مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ۱۳۳-۱۲۷

ارزیابی تغییرات نیکوتین در گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum* L.) جهش‌یافته با T-DNA

سمانه ستار[۱]، غلامرضا اصغری[۱]، علی‌اکبر احسانپور[۲*]، فریبا امینی[۳]

۱- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی
۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
۳- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۶

چکیده

هدف: گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) حاوی مقدار زیادی آلکالوئید نیکوتین است که برای سلامتی انسان مضر است. دستورزی‌های ژنتیکی از جمله انتقال ژن‌های مسدود کننده مسیر بیوسنتز نیکوتین، القاء موتاسیون، ایجاد تغییرات سوماکلونال و انتقال T-DNA به منظور القاء تغییرات مناسب ژنتیکی برای کاهش بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر تولید نیکوتین می‌تواند موجب تغییر در میزان نیکوتین در این گیاه گردد، لذا این تحقیق با هدف بررسی تغییرات نیکوتین در گیاهان توتون جهش یافته با T-DNA طراحی و انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر گیاهان جهش یافته K4 حاوی (T-DNA)، گیاهان حاوی Ri-TDNA، گیاهان باززائی شده از برگ و گیاهان طبیعی روی محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین تکثیر یافتند. سپس برگ‌های گیاهان جهش‌یافته و طبیعی جداگانه خشک و آسیاب شدند. عصاره استخراج شده توسط هگزان از بافت برگ، توسط TLC و GC از نظر کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: آنالیز عصاره‌های حاصله کاهش میزان نیکوتین در گیاه جهش‌یافته K_4 و افزایش آن را در گیاهان باززایی شده و جهش یافته Ri-TDNA نسبت به گیاهان طبیعی مادری نشان دادند.

نتیجه گیری: احتمالاً تغییر در میزان نیکوتین در گیاهان جهش‌یافته و باززائی شده به خاطر فعال‌سازی ژن‌های آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آلکالوئید نیکوتین در مورد گیاه جهش‌یافته حاوی Ri-TDNA و بالعکس خاموش شدن و یا کاهش بیان این ژن‌ها در گیاه جهش یافته K_4 (حاوی T-DNA) می باشند.

واژگان کلیدی: توتون، جهش یافته، نیکوتین

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در مورد اثرات فیزیولوژیکی و خواص سمی نیکوتین در انسان مطالعات نسبتا وسیعی صورت گرفته است و امروزه به طور قطع نیکوتین در ردیف سموم با اثرات بسیار مضر برای سلامتی انسان معرفی می‌گردد. مشخص شده که با ورود این ماده به بدن انسان اختلالات فیزیولوژیک شدید در بدن ایجاد شده و با مقادیر زیاد حتی می تواند موجب مرگ شود (۱). گزارشات نشان می‌دهند که در سطح جهانی از سال ۱۹۶۷ تا سال ۱۹۹۲ مصرف سیگارهای تولیدی بیش از دو برابر شده است یعنی از ۲/۸ تریلیون به ۵/۷ تریلیون (۵/۷ میلیون میلیون) عدد یعنی حدود ۲۵ درصد مصرف افزایش سرانه سیگار در همین دوره زمانی رسیده است. در کشورهای توسعه یافته نتایج افزایش مصرف سیگار که طی دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۷۰ گسترش یافت، اکنون دیده می شود. تقریباً ۲۰ درصد کل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته در سال ۱۹۹۰ ناشی از مصرف فرآورده‌های دخانیات بوده است. در گروه سنی ۶۹-۳۵ سال حدود ۳۵ درصد از مرگ‌ها در بین مردان و ۱۵ درصد در بین زنان به علت مصرف دخانیات گزارش شده است (۱). سازمان بهداشت جهانی برآورد کرده است که در دهه ۲۰۳۰-۲۰۲۰ دخانیات عامل مرگ ۱۰ میلیون نفر در سال خواهد بود که ۷۰ درصد از این تعداد در کشورهای در حال توسعه اتفاق خواهد افتاد (۲).

آلکالوئید اصلی گیاه توتون نیکوتین است (۳). نیکوتین آلکالوئیدی مایع، دارای حالت روغنی و بیرنگ است اما اگر در مجاورت هوا قرار بگیرد ابتدا زرد رنگ و سپس قهوه ای می‌گردد که ماده‌ای بسیار سمی است (۱). یکی از راه‌کارهای مهم برای کاهش خسارت‌های ناشی از نیکوتین به سلامت انسان این است که مقدار نیکوتین موجود در توتون کاهش یابد. این کار با توقف و یا کاهش بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز نیکوتین امکان‌پذیر است. بنابراین، با استفاده از سامانه انتقال ژن توسط باکتری آگروباکتریوم می‌توان ژن‌های خارجی را به گیاه وارد کرد و میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله نیکوتین را تغییر داد (۴، ۵، ۶).

در جریان انتقال ژن توسط این باکتری بخشی از پلاسمید Ti که T-DNA (T-DNA= Transferred DNA) نامیده می‌شود وارد سلول گیاه شده و سپس در ژنوم گیاه ادغام می‌گردد. T-DNA در سوش‌های وحشی (Wild type) آگروباکتریوم حاوی ژن‌های ایجاد کننده غده (gall) (ژن‌های مولد اکسین و سیتوکینین) و همچنین تولید کننده اسیدآمینه های تغییر یافته‌ای به نام Opines می‌باشد. اوپین توسط سلول‌های گیاهی تراریخت شده تولید می‌شود و منبع کربن و نیتروژن سلول‌های آگروباکتریوم محسوب می‌گردد (۵، ۶). باکتری با استفاده از گروهی از ژن‌ها به نام Vir genes به سلول گیاهی متصل و سپس یک نسخه از T-DNA خود را با مکانیزم مولکولی پیچیده و دقیق به هسته سلول گیاهی منتقل می کند. انتقال T-DNA بدون ژن‌های مولد غده به سلول گیاه می‌تواند در بیان ژن‌های موجود در گیاه تغییر ایجاد نموده به عنوان مثال موجب افزایش یا کاهش بیان و یا حتی روشن نمودن ژن‌های خاموش در سلول گیاه شود (۷، ۸).

تاکنون گزارشات زیادی در زمینه انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم به گیاه توتون منتشر شده است. به عنوان مثال، Alvarez و همکاران (۹) از ریشه های جهش‌یافته گیاه *N. tabacum* جهت تولید آنتی بادی 14D9 استفاده نمودند. در این آزمایش آنها تأثیر DMSO (Dimethyl sulfoxide)، PVP (Polyvinylpyrrolidone) و ژلاتین بر میزان تولید آنتی بادی را بررسی نمودند. Altosaar و همکاران (۱۰)فاکتور رشد وابسته به انسولین انسانی (hIGF-1) که یک پروتئین ضروری جهت رشد و تکامل جنین انسان می‌باشد را توسط توتون جهش یافته ایجاد نمودند.

پس از انتقال ژن به گیاه، اولین مرحله، بهینه‌سازی شرایط باززائی گیاه از قطعات جدا کشت گیاه می‌باشد. به عبارت دیگر تعریف سامانه باززائی برای یک گیاه از ضرورت‌های اولیه است. باززایی نشان دهنده توان یا ظرفیت توارثی یک سلول گیاهی منفرد برای ایجاد یک گیاه کامل است که به این پتانسیل پرتوانی اطلاق می‌شود (۱۱). تغییرات ژنتیکی مشاهده شده بین نسل‌های گیاهان جدید حاصل از کشت سلول های سوماتیک در شرایط آزمایشگاهی به عنوان تنوعات سوماکلونال تعریف می‌شود. این تنوع تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر از جمله تغییر در مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد که از یک طرف از مشکلات کشت بافت محسوب می‌شود و از طرف دیگر می تواند به عنوان یکی از روش‌های اصلاح نباتات به کار رود (۱۲). یکی از منابع القاء کننده تنوعات سوماکلونال، انتقال T-DNA به سلول گیاهی است. بنابراین گیاه جهش یافته حاوی T-DNA می‌تواند دستخوش این نوع دگرگونی ژنتیکی شود. با توجه به اهمیت حفظ سلامت جامعه و اثرات ناشی از نیکوتین، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات آلکالوئیدهای موجود در گیاهان توتون جهش یافته با T-DNA حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین و ژن بتا گلوکورونیداز به عنوان ژن‌های گزینش کننده و ژن‌های گزارشگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرگیاهان مورد استفاده در این پژوهش از گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. ابتدا بذر گیاهان جهش یافته لاین

www.SID.ir
Archive of SID

K4 (حاوی T-DNA)، Ri-TDNA و گیاهان باززایی شده از قطعات جدا کشت برگ و گیاهان غیر جهش یافته (شاهد) در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog) (۱۳) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در pH معادل ۵/۸ کشت گردیدند و گیاهان در اطاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۹۰ مول بر مترمربع ثانیه رشد داده شد و با فاصله هر ۴ هفته واکشت شدند.

استخراج آلکالوئیدها از گیاه: مقدار ۱۰ گرم برگ گیاهان تکثیر یافته در شرایط کشت در شیشه جدا شد و در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت خشک گردید و به صورت پودر در آمد. سپس یک گرم پودر از هر لاین گیاهی فوق به دقت توزین و با ۴۰ میلی‌لیتر محلول استخراج با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر (۱۰۰۰ میلی‌لیتر n-هگزان با ۰/۵ گرم هپتادکان به عنوان استاندارد داخلی)، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۸ نرمال عصاره‌گیری شد (۴). عصاره حاصل سریعاً با روش TLC (Thin layer chromatography) و GC (Gas chromatography) آنالیز شد.

تشخیص کیفی آلکالوئید نیکوتین با روش TLC: برای انجام TLC ازروش Wagner و همکاران (۱۴) با حلال حاوی آب، متانول، اتیل استات به ترتیب با نسبت ۵ : ۶/۲۵ : ۵۰ جهت تفکیک مطلوب نیکوتین استفاده شد. کاشتن لکه‌ها روی پلیت ۲ سانتی‌متر بالاتر از لبه و از دو طرف پلیت نیز با فاصله ۲ سانتی‌متر انجام شد. روی پلیت TLC حاوی سیلیکاژل 60F254 ۵ لکه مربوط به گیاه شاهد (غیر جهش یافته)، جهش یافته K4، جهش یافته Ri-TDNA، باززایی شده از هر کدام ۱۰ میکرولیتر با فواصل ۲ سانتی متر کاشته شدند و خط حرکت حلال نیز مشخص شد. پس از اتمام TLC و خشک شدن پلیت در هوای آزاد ابتدا معرف دراژندرف و بلافاصله بعد از آن معرف نیتریت سدیم روی پلیت اسپری شد. سپس در دستگاه UV اسپکتروفتومتری لکه ها در طول موج ۲۵۴ نانومتر شناسایی شدند (۵). این آزمایش در دو تکرار مجزا انجام گردید.

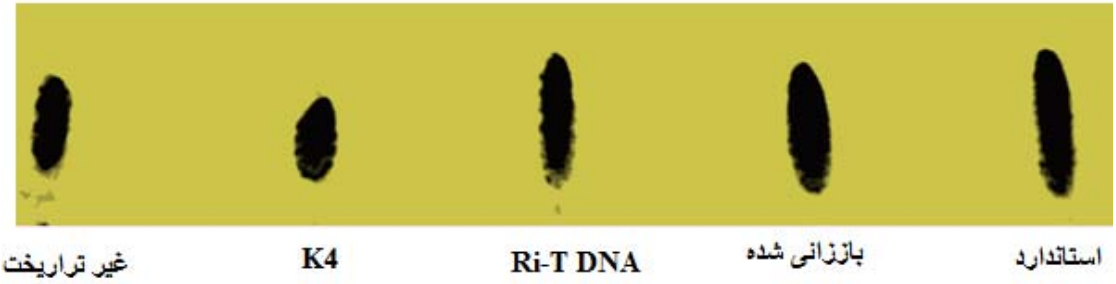
تشخیص کمی آلکالوئید نیکوتین با روش GC: برای آزمایش GC بر اساس روش Stamfil و همکاران (۱۵) ابتدا استوک نیکوتین با غلظت۴۸/. درصد در آب مقطر تهیه شد و۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استخراج و ۲۵ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۸ نرمال به آن افزوده شد و در دمای ۸-۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از این محلول به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵، ۳/۷۵، ۶/۲۵ و ۱۰ میلی‌لیتر به بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری به طور جداگانه انتقال داده شد و با محلول استخراج به حجم رسانده شد. به این ترتیب غلظت‌های ۰/۲۲۵، ۰/۴۵، ۰/۶۷۵، ۱/۱۲۵ و ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیکوتین تهیه شد (۴) سپس از این غلظت‌ها و همچنین عصاره حاصله از گیاهان جهش‌یافته و غیر جهش یافته هر کدام ۰/۵ میکرولیتر به طور جداگانه سه بار به دستگاه GC مدل (Hewlwtt Pakar 5890) تزریق شدند. شرایط دستگاه GC عبارت بودند از: ستون مورد استفاده OV1-capillary column، نوع دتکتورFID، دمای دتکتور ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، فاز متحرک (گاز حامل) N2 (نیتروژن)، Ramp Rate به ازای هر یک دقیقه ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش دما.

کلیه آزمایشات بر اساس طرح کامل تصادفی با حد اقل ۳ تکرار انجام گردید. میانگین داده های بدست آمده مورد آنالیز ANOVA قرار گرفت و میانگین ها بر اساس آزمون Tukey در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار Sigmastat version 2 مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج آنالیز TLC

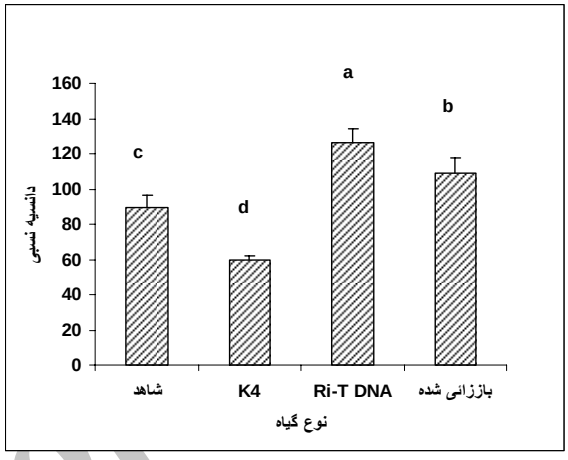
در TLC انجام شده لکه‌های با Rf (retention factor) دقیقا مشابه با Rf استاندارد نیکوتین مشاهده شد (Rf=0.1) که این لکه‌ها در نور UV،۲۵۴ نانومتر دیده شدند. هم چنین این لکه‌ها با معرف دراژندرف هم رنگ نارنجی ایجاد نمودند. بنابراین وجود نیکوتین در هر دو گیاهان جهش یافته و غیرجهش یافته توتون ثابت شد (شکل ۱).



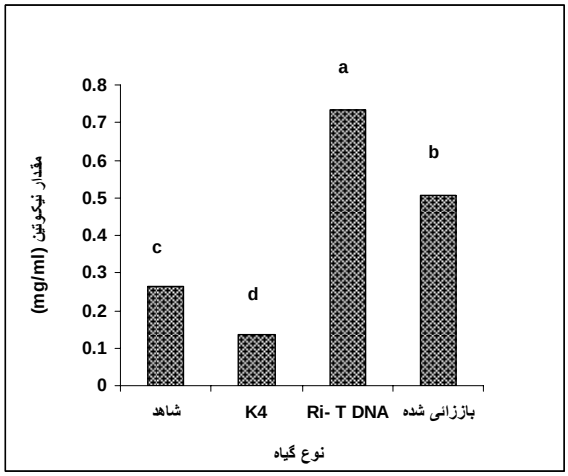
شکل۱: نتایج آنالیز TLC مربوط به میزان تراکم نسبی نیکوتین در نمونه استاندارد نیکوتین و گیاهان مختلف باززایی شده از برگ، جهش یافته حاوی Ri-TDNA ، K_4 (جهش یافته حاوی T-DNA)، گیاه غیر جهش یافته.

Archive of SID
www.SID.ir

با استفاده از لکه‌های حاصل از کروماتوگرافی (TLC) دانسیته نسبی لکه‌های حاوی نیکوتین در همه ی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار ImageJ Version 4 محاسبه شد و نمودار مربوط رسم گردید (شکل ۲). همانطور که در شکل ۳ مشخص است دانسیته نسبی نیکوتین در گیاه جهش یافته K4 نسبت به گیاه غیر جهش یافته به طور معنی‌داری کاهش یافته و در گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA و گیاهان باززایی شده به طور معنی‌داری افزایش نشان داد.



شکل۲: دانسیته نسبی نیکوتین در نتایج حاصل از آنالیز TLC . به ترتیب از راست: گیاهان باززایی شده از برگ، گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA ، K4 (گیاهان جهش یافته حاوی T-DNA)، شاهد (غیر جهش یافته). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده ها بر اساس تست Tukey می‌باشد ($P<0.05$).



شکل ۳: میزان آلکالوئید بر اساس آنالیز GC در گیاهان: به ترتیب از راست: گیاهان باززایی شده از برگ، گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA ، K4 (گیاهان جهش یافته حاوی T-DNA) ، گیاهان غیر جهش یافته. حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها بر اساس تست Tukey می باشد ($P<0.05$).

نتایج آنالیز GC

در بررسی آنالیز GC نمونه های استاندارد و عصاره‌های گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در مورد استانداردهای نیکوتین و نمونه‌های عصارهای گیاهی، قله مربوط به نیکوتین را به خوبی در طیف به دست آمده نشان داد. برای هر کدام از نمونه‌های استاندارد و عصاره‌های گیاهی سه تکرار انجام گرفت و میانگین گرفته شد و سپس نموداری براساس میانگین سطح زیر منحنی نیکوتین به استاندارد داخلی نسبت به غلظت نیکوتین رسم شد و از آنجا معادله‌ی خط به دست آمد. با استفاده از معادله خط به دست آمده و میانگین نسبت سطح زیر منحنی نیکوتین به استاندارد داخلی در عصاره‌های گیاهی غلظت نیکوتین در هر گیاه محاسبه گردید (شکل ۳). همانطور که شکل ۳ نشان می‌دهد مقدار نیکوتین در گیاه جهش یافته حاوی Ri-TDNA و گیاه باززایی شده نسبت به گیاه غیر جهش یافته افزایش معنی‌داری نشان داد ولی مقدار نیکوتین در گیاه جهش یافته K4 حاوی T-DNA نسبت به گیاه غیر جهش یافته به طور معنی‌داری کاهش یافت.

بحث

با توجه به اهمیت گیاه توتون از نظر مطالعات انتقال ژن و همچنین وجود نیکوتین در این گیاه (۸) در این تحقیق تغییر میزان آلکالوئید نیکوتین در گیاهان جهش‌یافته و غیر جهش یافته گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیزهای کمی آلکالوئیدها و همچنین بررسی دانسیته نسبی نیکوتین بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری بین غلظت نیکوتین در اندام هوایی لاین‌های مختلف مورد بررسی می‌باشد. گیاهان باززایی‌شده و جهش‌یافته Ri-TDNA افزایش معنی‌داری در میزان نیکوتین نسبت به گیاه جهش یافته K4 و گیاهان غیرجهش‌یافته نشان دادند. به عبارت دیگر الگوی تغییرات دانسیته نسبی و میزان واقعی نیکوتین اندازه گیری شده توسط GC کم و بیش الگوی یکسانی را نشان داد. نتایج کاهش شدید و یا افزایش معنی‌دار نیکوتین را به ترتیب در گیاهان جهش‌یافته K4 و Ri-TDNA نشان داد. این طور استنباط می شود که در گیاهان جهش‌یافته K4 حاوی T-DNA و جهش‌یافته حاوی Ri-TDNA انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی احتمالاً بر میزان تولید نیکوتین اثر گذاشته است. نوع، شدت و میزان این تأثیر به عوامل مختلفی وابسته است که از جمله آنها می‌توان به نوع ژن، اندازه DNA انتقالی، تعداد نسخه T-DNA ادغام شده درون ژنوم سلول‌های گیاهی و به محل ادغام این نسخه‌ها اشاره کرد (۷، ۱۱،۱۶،۱۷). در حال حاضر در حد یک فرض می‌توان گفت احتمالاً انتقال DNA به ژنوم گیاه تنباکو از طریق

Archive of SID

www.SID.ir

فعال‌سازی مسیر رونویسی ژن‌های آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آلکالوئید نیکوتین در مورد گیاه جهش‌یافته Ri-TDNA و یا بالعکس، خاموش نمودن این مسیر در لاین K4، حاوی- T DNA عمل نموده است (۱۵، ۱۸).

از آنجائیکه در لاین حاوی Ri-TDNA، ژن‌های Aux که مولد هورمون اکسین است نیز وجود دارد بنابراین انتقال Ri-TDNA به گیاه توتون و افزایش میزان آلکالوئید در گیاه جهش یافته حاوی این ژن را شاید بتوان به اثرات فیزیولوژیک اکسین نیز نسبت داد چون اکسین در سلول‌های گیاهی باعث افزایش سنتز DNA، پروتئین‌ها و RNA و خصوصاً rRNA می شود و این مجموعه موجب تغییر بیان ژن‌ها می‌گردند بنابراین می‌توان استنباط نمود که این تغییر احتمالا در میزان نیکوتین نیز موثر بوده است (۱۹). اگرچه در گزارش حاضر از انتقال T-DNA به گیاه توتون جهت القاء تغییرات میزان نیکوتین استفاده شده است ولی برخی پژوهشگران چنین تغییراتی را در میزان متابولیت‌های ثانویه با انتقال ژن‌های مسیر بیوسنتز این مواد گزارش نموده‌اند (۱۵،۲۰).

در رابطه با علت اختلاف معنی‌دار بین سطح آلکالوئید گیاهان باززایی‌شده و گیاه جهش‌یافته K4 نیز می‌توان به این مسئله اشاره کرد که احتمالاً وقوع تغییرات ژنتیکی سوماکلونال در گیاهان باززایی شده با تأثیر بر ژن‌های مسیر بیوسنتز نیکوتین و یا با تاثیر در سایر فرایندهای فیزیولوژیکی و کاتابولیسمی گیاه میزان تولید این آلکالوئید را تغییر داده است. تنوعات سوماکلونال نیز ممکن است منجربه تغییر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها از جمله نیکوتین شود که این تغییرات به صورت تصادفی رخ می‌دهد و ممکن است باعث افزایش یا کاهش تولید یک یا چند آلکالوئید شود. نظیر چنین تغییراتی قبلا در سوسپانسیون سلولی گیاه یونجه نیز گزارش شده است به طوری که تنوعات سوماکلونال باعث افزایش میزان مقاومت به شوری در سوسپانسیون سلولی یونجه شده است که این کار با تغییر در بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پرولین صورت گرفته است (۱۲).

نتیجه گیری

قابل ذکر است که تاکنون در زمینه القاء جهش با استفاده از T-DNA به منظور تغییر میزان نیکوتین گزارشی در منابع علمی ارائه نشده است. بنابراین اولین سئوال این است که آیا اساسا چنین روشی می‌تواند در این تغییر موثر باشد؟ به همین منظور به عنوان یک کار مقدماتی و به منظور صرفه جوئی در وقت صرفا تعداد معدودی از لاین‌های جهش‌یافته که قبلا از نظر برخی از صفات مورفولوژیکی از جمله افزایش تعداد کرک برگ و تفاوت در الگوی رشد مطالعه شده بودند (داده‌های این مطالعه هنوز منتشر نشده است)، انتخاب شدند بدیهی است برای توسعه دانش در این زمینه در آینده تعداد نسبتا بیشتری از لاین‌های جهش یافته ارزیابی خواهد شد. در مجموع با توجه به وجود اطلاعات کم پیرامون اثرات ناشی از انتقال T-DNA مولد اکسین بر روی میزان آلکالوئیدهای گیاه توتون می توان به عنوان یک پیشنهاد اولیه برای بیان نحوه تأثیر انتقال ژن بر بیوسنتز آلکالوئیدها و ایجاد اختلاف معنی‌دار بین سطوح آلکالوئید در بین گیاهان مورد بررسی به این مورد اشاره نمود که اختلاف در میزان سنتز نیکوتین و انتقال آن به بخش هوایی در بین گیاهان مورد بررسی می‌تواند تا حدی علت بروز اختلاف سطح آلکالوئید را توجیه نماید (۱۱).

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Sabor ordobadi, A. [Cigaret and healty]. 1th Ed. Iran: Hoda company; 1366; 13-23. Persian.

2. Khaje daloei, M, Molavi nojomi, M. [Methods of control and checking of smoking]. 1th Ed. Iran: Seda company; 2003; 23-25. Persian.

3. Afsharipour, s. [Pharmacogenosy]. 1th Ed. Iran: University of Medical Science of Isfahan company; 2007. Persian.

4. Micheal T, Madigan J, John M, Parker J. Brock biology of micro oganisms prentice Hall International, Ine. Eight edition. UK; 1997.

5. Oietz A, Arndt N, Kay V, Bode J. Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in petunia. Transgenic Research. 2003; 12(1): 83-99.

6. Toth S. Scott P, Sorvari S, Toldi O. Effective and reproducible protocols for *in vitro* culturing plant regeneration of the physiological model plant Ramonda myconi L. Plant Science. 2004; 12: 1027-1034.

7. Birch RG. Plant transformation. Problem and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. 1997; 48: 297-326.

8. Carl NMD. Rapid flowering Nicotiana tabacum L. Sex plant reproduction. 1999; 12: 123-124.

9. Alvarez MA, Giulietti AM, Martinez C, Petruccelli S. Expression of the antibody 14D9 in Nicotiana tabacum hairy roots. Electronic Journal of Biotechnology. 2005; 717-725.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Altosaar I, Belbaraka L, Belgoudi Y, Cheng X, Panahi M, Zaman A. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial E. coli fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants. Transgenic Research. 2004; 13: 245-256.

11. Hille J, Wullems G, Schilperoot RA. Non oncogenenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefacinces* to transfer T-DNA into plant cells. Plant Molecular Biology. 1983; 2: 155-163.

12. Ehsanpour, AA, Amini, F.[Plant cell and tissue culture]. 2th Ed. Jahad University, Isfahan branch; 2003; 127-181. Persian.

13. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962; 15: 473-497.

14. Wagner H, Bladt S, Zaginski EM. Plant drug analysis . Translated by Scott. Berlin. Springler-Verlog. 1984; 86.

15. Stanfil SB, Jia LT, Ashley DJ, Watson CH. Rapid and chemically selective nicotin quantification in smokeless tobacco products using GC/MS. Journal Chromatography Science. 2009; 47: 902-909.

16. Zupan JR, Zambryski PC. Trabsfer of T-DNA from *Agrobacterum* to the plant cells. Plant Physiology. 1995; 107: 1041-1047.

17. Canel C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S, Vander Fits L, Pasquali G, Vander Heijden R, Hoge JH, Verpoorte R. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarbonylase on alkaloid production by cell cultures of Catharanthus roseus. Planta. 1998; 205: 414-419.

18. Kuhelmeier C, Green PJ, Chua NH. Regulation of gene expression in higher plants. Plant Physiology. 1997; 38: 57-221.

19. Stanfill SB, Jia LT, Ashley DJ, Watson CH. Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC-MS. J Chromatogr Sci. 2009; 47(10): 902-909.

20. Altosaar I, Belbaraka L, Belgoudi Y, Cheng X, Panahi M, Zaman A. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants. Transgenic Research. 2004; 13: 245-256.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Summer 2011; 2(2): 127-133

Evalution of Nicotine Changes in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants Mutated by T-DNA

Sattar S[1], Asghari GHR[1], Ehsanpour AA[2*], Amini F [3]

1. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Medical Science of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Univresity of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science, Arak Univresity, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: ehsanpou@yahoo.com

Received: 4 Jul. 2011 Accepted: 27 Nov. 2011

Abstract

Aim: *Nicotiana tabacum* contains nicotine, Which is used in cigarettes causing many health problems. Application of new technologies such as, plant tissue culture, genetic engineering in order to block the pathway of nicotin biosynthesis, and somaclinal variation can be used as tools to produce plants with a lower level of nicotin. The aim of this research is to evaluate nicotine changes in tobacco plants mutated by T-DNA.

Material and methods: In this research transgenic plants including K4 carrying T DNA, plants carring Ri TDNA and regenerated plants from leaf and wild type plants (mother plants) were grown on MS medium containing canamycin. Leaves were harvested and dried, and extracted with hexan as internal standard. Then analysed using TLC and GC.

Results: The analysis of the extracts showed that nicotine content decreased in line k4 (containing T-DNA) and increased in Ri-TDNA (plant containing Ri-TDNA) and regenerated plants compared to non mutated plants.

Conclusion: Variation of nicotine content in mutated plants might be related to the activation or inhibition of the key enzymes involved in nicotin biosynthesis pathway.

Keywords: Nicotine**,** Tobacco, Transgenic

Archive of SID

www.SID.ir