پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۲۰۲-۱۹۶)

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

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 نظرمی‌رسد از فن‌آوری 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 باززائی 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 باززائی 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

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 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

مولف مسئول: علی اکبر احسانپور– اصفهان: دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی E-mail: ehsanpou@yahoo.com
۱. گروه زیست شناسی، 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

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شود(۲). سلول‌های سوماتیکی گیاهان باززایی شده حاصل از کشت بافت، گاهی تغییرات ژنتیکی نشان می‌دهند. این تغییرات ژنتیکی منحصر به فردی را در اختیار اصلاح‌کننده گیاه برای استفاده در برنامه های اصلاحی قرار می‌دهد. از آن‌جایی‌که تغییرات در سلول‌هایی که دارای منشا سوماتیکی (بدنی) هستند رخ می‌دهد. این تغییرات تحت نام تغییرات سوماکلونال شناخته می‌شوند(۳). تعیین این نوع از تنوعات ژنتیکی از طریق روش‌های مولکولی، چشم انداز نوینی را برای بررسی تنوع زیستی فراهم آورده است(۵). نشانگرهایی که برای شناسائی این تغییرات استفاده می‌شوند عبارتند از RFLP, AFLP, SSR و RAPD. در بین نشانگرهای مختلف مولکولی از نشانگرهای RAPD برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی به کار می‌رود.

مهندسی ژنتیک می‌تواند وسیله‌ای مناسب برای افزایش آلکالوئیدها به‌وسیله روش‌هایی همچون بلوک کردن مسیرهای رقابتی، کاهش کاتابولیسم محصولات و غلبه بر مراحل محدودکننده سرعت باشد(۶). امکان انتقال T-DNA توسط Agrobacterium. tumefaciens حامل ژن‌های مارکر همچون ژن GUS و ژن مقاومت به کانامیسین (NPTII) به‌منظور 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 نسخه‌هایی از ژن است که در ژنوم گیاه ادغام می‌شود. به هر حال ادغام T-DNA با توجه به نوع و شدت اثری که بر ژنوم ایجاد می‌کند، می‌تواند با اثر بر مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه گاهی نوع و مقدار آن‌ها را تغییر دهد(۱۰،۱۱).

با توجه به ناکافی بودن اطلاعات منتشر شده در زمینه روش‌های تغییر مسیر متابولیسمی تولید آلکالوئیدها در این گیاه، هدف اساسی این پژوهش باززایی گیاه و بررسی تغییرات سوماکلونال احتمالی در گیاهان باززایی شده و نیز بررسی تغییرات میزان آتروپین تولید شده در گیاه داتورا و بررسی ارتباط بین تغییرات سوماکلونال و تولید این ماده می‌باشد.

مواد و روش ها

در پژوهش‌های قبلی محیط کشت مناسب جهت باززایی .Datura metel L با استفاده از محیط کشت MS (murashig and Skoog, 1962) (۷) در غلظت ۱mg/L BAP بهینه شد. در این پژوهش ابتدا جهت بررسی وقوع تنوع سوماکلونال بین گیاهان شاهد و لاین‌های باززایی شده داتورا، چهار لاین از گیاهان باززایی شده را به همراه گیاه شاهد انتخاب کرده و از برگ آن‌ها 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 باززایی شده اقدام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرومتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR . ۰/۸ میکرولیتر ۲ MgCl، 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 ۹۴درجه 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 رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) در حضور تابش UV از ژل عکس‌برداری گردید.

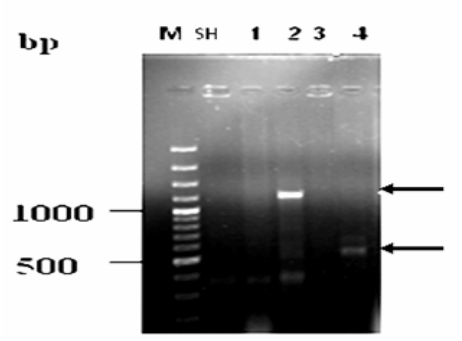
جهت تعیین مقدار آلکالوئید آتروپین‌ها ابتدا گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت رشد یافته در

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط کشت در شیشه به دو قسمت اندام هوایی و ریشه تفکیک و به طور جداگانه توزین شدند و در آون با دمای ۷۰°C به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. سپس اجزای گیاه توسط آسیاب به‌صورت پودر درآمدند. بعد یک گرم از پودر به‌دقت توزین شد ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۰/۲۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸-۹۵ درصد افزوده شد. پس از چند بار تکان دادن، فاز کلروفرمی دور ریخته شد و به فاز آبکی در حدود ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم دیگر به همراه ۰/۷۵ میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد افزوده شد. پس از چند بار تکان دادن و دو فازی شدن عصاره، این‌بار فاز آبکی دور ریخته شد و فاز کلروفرمی زیرین در بن‌ماری قرار گرفت تا تغلیظ شود و به حجم ۱ میلی‌لیتر 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 نیتریت سدیم بر روی کاغذ TLC شناسایی و با استفاده از نرم‌افزار Image j 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 معنی‌دار بودن در سطح $p<0/05$ محاسبه شد و نمودار آن‌ها رسم گردید.

یافته ها

جهت بررسی وجود شباهت یا اختلاف ژنتیکی بین گیاهان شاهد و باززایی شده داتورا و با استفاده از ۶ 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. به‌کارگیری شش نوع پرایمر RAPD (جدول شماره ۱) و مقایسه محصولات آن‌ها بر روی ژل آگارز نشان داد که پرایمر FPK2-19 به‌خوبی می‌تواند گویای وقوع تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان شاهد و لاین‌های باززایی شده داتورا باشد. وجود باند bp ۱۱۰۰ 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 bp ۵۲۰ 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) و۴ (R4) با توجه به اختلاف ژنتیکی نسبت به شاهد برای آنالیزهای میزان آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفتند.

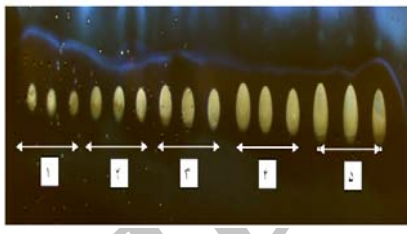


تصویر شماره ۱: الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA با استفاده از پرایمر FPK2-19. C: کنترل منفی، SH: گیاه شاهد و ۱، ۲، ۳ , ۴: لاین‌های باززایی شده

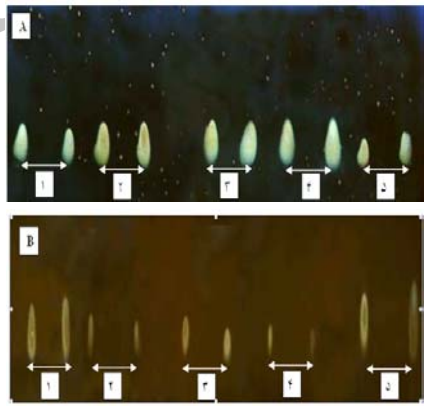
با توجه به این‌که حدود غلظت آتروپین و هیوسین گزارش شده در نمونه‌های گیاهی ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ (ppm) گزارش شده است مقدار ۵ غلظت متفاوت از آتروپین استاندارد تهیه گردید و از هر یک از نمونه‌های استاندارد

www.SID.ir

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



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



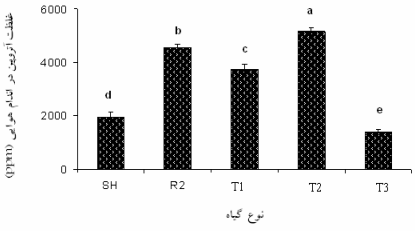
تصویر شماره ۳:

پس از تهیه عکس از لکه‌های حاصل، دانسیته نسبی همهٔ نمونه‌ها (استاندارد وگیاهی با نرم‌افزار Image j محاسبه و منحنی تغییرات غلظت نمونه‌های استاندارد آتروپین، بر اساس تغییرات دانسیته نسبی[1] آن‌ها ترسیم گردید. با توجه به منحنی استاندارد حاصل مقادیر غلظت آتروپین در اندام‌های هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد، باززایی شده و تراریخت محاسبه شد. آنالیز واریانس آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین سطوح آتروپین در اندام هوایی گیاهان مورد بررسی وجود دارد. گیاهان لاین‌های ۱ (T1) و ۲ (T2) تراریخت به ترتیب ۹۱/۵۲ و ۱۶۴/۹۷ درصد، افزایش معنی‌دار و چشم‌گیر آلکالوئید را نسبت به شاهد نشان دادند و لاین ۳ تراریخت (T3)، ۲۹/۰۲ درصد کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد. گیاهان باززایی شده لاین ۲ (R2) نیز ۱۳۴/۶۲ درصد افزایش معنی دار آلکالوئید را نسبت به شاهد نشان دادند. در بین گیاهان تحت بررسی، لاین ۲ (T2) و ۳ (T3) تراریخت به ترتیب با ۲۶۴/۹۷ و ۷۰/۹۸ درصد آتروپین بیشترین و کمترین مقدار آلکالوئید را در اندام هوایی نشان دادند (تصویر شماره ۴). در رابطه با ریشه، لاین ۲ تراریخت (T2) با مقدار ۹۴/۲۵ درصد کاهش معنی‌دار آلکالوئید نسبت به شاهد، کمترین غلظت آتروپین را در بین گیاهان نشان داد. در حالی‌که آتروپین در اندام‌های هوایی این لاین بیشترین غلظت را نسبت به سایرین نشان داد. همچنین گیاهان باززایی شده لاین ۲ (R2) و لاین ۱ تراریخت (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 تراریخت (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).

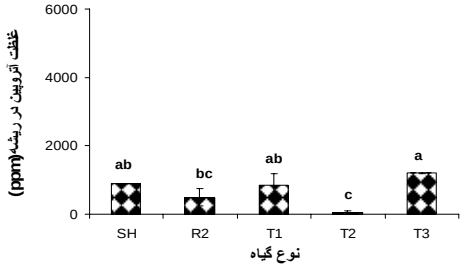
1. Relative Densite

Archive of SID
www.SID.ir

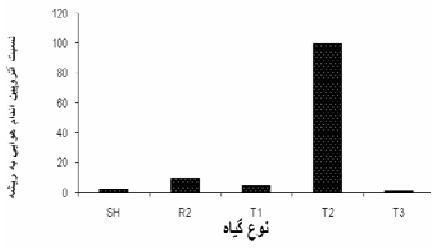
محاسبه نسبت آتروپین اندام هوایی به ریشه برای هر یک از گیاهان مورد بررسی نشان داد که این نسبت در بین همه گیاهان مورد بررسی مثبت می‌باشد. به‌عبارت دیگر در همه گیاهان مقدار آتروپین اندام هوایی بیشتر از ریشه است. این نسبت در مورد گیاهان لاین ۲ تراریخت (T2) بیشترین و در گیاهان لاین ۳ تراریخت (T3) کمترین مقدار را نشان داد (نمودار شماره۶). یادآوری می‌گردد که نتایج نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که لاین ۲ نسبت به بقیه لاین‌ها دارای تغییرات سوماکلونال است.



شکل شماره ٤: غلظت آتروپین در اندام هوایی گیاهان تراریخت (T1, T2,T3). SH : شاهد R2 : (گیاهان باززایی شده). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها (P۰/۰۵) بر اساس تست.



نمودار شماره ۵: غلظت آتروپین در ریشه گیاهان تراریخت (T1, T2,T3). SH : شاهد R2 : (گیاهان باززایی شده). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها (P۰/۰۵) بر اساس تست.



نمودار شماره ٦: نسبت آتروپین اندام هوائی به ریشه گیاهان تراریخت (T1, T2,T3). SH : شاهد R2 : (گیاهان باززایی شده).

بحث

از بین پرایمرهای RAPD، پرایمر FPK2-19 به‌خوبی توانست وقوع تنوع ژنتیکی سوماکلونال در بین گیاهان شاهد و لاین‌های باززایی شده داتورا را نشان دهد. از ۴ لاین مورد بررسی وجود باند ۱۱۰۰ kb 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 شماره۱). همچنین وجود باند ۵۲۰ bp در لاین ۴ و عدم آن در گیاهان شاهد و نیز لاین‌های۱، 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 این‌صورت که وجود باند اضافی bp ۱۱۰۰ در لاین ۲ (R2) و عدم آن در گیاهان شاهد احتمالاً باعث ۱۳۴/۶۲ درصد افزایش معنی دار 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) به‌دلیل 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 الکالوئید در لاین ۴ از گیاهان تراریخت می‌باشد. در رابطه با علت وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح

Archive of SID

www.SID.ir

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 اثرگذاشته 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 الکالوئید در گیاهان معمولاً از روش‌های حساس‌تری نظیر HPLC استفاده می‌شود این روش نیاز به مواد و دستگاه کارا و هزینه بالاتری لازم داشته و بهینه سازی 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 الکالوئید 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 شماره۴). 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 شماره۴). 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 شماره۵). به‌عبارت 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 حالی‌که در بخش‌های هوایی مقادیر بالای تجمع آلکالوئیدها مشاهده می‌شود. این الگو احتمالاً منعکس‌کننده 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 معنی دار 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

Archive of SID
www.SID.ir

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

- اختلاف در مقدار و نسبت بخش‌های اندام هوائی یعنی برگ و ساقه برداشته شده برای آنالیز وجود دارد. چون این دو اندام ممکن است پتانسیل ذخیره‌ای متفاوتی برای تجمع آلکالوئید داشته باشند(۷).

- به دلیل وقوع تغییرات سوماکلونال در بین 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 می‌نماید.

References

1. Evan S, Willian C. 2002.Treas and Evans Pharmacognosy. London Harcourt Publisher 11, 4-8.

۲. میر حیدر، ح. ۱۳۷۳. معارف گیاهی (کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها). انتشارات تیمورزاده تهران. جلد ۵. ۴۴۸ صفحه.

۳. نوروزی، پیمان.۱۳۸۲. بررسی تحمل به شوری و تنوع کروموزومی در کشت سلول چقندرقند. مجله چغندر قند 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 temperateforests. Center for International Foresty 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 inoxia 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 Enineering of Tropane Alkaloid Biosynthesis in Plants. Journal of Integrative Plant Biology 2005; 47: 136-143.
9. Abd El-Rahman R, Gabal A, Khlifa HD. Production of Scopolamine and Hyoscyamine in Calli and Regenerate Culture of Datura metel 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.

Archive of SID

www.SID.ir