مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره اول، (پیاپی۳) بهار ۱۳۸۹، صفحه ۷۶-۶۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۱۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۸/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۱/۲۲

بررسی مقایسه‌ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین تراریخت و گیاهچه‌های شابیزک (*Atropa belladonna* L.) تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید

نجمه احمدیان چاشمی، مظفر شریفی [۱]*، فرح کریمی [۲]، حسن رهنما [۳]
[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۳] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، تهران، ایران

چکیده

اغلب گیاهان خانواده سیب‌زمینی دارای آلکالوئیدهای مهم زیستی، از جمله نیکوتین و تروپان آلکالوئیدهایی، مانند هیوسیامین (آتروپین) و اسکوپولامین هستند. این آلکالوئیدها کاربردهای وسیعی در تهیه داروهای مهم و مصرف جهانی گسترده‌ای دارند. شابیزک (*Atropa belladonna*) گیاهی دارویی، علفی از این خانواده است که مقدار زیادی از تروپان آلکالوئیدها را در ریشه خود تولید می‌کند. در این پژوهش، با استفاده از قطعات جداکشت حاصل از دانه‌رست‌های شابیزک مربوط به دو جمعیت واز و گرمستان استان مازندران، در محیط کشت MS تغییریافته، تعداد زیادی گیاهچه نوپدید یکسان تکثیر شدند. این گیاهچه‌ها در محیط MS جامد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید شامل ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و۱ میلی‌مولار، به مدت چهار هفته، کشت داده شدند. از طرفی دیگر نیز ریشه‌های مویین تراریخت تولید شده توسط آگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) نیز تکثیر و تحت تأثیر غلظت‌های ذکر شده از سالیسیلیک‌اسید قرار داده شدند. سپس آتروپین و اسکوپولامین تولید شده در ریشه و اندام هوایی گیاهان نوپدید و ریشه‌های مویین تراریخت، به وسیله HPLC سنجش و مقایسه شد. به طور کلی، مقدار آلکالوئیدهای حاصل از ریشه‌های مویین بیشتر از اندام‌های گیاهچه‌های مورد مطالعه بود. از طرفی، مقدار آلکالوئیدها در ریشه گیاهچه‌ها از بخش هوایی بالاتر بود. همچنین، در ریشه‌های مویینه نسبت آتروپین به اسکوپولامین بیشتر بود، در حالی که در گیاهچه‌ها نسبت اسکوپولامین به آتروپین بیشتر بود. در مجموع؛ استفاده از ریشه‌های مویین و کشت آنها به جای گیاهان، به منظور مطالعات بیشتر و تولید این ترکیبات مهم در مقیاس وسیع قابل توجه است.

واژه‌های کلیدی: تروپان آلکالوئید، ریشه مویین، سالیسیلیک‌اسید، شابیزک (*Atropa belladonna*)

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: msharifi@modares.ac.ir، شماره تماس: ۸۲۸۸۴۴۴۵-۰۲۱

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آلکالوئیدهای گیاهی، یکی از بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و صنعتی هستند که در بسیاری از گیاهان بررسی شده‌اند. تعدادی از گیاهان خانواده سیب‌زمینی، از جمله شابیزک (*Atropa belladonna*)، تاتوره (*Datura stramonium*)، بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) و مهرگیاه (*Mandragora officinarum*) | در ایران به حالت خودرو می‌رویند و به دلیل داشتن آلکالوئیدهای باارزش دارای خاصیت دارویی هستند (زرگری، ۱۳۷۵).

شابیزک یکی از گیاهان این خانواده، از قدیم در طب سنتی مورد توجه بوده است و این ویژگی به آلکالوئیدهای موجود در آن مربوط می‌شود. این گیاه دارای یک درصد آلکالوئیدهای مشتق از تروپان (هیوسیامین و اسکوپولامین)، آتروپیک اسید و بلادونین است (زمان، ۱۳۷۰). هیوسیامین، یکی از آلکالوئیدهای مهم این گیاه است که دارای اثر قوی آنتی‌کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک است و در درمان دردهای حاد شکمی به کار می‌رود (زرگری، ۱۳۷۵). آتروپین با فرمول C17H23NO3، فرم راسمیک هیوسیامین است که در طول استخراج ایجاد می‌شود (Hashimoto and Yamada, 1986; Tahara *et al.*, 1999; Miraldi *et al.*, 2001). اسکوپولامین نیز فرم ۶، ۷- اپوکسید هیوسیامین است (Hashimoto and Yamada, 1987; Matsuda *et al.*, 1991). هردو این ترکیبات بر سیستم عصبی پاراسمپاتیک تأثیر می‌گذارند (Zhang *et al.*, 2004)، اما تفاوت این دو ترکیب در تأثیر آنها بر سیستم عصبی مرکزی است و از آنجا که اسکوپولامین نسبت به آتروپین تأثیر بیشتری بر روی سیستم عصبی مرکزی دارد، تقاضا برای تولید این ترکیب بسیار بیشتر است (Rahman *et al.*, 2006).

یکی از روش‌هایی که امروزه در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت یا سلول گیاهی است. محققان با استفاده از این روش سعی کرده‌اند تا تولید متابولیت‌های با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. در کشت سلول و بافت، به ویژه در مراحل قبل از تمایز بافت‌ها و اندام‌ها، ممکن است میزان تشکیل برخی از متابولیت‌ها با گیاه کامل تفاوت داشته باشد و آنزیم‌هایی که مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها را در گیاه کنترل می‌کنند، در کشت سلول در مقایسه با گیاه فعالیت یکسانی نداشته باشند. از آنجایی که محل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ریشه است، دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان دارای آنها با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز، در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (Dechaux *et al.*, 2005).

استفاده از ریشه‌های مویینه تراریخت از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه در مقادیر بسیار بالاتر از کشت های سلولی و کشت گیاه مناسب‌تر معرفی شده است. در این نوع کشت‌ها می‌توان متابولیت‌های ثانویه بیشتری نسبت به ریشه طبیعی گیاه تولید نمود. این ویژگی با ثبات ژنتیکی و رشد سریع ریشه در محیط ساده فاقد هورمون، آنها را به طور خاصی برای مطالعات بیوشیمیایی مناسب می‌سازد (Alvarez *et al.*, 2000; Pinol *et al.*, 1999)؛ اما در بیشتر مواقع، تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش نیاز به تحریک تولید آنها است. از جمله اقداماتی که به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت درشیشه به کار می‌رود، استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی است. یک محرک ترکیبی است که نه

Archive of SID

www.SID.ir

تنها باعث تجمع فیتوالکسین‌ها در گیاهان می‌شود، بلکه هر نوع مسیر مربوط به پاسخ‌های دفاعی را نیز تحریک می‌کند که نتیجه آن سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (Kang *et al.*, 2004).

ترکیباتی مانند سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک اسید، ازجمله مولکول‌های مؤثر در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها هستند و به طور گسترده‌ای در این زمینه مطالعه شده‌اند. نقش سالیسیلک اسید در مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن‌ها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده است. اخیراً نقش آن به عنوان یک ترکیب علامت‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان پر رنگ‌تر شده و همچنین گزارش شده است که باعث افزایش تولید آلکالوئیدها در کشت‌های تعلیقی ریشه‌های تراریخته می‌شود (Alvarez *et al.*, 2000).

در این تحقیق، با توجه به مطالعات گذشته و درصد پایین جوانه‌زنی بذرهای شابیزک، چگونگی تولید تروپان آلکالوئیدها درگیاهچه‌های نوپدید که منشا بذر آنها از دو رویشگاه مختلف بود و همچنین ریشه‌های مویین که با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز سویه *AR15834* تهیه شد، مورد بررسی قرار گرفت. سپس اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های مختلف بر میزان تولید آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین، به طور جداگانه در بخش هوایی و ریشه گیاهچه‌های نوپدید و ریشه‌های مویین تراریخت مقایسه و ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه قطعات جداکشت شابیزک و اعمال تیمار در کشت در شیشه

ابتدا دو جمعیت از بذرهای شابیزک جمع‌آوری شده از دو منطقه واز و گرمستان واقع در مازندران (مختصات جغرافیایی به ترتیب: N:52°, 7′, E:36°, 20′ و N:53°, 9′, E:36°, 14′)، به مدت ۷۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی و در نهایت، چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون هورمون کشت و سپس در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۲/۶µmol $^{m-2\ s-1}$ و دمای اتاق رشد روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور شاخه افزایی، ابتدا از اندام هوایی دانه‌رست‌های حاصل قطعات یک سانتی‌متری دارای یک جوانه جدا و در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین (BA) وارد شدند. بدین صورت، تعداد کافی از اندام هوایی نوپدید به دست آمد. به منظور بررسی اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید بر تولید تروپان آلکالوئیدها، قطعات یکسان از اندام‌های هوایی، در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA (جهت ریشه‌دار شدن) و دارای غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید کشت شدند. برای هر یک از غلظت‌ها، ۵ تکرار به طور مستقل (شیشه‌های مخصوص کشت) در نظر گرفته شد و در هر تکرارسه قطعه با اندازه مساوی و دارای یک جوانه استفاده گردید. سپس به مدت چهار هفته در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرارداده شدند. بعد از چهار هفته، گیاهان برداشت شدند و طول اندام هوایی و ریشه‌ها، وزن تر آنها، میزان کلروفیل و آنتوسیانین اندازه‌گیری شد و اندام هوایی و ریشه‌ها به طور جداگانه برای سنجش آلکالوئید در فریزر نگهداری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر و اعمال تیمار بر ریشه‌های مویین تراریخت

در این مرحله، از لاین V۳ ریشه مویین که توسط آگروباکتریوم ریزوژنز سویه *AR15834* از قطعات برگی شابیزک مربوط به منطقه واز تهیه گردیده و تراریخت بودن آن به دو روش هیستوشیمیایی و مولکولی به اثبات رسیده بود، جهت مطالعه تولید تروپان آلکالوئیدها و تغییرات آنها توسط تیمار سالیسیلیک‌اسید استفاده شد (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۶). جهت اعمال تیمار، مقادیر هموزن از ریشه‌های مویین (۴ گرم) وارد محیط‌های کشت مایع MS بدون هورمون و حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید شدند. سپس روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از دو هفته، ریشه‌ها توسط آب مقطر (۴ درجه سانتی‌گراد) و پمپ خلأ شستشو و به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر میزان رشد آنها، وزن شدند و برای انجام مراحل بعدی در فریزر نگهداری شدند. ریشه‌های تراریخت با ریشه‌های طبیعی گیاهچه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

سنجش کلروفیل برگ

کلروفیل برگ گیاهچه‌های نوپدید با منشا واز و گرمستان، به روش Arnon سنجش شد (Arnon, 1949). میزان کلروفیل a و b نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

کلروفیل a = $[12.7(D_{663}) - 2.6(D_{645})]\ V/100W$

کلروفیل b = $[22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})]\ V/100W$

(D: میزان جذب نور، V: حجم عصاره و W: وزن نمونه تر)

سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش آنتوسیانین کل، ۰/۲ گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها با ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و کلریدریک‌اسید به نسبت ۱:۹۹ عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت یک شب، در تاریکی، در یخچال قرار داده شد. میزان جذب این توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی ($E= 33000\ mol/cm^2$) استفاده گردید (Krizek *et al.*, 1998).

استخراج آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئید از اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های مویین، به طور جداگانه، انجام شد (Dashek, 1997; Lucio *et al.*, 1997): ۱/۵ گرم از بافت گیاهی با ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد سائیده و به مدت ۱۵ ساعت رفلاکس (تقطیر برگشتی) شد. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی (واتمن ۱) صاف و توسط دستگاه Rotary evaporator خشک شد. به بقایای عصاره خشک شده، ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط حاصل از مقادیر مساوی از سولفوریک اسید ۵ درصد (V/V) و دی‌اتیل‌اتر اضافه شد. فاز آبی جمع و pH آن به وسیله سود ۱۰ نرمال تا حدود ۱۰ بالا برده شد. به محلول حاصل ۶۰ میلی‌لیتر کلروفرم در سه مرحله اضافه شد و فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئیدها توسط دستگاه Rotary evaporator خشک و باقیمانده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش آلکالوئیدها به وسیله HPLC

عصاره آلکالوئیدی به روش Roos و Lau-Cam (۱۹۸۶) به وسیله دستگاه HPLC مدل Philips با Pu 41110; UV/ Vis detector و ستون S5ODS1-8961 (C18: 250mm - 4 mm) مورد سنجش قرار گرفت. طول موج دستگاه روی ۲۳۰nm= λ تنظیم شد، سرعت جریان حلال نیز ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی آب، متانول، استیک‌اسید و تری‌اتیل‌آمین (۸۳: ۱۵: ۱/۵: ۰/۵ درصد) بود. میزان دو آلکالوئید آتروپین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده (شکل ۵) با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه گردید. منحنی استاندارد نیز براساس سطح زیر منحنی دو ترکیب استاندارد، آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید، در سه غلظت ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و آزمون دانکن جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$ انجام شد.

نتایج

اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید بر رشد گیاهچه‌ها

افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید تا یک میلی‌مولار، به طور معنی‌دار موجب کاهش طول و وزن تر اندام هوایی هر دو گروه گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان گردید ($p<۰/۰۵$). طول و وزن تر ریشه نیز در هر دو گروه واز و گرمستان با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید کاهش یافت و حتی در بالاترین غلظت سالیسیلیک‌اسید (۱ میلی‌مولار) میزان ریشه بسیار ناچیز بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه طول و وزن تر اندام هوایی و ریشه، کلروفیل a و b و آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید (حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq۰/۰۵$ است).

گیاه	سالیسیلیک‌اسید (mM)	اندام هوایی		ریشه		کلروفیل (mg g^{-1} FW)		آنتوسیانین
		طول (cm)	وزن تر (g)	طول (cm)	وزن تر (g)	کلروفیل a	کلروفیل b	mmol g^{-1} FW
واز	۰	ab۲/۶۹۸	a۰/۲۷۵۸	a۶/۹۹۸	a۰/۲۲۳۶	d۰/۴۵۵	c۰/۱۵۲	c۰/۰۷
	۰/۰۱	b۱/۸۹۸	abc۰/۱۹۵۸	a۷/۰۶۴	b۰/۱۵۷۶	c۰/۷۳۱	bc۰/۲۶۰	bc۰/۰۸
	۰/۱	bcd۱/۷۷۰	ab۰/۲۵۵۲	b۵/۶۱۴	c۰/۰۵۱۸	cd۰/۵۶۷	bc۰/۲۱۵	bc۰/۰۸
	۱	cd۰/۹۷۶۰	c۰/۰۳۲۴	d۰	d۰	–	–	–
گرمستان	۰	a۳/۴۴۴	a۰/۲۸۴۴	a۶/۷۳۰	b۰/۱۴۹۸	bc۰/۷۸۶	ab۰/۳۰۹	a۰/۱۱
	۰/۰۱	b۲/۱۱۲	abc۰/۲۱۹۸	a۶/۹۶۴	b۰/۱۵۲۲	a۱/۱۵۵	a۰/۴۰۷	ab۰/۱۰
	۰/۱	bc۱/۸۱۰	bc۰/۰۷۴۴	c۲/۰۹۸	d۰/۰۱۱	ab۱/۰۲۴	a۰/۳۸۲	a۰/۱۱
	۱	d۰/۸۹۰۰	c۰/۰۳۳۸	d۰	d۰	–	–	–

Archive of SID

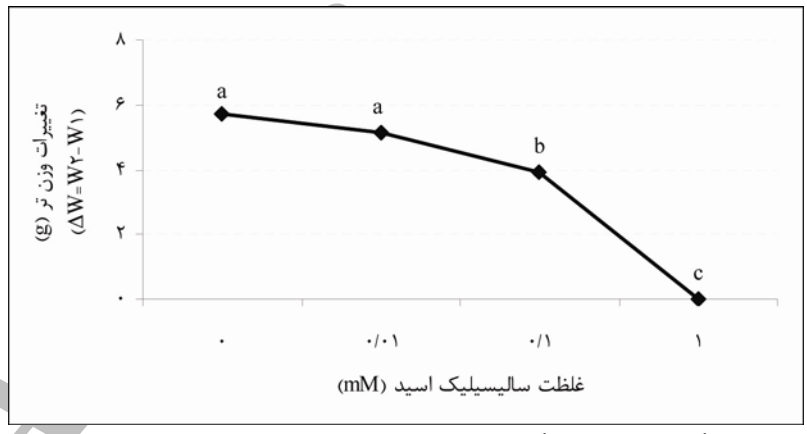
www.SID.ir

اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر میزان کلروفیل a و b و آنتوسیانین گیاهچه‌ها

در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید مقدار کلروفیل a نسبت به شاهد در هر دو گروه افزایش معنی‌دار داشت، اما با افزایش سالیسیلیک‌اسید به ۰/۱ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری در مقدار کلروفیل مشاهده نشد. میزان کلروفیل a بین گیاهچه‌های واز و گرمستان نیز اختلاف معنی‌دار داشت و در گیاهان گرمستان در تمام سطوح سالیسیلیک‌اسید نسبت به گیاهان واز بیشتر بود. مقدار کلروفیل b در بین تیمارهای سالیسیلیک‌اسید اختلاف معنی‌داری نشان نداده، اما سطح آن مشابه کلروفیل a در گروه گرمستان بالاتر از واز بوده است. تیمارهای سالیسیلیک‌اسید اثر معنی‌داری بر مقدار آنتوسیانین کل گیاهان واز و گرمستان نداشته، اما به طور کلی مقدار آن در گیاهان گرمستان بیشتر از واز بوده است (جدول ۱).

اثر سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های مویین تراریخت

نتایج حاصل از مطالعه اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های مویین نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید رشد ریشه‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. ریشه‌ها در بالاترین غلظت سالیسیلیک‌اسید (۱ میلی‌مولار) نه تنها از خود رشد نشان ندادند، بلکه احتمالاً به دلیل تخریب بافتی رنگ آنها تیره شده و اغلب از وزن تر کمتری نسبت به وزن اولیه خود برخوردار بودند (شکل ۲).



شکل ۲- اثر سالیسیلیک‌اسید بر تغییرات وزن تر ریشه‌های مویین تراریخت
(حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است).

تولید آلکالوئید در ریشه‌های مویین و اندام‌های گیاهچه‌ها

نتایج بررسی آتروپین و اسکوپولامین تولید شده تحت اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید نشان داد که محتوای آتروپین ریشه‌های تراریخت با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۳)؛ به طوری که در حضور ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، مقدار آتروپین این ریشه‌ها به ۰/۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید. بیشترین مقدار اسکوپولامین ریشه‌های تراریخت در تیمار ۰/۰۱ سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد که ۰/۲۳ میلی‌گرم در گرم

Archive of SID

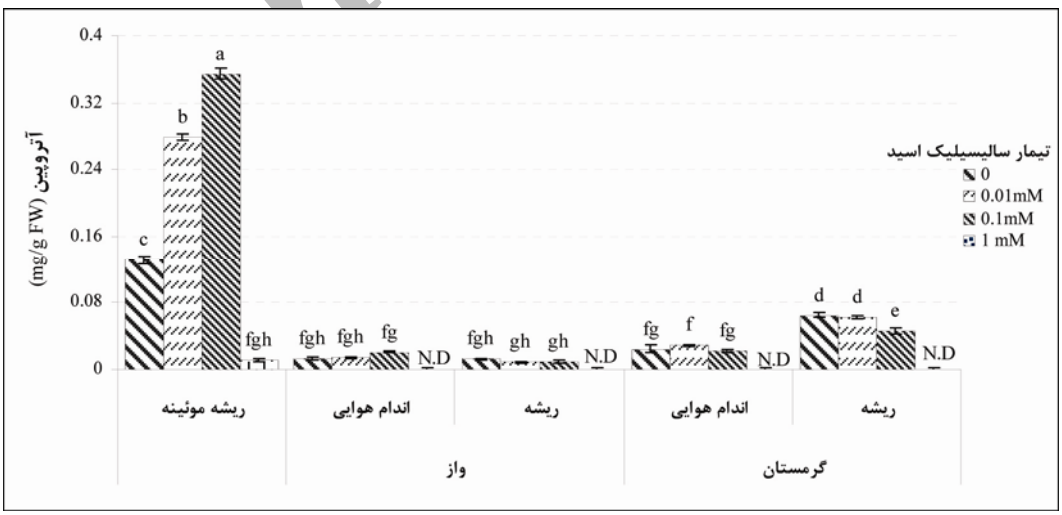
www.SID.ir

وزن تر بود و در تیمارهای بالاتر به شدت کاهش معنی‌دار نشان داد.

در اندام هوایی گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان و همچنین ریشه گیاهان واز اختلاف معنی‌داری در مقدار آتروپین تولید شده در تیمارهای مختلف سالیسیلیک‌اسید مشاهده نشد. بالاترین غلظت آتروپین در گیاهان، در ریشه‌های گیاهان گرمستان (۰/۰۶ میلی گرم در گرم وزن تر) مشاهده شد که در این ریشه‌ها مقدار آتروپین در غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین مقدار اسکوپولامین در بین دو گروه گیاهی در ریشه گیاهان گرمستان مشاهده شد که ۰/۰۹ میلی گرم در گرم وزن تر بود. بخش‌های هوایی این گیاهان تنها در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری در میزان اسکوپولامین تولید شده نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند. در اندازه‌گیری مقدار اسکوپولامین تولید شده در اندام هوایی و ریشه‌های گیاهان واز نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

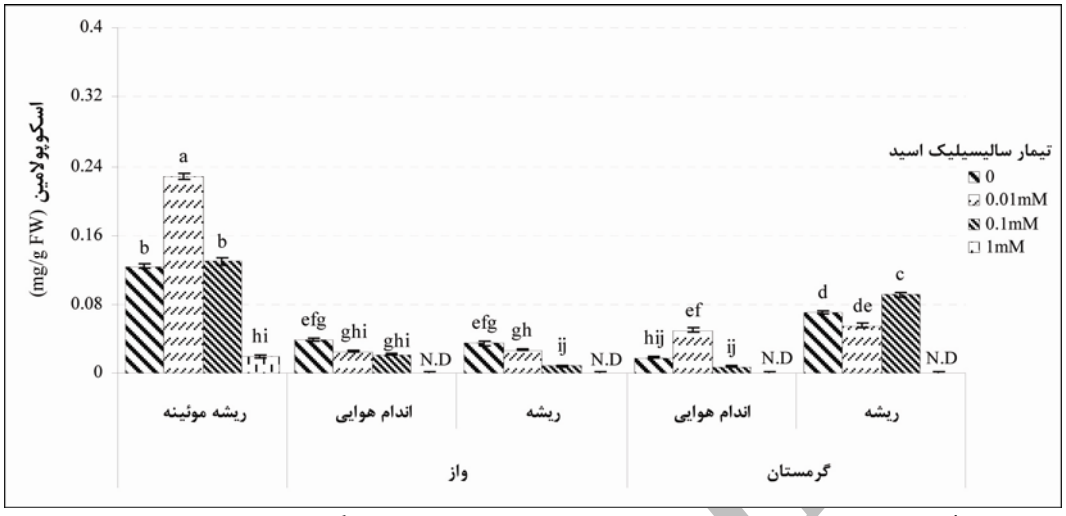
در بالاترین غلظت انتخابی سالیسیلیک‌اسید (۱ میلی‌مولار) به دلیل فقدان ریشه و عدم رشد مناسب گیاهچه‌ها امکان بررسی محتوای الکالوئیدی وجود نداشت.

به طور کلی، در حضور تیمارهای سالیسیلیک‌اسید، بیشترین مقدار آلکالوئیدها در ریشه‌های تراریخت و بعد از آن در ریشه‌های گیاهان جمعیت گرمستان مشاهده شد. مقدار آتروپین و اسکوپولامین موجود در ریشه‌های تراریخت به طور کاملاً معنی‌دار بیشتر از اندام‌های مختلف گیاهان بوده است که کمینه این اختلافات با گیاهچه‌های گرمستان و بیشینهٔ آن با گیاهچه‌های واز بوده است. از طرفی، نتایج نشان داد که در ریشه‌های تراریخت مقدار آتروپین بیشتر از اسکوپولامین بوده، در حالی که در اندامهای گیاهچه‌ها، سطح اسکوپولامین بالاتر از سطح آتروپین بوده است؛ اگر چه مقدار هریک از این آلکالوئید به تنهایی در ریشه‌های مویین چند برابر بالاتر ازگیاهچه‌ها بود (شکل‌های ۳ و ۴).

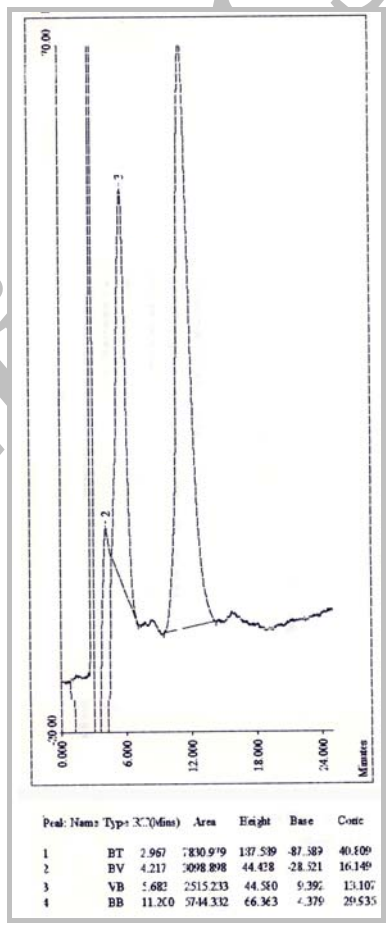


شکل ۳- تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید بر میزان آتروپین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های مویین تراریخت (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است). N.D: مقدار ناچیز.

www.SID.ir



شکل ۴- تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های مویین تراریخت (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq$۰/۰۵ است). N.D: مقدار ناچیز.



شکل ۵- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین حاصل از ریشه‌های مویین تراریخت در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (سطح زیر منحنی شماره ۳ مربوط به اسکوپولامین [RT -۵/۵±۰/۵ min] و شماره ۴ مربوط به آتروپین [RT-۱۱/۵±۰/۵ min] است). RT: Retention Time.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌های تراریخت

سالیسیلیک‌اسید به عنوان یک ملکول علامت‌رسانی در پاسخ‌های دفاعی گیاهان نقش دارد. استفاده از این اسید به عنوان محرک خارجی، بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی، از جمله ژن‌های مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها را افزایش می‌دهد (Wen *et al.*, 2005). در سال ۱۹۹۲، Manthe و همکاران گزارش دادند که رشد *Vicia faba* L. بعد از هفت روز تیمار با سالیسیلیک‌اسید حدود ۲۵ درصد کاهش می‌یابد. همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان داد، سالیسیلیک‌اسید تأثیر منفی بر رشد هر دو گروه گیاهچه‌ها و ریشه‌های موینه شابیزک داشت. گزارش‌های مختلفی وجود دارد مبنی بر اینکه سالیسیلیک‌اسید، افزایش تولید فیتوالکسین‌ها را در کشت سلول، بافت و ریشه‌های مویین باعث می‌شود (Lee *et al.*, 2001 and Alvarez *et al.*, 2000). سالیسیلیک‌اسید خارجی (در محیط) به عنوان یک سیگنال ملکول فعال‌کنندهٔ ژن‌های دفاعی است و همچنین به عنوان مهارکننده‌ای در بیوسنتز اتیلن است. بنابراین، سالیسیلیک‌اسید می‌تواند یا به طور مستقیم با مهار بیوسنتز اتیلن عمل کند و یا به طور غیر مستقیم با فعال کردن ژن‌های دفاعی منجر به القای تشکیل ترکیبات مختلف در گیاه گردد.

در ریشه‌های مویین تراریخت نیز با توجه به اینکه تأثیر سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش رشد آنها در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و توقف رشد آنها در ۱ میلی‌مولار شد، می‌توان بیان کرد که در غلظت بالای این ترکیب، به علت ایجاد تنش و نیز آسیب شدید بافت ریشه موجب ممانعت رشد و کاهش متابولیسم سلول شده است. در سال ۲۰۰۴ نیز Kang و همکاران گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید تأثیر منفی بر رشد ریشه‌های مویین *Scopolia parviflora* دارد. کاربرد خارجی غلظت‌های پایین سالیسیلیک‌اسید موجب افزایش رشد ریشه‌های موینه تراریخت گیاهانی مانند *Cataranthus roseus* شده است (Echevaria-Machado *et al.*, 2007) اثر متفاوت غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های مویین تراریخت می‌تواند به علت نقش آن در مسیر علامت‌رسانی سلولی باشد، زیرا سالیسیلیک‌اسید در غلظت پایین برای علامت‌رسانی سلول سودمند است، اما در غلظت بالا موجب اختلال در رشد می‌شود.

سنجش کلروفیل a و b و آنتوسیانین کل

در تحقیقی Moharekar و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اضافه کردن سالیسیلیک‌اسید خارجی به محیط باعث کاهش نسبت کلروفیل a به b و افزایش کاروتنوئیدها در دانه‌رست‌های گندم و لوبیا می‌شود. سالیسیلیک‌اسید به عنوان یک ترکیب علامت‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان و تولید فیتوالکسین‌ها عمل می‌کند (Alvarez *et al.*, 2000)، اما همان‌طور که در قسمت نتایج بیان شد، مقدار کلروفیل و آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید تفاوت چندانی را نشان نداد و حتی در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار نسبت کلروفیل a به b در مقایسه با شاهد افزایش یافت. نتایج تحقیقی که توسط Šesták و Ullmann در سال ۱۹۶۰ انجام شد، نشان داد که حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه در محیط کشت بر مقدار آنتوسیانین و کلروفیل گیاهان گندم و جو تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش مقدار آنتوسیانین و افزایش کلروفیل

Archive of SID

www.SID.ir

می‌گردد. تأثیر 2,4-D در کشت بافت *Oxalis dispar* نیز مشابه این نتایج را نشان داد (Sunderland, 1966). بنابراین، در تحقیق حاضر نیز احتمالاً وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت (از جمله اکسین) اثر کاهشی سالیسیلیک‌اسید بر مقدار کلروفیل و همچنین اثر افزایشی آن بر آنتوسیانین گیاه را از بین برده است.

مقایسه آلکالوئیدهای تولید شده در نمونه‌های مورد بررسی

همان‌طور که نتایج نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید مقدار آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت افزایش می‌یابد، اما این افزایش رابطه خطی نداشت و در غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید مقدار آلکالوئیدها به شدت کاهش پیدا می‌کند. نتایج Lee و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ نشان داد که در غلظت بالای سالیسیلیک‌اسید با وجود کاهش شدید رشد ریشه‌های مویین *Atropa belladonna*، مقدار زیادی اسکوپولامین و هیوسیامین در محیط کشت آزاد می‌شود. این نتیجه بیانگر آن است که غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید، رشد ریشه‌ها را مختل می‌کند، اما فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها همچنان ادامه دارد و این ترکیبات تولید و به محیط کشت ترشح می‌شوند. البته، این دانشمندان در غلظت‌های پائین سالیسیلیک‌اسید، تروپان آلکالوئیدها را در محیط‌کشت مشاهده نکردند. از طرفی، نتایج مطالعات Dhakulkar و همکاران در سال ۲۰۰۵ تولید میزان بالایی از متابولیت‌های ثانویه را در کشت ریشه‌های مویین *Datura innoxia* نسبت به کشت سلول، کالوس و گیاه نشان داد.

در تحقیق حاضر که بر مقایسه همزمان دو سیستم کشت گیاهچه نوپدید و ریشه‌های تراریخت متمرکز بود، ضمن تایید بالا بودن میزان تولید تروپان آلکالوئید در ریشه تراریخت شابیزک، مشخص شد که در شرایط یکسان میزان تولید در ریشه‌های تراریخت نسبت به ریشه طبیعی یا اندام هوایی بسیار بالاتر است. برخلاف ریشه‌های مویین که در آنها مقدار آتروپین بیشتر از اسکوپولامین بوده، در گیاهان سطح اسکوپولامین بالاتر از سطح آتروپین است، اما با وجود این، باز هم مقدار این آلکالوئید در ریشه‌های مویین بالاتر بوده است.

در سال ۱۹۹۵، Mendoza و Vargas با آزمایش‌های خود نشان دادند که بین تولید اسکوپولامین و فعالیت فتوسنتزی رابطه مستقیمی وجود دارد و در حقیقت، تولید اسکوپولامین با افزایش سطح کلروفیل (نسبت کلروفیل a به b) نسبت مستقیم دارد. از طرفی، احتمال می‌رود که فعالیت فتوسنتزی، مرحله‌ای از سنتز اسکوپولامین را که به وسیله آنزیم هیوسیامین ۶- بتا هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود، تحریک نموده، یا سرعت تخریب اسکوپولامین را کاهش می‌دهد.

همچنین Palazon و همکاران در تحقیقی بر روی *Duboisia* در سال ۲۰۰۳، موفق به به‌دست آوردن لاین‌هایی از این گیاه شدند که تولید بالایی از اسکوپولامین را نشان داد. آنها پیشنهاد کردند که افزایش فعالیت هیوسیامین ۶- بتا هیدروکسیلاز در این گیاهان ممکن است به تبدیل بیشتر هیوسیامین به اسکوپولامین منجر شود و احتمال دارد هیوسیامین یک تنظیم پس‌خوردی بر روی تجمع اسکوپولامین در گیاه داشته باشد که با افزایش آنزیم هیوسیامین۶- بتا هیدروکسیلاز و با تولید اسکوپولامین این مهار پس‌خوردی نیز برداشته شود. در حقیقت بین فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم یا آنزیم‌های مسؤول در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین با محتوای هیوسیامین همبستگی وجود دارد (Dechaux *et al.*, 2005; Palazon *et al.*, 2003).

بررسی اکولوژیک دو منطقه واز و گرمستان ازنظر رطوبت، بارندگی، بافت خاک، pH و عناصر موجود در خاک در مطالعات کریمی و همکاران (۱۳۸۳) نشان می‌دهد که این دو منطقه از نظر رطوبت، بارندگی و بافت خاک اندکی متفاوتند؛ به این صورت که از غرب به شرق رشته‌کوه‌های البرز از میزان بارندگی کاسته می‌شود و دمای محیط افزایش می‌یابد. بعضی از سازگاری‌هایی که این گیاهان با شرایط محیطی خود پیدا کردند، احتمال دارد به طور اکتسابی به نسل بعد منتقل شده باشد و در نسل‌های بعدی نیز ظاهر شود. در بررسی‌های ما نیز با وجود استفاده از کشت مشابه و شرایط یکسان، بروز این تفاوت‌ها در بذرهای دو جمعیت واز و گرمستان مشاهده شد، اما این که تفاوت‌ها تا چه زمانی باقی می‌مانند و چه زمانی این گیاهان نوپدید به شرایط یکسان محیط‌کشت بر می‌گردند، نامشخص است.

جمع‌بندی نهایی

استفاده از تیمار سالیسیلیک‌اسید افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها را سبب شد؛ به نحوی که بیشترین مقدار آتروپین در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار (۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های مویین و بیشترین مقدار اسکوپولامین نیز در ریشه‌های مویین تراریخت در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار به مقدار ۰/۲۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر بوده است. در بین گیاهچه‌ها نیز، گیاهچه‌های گرمستان از نظر تولید آلکالوئیدها بهتر از گیاهان واز بودند که بیشترین آتروپین تولید شده مربوط به ریشه این گیاهان در غلظت‌های پایین و بیشترین اسکوپولامین تولید شده نیز در ریشه‌های گیاهان گرمستان در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد. این نتایج ممکن است نشان‌دهنده تثبیت ژنتیکی صفاتی باشد که هر یک از این دو جمعیت در محیط طبیعی خود کسب نموده‌اند. با وجود این محتوای آلکالوئیدی اندام‌های مختلف گیاهان قابل قیاس با محتوای آلکالوئیدی ریشه‌های مویین نیست. بنابراین، سالیسیلیک‌اسید می‌تواند به عنوان تیماری مناسب برای سیستم‌های کشت ریشه‌های مویین و استخراج آلکالوئیدهای مورد نظر از آنها استفاده گردد.

منابع

احمدیان چاشمی، ن.، شریفی، م.، رهنما، ح. و کریمی، ف. (۱۳۸۶) بررسی تولید تروپان آلکالوئیدها از طریق کشت ریشه‌های تراریخته گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*) با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes*. دومین همایش ملی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، کرمان، ایران.

زرگری، ع. (۱۳۷۵) گیاهان دارویی. جلد ۳. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

زمان، س. (۱۳۷۰) گیاهان دارویی با روش کشت، برداشت، داشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. انتشارات ققنوس، تهران.

کریمی، ف.، زینالی، ا.، امینی اشکوری، ط. و نظری، ف. (۱۳۸۳) بررسی اکولوژیک و تعیین درصد مواد مؤثره گیاهان واجد اولویت‌های دارویی- اقتصادی (گیاه شابیزک، *Atropa belladonna*). جهاد دانشگاهی، واحد شهید بهشتی، تهران.

Archive of SID

www.SID.ir

belladonna to salicylic acid stress. Journal of Bioscience and Bioenginering 91(6): 586-589.

Lucio, D. R., Maria, E., Viana, C., Luiz, C., De Andrade, F., Marcello, B. and Giberto, B. (1997) Process for extraction and purification of alkaloid. United States Patent 5: 684-155.

Manthe, B., Schulz, M. and Schnabl, H. (1992) Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L. evidence for salicylic acid metabolization. Journal of Chemical Ecology 18: 1525-1539.

Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1991) Molecular cloning of hyoscyamine 6-β-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Journal of Biological Chemistry 266(15): 9460-9464.

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.

Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S. and Comparini, I. (2001) Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. Fitoterapia 72: 644-648.

Moharekar, S. T., Lokhande, S. D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A. and Chavan, P. D. (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. Photosynthetica 41(2): 315-317.

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

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

Pinol, M. T., Palazon, J., Cusido, M. R. and Ribo, M. (1999) Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. Plant Science 141: 41-49.

Rahman, L., Kitamura, Y., Yamaguchi, J., Mukai, M., Akiyamaa, K., Yamamoto, H., Muranaka, T. and Ikenaga, T. (2006) Exogenous plant H6H but not bacterial HCHL gene is expressed in *Duboisia leichhardtii* hairy roots and affects

Alvarez, P. S., Spollansky, T. C. and Giulietti A. M. (2000) The influence of different biotic and abiotic elisitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmensia candida*. Enzyme and Microbial Technology 26: 254-258.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Dashek, W. V. (1997) Methods in plants biochemistry and molecular biology. 185-189. CRC Press, Boca Raton.

Dechaux, C. and Boitel-Conti, M. (2005) A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. Acta biologica cracoviensia Series Botanica 47(1): 101-107.

Dhakulkar, S., Bhargava, S., Ganapathi, T. R. and Bapat, V. A. (2005) Induction of hairy roots in *Gmelina arborea Roxb*. using *Agrobacterium rhizogenes*. Founder's Day Special Issue: 100-106.

Echevarria-Machado, I., Escobedo-G. M., R. M. and Larque-Saavedra, A. (2007) Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. Plant Physiology and Biochemistry 45: 501-507.

Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1986) Hyoscyamine 6-β-hydroxylase, a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures. Plant Physiolgy 81: 619-625.

Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1987) Purification and characterization of hyoscyamine 6-β-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. European Journal of Biochemistry 164: 277-285.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K. and Choi, M. S. (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.

Krizek, D. T., Brita, S. J. and Miewcki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient level of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. Plant Physiology 103: 1-7.

Lee, K., Hirano, H., Yamakawa, T., Kodama, T., Igarashi, Y. and Shimomura, K. (2001) Responses of transformed root culture of *Atropa*

Archive of SID

www.SID.ir

(1999) Enantiomeric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. Journal of Chromatography A. 848: 465-47.

Wen, P., Chen, J., Kong, W., Pan, Q., Wan, S. and Huang, W. (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science 169: 928-934.

Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E. and Oksman caldentey, M. (2004) Engineering tropane biosynthtic pathway in *Hyoscyamus nigar* hairy root cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101 (17): 6786-6791.

tropane alkaloid production. Enzyme and Microbial Technology 39: 1183-1189.

Roos, R. W. and Lau-Cam, C. (1986) General reversed- phase HPLC method for the separation of drugs using triethyamine as a competing base. Journal of Chromatography 370: 403-418.

Šesták, Z. and Ullmann, J. (1960) Effect of gibberellic acid on the dynamics of chlorophyll synthesis in etiolated seedlings. Biologia Plantarum 2: 43-47.

Sunderland, N. (1966) Pigmented plant tissues in culture. I. Auxins and pigmentation in chlorophyllous tissue. Annals of Botany 30: 253-268.

Tahara, S., Okayama, A., Kitada, Y., Watanabe, T., Nakazawa, H., Kakehi, K. and Hisamatu, Y.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments

Najmeh Ahmadian Chashmi, [1*] Mozafar Sharifi, [2] Farah Karimi and [3] Hasan Rahnama

[1*] Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[3] Agricultural Biotechnology Research Institute, Seed and Plant Improvement Institute, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Most Solanaceae plants produce a range of biologically important alkaloids including nicotine and tropane alkaloids, such as hyoscyamine (atropine) and scopolamine. These alkaloids are used for their medicinal properties. *Atropa belladonna* is a medicinally important herbaceous plant that produces high amount of tropane alkaloids in roots. In this research, *Atropa belladonna* explants were obtained from sterilized seedlings in the modified Murashige and Skoog (MS) solid medium. The seeds were collected from Vaz and Garmestan regions of Mazandaran Province, Iran. Explants were cultured for four weeks on a modified MS solid medium, containing different concentrations of salicylic acid (0, 0.01, 0.1 and 1 mM). In addition, hairy roots of *Atropa belladonna* that was established by transformation with *Agrobacterium rhizogenes*, were cultured in MS medium for two weeks. Then the production of two tropane alkaloids, atropine and scopolamine, in different parts of neoformed plants were assayed by HPLC method. Generally, tropan alkaloids content in hairy roots was considerably higher compared to those contents in plants. Although Garmestan population was better than Vaz group, the amount of atropine in hairy roots was influenced by salicylic acid as high as 5 to 35 times of produced atropine in different parts of plants. The scopolamine content in the hairy roots was 2-30 times higher than in plant organs. In conclusion, it is suggested that, hairy root lines can be used as a replacement of plants in further studies and for tropane alkaloids production in economical and commercial scales.

Key words: Tropane alkaloids, Hairy roots, Salicylic acid, *Atropa belladonna*

* Corresponding Author: msharifi@modares.ac.ir

www.SID.ir