

بررسی بیان ژن *H6H* و ایزوفرمهای *PMT* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های مویی و اندامهای مختلف شایبک (*Atropa belladonna* L.)

آذر مرادی^۱، مظفر شریفی*^۱ و امیر موسوی^۲

^۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

^۲ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۸

چکیده

شایبک (*Atropa belladonna*)، گیاهی از تیره سیب‌زمینی و جنس *Atropa* و یک گیاه دارویی بسیار مهم است که دارای مقدار قابل توجهی از کالوئیدهای مهم از جمله آتروپین و اسکوپولامین در ریشه های خود می باشد. تولید این کالوئیدها که در تهیه برخی داروهای مهم کاربرد دارند از طریق کشت بافت و کشت ریشه های موئینه مورد توجه می باشد. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار) سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول علامت رسان بر میزان بیان ژنهای هیوسيامین ۶-بتا هیدروکسیلاز (*H6H*) و پوترسین n-متیل ترانسفراز (*PMT*) در ریشه های مویی و گیاهچه های شایبک مورد بررسی قرار گرفت. سطح بیان این ژنها با روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شد. غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید اثرات متفاوتی بر میزان بیان ژنهای مذکور داشت. ایزوفرمهای *PMT* و ژن *H6H* نیز در اندامهای مختلف شایبک و در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید به طور متفاوتی بیان شدند. بیان ژن *H6H* و ایزوفرم *PMT2* در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار در ریشه های مویی افزایش یافت. بیان ایزوفرم *PMT2* در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار در ریشه ها نیز افزایش یافت. درحالی که این ژنها در اندام هوایی بیان نداشتند و بیان آنها تحت تیمار با سالیسیلیک اسید تغییر چشمگیری نکردند.

واژه های کلیدی: آتروپین، اسکوپولامین، سالیسیلیک اسید، شایبک.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۴۴۵، پست الکترونیکی: msharifi@modares.ac.ir

مقدمه

، *Scopolia* و *Hyoscyamus*. *Duboisia*، گیاه دارویی شایبک که کالوئیدهای مهم در طب گیاهی به عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌شوند (۱۴).

شایبک، گیاهی از تیره سیب‌زمینی و جنس *Atropa* است که علفی، چندساله، با ریشه‌های ضخیم، ساقه‌ای منشعب، پرشاخه و برگهای متناوب و بیضی شکل می‌باشد. این گیاه در طی دوره رشد، ریشه زیاد (به طول ۶۰-۴۰ cm) تولید می‌کند. گرما و نور فراوان باعث افزایش کالوئیدهای آن می‌شود و نور یکی از عوامل مؤثر بر پراکنش این گیاه می‌باشد (۱). اثرات مهم این گیاه؛ ضد اسپاسم عضلات

تیره سیب زمینی یکی از تیره‌های مهم با ۵۸ جنس و نزدیک به ۲۰۰۰ گونه است که ۹۰۰ گونه آن را جنس سولانوم تشکیل می‌دهد. گونه‌های تیره سیب‌زمینی در نواحی گرمسیری فراوانند و بتدریج به طرف مناطق معتدل و سرد از وفور آنها کاسته می‌شود. تیره سیب‌زمینی را از نظر کاربرد دارویی و غذایی باید یکی از تیره‌های بسیار مهم نهانانگان به شمار آورد. برخی از سولاناسه‌ها را "میدریاتیک" گویند، زیرا دارای کالوئیدهایی مانند اسکوپولامین و آتروپین هستند که بازکننده مردمک چشم است (۳). تعدادی از گیاهان این خانواده مانند *Atropa*

رسان تنش در گیاهان شناخته شده و نقش مهمی در پاسخ های گیاه به پاتوژنها و دیگر عوامل تنش زا ایفا می کند (۴). سالیسیلیک اسید همچنین موجب افزایش بیان ژنهای مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی از متابولیت های ثانویه در گیاهان می شود (۱۲). به عنوان نمونه ایندول الکلوئیدها در کشتهای سلولی *Catharanthus roseus* و الکلوئیدها در کشتهای ریشه های مویی *Brugmansis candida* (۸) می توانند توسط استیل-سالسیلیک اسید، یک آنالوگ SA القا شوند (۱۵). از آنجایی که آنزیمهای H6H و PMT در مسیر تولید تروپان الکلوئیدها نقش کلیدی دارند در این تحقیق تأثیر SA بر بیان این دو ژن در اندامهای مختلف شاییزک تعیین شد.

مواد و روشها

بذرهای شاییزک (*Atropa belladonna*) از دو منطقه مختلف در استان مازندران جمع آوری شد و گیاهچه های شاییزک و ریشه های مویی به وسیله آگروباکتریوم ریزوژنز به دست آمد. ریشه های مویی در محیط کشت تعلیقی و گیاهچه ها در محیط جامد MS به ترتیب به مدت ۱۴ و ۳۰ روز، تحت تأثیر غلظتهای مختلف ۰، ۰/۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید قرار گرفتند و سپس میزان تروپان الکلوئیدها توسط HPLC سنجیده شد (۱).

واکنش زنجیره ای ترانس کربتاز معکوس (RT-PCR): RNA کل از ریشه های مویی، برگ و اندام هوایی گیاه شاییزک، با استفاده از محلول RNX (RNA extraction solution) شرکت سیناژن و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. ابتدا ۰/۲ تا ۰/۳ گرم از نمونه مورد نظر با استفاده از هاون در نیتروژن مایع کاملاً سائیده و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول RNX Plus به نمونه اضافه شد. پس از نگهداری مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه گردید و به خوبی همگن شد. سپس نمونه در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴

صاف، تخدیرکننده، کاهش عرق و مسکن است. در طب سنتی به عنوان آرام بخش اعضای متورم به خصوص معده و روده مورد استفاده قرار می گیرد، در بیماری پارکینسون برای کاهش لرزش و سختی اعضا و افزایش قدرت تکلم و حرکت همچنین به عنوان داروی بی هوشی تجویز می شود. هیوسیامین (آتروپین)، یکی از الکلوئیدهای مهم این گیاه است که اثر قوی آنتی کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک دارد و در درمان دردهای حاد شکمی به کار می رود (۲). اسکوپولامین نیز شکل ۶، ۷-اپوکسید هیوسیامین می باشد که بر روی سیستم عصبی اثر می گذارد (۷). بیوسنتز تروپان الکلوئیدها مانند هیوسیامین و اسکوپولامین با تشکیل یون N-متیل پیرولینیوم از آمینواسیدهای اورنیتین و آرژنین آغاز می شود (۱۰). پوترسین N-متیل ترانسفراز آنزیم دخیل در برداشت پوترسین از مخزن پلی آمین می باشد و N-متیلاسیون دی آمین را به شکل N-متیل پوترسین کاتالیز می کند. این مرحله اولین مرحله مشترک در بیوسنتز تروپان الکلوئیدها و نیکوتین می باشد و منجر به تولید یک ترکیب حد واسط دارای بار مثبت (N-متیل پیرولینیوم) می گردد. سپس مسیر تروپان الکلوئیدها از مسیر تولید نیکوتین جدا می شود. ترکیب متیل پیرولینیوم با استواسیتیک اسید منجر به تولید تروپینون می گردد، که اولین ترکیب دارای حلقه تروپان می باشد و توسط آنزیم تروپینون ردوکتاز-I به تروپین تبدیل می شود و سپس با ترکیب شدن تروپین با یکی از مشتقات حاصل از فنیل آلانین به نام تروپیک اسید، هیوسیامین (آتروپین) تشکیل می شود (۹).

در آخرین مرحله مسیر بیوسنتزی تروپان الکلوئیدها، هیوسیامین توسط آنزیم هیوسیامین ۶- β هیدروکسیلاز (H₆H)، یک دی اکسیژناز وابسته به ۲-اکسولوتارات، هیدروکسیلاسیون هیوسیامین را به ۶- β هیدروکسی هیوسیامین و نیز اپوکسیداسیون ۶- β هیدروکسی هیوسیامین را به اسکوپولامین (هیوسین)، کاتالیز می کند.

سالیسیلیک اسید (SA) به عنوان یکی از مولکولهای علامت

تکثیر cDNA ژن توبولین (House keeping) در RT-PCR استفاده شد. آغازگرها با استفاده از توالبهای cDNA مربوط به ژنهای *PMT1*, *H6H*, *PMT2*, *PMT1,2* و توبولین که از سایت NCBI به دست آمد، طراحی شدند (جدول ۱). برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی در مقایسه با کنترل خارجی، بیان ژن در چرخه های متفاوت بررسی شد و پس از ارزیابی نتایج روی ژل، بهترین شرایط تعداد ۳۲ چرخه برای بررسی بیان ژنهای مورد نظر و کنترل خارجی آن انتخاب شد. مبنای انتخاب رسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصول PCR بود. برای پیدا کردن بهترین دمای اتصال پرایمرها از گرادیان دمایی برای هر کدام از ژنها استفاده شد. چرخه های PCR استفاده شده شامل ۹۴ درجه سانتی گراد در ۲ دقیقه و ۹۳ درجه سانتی گراد در ۳۰ ثانیه بود. برای اتصال (Annealing) دماهای انتخاب شده مطابق جدول (۱) به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۵ دقیقه انجام شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (۱درصد) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده و عکسبرداری شد. برای ارزیابی کمی بیان ژنها از مقایسه شدت چگالی باندهای ژن نسبت به کنترل خارجی و از نرم افزار Total lab استفاده گردید.

درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی برداشته و به ویال جدید منتقل شد و هم حجم آن، ایزوپروپانول اضافه شد. نمونه ۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ کردن مجدد نمونه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و خارج کردن محلول رویی، رسوب در ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. سانتریفیوژ نهایی نمونه ها در ۷۵۰۰g به مدت ۸ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج و رسوب مدتی در دمای اتاق قرار داده شد تا اتانول تبخیر شود. نمونه ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

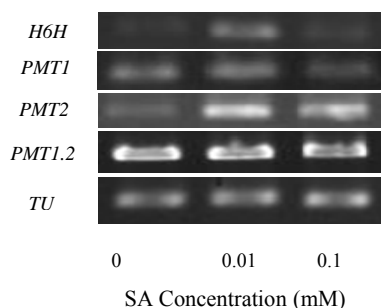
سپس کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید. از ۵ میکروگرم RNA کل با استفاده از الیگومر تیمیدین (Oligo - dT₁₈) به عنوان آغازگر (Primer) برای ساختن cDNA استفاده شد. ساختن cDNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن و طبق دستور شرکت سازنده آن انجام شد.

بررسی بیان ژنها : به منظور بررسی بیان ژنهای *H6H*, *PMT1*, *PMT2* و *PMT1,2* از آغازگر های اختصاصی مربوط به این ژنها در گیاه شابیزک استفاده گردید و به عنوان کنترل خارجی از آغازگرهای اختصاصی پیشرو برای

جدول ۱- تعداد سیکل ها و طول توالی های تکثیر شده

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Tm (°C)	Product size(bp)	Cycles
<i>Tu</i>	Fw	GCTTTCAACAACCTTCTTCAG	54	700	32
	Rv	GGGCGTAGGAGAAAGC			
<i>H6H</i>	Fw	CACTTTGGCTCATGGTTGTCA	52	270	32
	Rv	CCATCATAGTGTCTCTGAACC			
<i>PMT1</i>	Fw	GTGTACTAACTCTATCAAGCC	54	317	32
	Fv	TAGTTGGGTAACGAGAGACCTCA			
<i>PMT2</i>	Fw	AACGAGTTCGGGTGTATTAAG	58	445	32
	Rv	ATGCAGCCCCATACCAAGAACC			
<i>PMT1.2</i>	Fw	AGTCAGCAACTTATGGGAAGG	56	750	32
	Rv	GATGGCAAAATAAAAAGCTGC			

با ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید کمترین بیان را نشان داد. به نظر می رسد که در ریشه های مویی غلظت ۰/۰۱ میلی مولار بر بیان ژنهای *H6H*، *PMT1* و *PMT2* اثر بیشتری دارد و همچنین ایزوفرم *PMT2* تأثیرپذیری بیشتری نسبت به سالیسیلیک اسید از خود نشان می دهد (شکل ۱).



شکل ۱- تغییرات میزان بیان ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1.2* تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در ریشه های موئی شایبیک، توبولین (TU): کنترل خارجی

بیان ژن *H6H* در ریشه های شایبیک تیمار یافته با ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و کمترین بیان آن در تیمار با ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در غلظت ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید، بیان ایزوفرم *PMT1* نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار به کمترین حد خود رسید. در حالی که بیان ایزوفرم *PMT2* به شدت تحت تأثیر غلظت ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید قرار گرفت و بیان آن در دو غلظت مذکور نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. و اما میزان بیان ژن *PMT1.2* در غلظتهای ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار نسبت به نمونه شاهد افزایش و میزان این افزایش در این دو غلظت تقریباً به یک میزان بود بررسی نتایج به دست آمده از اثر غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید مطابق با نتایج خانم احمدیان (۱) بود. به طوری که میزان بیان ژن *H6H* و

جهت تعیین ماهیت و صحت عملکرد پرایمرها، قطعات حاصل از PCR ژن *H6H* و ایزوفرمهای *PMT1* و *PMT2* با آنزیمهای *BamH1*، *Hinf1* و *Tag1* هضم شد. برای بررسی بیان ژن از هر گروه حداقل دو تکرار مستقل از هم صورت گرفت و میانگین بیان ژن در هر دو گروه برای ارزیابی نهایی استفاده شد.

نتایج و بحث

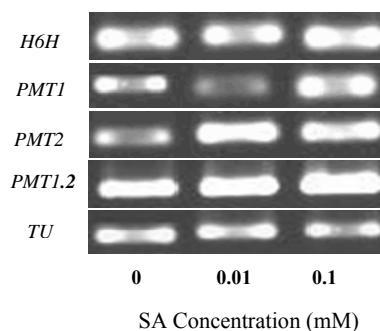
بیان ژن *H6H* و ایزوفرمهای *PMT* تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید به عنوان یک ماده علامت رسان کلیدی که در فعالسازی پاسخهای دفاعی گیاهان شرکت می کند (۵)، بررسی گردید.

بررسی بیان ژنها در ریشه های مویی شایبیک تحت تأثیر غلظتهای مختلف (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار) سالیسیلیک اسید نشان داد که بیان ژن *H6H* در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و در غلظت ۰/۱ میلی مولار کاهش یافت و به حد شاهد رسید. این نتایج با نتایج به دست آمده از تحقیقات احمدیان و همکاران که نشان داد (۱) میزان اسکوپولامین در شایبیک در تیمار با ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در ریشه های مویی القا می شود، مطابقت دارد. با توجه به اینکه آنزیم *H6H* در تبدیل آتروپین به اسکوپولامین نقش دارد؛ به نظر می رسد که افزایش مقدار اسکوپولامین توسط سالیسیلیک اسید مربوط به افزایش بیان ژن *H6H* در اثر سالیسیلیک اسید باشد. بیان ایزوفرم *PMT1* در همه غلظتها نسبت به شاهد کاهش یافت. بیان ایزوفرم *PMT2* در حضور غلظتهای سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و این افزایش در غلظت ۰/۰۱ چشمگیرتر بود. با توجه به کاهش بیان ایزوفرم *PMT1* تحت تیمار سالیسیلیک اسید و افزایش ایزوفرم *PMT2* به نظر می رسد که بیان این دو ایزوفرم تحت تیمار سالیسیلیک اسید به طور معکوس بیان می شوند و افزایش یکی با کاهش دیگری همراه می باشد. ژن *PMT1.2* در نمونه شاهد بیشترین بیان را داشت و در تیمار

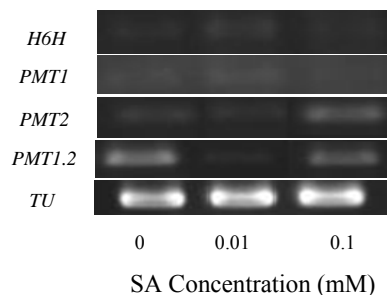
بررسی بیان ژن *H6H* و ایزوفرمهای *PMT1* و *PMT2* در غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار در اندام هوایی سالیسیلیک اسید نشان داد که به طور کلی این ژنها در اندام هوایی بیان چندانی را نشان ندادند و تنها تغییر قابل توجهی که در بیان این ژنها دیده شد تغییر در بیان ایزوفرم *PMT2* در غلظت ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید بود. در اندام هوایی گیاهان اختلاف معنی داری در آتروپین و اسکوپولامین تولید شده در تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید مشاهده شد (۱). و این مشابه با رفتار بیان ژن *H6H* و ایزوفرم *PMT2* بود (شکل ۳). اما نتیجه چشمگیری که از مطالعه بیان ایزوفرمهای *PMT* در اندام هوایی به دست آمد اثر قابل توجه غلظت ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید بر افزایش بیان ایزوفرم *PMT2* می باشد. لازم به ذکر است که به طور کلی میزان بیان ژنهای *H6H* و *PMT* در ریشه این گیاه بیشتر از برگها و ساقه ها می باشد. در تحقیقات اخیر نیز منحصر بودن بیان ژن *PMT* به ریشهها در گیاهان *Nicotiana sylvestris* (۶)، *Atropa belladonna* (۱۱) و سپس در گیاهان تولید کننده *Calystegine Solanum lycopersicum* نظیر *Calystegia sepium* و *Datura stramonium* (۱۳) نشان داده شد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق سالیسیلیک اسید بر بیان ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1,2* بر طبق انتظار، تأثیر گذار بوده و موجب کاهش و یا افزایش بیان آنها می شود. نکته مهمی که در تحقیق حاضر باید مورد توجه قرار گیرد اثرات متفاوت غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر بیان ژنهای مذکور و رفتار متفاوت ایزوفرمهای *PMT* در پاسخ به این مولکول سیگنالینگ می باشد. نکته دیگری که نمی توان نادیده گرفت تأثیر غلظتهای متفاوت سالیسیلیک اسید بر بیان ژنهای مذکور در اندامهای مختلف شایبک می باشد.

مقدار اسکوپولامین با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید روند کاهشی را نشان دادند. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که اثر تیمار سالیسیلیک اسید بر بیان ایزوفرم *PMT2* بیش از *PMT1* می باشد. زیرا *PMT2* در دو غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید افزایش یافت. در حالی که بیان *PMT1* فقط در غلظت ۰/۱ میلی مولار افزایش یافت. با توجه به نتایج به نظر می رسد که ایزوفرمهای *PMT1* و *PMT2* در اثر غلظتهای متفاوت مولکول علامت رسان سالیسیلیک اسید رفتار متفاوتی را در ریشه از خود نشان می دهند (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات میزان بیان ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1,2* تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در ریشه های شایبک، توبولین (TU): کنترل خارجی



شکل ۳- تغییرات میزان بیان ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1,2* تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در اندام هوایی شایبک، توبولین (TU): کنترل خارجی

منابع

۱. احمدیان، ن.؛ (۱۳۸۷) بررسی میزان تروپان آلکالوئیدها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات، سالیسیلیک اسید و فنیل آلانین در قطعات جداگشت و اندام‌های مختلف شایبیزک، پایان نامه کارشناسی ارشد، تربیت مدرس
۲. زرگری، ع.؛ (۱۳۷۲) گیاهان دارویی؛ ج. ۳، انتشارات دانشگاه تهران، ص: ۵۴۶-۶۳۶
۳. قهرمان، ا.؛ (۱۳۷۳) کروموفیت‌های ایران؛ ج. ۳، تهران: مرکز نشر دانشگاهی.
- Datura stramonium*: Hyoscyamine is stable to *in vivo* oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process. *Phytochemistry*. 61: 323-329.
- Suzuki K., Yamada Y., Hashimoto T.; (1999) Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol*. 40: 289-297.
 - Taguchi G., Yazawa T., Hayashida N., Okazaki M.; (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J Biochem*. 268: 4086-94.
 - Teuber M., Azemi M.E., Namjoyan F., Meier A. C., Wodak A., Brandt W., Drkger, B.; (2007) Putrescine N-methyltransferases – a structure-function analysis. *Plant Mol. Biol*. 63: 787-801.
 - Zhang W., Franco C., Curtin C., Conn S.; (2004) To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *J. Biomedicine Biotechnol*. (5): 264-271, 2004.
 - Zhao J., Zhu WH., Hu Q., He XW.; (2000) Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*. 22: 1221-6.
 - Draper J.; (1997) Salicyliate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense, *Trends Plant Sci*. 2: 162-165.
 - Durner J., Shah J., Klessig D.F.; (1997) Salicylic acid and disease resistance in plant, *Trends Plant Sci*. 2: 1360-1385.
 - Hashimoto T., Tamaki K., Suzuki K., Yamada Y.; (1998) Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol*. 39: 73-79.
 - Hashimoto T., Hayashi A., Amano Y., Kohno J., Iwanari H., Usuda S., Yamada Y.; (1991) Hyoscyamine 6P-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J Biol Chem*. 266: 4648-4653
 - Lee J., Klessig DF., Nurnberger T.; (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*. 13: 1079-93.
 - Marcy NH., Timothy WA., Sung HK., Edward L.; (1996) 1-Methylpyrrolidine-2-acetic acid is not a precursor of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 41: 767-773.
 - Stephen P., David O.H.; (2002) Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in

Study on gene expression of Hyoscyamine 6- β hydroxylase (*H6H*) and Putrescine N-methyl transferase (*PMT*) isozymes under different concentrations of salicylic acid in hairy roots and different organs of *Atropa belladonna* L.

Moradi A.¹, Sharifi M.¹ and Mousavi A.²

¹Department of plant science, Faculty of biological science, Tarbiat modares university, Tehran, Iran.

²National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Abstract

Atropa belladonna, a member of Solanaceae family, is a very important pharmaceutical plant. Its roots are composed of significant amount of important alkaloids atropine and scopolamin. In this study the effect of different concentrations (0, 0.01 and 0.1 mM) of salicylic acid as a signal molecule was evaluated on gene expression levels of hyocyanin 6- β hydroxylase (*H6H*) and putrescinN-methyl transferase (*PMT*) in the hairy roots and plantlet. Expression level of these genes was evaluated by semi quantitative RT-PCR. The results showed that different concentrations of salicylic acid have different effects on gene expression levels. Isozymes of *PMT* and *H6H* in different organs and in response to the concentrations of salicylic acid were differentially expressed. *H6H* and *PMT2* genes expression were increased at 0.01mM in the hairy roots. Expression of *PMT2* in the roots was increased at 0.01mM. But the level of gene expression in shoot was not significantly affected.

Keywords: atropine, scopolamine, salicylic acid, *Atropa belladonna*, semi quantitative RT-PCR