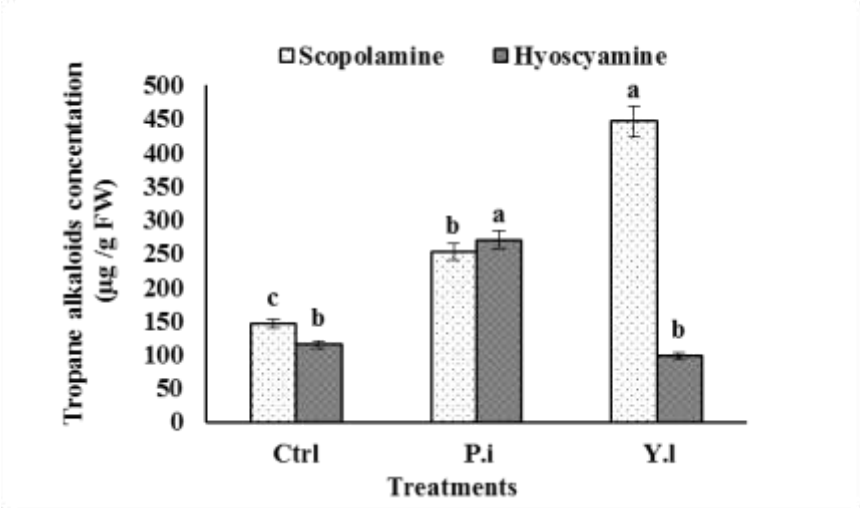
تأثیر مخمر *Y. lipolytica* و قارچ اندوفیت *P. indica* بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها: جدول ۲ نشان می‌دهد که اثر تیمارها بر میزان تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. در شکل‌های ٦ و ۷، میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد، مقایسه شده است.

نتایج نشان داد که مقدار اسکوپولامین ریشه و اندام هوایی در تیمار *P. indica* به ترتیب به میزان ۸۷/٤ درصد و ۷۳/۱ درصد افزایش یافت. مقدار هیوسیامین در ریشه اندکی کاهش یافته و در عوض، در اندام هوایی به میزان ۱۳۵/٤ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان داده است. در یک تحقیق انجام شده بر کشت سلولی گیاه *Linum album*، قارچ *P. indica* باعث افزایش تولید لیگنان و پودوفیلوتوکسین (متابولیت ثانویه‌ی ضدسرطان) درحد شش برابر شد (Kumar *et al.*, 2013). هم‌چنین گزارش شده که این قارچ علاوه بر افزایش زیست‌توده گیاه *Artemisia annua*، باعث افزایش در مقدار متابولیت ثانویه آن یعنی آرتمیسین (داروی ضد مالاریا) گردیده است (Das *et al.*, 2013). این نتایج نشان می‌دهند که قارچ مذکور علاوه بر افزایش رشد قادر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی در گیاهان می‌باشد و می‌تواند یک راهکار با ارزش برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی ارائه دهد. در مورد کاهش هیوسیامین در ریشه و به تبع آن افزایش حدود ۲/۵ برابری هیوسیامین در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با *P.indica*، می‌توان گفت از آنجایی که فعالیت آنزیم Putrescine N-methyltransferase یا PMT (بعنوان آنزیم کلیدی و اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز تروپان‌آلکالوئیدها) در سلول‌های دایره محیطیه ریشه گیاهچه‌های بذرالبنج مشخص شده است (Suzuki *et al.*, 1999)، احتمالاً قارچ *P. indica*، از طریق یک سازوکار ناشناخته، باعث افزایش انتقال آلکالوئید از ریشه به بخش‌های هوایی و ذخیره‌سازی آن در برگ‌ها می‌شود که می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر گیاه‌خواران و بیمارگرهای گیاهی گردد. نتایج نشان داد که مقدار اسکوپولامین ریشه و اندام هوایی در تیمار *Y .lipolytica* به ترتیب به میزان ۲۱/۷ درصد و ۲۰٦ درصد افزایش معنی‌دار و مقدار هیوسیامین در ریشه و اندام هوایی به میزان اندکی نسبت به شاهد کاهش یافته است. در گیاه بذرالبنج با افزودن عصاره مخمر، تغییری در رشد ریشه و تولید هیوسیامین مشاهده نشد، اما عصاره مخمر در غلظت ۰/۵ و ۱ گرم در لیتر موجب افزایش تولید اسکوپولامین شد (Hong *et al.*, 2012). در تحقیقی دیگر، موفق به بدست آوردن لاین‌هایی از گیاه Duboisia شدند که تولید بالایی از اسکوپولامین را نشان داد و بین فعالیت آنزیم یا آنزیم‌های مسئول در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین مانند Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase یا آنزیم H6H با محتوای هیوسیامین همبستگی وجود داشت (Palazon *et al.*, 2003). در نتیجه، می‌توان این‌گونه استنباط کرد که احتمالاً آنزیم H6H که در مسیر تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین نقش دارد، در گیاه تیمار شده با *Y. lipolytica* فعال شده و در نتیجه باعث تبدیل بیشتر هیوسیامین به اسکوپولامین شده است. مطالعات بیشتری در ارتباط با سازوکار تأثیر *P. indica* و *Y .lipolytica* بر میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی هیوسیامین و اسکوپولامین در گونه‌های گیاهی

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020



شکل ٦- اثر تیمارهای *P. indica* **و** *Y .lipolytica* **بر میزان تروپان‌آلکالوئیدهای ریشه گیاهچه‌های بذرالبنج.** Ctrl = **شاهد،** P.i= *P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica* **حروف متفاوت (در هر صفت) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.**



شکل ۷- اثر تیمارهای *P. indica* **و** *Y .lipolytica* **بر میزان تروپان‌آلکالوئیدهای اندام هوایی گیاهچه‌های بذرالبنج.** Ctrl = **شاهد،** P.i= *P.indica*، Y.i= *Y.lipolytica* **حروف متفاوت (در هر صفت) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.**

حاوی این ترکیبات ارزشمند دارویی، مورد نیاز است.

در مجموع نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که تیمارهای قارچ همزیست *P. indica* و مخمر *Y. lipolytica*، موجب افزایش رشد، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر میزان تولید تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه و اندام‌هوایی گیاه بذرالبنج گردید. به طورکلی تیمار قارچی موجب افزایش حدود ۲/۵ برابری هیوسیامین در اندام هوایی شد و تیمار مخمر افزایش بیش از ۳ برابری میزان اسکوپولامین در اندام هوایی را نشان داد.

منابع

اسمعیل‌زاده بهابادی ص. و شریفی م. (۱۳۹۲) افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت ۲: ۱۲۸- ۱۱۹.

ولاگ، ژ. و استودولا، ژ (۱۳۹۲) گیاهان دارویی (روش‌های کشت، برداشت و شرح مصور رنگی ۲۵٦ گیاه) ترجمه زمان، س.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020

انتشارات ققنوس.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Bagde, U. S., Prasad, R. and Varma A. (2010) Interaction of Mycobiont: *Piriformospora indica* with medicinal plants and plants of economic importance. African Journal of Biotechnology 9: 9214-9226.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chance, B., Maehly, A. (1955) Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 2: 764-775.

Chen, G. X. and Asada, K. (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiology 30: 987-998.

Darvishi-Harzevili ,F. (2014) Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Springer Briefs in Microbiology 17-74.

Das, A., Prasad, R., Srivastava, R. B., Deshmukh, S., Rai, M. K., Varma A. (2013) Cocultivation of *Piriformospora indica* with medicinal plants: case studies. In, *Piriformospora indica*. (eds. Varma, A., Kost, G. and Oelmuller, R.) Pp. 149-171. Springer Heidelberg, Berlin.

Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M., Shekari, F. (2011) The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms of two wheat cultivars. Fresenius Environmental Bulletin 20: 2021-2026.

Gancedo, C., Flores, C. L. (2005) *Yarrowia lipolytica* mutants devoid of pyruvate carboxylase activity show an unusual growth phenotype. Eukaryotic Cell 4: 356–64.

Hill, T.W., Kafer E. (2001) Improved protocols for aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Newsletter 48: 20-21.

Hong, M. L. K., Bhatt, A., Ping, N. S., Keng, C. L. (2012) Detection of elicitation effect on hyoscyamus root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. Romanian Biotechnological Letters 17: 7340-7351.

Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., Shimomura, K. (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports 5: 239-242.

Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A. K. (2009) Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology 155: 780-790.

Kumar, V., Sahai, V., Bisaria, V. S. (2013) Effect of *Piriformospora indica* on enhanced biosynthesis of anticancer drug, podophyllotoxin. In: Plant Cell Cultures of *Linum album*, in *Piriformospora indica*. Pp. 119-137.

Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. Food Microbiology 23: 341–350.

Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2002) Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. Food Microbiology 19: 597–604.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant Science 7: 405-410.

Murashige ,T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Namedo, A. G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviewes 1: 69-79.

Nicaud, J. M. (2012) *Yarrowia lipolytica*. Yeast Review 29: 409- 418.

Noora, H., Shahabivand, S., Karimi, F., Aghaee, A., Aliloo, A. A. (2017) *Piriformospora indica* affects growth, tropane alkaloids production and gene expression in *Atropa belladonna* L. plantlets. Medicinal Plants 9: 55-62.

O'Hagan, D. (2000) Pyrrole, Pyrrolidine, Pyridine, Piperidine and Tropane Alkaloids. Natural Product Reports 17: 435–446.

Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R. M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K. M., Pinol, M. T. (2003) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene. Plant Science 165: 1289-1295.

Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L., Mirjalili, M. H. (2008) Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules 13: 1722-1742.

Perez-Campo, F. M., Dominguez, A. (2001) Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. Current Microbiology 43: 429–433.

Prasad, R., Kamal, S., Sharma, P. K., Oelmuller, R., Varma, A. (2013) Root endophyte *Piriformospora indica* DSM 11827 alters plant morphology, enhances biomass and antioxidant activity of medicinal plant *Bacopa monniera*. Journal of Basic Microbiology 53: 1016-1024.

Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. (2003) Elicitation of plant and microbial systems. Biotechnol Biotechnology and Applied Biochemistry 37: 91-102.

Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R., Lou, B. (2010) *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. Journal of Plant Physiology 167: 1009-1017.

Suzuki, K., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1999) Expression of *Atropa belladonna* putrescine JV-methyltransferase gene in root pericycle. Plant and Cell Physiology 40: 289-297.

Varma, A. and Hock E. A. B. (2012) The Symbiotic Fungus *Piriformospora indica*. 2nd Ed. Springer, Berlin.

Wu, Q. S., Zou, Y. N., Abd-Allah, E. F. (2014) Mycorrhizal association and ROS in plants. In: Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling Oxidative Damage to Plants. (ed. Ahmad, P.) Pp.453-475. Elsevier.

Ziegler, J. and Facchini P. J. (2008) Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. The Annual Review of Plant Biology *59*: 735-769.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 3:30 IRDT on Saturday September 19th 2020