

*Detremination of atropine content of transgenic and regenerated *Datura metel* L. plants using TLC method*

Taibeh Homaei¹,
Ali Akbar Ehsanpour¹,
Gholamreza Asghari²

¹Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
²Faculty of Pharmaceutical Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received January 19, 2011 ; Accepted January 23, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Datura metel* L. plant is a reach source of medicinal alkaloids including hiociamin, scopolamine and atropine. It is necessary to use new technology for increasing potential of secondary metabolites production. There are different methods for this approach. For example mutation, induction of somaclonal variation and T-DNA transfer to the plant.

Materials and methods: For evaluation of somaclonal variation in regenerated plants RAPD PCR was applied.

Results: Among primers used, FPK2-19 primer showed the highest genetic variation. Leaves and roots of transgenic lines (number 1,2,3) were analyzed for atropine content using TLC. Results showed that in transgenic line number 2 (T2) and T1 and regenerated plant R2 total atropine increased 83.04%, 61.01 and 77.79% significantly in comparison to non transgenic plants. However, in line T3 total atropine was decreased 9.40% in comparison with control plants. Atropine content in shoot and leaf of line T2 plants was 164.97% higher than non transgenic plants, while roots in line T2 plants with 94.25% was lower than non transgenic plants.

Conclusion: It can be concluded that atropine content of shoot was higher than roots and it may be produced in roots and then are transported to shoot and leaf. Somaclonal variation and T-DNA transferring to plant may affect on the gene or genes expression involved in atropine biosynthesis pathway

Key words: *Datura metel*, atropin, transgenic, RAPD PCR

تعیین مقدار میزان آتروپین گیاه تراریخت و بازرانی شده TLC به روش Datura metel L.

طیبه همایی بروجنی^۱
علی اکبر احسانپور^۱
غلامرضا اصغری^۲

چکیده

سابقه و هدف: گیاه Datura metel L. غنی از آلکالوئیدهای مهم دارویی شامل هیوسیامین، اسکوپولامین و آتروپین است. ضروری به نظر می‌رسد از فن آوری نوین جهت افزایش پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شود. چندین روش برای نیل به این هدف وجود دارد. به عنوان مثال موتاسیون، القاء تنوعات سوماکلونال و انتقال T-DNA به گیاه.

مواد و روش‌ها: برای ارزیابی تنوعات سوماکلونال در گیاهان بازرانی شده RAPD-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: در بین پرایمرهای استفاده شده پرایمر FPK2-19 بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان داد. برگ و ریشه‌های لاین‌های تراریخت (شماره‌های ۱، ۲، ۳) از نظر میزان آتروپین به روش TLC بررسی شدند. نتایج نشان داد که در لاین شماره ۲ (T2) و T1 و گیاهان بازرانی شده R2 میزان کل آتروپین به ۸۳/۰۴، ۶۱/۰۱ و ۷۷/۷۹ درصد نسبت به گیاه غیر تراریخت افزایش نشان داد. به هر حال در لاین T3 میزان کل آتروپین ۹/۴ درصد نسبت به گیاه شاهد کاهش نشان داد. میزان آتروپین نوساقه و برگ در لاین T2 ۱۶۴/۹۷ درصد نسبت به گیاه غیر تراریخت افزایش داشت.

استنتاج: می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میزان آتروپین در نوساقه نسبت به ریشه بیشتر بود و این نتیجه ممکن است به واسطه تولید اتروپین‌ها در ریشه و سپس انتقال آن به نوساقه و برگ باشد. تنوعات سوماکلونال در انتقال T-DNA به گیاه در بیان ژن یا ژن‌های تولیدکننده آتروپین اثر بگذارد.

واژه‌های کلیدی: داتورا متل، تراریخت، آتروپین، RAPD PCR

مقدمه

آلکالوئیدهای تمام گونه‌های آتروپین، اسکوپولامین و هیوسین را تشکیل می‌دهد (۱). از آنجایی که این ترکیبات دارای اثرات آنتی موسکارینی هستند، در درمان اختلالات عصبی و ناراحتی‌های قلبی کاربرد زیادی دارند. با توجه به اهمیت دارویی و اقتصادی این گیاه، تکثیر آزمایشگاهی آن با استفاده از فنون کشت بافت می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های ازدیاد سنتی در نظر گرفته

جنس داتورا یکی از مهم‌ترین جنس‌های تیره سولاناسه می‌باشد که در نواحی گرم و معتدل کره زمین پراکنده است. بوته‌ای یک‌ساله است و ارتفاع آن از ۳۰ سانتی‌متر تا ۲ متر می‌رسد. میزان آلکالوئیدها در قسمت‌های مختلف گیاه و نیز در گونه‌های مختلف این جنس اختلاف زیادی دارد. ولی نوع آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف تقریباً مشابه بوده و بیشترین مقدار

E-mail: ehsanpou@yahoo.com

مؤلف مسئول: علی اکبر احسانپور - اصفهان: دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. دانشکده علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۵/۱۰ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۳

مواد و روش ها

در پژوهش های قبلی محیط کشت مناسب جهت بازرایی *Datura metel L.* با استفاده از محیط کشت MS (murashig and Skoog, 1962) (v) در غلظت BAP 1mg/L بهینه شد. در این پژوهش ابتدا جهت بررسی وقوع تنوع سوماکلونال بین گیاهان شاهد و لاین های بازرایی شده داتورا، چهار لاین از گیاهان بازرایی شده را به همراه گیاه شاهد انتخاب کرده و از برگ آن ها با استفاده از CTAB از برگ DNA استخراج شد (۱۰). سپس با به کارگیری شش نوع پرایمر RAPD (جدول شماره ۱) نسبت به بررسی تغییرات ژنتیکی بین گیاهان شاهد و بازرایی شده اقدام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرومتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR. ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر Taq Enzyme، ۱/۵ میکرولیتر Primer انجام پذیرفت.

جدول شماره ۱: پرایمرهای به کار رفته در PCR برای تعیین تنوع سوماکلونال. توالی

RAPD PRIMER	Sequense
OPAA 0-3	5'-TTA GCG CCC C-3'
FPK1-05	5'-ACT TGG CGG CCT-3'
OPAA-20	5'-TTG CCT TCG G-3'
OPAA-14	5'-AAC GGG CCA A-3'
OPB-08	5'-GTC CAC ACG G-3'
FPK2-19	5'-GGA CGG CGT T-3'

شرایط PCR شامل ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۳۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ سیکل بود. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) در حضور تابش UV از ژل عکس برداری گردید.

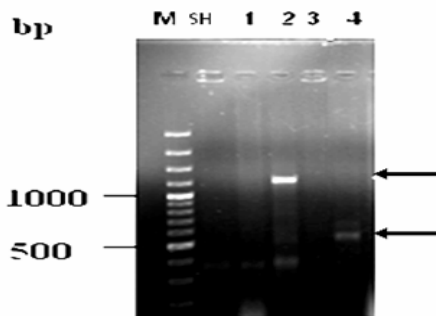
جهت تعیین مقدار آلکالوئید آتروپین ها ابتدا گیاهان شاهد، بازرایی شده و تراخیخت رشد یافته در

می شود (۲). سلول های سوماتیکی گیاهان بازرایی شده حاصل از کشت بافت، گاهی تغییرات ژنتیکی نشان می دهند. این تغییرات ژنتیکی منحصر به فردی را در اختیار اصلاح کننده گیاه برای استفاده در برنامه های اصلاحی قرار می دهد. از آنجایی که تغییرات در سلول هایی که دارای منشا سوماتیکی (بدنی) هستند رخ می دهد. این تغییرات تحت نام تغییرات سوماکلونال شناخته می شوند (۳). تعیین این نوع از تنوعات ژنتیکی از طریق روش های مولکولی، چشم انداز نوینی را برای بررسی تنوع زیستی فراهم آورده است (۵). نشانگرهایی که برای شناسایی این تغییرات استفاده می شوند عبارتند از AFLP, RFLP, SSR و RAPD. در بین نشانگرهای مختلف مولکولی از نشانگرهای RAPD برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی به کار می رود.

مهندسی ژنتیک می تواند وسیله ای مناسب برای افزایش آلکالوئیدها به وسیله روش هایی همچون بلوک کردن مسیرهای رقابتی، کاهش کاتابولیسیم محصولات و غلبه بر مراحل محدود کننده سرعت باشد (۶). امکان انتقال T-DNA توسط *Agrobacterium tumefaciens* حامل ژن های مارکر همچون ژن GUS و ژن مقاومت به کانامیسین (NPTII) به منظور القای تغییر در ژنوم و بررسی امکان تولید آلکالوئیدهای تروپان در گیاهان دارویی وجود دارد. در چنین مواردی آثار حاصل از ادغام T-DNA در ژنوم وابسته به محل و تعداد نسخه هایی از ژن است که در ژنوم گیاه ادغام می شود. به هر حال ادغام T-DNA با توجه به نوع و شدت اثری که بر ژنوم ایجاد می کند، می تواند با اثر بر مسیرهای تولید متابولیت های ثانویه گاهی نوع و مقدار آن ها را تغییر دهد (۱۱، ۱۰).

با توجه به ناکافی بودن اطلاعات منتشر شده در زمینه روش های تغییر مسیر متابولیسیم تولید آلکالوئیدها در این گیاه، هدف اساسی این پژوهش بازرایی گیاه و بررسی تغییرات سوماکلونال احتمالی در گیاهان بازرایی شده و نیز بررسی تغییرات میزان آتروپین تولید شده در گیاه داتورا و بررسی ارتباط بین تغییرات سوماکلونال و تولید این ماده می باشد.

پرایمر مختلف عمل RAPD-PCR انجام شده و الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA در لاین‌های ۱، ۲، ۳، و ۴ بر روی ژل آگارز مورد مقایسه قرار گرفتند. به کارگیری شش نوع پرایمر RAPD (جدول شماره ۱) و مقایسه محصولات آن‌ها بر روی ژل آگارز نشان داد که پرایمر FPK2-19 به خوبی می‌تواند گویای وقوع تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان شاهد و لاین‌های باززایی شده داتورا باشد. وجود باند ۱۱۰۰ bp در لاین شماره ۲ و عدم آن در گیاهان شاهد و سایر لاین‌های باززایی شده می‌تواند بیانگر رخداد نوعی تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان باززایی شده باشد (تصویر شماره ۱). همچنین وجود باند ۵۲۰ bp در لاین ۴ و عدم آن در گیاهان شاهد و نیز لاین‌های ۱، ۲ و ۳ می‌تواند تأیید دیگری بر وقوع نوعی تنوع ژنتیکی سوماکلونال در گیاهان لاین شماره ۲ و ۴ باشد. از بین گیاهان باززایی شده لاین‌های ۲ (R2) و ۴ (R4) با توجه به اختلاف ژنتیکی نسبت به شاهد برای آنالیزهای میزان آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفتند.



تصویر شماره ۱: الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA با استفاده از پرایمر FPK2-19. C: کنترل منفی، SH: گیاه شاهد و ۱، ۲، ۳، ۴: لاین‌های باززایی شده

با توجه به این که حدود غلظت آتروپین و هیوسین گزارش شده در نمونه‌های گیاهی ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ ppm گزارش شده است مقدار ۵ غلظت متفاوت از آتروپین استاندارد تهیه گردید و از هر یک از نمونه‌های استاندارد

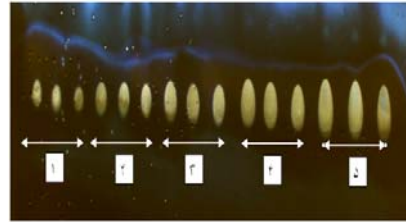
شرایط کشت در شیشه به دو قسمت اندام هوایی و ریشه تفکیک و به طور جداگانه توزین شدند و در آن با دمای ۷۰°C به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. سپس اجزای گیاه توسط آسیاب به صورت پودر درآمدند. بعد یک گرم از پودر به دقت توزین شد ۱۰ میلی لیتر کلروفرم و ۰/۲۵ میلی لیتر محلول آمونیاک غلیظ (۲۵ درصد) به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با دور ۶۵ rpm و در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس عصاره مورد نظر با کاغذ صافی صاف شد و به عصاره صاف شده ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۹۸-۹۵ درصد افزوده شد. پس از چند بار تکان دادن، فاز کلروفرمی دور ریخته شد و به فاز آبکی در حدود ۱۰ میلی لیتر کلروفرم دیگر به همراه ۰/۷۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد افزوده شد. پس از چند بار تکان دادن و دو فاز شدن عصاره، این بار فاز آبکی دور ریخته شد و فاز کلروفرمی زیرین در بن ماری قرار گرفت تا تغلیظ شود و به حجم ۱ میلی لیتر کاهش یابد. عصاره حاصل جهت بارگیری بر روی کاغذ TLC تجاری مورد استفاده قرار گرفت (۹). لکه‌ها با استفاده از محلول‌های استاندارد آتروپین و معرف دراژندروف و نیتريت سدیم بر روی کاغذ TLC شناسایی و با استفاده از نرم افزار Image دانسیته نسبی نمونه‌ها محاسبه و منحنی استاندارد غلظت/ دانسیته، از نمونه‌های استاندارد ترسیم شد. آزمایشات تعیین مقدار آلکالوئید در طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار Sigma Stat 2.0 انجام شد. مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی انجام گردید و سطوح معنی دار بودن در سطح $p < 0.05$ محاسبه شد و نمودار آن‌ها رسم گردید.

یافته‌ها

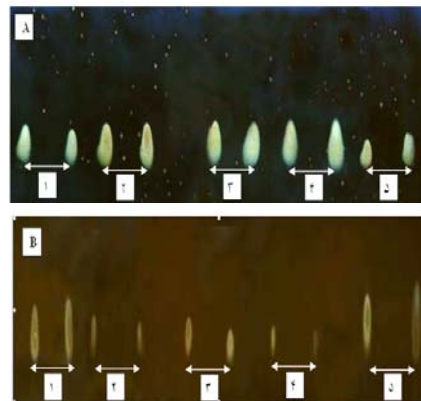
جهت بررسی وجود شباهت یا اختلاف ژنتیکی بین گیاهان شاهد و باززایی شده داتورا و با استفاده از ۶

آتروپین در اندام‌های هوایی گیاهان مورد بررسی وجود دارد. گیاهان لاین‌های ۱ (T1) و ۲ (T2) تراویخت به ترتیب ۹۱/۵۲ و ۱۶۴/۹۷ درصد، افزایش معنی‌دار و چشم‌گیر آلکالوئید را نسبت به شاهد نشان دادند و لاین ۳ تراویخت (T3)، ۲۹/۰۲ درصد کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد. گیاهان باززایی شده لاین ۲ (R2) نیز ۱۳۴/۶۲ درصد افزایش معنی‌دار آلکالوئید را نسبت به شاهد نشان دادند. در بین گیاهان تحت بررسی، لاین ۲ (T2) و ۳ (T3) تراویخت به ترتیب با ۲۶۴/۹۷ و ۷۰/۹۸ درصد آتروپین بیشترین و کمترین مقدار آلکالوئید را در اندام‌های هوایی نشان دادند (تصویر شماره ۴). در رابطه با ریشه، لاین ۲ تراویخت (T2) با مقدار ۹۴/۲۵ درصد کاهش معنی‌دار آلکالوئید نسبت به شاهد، کمترین غلظت آتروپین را در بین گیاهان نشان داد. در حالی که آتروپین در اندام‌های هوایی این لاین بیشترین غلظت را نسبت به سایرین نشان داد. همچنین گیاهان باززایی شده لاین ۲ (R2) و لاین ۱ تراویخت (T1) نیز به ترتیب ۴۵/۲۱ و ۵/۰۳ درصدی نسبت به شاهد نشان دادند که کاهش معنی‌داری نبود. مقدار غلظت آتروپین در لاین ۳ تراویخت (T3) با مقدار ۳۳/۰۳ درصد نسبت به شاهد، بیشترین مقدار را در بین ریشه‌های گیاهان تحت بررسی داشت. این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. این در حالی بود که آتروپین در اندام‌های هوایی این لاین کمترین غلظت را نسبت به سایرین نشان داده بود. در مجموع روند تغییرات غلظت آتروپین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی کاملاً بر عکس یکدیگر بود که این می‌تواند انتقال احتمالی آلکالوئید از ریشه به ساقه را تأیید کند (تصویر شماره ۵ و ۴).

و نیز عصاره اندام‌های هوایی و ریشه نمونه‌های گیاهی (شاهد، باززایی شده و تراویخت)، حجم یکسانی بر روی پلیت کاشته و پس از اتمام جداسازی از لکه‌های حاصل از کروماتوگرافی استاندارد (نمودار شماره ۲) و اندام‌های هوایی و ریشه عکس برداری شد (نمودار شماره ۳).



تصویر شماره ۲: کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) غلظت‌های مختلف استاندارد. ۱: آتروپین با غلظت ۳۱۲/۵ ppm، ۲: آتروپین با غلظت ۶۲۵ ppm، ۳: آتروپین با غلظت ۱۲۵۰ ppm، ۴: آتروپین با غلظت ۲۵۰۰ ppm و ۵: آتروپین با غلظت ۵۰۰۰ ppm



تصویر شماره ۳:

پس از تهیه عکس از لکه‌های حاصل، دانسیته نسبی همه نمونه‌ها (استاندارد و گیاهی با نرم‌افزار Image محاسبه و منحنی تغییرات غلظت نمونه‌های استاندارد آتروپین، بر اساس تغییرات دانسیته نسبی^۱ آن‌ها ترسیم

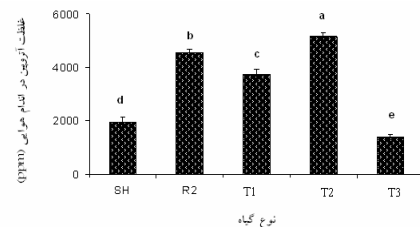
گردید. با توجه به منحنی استاندارد حاصل مقادیر غلظت آتروپین در اندام‌های هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد، باززایی شده و تراویخت محاسبه شد. آنالیز واریانس آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین سطوح

1. Relative Densite

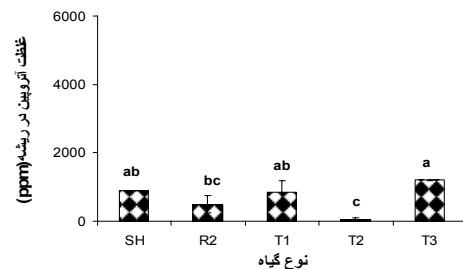
بحث

از بین پرایمرهای RAPD، پرایمر FPK2-19 به خوبی توانست وقوع تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان شاهد و لاین‌های باززایی شده داتورا را نشان دهد. از ۴ لاین مورد بررسی وجود باند kb ۱۱۰۰ در لاین شماره ۲ باززایی شده داتورا و عدم آن در گیاهان شاهد و سایر لاین‌های باززایی شده می‌تواند بیانگر رخداد نوعی تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان مورد بررسی باشد (نمودار شماره ۱). همچنین وجود باند bp ۵۲۰ در لاین ۴ و عدم آن در گیاهان شاهد و نیز لاین‌های ۱، ۲ و ۳ می‌تواند احتمالاً تأیید دیگری بر وقوع نوعی تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان مورد بررسی باشد. در رابطه با وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح آلکالوئید گیاهان باززایی شده (R2) و شاهد می‌توان به این مسأله اشاره کرد که احتمالاً وقوع تغییرات ژنتیکی در گیاهان باززایی شده با تأثیر بر ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئید میزان تولید آلکالوئید را تغییر داده است. به این صورت که وجود باند اضافی bp ۱۱۰۰ در لاین ۲ (R2) و عدم آن در گیاهان شاهد احتمالاً باعث ۱۳۴/۶۲ درصد افزایش معنی‌دار آتروپین در اندام هوایی این لاین نسبت به شاهد شده است. بدیهی است که ایجاد تغییرات در سطوح آلکالوئید گیاهان باززایی شده به‌ویژه افزایش به‌دست آمده در این پژوهش (در مورد لاین R2) به دلیل اهمیت فوق‌العاده آلکالوئیدهای تروپان بسیار مطلوب بوده و اعمال تغییراتی از این دست و تکثیر گیاهان حاصله می‌تواند موفقیتی در جهت بهبود هرچه بیشتر محصولات ثانویه ارزشمند دارویی و تجاری گیاهان باشد. از طرف دیگر کاهش میزان آلکالوئیدها در گیاهان باززایی شده این زمینه را ایجاد می‌کند که بتوان از این روش نسبت به کاهش آلکالوئیدهای نامطلوب مانند نیکوتین در گیاه تنباکو اقدام نمود. دلیل چنین یافته‌هایی کاهش چشمگیر میزان آلکالوئید در لاین ۴ از گیاهان تراریخت می‌باشد. در رابطه با علت وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح

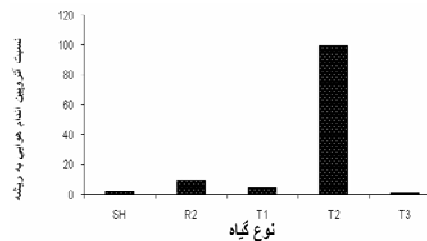
محاسبه نسبت آتروپین اندام هوایی به ریشه برای هر یک از گیاهان مورد بررسی نشان داد که این نسبت در بین همه گیاهان مورد بررسی مثبت می‌باشد. به عبارت دیگر در همه گیاهان مقدار آتروپین اندام هوایی بیشتر از ریشه است. این نسبت در مورد گیاهان لاین ۲ تراریخت (T2) بیشترین و در گیاهان لاین ۳ تراریخت (T3) کمترین مقدار را نشان داد (نمودار شماره ۶). یادآوری می‌گردد که نتایج نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که لاین ۲ نسبت به بقیه لاین‌ها دارای تغییرات سوماکلونال است.



شکل شماره ۴: غلظت آتروپین در اندام هوایی گیاهان تراریخت (T1, T2, T3). SH: شاهد (گیاهان باززایی شده). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها ($P < 0.05$) بر اساس تست.



نمودار شماره ۵: غلظت آتروپین در ریشه گیاهان تراریخت (T1, T2, T3). SH: شاهد (گیاهان باززایی شده). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها ($P < 0.05$) بر اساس تست.



نمودار شماره ۶: نسبت آتروپین اندام هوایی به ریشه گیاهان تراریخت (T1, T2, T3). SH: شاهد (گیاهان باززایی شده).

آلکالوئید اندام هوایی گیاهان شاهد و تراریخت نیز این طور استنباط می‌شود که ترانسفورماسیون و انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی با تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم بر ژن‌های بیوسنتزکننده آتروپین و در نتیجه بیان آنزیم‌های بیوسنتزکننده آلکالوئید بر میزان تولید این محصولات اثر گذاشته است. نوع، شدت و میزان این تأثیر به عوامل مختلفی وابسته است که از جمله آن‌ها می‌توان به تعداد نسخه T-DNA ادغام شده درون ژنوم سلول‌های گیاهی و به محل ادغام این نسخه‌ها اشاره کرد. در حال حاضر در حد یک فرض می‌توان گفت احتمالاً انتقال T-DNA به ژنوم گیاه داتورا متل از طریق فعال‌سازی مسیر رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئید و یا بالعکس و خاموش نمودن این مسیر عمل نموده است. به هر حال اظهار نظر قطعی در این خصوص نیاز به مطالعه دقیق‌تر دارد. در بررسی میزان الکلوئید در گیاهان معمولاً از روش‌های حساس‌تری نظیر HPLC استفاده می‌شود این روش نیاز به مواد و دستگاه کارا و هزینه بالاتری لازم داشته و بهینه‌سازی شرایط آن گاهی چندین ماه وقت لازم دارد. در حالی که روش TLC ممکن است حساسیت و دقت آن کمتر باشد ولی حداقل در مورد بررسی میزان الکلوئید در منابع گیاهی در زمان کوتاه‌تر و هزینه کمتر جایگزین خوبی می‌باشد (۴).

در مجموع روند تغییرات غلظت آتروپین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی کاملاً برعکس یکدیگر بود. در رابطه با ریشه، لاین‌های R2، T1 و T3 تغییرات معنی‌دار نسبت به شاهد نشان ندادند. تنها لاین T2، با مقدار ۹۴/۲۵ درصد کاهش معنی‌دار آلکالوئید نسبت به شاهد، کمترین غلظت آتروپین را در بین گیاهان مورد نظر نشان داد (نمودار شماره ۴). این در حالیست که آتروپین در اندام‌های هوایی این لاین به شدت افزایش یافته به طوریکه بیشترین غلظت را نسبت به سایرین نشان داد (تصویر شماره ۴). این نکته بیانگر این است که به احتمال زیاد در T2، قدرت سنتز آلکالوئید در ریشه و

انتقال آن به ساقه نسبت به شاهد بسیار زیاد شده است. علاوه بر آن بین سطوح آلکالوئید ساقه و ریشه در همه گیاهان مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. این اختلاف از طریق محاسبه نسبت آتروپین اندام هوایی به ریشه برای هر یک از گیاهان مورد بررسی پی‌گیری شد. نتایج نشان داد که این نسبت در بین همه گیاهان مورد بررسی مثبت (بیشتر از ۱) می‌باشد (تصویر شماره ۵). به عبارت دیگر در همه گیاهان مورد بررسی مقدار آتروپین ساقه بیشتر از ریشه بود. این دو مسأله یعنی معنی‌دار بودن اختلاف سطوح آلکالوئید اندام هوایی و ریشه از یک طرف، و از طرف دیگر مثبت بودن نسبت سطوح آلکالوئید اندام هوایی به ریشه می‌تواند تأیید کننده این موضوع باشد که در تمام گونه‌های مورد بررسی آلکالوئید در ریشه ساخته شده و به اندام هوایی منتقل شده است. تحقیقات نشان داده که بازهای آزاد اسکوپین و تروپین که پیش‌ساز سنتز آلکالوئیدهای تروپان هستند در ریشه‌ها بیشتر وجود دارند. در حالی که در بخش‌های هوایی مقادیر بالای تجمع آلکالوئیدها مشاهده می‌شود. این الگو احتمالاً منعکس کننده موقعیت فیزیولوژیکی اندام‌ها در رابطه با سنتز و توزیع آلکالوئید است. معمولاً ریشه‌ها محل بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان می‌باشد و آلکالوئیدها بعد از بیوسنتز به بخش‌های هوایی منتقل می‌شوند و ممکن است در آن‌جا مشتقات دیگری نیز تولید کنند (۱۲).

در مجموع با توجه به وجود اطلاعات کم پیرامون اثرات ناشی از انتقال T-DNA حامل ژن GUS و NPTII، بر روی میزان آلکالوئیدهای گیاه می‌توان به‌عنوان یک پیشنهاد اولیه برای بیان نحوه تأثیر ترانسفورماسیون بر بیوسنتز آلکالوئیدها و ایجاد اختلاف معنی‌دار بین سطوح آلکالوئید در بین گیاهان مورد بررسی به موارد ذیل اشاره کرد.

- اختلاف در میزان سنتز آتروپین و انتقال به بخش‌های هوایی در بین گیاهان مورد بررسی وجود دارد. زیرا عدم بیوسنتز و انتقال به بخش‌های هوایی و نیز

گیاهان. اختلاف در بیان نوع آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آلکالوئید وجود دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از تحصیلات تکمیلی دانشگاه به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

بیوسنتز اما عدم انتقال نیز می تواند تا حدی علت بروز اختلاف سطوح آلکالوئید را توجیه نماید.

- اختلاف در مقدار و نسبت بخش های اندام هوایی یعنی برگ و ساقه برداشته شده برای آنالیز وجود دارد. چون این دو اندام ممکن است پتانسیل ذخیره ای متفاوتی برای تجمع آلکالوئید داشته باشند (۷).

- به دلیل وقوع تغییرات سوماکلونال در بین

References

1. Evan S, Willian C. 2002. Treas and Evans Pharmacognosy. London Harcourt Publisher 11, 4-8.
2. میر حیدر، ح. ۱۳۷۳. معارف گیاهی (کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری ها). انتشارات تیمورزاده تهران. جلد ۵. ۴۴۸ صفحه.
3. نوروزی، پیمان. ۱۳۸۲. بررسی تحمل به شوری و تنوع کروموزومی در کشت سلول چقدرقند. مجله چقدرقند علمی - پژوهشی. جلد ۱۹ شماره ۱. ۵۴-۵۹.
4. Mandal S, Naqvi AA, Thakur RS. Simultaneous determination of atropine and scopolamine in plants by mixed-column high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 2007; 2: 208-210.
5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962; 15: 473-497.
6. Szmidt AE. Measuring and monitoring biodiversity in tropical and temperate forests. *Center for International Forestry Research* 1994; 45: 177-193.
7. Pascal K, Marion V, Yann B, Jean-Yves C, Vincent C. Testing for atropine and scopolamine in hair by LC-MS-MS after Datura innoxia abuse. *Journal of Analytical Toaxonomy* 2006; 30: 454-457.
8. Zhang L, Kai GY, Lu BB, Zhang HM, Tang KX, Jiang JH, et al. Metabolic Engineering of Tropane Alkaloid Biosynthesis in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 2005; 47: 136-143.
9. Abd El-Rahman R, Gabal A, Khelifa HD. Production of Scopolamine and Hyoscyamine in Calli and Regenerate Culture of Datura metal L. *Journal of Applied Science Research* 2008; 4: 1858-1866.
10. Zayed R, Wink M, El-Shamy H. In vitro organogenesis and alkaloid accumulation in Datura innoxia. *Z Naturforsch* 2006; 61(c): 560-564.
11. Ehsanpour AA, Twell D. Analysis of SFL1 and SFL2 Promoter Region in Arabidopsis thaliana using gateway cloning system. *Journal of Science* 2005; 16: 303-309.
12. Samuelsson G. *Drugs of Natural origin*. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm. 1992. pp. 318.