

# افزایش ساخت تروپان آلکالوئیدها و بیان ژن *h6h* در گیاهچه‌های شاهبیزک<sup>۱</sup> در اثر کربوهیدرات‌ها

بهاره وکیلی<sup>۱</sup>، فرح کریمی<sup>۲\*</sup>، مظفر شریفی<sup>۳</sup>، مهرداد بهمنش<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد علوم گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

۲- استادیار علوم گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

۳- دانشیار علوم گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- دانشیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

\*تهران، صندوق پستی ۱۵۹-۱۸۱۵۵

fkarimi@shahed. ac. ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۷/۲۲، پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۴)

**چکیده** - تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین به عنوان داروهای آنتی‌کولینرژیک استفاده‌ی گسترده‌ای دارند. شاهبیزک نیز مانند بیشتر گیاهان تیره سیب‌زمینی، حاوی این دو تروپان آلکالوئید است. در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان تیره سیب‌زمینی، کربوهیدرات‌ها علاوه بر این که به عنوان منابع کربن برای تامین انرژی قطعات جداگشت به کار می‌روند، به عنوان ملکول‌های سیگنال نیز در سوخت و ساز آلکالوئیدها نقش دارند. در این پژوهش تأثیر کربوهیدرات‌های سوربیتول، مانیتول و سوکروز بر رشد، محتوای کلروفیل، تولید هیوسیامین و اسکوپولامین و بیان ژن هیوسیامین  $\beta$ -6 هیدروکسیلاز (*h6h*) در گیاهچه‌های شاهبیزک بررسی شد. تیمار با این کربوهیدرات‌ها رشد گیاهچه‌ها را کاهش داد ولی موجب افزایش محتوای کلروفیل *a* و همچنین نسبت آن به کلروفیل *b* شد. محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاهچه‌ها نیز افزایش یافت. این تیمارها سبب افزایش بیان ژن *h6h* در اندام‌های مختلف گیاهچه‌های شاهبیزک نیز شدند. در این مطالعه تغییرات محتوای اسکوپولامین با تغییرات الگوی بیان ژن *h6h* متناسب بود.

**کلیدواژگان:** اسکوپولامین، هیوسیامین، هیوسیامین  $\beta$ -6 هیدروکسیلاز، مانیتول، سوربیتول، سوکروز.

## ۱- مقدمه

پتانسیل اسمزی) استفاده می‌شود. در مواردی مشاهده شده که قطعات جداگشت در شرایطی که منبع کربن دیگری در اختیار نداشته باشند قادرند از قندهایی نظیر مانیتول و سوربیتول به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند؛ هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که کربوهیدرات‌ها علاوه بر این به‌عنوان مولکول‌های علامت (سیگنال) در سوخت و ساز آلکالوئیدها مؤثرند [۱۰].

## ۱-۲- سابقه کاربرد کربوهیدرات‌ها در کشت

## درون شیشه‌ای گیاهان

همانطور که پیش‌تر گفته شد تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین به‌دلیل فعالیت آنتی‌کولینرژیک به‌طور گسترده در پزشکی استفاده می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌فناوری گیاهی و فناوری‌های مهندسی متابولیک به‌ویژه روش‌های کشت سلول و بافت گیاهان ابزاری جدید برای تولید تجاری این ترکیبات دارویی گیاهی فراهم کرده است [۱۱]. در سال ۱۹۹۹ Zabetakis و همکاران، تأثیر محرک‌های متیل جاسمونات، عصاره دیواره سلولی مخمر و الیگوگالاکتورونیدها را بر انباشتگی تروپان‌آلکالوئیدهای لیتورین، هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویی گیاه داتورا استرامونوم بررسی کرده و نتیجه گرفته‌اند که هر سه محرک به‌ترتیب: الیگوگالاکتورونید < محرک قارچی < متیل جاسمونات) موجب افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه مویی این گیاه می‌شوند [۱۲].

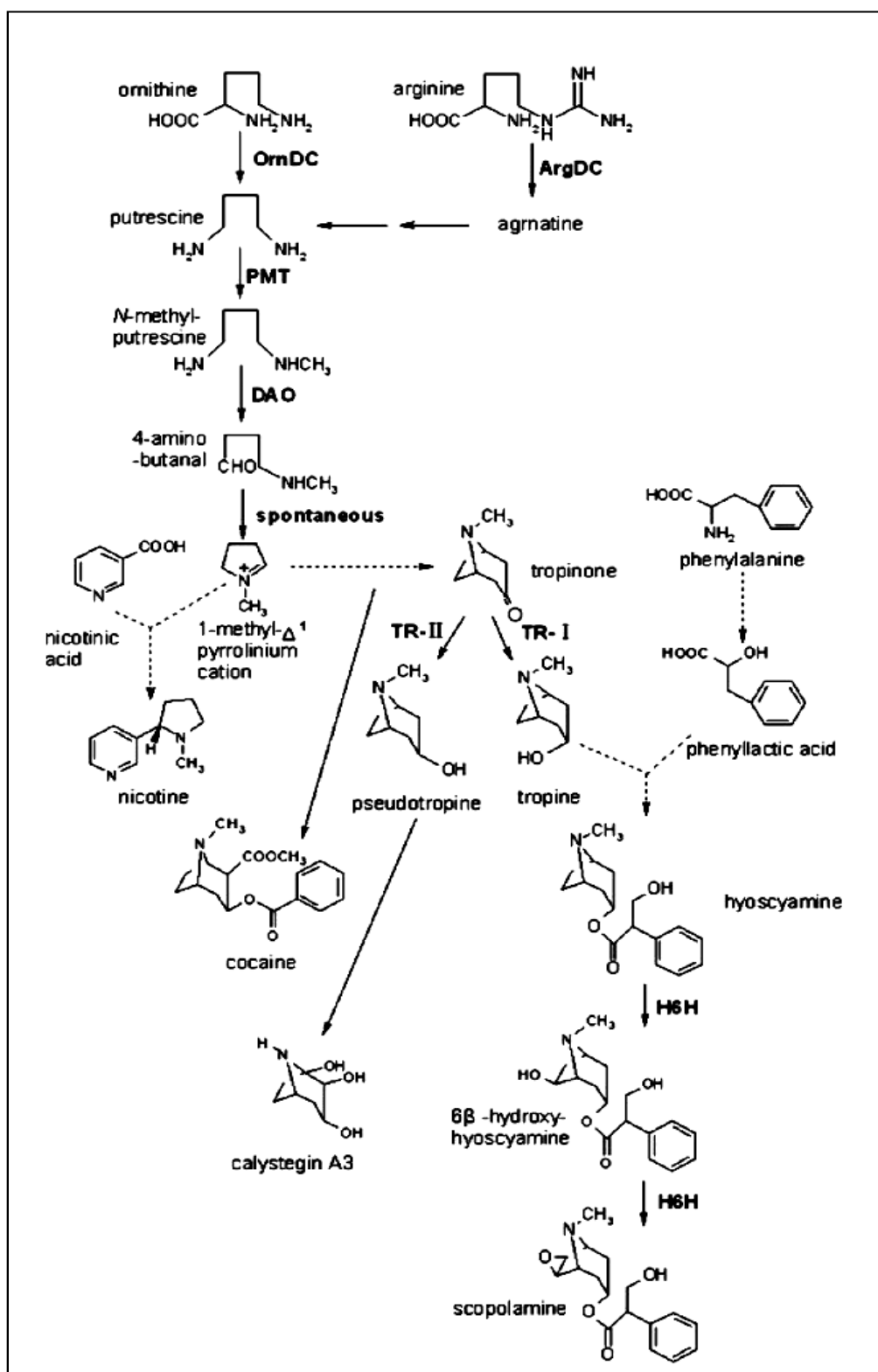
در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۰۲، Rothe و همکاران در کشت ریشه *Atropa belladonna* از قندهایی مانند سوربیتول و مانوز که به‌طور معمول به‌عنوان اوسموتیکوم به‌کار می‌روند، به‌عنوان منبع کربن استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیبات در کنار برخی از فیتوهورمون‌ها، سبب افزایش تولید تروپان‌آلکالوئیدها به‌ویژه کلیستژین می‌شوند [۱۰].

تروپان‌آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین که به‌عنوان داروهای آنتی‌کولینرژیک و مؤثر بر اعصاب پاراسمپاتیک استفاده‌ی گسترده دارند، بیشتر در گیاهان خانواده سیب‌زمینی مانند تاتوره (*Datura*)، بنگ‌دانه (*Hyoscyamus*) و شاهبیزک (*Atropa*) وجود دارند [۱]. در شاهبیزک مانند بیشتر گیاهان تیره سیب‌زمینی، هیوسیامین (آتروپین) آلکالوئید اصلی است؛ درحالی‌که اسکوپولامین (هیوسین) کمتر تولید می‌شود. اسکوپولامین به خاطر آثار فیزیولوژیک مطلوب‌تر و عوارض جانبی کمتر نسبت به هیوسیامین ارزش دارویی بیشتری دارد و برای مصارف دارویی ترجیح داده می‌شود [۲]. اسکوپولامین و هیوسیامین در ریشه‌های جوان ساخته می‌شوند. مقدار قابل توجهی از این ترکیبات، پس از ساخته شدن در ریشه‌های جوان به بخش‌های هوایی گیاه منتقل و ذخیره می‌شوند [۳]. مراحل بیوسنتز اسکوپولامین، پیچیده و نیازمند مراحل مختلف آنزیمی است (شکل ۱). انتهای این مسیر بیوسنتزی، هیوسیامین B-6 هیدروکسیلاز (H6H)، آنزیمی کلیدی در تولید اسکوپولامین است [۴]. این آنزیم با انجام دو اکسیداسیون پی‌درپی (شکل ۲) هیوسیامین را به اسکوپولامین تبدیل می‌کند [۵-۶].

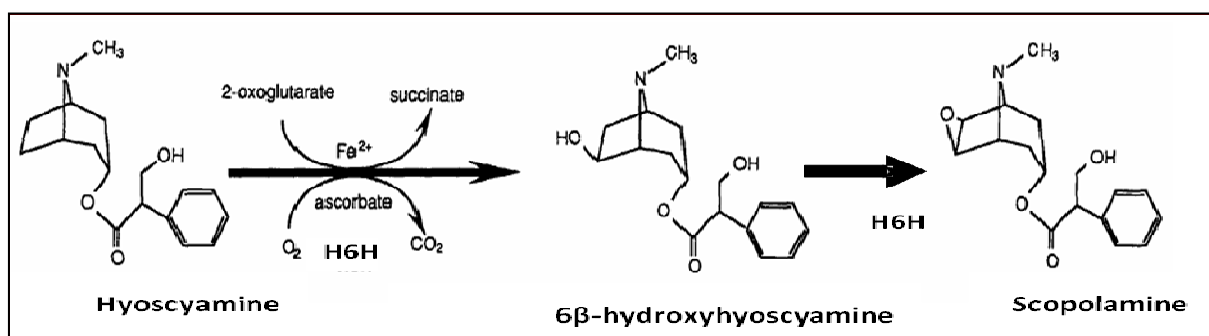
آنزیم H6H از خانواده دی‌اکسیژنازهای وابسته به ۲-اکسوگلو تارات است و برای فعالیت خود علاوه بر سوبسترای آلکالوئیدی به  $Fe^{2+}$ ، ۲-اکسوگلو تارات،  $O_2$  مولکولی و آسکوربات احتیاج دارد و محل فعالیت آن در لایه دایره محیطه (pericycle) ریشه شناسایی شده است [۸] و [۹].

## ۱-۱- نقش کربوهیدرات‌ها در رشد گیاهان

در محیط‌های مصنوعی کشت گیاهان معمولاً سوکروز به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد بهینه گیاه به‌کار می‌رود درحالی‌که از مانیتول و سوربیتول به‌عنوان اوسموتیکوم (افزایش‌دهنده



شکل ۱ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها [۷]



شکل ۲ مسیر فعالیت هیوسيامین ۶-β هیدروکسیلاز [۱۳]

### ۱-۳- اهداف پژوهش

در این پژوهش تاثیر غلظت‌های مختلفی از کربوهیدرات‌های سوربیتول، مانیتول و سوکروز به‌عنوان نامزدهایی برای تحریک بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها و افزایش محتوای هیوسيامین و اسکوپولامین بررسی و مقایسه شده است؛ از سوی دیگر بیان ژن *h6h* در گیاهچه‌های تحت تیمار بررسی شده تا بتوان روند تغییرات محتوای اسکوپولامین را با تغییرات بیان این ژن مقایسه و تنظیمات حاکم بر تولید اسکوپولامین در گیاه را بررسی کرد

### ۲- مواد و روش‌ها

#### ۱-۲- کشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

بذرهای گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.) از منطقه ساری-گرمستان با طول جغرافیایی ۱۴° و ۳۶° شرقی و عرض جغرافیایی ۹° و ۵۳° شمالی جمع‌آوری و در سایه و دمای اتاق خشک شدند. از کشت بذرها در محیط غذایی پایه MS (Murashige and Skoog) گیاهچه به‌دست آمد [۱۴]. برای تکثیر گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، قطعات جداکشت تک‌گره از اندام هوایی گیاهچه‌های حاصل از بذر، جدا و به محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز انتقال داده شد. با رشد جوانه‌های قطعات

جداکشت، دوباره تکثیر اندام هوایی هر دو هفته یکبار انجام شد تا تعداد کافی نوساقه به‌دست آمد. در مرحله بعد، قطعات جداکشت تک‌گره از نوساقه‌ها جدا شدند و در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA، همراه با غلظت‌های مورد نظر مانیتول، سوربیتول و سوکروز کشت داده شدند. بدین ترتیب هم‌زمان با رشد جوانه‌ها در قطعات جداکشت، نوساقه‌ها ریشه‌دار شدند و تیمارهای مورد نظر نیز اعمال شد. برای اعمال تیمارها غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار از سوکروز، مانیتول و سوربیتول به محیط‌های کشت بدون قند افزوده شد. در مورد سوکروز علاوه بر سه غلظت بالا غلظت ۸۷/۶۴ میلی‌مولار (معادل محیط کشت MS یا همان ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز) نیز به‌کار رفت. برای هر یک از غلظت‌ها، ۳ تکرار به‌طور مستقل در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت، دمای روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از گذشت چهار هفته از رشد گیاهچه‌ها، نتایج بررسی شد

#### ۲-۲- برداشت نمونه‌های گیاهی

ریشه‌ها و اندام هوایی گیاهچه‌ها جداگانه جمع‌آوری شدند. نمونه‌های هر اندام گیاهی پس از توزین به دو

ایزوکراتیک، حاوی آب، متانول، اسید استیک و تری اتیل آمین (۸۳: ۱۵: ۰.۱: ۵: ۰/۵) بود. طول موج دستگاه روی ۲۵۸ نانومتر تنظیم شد. برای هر تزریق از ۲۰ میکرولیتر عصاره استفاده شد. محتوای دو آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین براساس سطح زیر منحنی پیک های حاصل با زمان بازداری مربوط و مقایسه آن با منحنی کالیبراسیون غلظت/ سطح ترکیبات استاندارد، محاسبه شد. از آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید (sigma) به- عنوان استاندارد، برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و محتوای آلکالوئیدها براساس میلی گرم بر گرم در وزن تر بافت محاسبه شد.

#### ۲-۵- سنجش کلروفیل در برگ گیاهچه‌ها

۰/۰۵ گرم از برگ گیاه با استون ۸۰٪ در هاون چینی به خوبی ساییده و از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. حجم نهایی استون مصرف شده ۵ میلی لیتر بود. در انتها دانسیته<sup>۲</sup> نوری (D) عصاره به دست آمده در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر خوانده شد و محتوای کلروفیل a و b نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد؛ سپس بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد [۱۵].

$$a = [12.7 (D663) - 2.6 (D 645)] \text{ کلروفیل}$$

$$b = [22.9 (D645) - 4.68 (D 663)] \text{ کلروفیل}$$

#### ۲-۶- آنالیزهای مولکولی

##### ۲-۶-۱- استخراج ریونوکلئیک اسید نام

۰/۵ گرم از بافت گیاهی با نیتروژن مایع به خوبی سائیده و ریونوکلئیک اسید نام به وسیله RNX™ plus (Cinnagen) استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA به ترتیب با الکتروفورز

بخش تقسیم شدند. بخش اول برای مطالعات مولکولی، فوری به وسیله نیتروژن مایع تثبیت و در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد و بخش دوم برای اندازه گیری محتوای کلروفیل و تروپان آلکالوئیدها به فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  منتقل شد.

#### ۲-۳- استخراج آلکالوئید نام

یک گرم از بافت گیاهی (ریشه یا اندام هوایی) با نیتروژن مایع به خوبی ساییده و با ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط و ۲۰ ساعت روی لرزاننده<sup>۱</sup> عصاره گیری شد. تفاله های بافت با کاغذ صافی (واتمن ۱) جدا و عصاره حاصل به وسیله دستگاه تبخیر در خلا خشک شد. به بقایای عصاره خشک شده، ۱۰۰ میلی لیتر از مخلوط حاصل از مقادیر مساوی اسید سولفوریک ۵ درصد (v/v) و دی اتیل اتر اضافه (۱:۱) و به خوبی مخلوط شد. پس از جداسازی اتر به وسیله دکانتور، pH فاز آبی (حاوی آلکالوئیدها) با ۱۰N NaOH به ۱۰ افزایش یافت. سپس ۱۱۰ میلی لیتر کلروفرم در سه مرحله (۳۰+۴۰+۴۰) به آن اضافه شد و هر بار فاز کلروفرمی جدا و به یکدیگر اضافه شد. عصاره کلروفرمی با دستگاه تبخیر در خلاء خشک شد. بقایای خشک شده عصاره در ۲۰۰ میکرولیتر متانول (HPLC grade) حل و تا روز انجام HPLC در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد نگهداری شد. مراحل عصاره گیری برای هر نمونه سه بار جداگانه تکرار شد.

#### ۲-۴- سنجش آلکالوئیدها با HPLC

برای سنجش آلکالوئیدها از روش Lau-Cam و Roos (1986) استفاده شد [۱۹]. از دستگاه HPLC, Knauer GmbH Germany و ستون  $5\mu\text{m C18 (125} \times 4 \text{ mm ID)}$  استفاده شد. سرعت جریان حلال، ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و فاز متحرک

2. density

1. shaker

ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر بررسی شد و برای هر تیمار دو بار استخراج RNA انجام شد و از هر یک دو بار RT-PCR بعمل آمد.

## ۲-۶-۲- ساخت cDNA و RT-PCR

برای بررسی الگوی بیان ژن *h6h* در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های شاهبیزک تحت تأثیر تیمارهای انجام شده، روش RT-PCR نیمه کمی با استفاده از ژن خانه‌دار (*housekeeping*) توبولین به عنوان استاندارد خارجی و به صورت جداگانه به کار رفت. به این منظور، رشته اول cDNA از ۵ میکروگرم از RNA کل به وسیله پرایمر oligo-d(T) ساخته شد. PCR با بافر dNTP، PCR، رشته اول ddH<sub>2</sub>O، *Taq*-DNA polymerase، MgCl<sub>2</sub> و پرایمرهای اختصاصی ژن *h6h* با استفاده از توالی ارائه شده به وسیله سوزوکی و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد [۲۰]:

F:5'-CACTTTGGCTCATGGTTGTCA-3'  
R:5'CCATCATAGTGTCTCCT GAACC-3'

آغازگرها به وسیله شرکت Bioneer کره و با درجه خلوص High Purified Salt Free (HPSF) به صورت لیوفیلیزه ساخته شدند. طول قطعه حاصل از تکثیر ژن *h6h* به وسیله آغازگر اختصاصی آن، ۲۷۰ جفت باز بود. تکثیر ناحیه مورد نظر با دستگاه ترمال سائیکلر [PeQSTAR] و با شرایط واسرشته سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه (۹۴ درجه سانتی گراد)، واسرشته سازی به مدت ۴۵ ثانیه (۹۴ درجه سانتی گراد)، دمای اتصال به مدت ۴۵ ثانیه (۵۲ درجه سانتی گراد)، تکثیر به مدت ۵۰ ثانیه (۷۲ درجه سانتی گراد)، تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه (۷۲ درجه سانتی گراد) انجام شد.

1. synthesis

## ۳- یافته‌ها

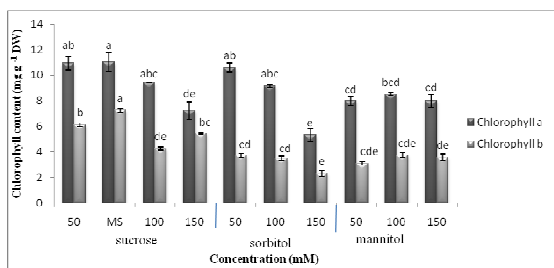
### ۳-۱- تأثیر تیمارها بر بعضی پارامترهای رشد

#### گیاهچه‌ها

مقایسه طول و وزن تر اندام هوایی و ریشه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کربوهیدرات‌ها به ترتیب در نمودار های ۱ و ۲ نشان داده شده است. طبق یافته‌های این پژوهش، طول اندام هوایی و ریشه و همچنین وزن تر آنها در محیط پایه (۸۷/۶۴ mM یا ۳۰ mg/L سوکروز) نسبت به سایر غلظت‌های سوکروز و همچنین نسبت به غلظت‌های مختلف مانیتول و سوربیتول به طور معنی داری بیشتر بود؛ در حالی که با افزایش یا کاهش غلظت سوکروز نیز طول گیاهچه‌ها و همچنین وزن تر آنها کاهش یافت (نمودار ۱- c). استفاده از سوربیتول و مانیتول به جای سوکروز در محیط کشت، طول اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها را به خصوص در غلظت‌های بالا به شدت کاهش داد؛ به طوری که در بالاترین غلظت سوربیتول و مانیتول (۱۵۰ میلی مولار) ریشه تشکیل نشد (نمودار ۱، a و b). وزن تر اندام هوایی و ریشه با افزایش غلظت سوربیتول و مانیتول کاهش یافت. بیشترین کاهش رشد طولی در غلظت‌های ۱۵۰ میلی مولار از هر سه کربوهیدرات مشاهده شد و رشد طولی گیاهچه‌ها به ترتیب در سوکروز بیشتر از سوربیتول و در سوربیتول بیش از مانیتول بود. از نظر وزنی نیز محیط MS پایه مناسب‌ترین محیط برای رشد ریشه و اندام هوایی بود ولی بین وزن تر اندام هوایی و ریشه در

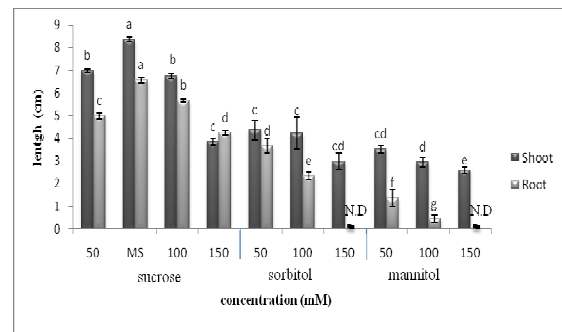
به یکدیگر نداشت ولی در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کاهش معنی داری یافت. محتوای کلروفیل **b** در این تیمار در محیط پایه MS بیشترین مقدار و در غلظت ۱۰۰ میلی مولار سوکروز کمترین مقدار را نشان داد. در تیمار با سوربیتول بین محتوای کلروفیل **a** و **b** در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی در ۱۵۰ میلی مولار سوربیتول کاهش معنی داری نشان داد. تفاوت معنی داری بین محتوای کلروفیل **a** و **b** در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار مشاهده نشد. بین غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار سوکروز و سوربیتول تفاوت معنی داری از نظر محتوای کلروفیل **a** وجود نداشت؛ ولی در غلظت ۵۰ میلی- مولار مانیتول محتوای کلروفیل **a** کمتر از همین غلظت از سوکروز و سوربیتول بود. همچنین محتوای کلروفیل **a** در غلظت ۱۵۰ میلی مولار سوربیتول به طور معنی داری کمتر از محتوای آن در همین غلظت از مانیتول بود.

بیشترین مقدار کلروفیل **b** در محیط کشت پایه MS مشاهده شد و در مجموع، محتوای کلروفیل **b** در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار سوکروز بیشتر از محتوای آن در همین غلظت ها از سوربیتول و مانیتول بود. بین محتوای کلروفیل **b** در غلظت های مختلف مانیتول و با همان غلظت ها از سوربیتول تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۳).

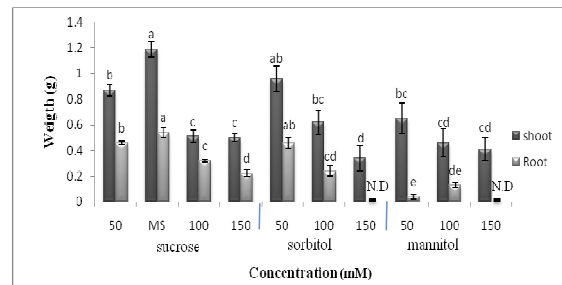


نمودار ۳ مقایسه محتوای کلروفیل **a** و **b** برگ گیاهچه های شایبک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0.05$  می باشد).

این محیط با تیمار ۵۰ mM سوربیتول تفاوت معنی داری مشاهده نشد. افزایش غلظت هر سه کربوهیدرات موجب کاهش وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها شد. در غلظت ۱۵۰ mM سوربیتول و مانیتول ریشه تشکیل نشد.



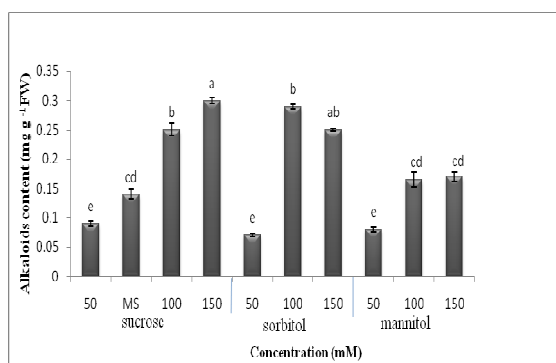
نمودار ۱ مقایسه طول اندام هوایی و ریشه در گیاهچه های شایبک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت برای هر اندام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0.05$  می باشد).



نمودار ۲ مقایسه وزن تر اندام هوایی و ریشه در گیاهچه های شایبک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت برای هر اندام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0.05$  می باشد).

### ۳-۲- تأثیر تیمارها بر محتوای کلروفیل **a** و **b** در گیاهچه ها

در تیمار سوکروز محتوای کلروفیل **a** در غلظت های ۵۰ میلی مولار، MS و ۱۰۰ میلی مولار تفاوت معنی داری نسبت



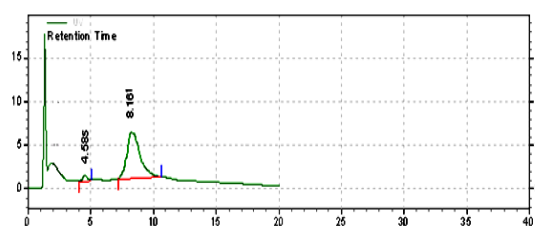
نمودار ۶ مقایسه محتوای اسکوپولامین (mg g<sup>-1</sup> F. W) در اندام هوایی گیاهچه شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$  می‌باشد).

در گیاهچه‌های تیمار یافته با سوربیتول در اندام هوایی، محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های تیمار یافته با غلظت ۵۰ میلی‌مولار نشان داد ولی بین این دو غلظت تفاوت معنی‌داری در محتوای آلکالوئیدها مشاهده نشد (نمودار های ۵ و ۶). همچنین با افزایش غلظت سوربیتول، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین افزایش یافت و بالاترین حد این نسبت در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۹). در ریشه نیز محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سوربیتول افزایش معنی‌داری نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌مولار سوربیتول نشان داد. در بالاترین غلظت انتخابی سوربیتول (۱۵۰ میلی‌مولار) به دلیل نبودن ریشه بررسی محتوای آلکالوئید در ریشه انجام نشد (نمودارهای ۷ و ۸).

تحت تاثیر تیمار مانیتول، محتوای هیوسیامین در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در اندام هوایی و ریشه افزایش معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد (نمودار های ۵ و ۷). محتوای اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه در

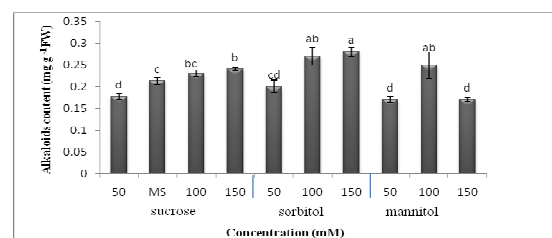
### ۳-۳- مقایسه آلکالوئیدهای تولید شده تحت تاثیر تیمارهای مختلف

زمان بازداری هیوسیامین (آتروپین) و اسکوپولامین (هیوسین) با استفاده از کروماتوگرام HPLC استانداردهای هیوسیامین و اسکوپولامین به ترتیب  $4/5 \pm 0/5$  و  $8/5 \pm 0/5$  به دست آمد (نمودار ۴).



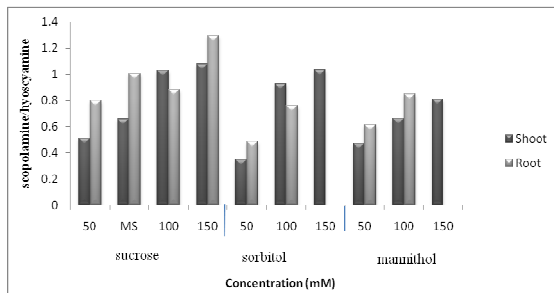
نمودار ۴ کروماتوگرام HPLC استانداردهای آتروپین (RT= 4. 5± 0. 5) و اسکوپولامین (RT= 8. 5± 0. 5)

در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار یافته با سوکروز، محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین با افزایش غلظت کربوهیدرات افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار های ۵ و ۶). همچنین با افزایش غلظت سوکروز در اندام هوایی، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین افزایش یافت و بالاترین حد این نسبت در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۹). در ریشه، محتوای هیوسیامین در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سوکروز نسبت به سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار ۷). همین روند در محتوای اسکوپولامین نیز مشاهده شد (نمودار ۸).



نمودار ۵ مقایسه محتوای هیوسیامین (mg g<sup>-1</sup> F. W) در اندام هوایی گیاهچه شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$  می‌باشد).





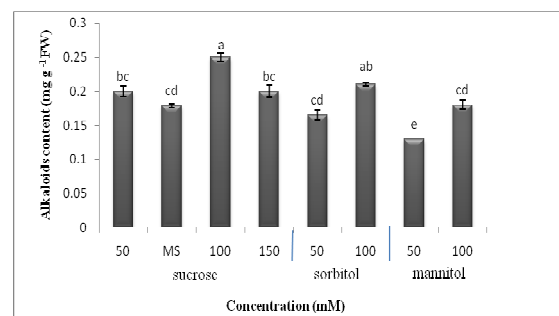
نمودار ۹ مقایسه نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول.

در میان تیمارهای مختلف، بیشترین محتوای اسکوپولامین در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار در اندام هوایی گیاهچه‌های تحت تیمار سوکروز و سپس در اندام هوایی در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار سوربیتول مشاهده شد. بیشترین محتوای هیوسیامین در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سوربیتول دیده شد. کمترین محتوای اسکوپولامین در اندام هوایی و در غلظت ۵۰ میلی‌مولار مانیتول و کمترین محتوای هیوسیامین در ریشه گیاهچه‌های تیمار یافته با ۵۰ میلی‌مولار مانیتول مشاهده شد.

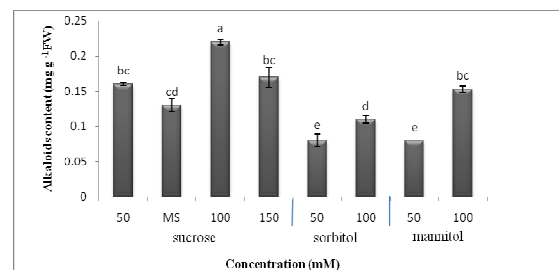
### ۳-۴- تأثیر تیمارها بر بیان ژن *h6h*

در اندام هوایی گیاهچه‌های شایبک تحت تیمار سوکروز، با افزایش غلظت کربوهیدرات، بیان ژن *h6h* به تدریج افزایش یافت (نمودار ۹). بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن *h6h* به ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌مولار سوکروز دیده شد. در ریشه نیز روند افزایشی بیان ژن *h6h* با افزایش غلظت سوکروز مشاهده شد ولی بین غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱۰).

غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌مولار این قند افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار های ۶ و ۸). در بالاترین غلظت انتخابی مانیتول (۱۵۰ میلی‌مولار) به دلیل فقدان ریشه بررسی محتوای آکالوئیدی در ریشه انجام نشد. با افزایش غلظت مانیتول در ریشه، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین افزایش یافت و بالاترین حد این نسبت در ریشه‌های تیمار یافته با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۹).

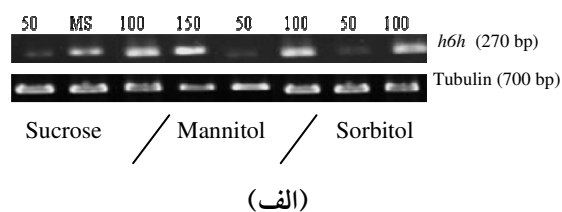


نمودار ۷ مقایسه محتوای هیوسیامین (mg g<sup>-1</sup> F. W) در ریشه گیاهچه‌های شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵  $p \leq$  می‌باشد).

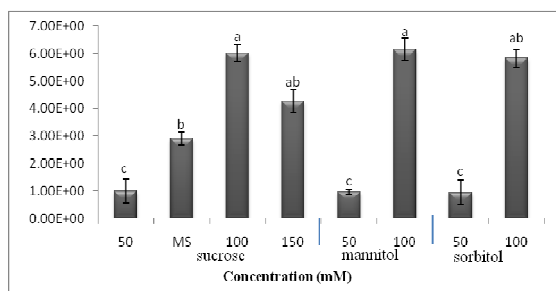


نمودار ۸ مقایسه محتوای اسکوپولامین (mg g<sup>-1</sup> F. W) در ریشه گیاهچه‌های شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵  $p \leq$  می‌باشد).

در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار یافته با مانیتول تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان ژن *h6h* نسبت به سایر غلظت‌ها مشاهده شد و در غلظت ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش یافت (نمودار ۹). در ریشه گیاهچه‌ها نیز بیان ژن *h6h* در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌مولار افزایشی ناگهانی نشان داد (نمودار ۱۰). تحت تیمار مانیتول بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن *h6h* به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌مولار در ریشه و ۵۰ میلی‌مولار در اندام هوایی دیده شد.



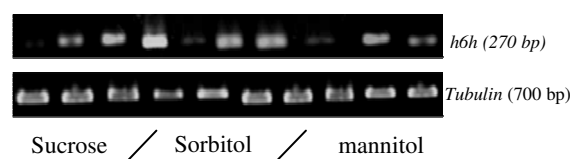
(الف)



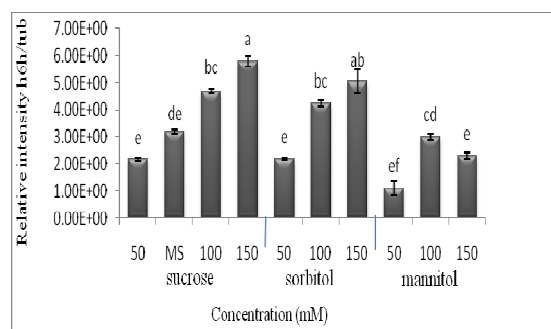
(ب)

**نمودار ۱۱** بررسی بیان ژن *h6h* در ریشه گیاهچه‌های شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، مانیتول و سوربیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0.05$  می‌باشد)، (الف) طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن *h6h* و توبولین به عنوان کنترل داخلی (ب) اندازه گیری مقدار کمی بیان ژن با استفاده از نرم افزار Image gage. S: سوربیتول، M: مانیتول.

در اندام هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با سوربیتول، افزایش معنی داری در بیان ژن *h6h* در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۹). بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن *h6h* به ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌مولار در اندام هوایی بود. در ریشه نیز در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش ناگهانی معنی داری نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۱۰).



(الف)



(ب)

**نمودار ۱۰** بررسی بیان ژن *h6h* در اندام هوایی گیاهچه‌های شایبک تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوکروز، مانیتول و سوربیتول (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $p \leq 0.05$  می‌باشد)، (الف) الگوی الکتروفورزی محصول PCR ژن *h6h* و توبولین به عنوان کنترل داخلی (ب) اندازه گیری مقدار کمی بیان ژن با استفاده از نرم افزار Image gage. S: سوربیتول، M: مانیتول.

## ۴- بحث

یافته‌های این بررسی درباره‌ی تأثیر تیمار با کربوهیدرات‌ها بر رشد گیاهچه‌ها با یافته‌های Rothe و Drager (۲۰۰۲) مطابقت داشت. آن‌ها طی مطالعات خود گزارش کردند که گلوکز، فروکتوز، سوربیتول یا هر اجتماعی با غلظت مولی مساوی (mixture equimolar) از این دو ترکیب، نمی‌تواند جایگزین سوکروز در افزایش رشد گیاهچه شاهبیزک شود. به نظر می‌رسد که سوکروز به‌عنوان ماده غذایی، سریع‌تر از سایر کربوهیدرات‌ها به‌سلول گیاهی جذب می‌شود [۱۰]؛ در ضمن در میان غلظت‌های مختلف سوکروز نیز غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر که به‌طور معمول در محیط پایه MS به‌کار می‌رود، غلظت بهینه برای رشد است. از آن‌جایی‌که این محیط در سال ۱۹۶۲ توسط Murashige و Skoog برای گیاه توتون از تیره سیب‌زمینی طراحی شد و گیاه شاهبیزک نیز از همین تیره است، به‌نظر می‌رسد به‌همین دلیل گیاه شاهبیزک نیز بیشترین رشد را در همان غلظت سوکروز تعیین شده به‌وسیله‌ی آن‌ها نشان داده باشد.

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر در زمینه تأثیر افزایش‌دهنده کربوهیدرات‌های سوربیتول، مانیتول و سوکروز، بر محتوای هیوسامین و اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های شاهبیزک مشابه یافته‌های Rothe و Drager در سال ۲۰۰۲ است که نشان دادند کربوهیدرات‌ها سبب افزایش تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه شاهبیزک می‌شود. قندهایی نظیر مانیتول و سوربیتول به‌طور معمول به‌عنوان اوسموتیکوم در محیط کشت به‌کار می‌روند، از طرفی تنش اسمزی سبب افزایش سنتز پوترسین می‌شود که یکی از پیش‌سازهای مسیر سنتز تروپان آلکالوئیدهاست. به‌نظر می‌رسد تنش اسمزی اعمال

شده به‌وسیله‌ی کربوهیدرات‌ها با تأثیر بر سنتز پوترسین سبب افزایش محتوای تروپان آلکالوئیدها شده است. مطالعات نشان داده است که کربوهیدرات‌ها نه تنها به‌عنوان منابع کربن، بلکه به‌عنوان مولکول‌های سیگنال در متابولیسم آلکالوئیدها مؤثرند [۱۰-۱۶]. براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، اثر افزایشی سوکروز بر محتوای اسکوپولامین بیشتر از سوربیتول و مانیتول بود. به نظر می‌رسد سوکروز علاوه بر این‌که به‌عنوان منبع کربن مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد، دارای نقشی ویژه به‌عنوان مولکول سیگنال در متابولیسم آلکالوئیدها است [۱۰].

در سال ۱۹۹۵، Mendoza و همکاران اظهار داشتند که بین تولید اسکوپولامین و فعالیت فتوسنتزی رابطه مستقیمی وجود دارد و در حقیقت تولید اسکوپولامین با افزایش سطح کلروفیل نسبت مستقیم دارد و می‌توان اینطور احتمال داد که فعالیت فتوسنتزی، فعال کننده مرحله‌ای از سنتز اسکوپولامین است که به‌وسیله زیمایه هیوسامین ۶- بتا هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود یا سرعت تخریب اسکوپولامین را مهار می‌کند [۱۷]. از آن‌جا که در مطالعه حاضر، نسبت کلروفیل a به b با افزایش غلظت کربوهیدرات‌ها افزایش یافت، بنابراین این احتمال نیز وجود دارد که کربوهیدرات‌ها با افزایش نسبت کلروفیل a به b و افزایش فعالیت فتوسنتزی، باعث افزایش اسکوپولامین شده باشند.

در گیاهان و بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، کربوهیدرات‌ها نه تنها به‌عنوان منابع کربن برای رشد مورد نیاز هستند، بلکه با تأثیر بر سیستم‌های حساس به کربوهیدرات، سبب تغییر در بیان برخی ژن‌ها می‌شوند. فراوانی یا کمبود کربوهیدرات‌ها می‌تواند سبب افزایش یا کاهش بیان ژن در گیاهان شود [۱۸]. در مطالعه حاضر،

## ۵- مراجع

- بیان ژن *h6h* با افزایش غلظت کربوهیدرات‌ها افزایش یافت. این نتایج پیشنهاد می‌کند که تأثیر کربوهیدرات‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنال در متابولیسم آلکالوئیدها، احتمالاً از طریق تغییر میزان بیان ژن‌ها است [۱۰]. از طرفی، اثر تحریکی سوربیتول، مانیتول و سوکروز بر ژن *h6h* و افزایش بیان این ژن تا حدود زیادی با الگوی تولید اسکوپولامین مشابه است به‌طوری‌که در اندام هوایی و ریشه در هر غلظتی که میزان بیان ژن *h6h* کاهش یافته است محتوای اسکوپولامین نیز به همان نسبت کم شده و در هر غلظتی که میزان بیان ژن *h6h* افزایش یافته است محتوای اسکوپولامین نیز به همان نسبت سیر افزایشی داشته است به گونه‌ای که بیشترین میزان بیان ژن *h6h* و بیشترین محتوای اسکوپولامین در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار در اندام هوایی گیاهچه‌های تحت تیمار سوکروز مشاهده شد. آنچه از نتایج ما به دست آمد حاکی از آن است که ارتباط مستقیمی بین میزان بیان ژن *h6h* و تولید اسکوپولامین وجود دارد؛ بنابراین می‌توان احتمال داد که تنظیم‌های در سطح بیان، در فعالیت آنزیم *H6H* نقش بیشتری نسبت به سایر تنظیمات دارند. همچنین می‌توان از این ژن به‌عنوان عاملی کلیدی و تنظیم‌کننده‌ای مهم در تولید تروپان‌آلکالوئید اسکوپولامین نام برد. بر این اساس برای مشخص شدن چگونگی تنظیم مقدار تروپان‌آلکالوئیدهای نهایی و به‌ویژه اسکوپولامین به تحقیقات بیشتری از جمله بررسی آنزیم‌های پوترسین-N-متیل ترانسفراز (PMT) و تروپینون ردوکتاز (TRI و TRII) و بیان ژن آن‌ها نیز نیاز است. همچنین روش‌های مولکولی، مهندسی ژنتیک، بیوتکنولوژی و بیوشیمی کمک شایانی برای کشف مسیرهای انتقال پیام کربوهیدرات‌ها در فعال‌سازی متابولیسم آلکالوئیدها خواهد کرد.
- [1] Kang, S., Jung, H., Kang, Y., Yun, D., Bahk, J., Yang, J., Choi, M. (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: 745-751.
- [2] Kai, G., Chen, J., Li, I., Zhou, G., Zhou, L., Zhang, L., Chen, Y., Zhao, L., (2007) Molecular cloning and characterization of a New cDNA encoding hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase from Roots of *Anisodus acutangulus*; *Biochemistry and Molecular Biology* 40: 715-722.
- [3] Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G. and Yamada, Y. (1992) Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *hyoscyamus niger*; *Plant Physiology* 100: 836-845.
- [4] Hashimoto, T., Matsuda, J., Yamada, Y. (1993) Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 $\beta$  - hydroxylase; *FIBS* 329: 35-39.
- [5] Palazón, J., Moyano, E., Cusidó, R. M., Bonfill M., Oksman-Caldentey, K. -M., Piñol M. T. (2003) Alkaloid production

- [10] Rothe, G., Drager B. (2002) tropan alkaloids- metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*; Plant science 163: 979-985.
- [11] Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L., Mirjalili. M. H. (2008) Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. *Molecules*, 13: 1722-1742.
- [12] Zabetakis I., Edwards R., Hagan O. (1999) Elicitation of tropan alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*; *phytochemistry*, 50: 53-56.
- [13] Matsuda J., Hashimoto T., Yamada Y. (1997) Analysis Of Active site Residues In Hyoscyamine 6P-HydroXylase; *Plant Biotechnology* 14: 51-57.
- [14] Murashige T., and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures; *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- [15] Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*; *Plant Physiology*. 24: 1-15.
- [16] Flores H. E. and Galston A. W. (1982) Polyamines and plant stress: activation of in *Duboisia hybrid* hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene; *Plant Science* 165: 1289–1295.
- [6] El Jaber-Vazdekis N., Gonzalez C., Ravelo A. G, Zarate R. (2008) Cloning, characterization and analysis of expression profiles of a cDNA encoding a hyoscyamine 6b-hydroxylase (H6H) from *Atropa baetica* Willk. ; *Plant Physiology and Biochemistry*. 1–6.
- [7] Zhang L., Ding R., Chai Y., Bonfill M., Moyano E., Oksman-Caldentey K. M., Xu T., Pi Y. ., Wang Z. ., Zhang H. ., Kai G. ., Liao Z. ., Sun X., and Tang K. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures; *PNAS* 101: 6786–6791.
- [8] Zárate, R., El Jaber-Vazdekis, N., Medina, B., Ravelo, A. G. (2006) Tailoring tropane alkaloid accumulation in transgenic hairy roots of *Atropa baetica* by over-expressing the gene encoding hyoscyamine 6b-hydroxylase; *Biotechnology Letters* 28:1271–1277.
- [9] Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1991) Molecular cloning of hyoscyamine 6B-Hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *hyoscyamus niger*; *Biological Chemistry* 266: 9460-9464.

- [19] Roos R. W. and Lau-Cam C. (1986) General reversed-phase HPLC method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base; Journal of chromatography 370: 403-418.
- [20] Suzuki K., Yun D. J., Chen X. Y., Yamada Y. and Hashimoto T. (1999) An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6- $\beta$ hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers; Plant Mol. Biol. 40:141-152.
- putrescine biosynthesis by osmotic shock; Science 217: 1259-1261.
- [17] Mendoza M. I. E. and Vargas L. V. M. (1995) Establishment and characterization of photosynthetic hairy root cultures of *Datura stramonium*; Plant cell, Tissue and organ culture 40: 197-208.
- [18] Koch K. E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants; Plant Physiology; Plant Molecular Biology 47:509-40.