Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

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

آذر مرادی[1]، مظفر شریفی*[1] و امیر موسوی[2]

[1] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[2] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ٨٩/٣/٨ تاریخ پذیرش: ٨٩/٤/٢٦

چکیده

شابیزک (*Atropa belladonna*)، گیاهی از تیرهٔ سیب‌زمینی و جنس Atropa و یک گیاه دارویی بسیار مهم است که دارای مقدار قابل توجهی از الکالوئید های مهم از جمله آتروپین و اسکوپولامین در ریشه های خود می باشد. تولید این الکالوئید ها که در تهیهٔ برخی داروهای مهم کاربرد دارند از طریق کشت بافت و کشت ریشه های موئینه مورد توجه می باشد. در این تحقیق اثر غلظتهای مختلف (٠، ٠/٠١ و ٠/١ میلی مولار) سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول علامت رسان بر میزان بیان ژنهای هیوسیامین ٦-بتا هیدروکسیلاز (H6H) و پوترسین n-متیل ترانسفراز (PMT) در ریشه های مویی و گیاهچه های شابیزک 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 شابیزک و در غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید به طور متفاوتی بیان شدند. بیان ژن *H6H* و ایزوفرم *PMT2* در غلظت ٠/٠١ میلی مولار در ریشه های مویی افزایش یافت. بیان ایزوفرم *PMT2* در غلظت ٠/٠١ 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، شابیزک.

* نویسنده مسئول، تلفن: ٨٢٨٨٤٤٤٥-٠٢١، پست الکترونیکی: msharifi@modares.ac.ir

مقدمه

تیرهٔ سیب زمینی یکی از تیره‌های مهم با ٥٨ جنس و نزدیک به ٢٠٠٠ گونه است که ٩٠٠ گونهٔ آن را جنس سولانوم تشکیل می‌دهد. گونه‌های تیرهٔ سیب‌زمینی در نواحی گرمسیری فراوانند و بتدریج به طرف مناطق معتدل و سرد از وفور آنها کاسته می‌شود. تیرهٔ سیب‌زمینی را از نظر کاربرد دارویی و غذایی باید یکی از تیره‌های بسیار مهم نهاندانگان به شمار آورد. برخی از سولاناسه‌ها را "میدریاتیک" گویند، زیرا دارای الکالوئیدهایی مانند اسکوپولامین و آتروپین هستند که بازکنندهٔ مردمک چشم است (٣). تعدادی از گیاهان این خانواده مانند Atropa ، Duboisia، Hyoscyamus و Scopolia به دلیل تولید الکالوئیدهای مهم در طب گیاهی به عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌شوند (١٤).

شابیزک، گیاهی از تیرهٔ 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 cm ٦٠-٤٠) تولید می‌کند. گرما و نور فراوان باعث افزایش الکالوئیدهای آن می‌شود و نور یکی از عوامل مؤثر بر پراکنش این گیاه می‌باشد (١). اثرات مهم این گیاه؛ ضد اسپاسم عضلات

Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

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 می‌شود. هیوسیامین (آتروپین)، یکی از آلکالوئیدهای مهم این گیاه است که اثر قوی آنتی‌کولینرژیک براعصاب پاراسمپاتیک دارد و در درمان دردهای حاد شکمی به کار می‌رود (۲). اسکوپولامین نیز شکل ٦، ۷-اپوکسیدهیوسیامین می‌باشد که بر روی سیستم عصبی اثر می‌گذارد (۷). بیوسنتز تروپان الکالوئیدها مانند هیوسیامین و اسکوپولامین با تشکیل یون N- متیل‌پیرولینیوم از آمینواسیدهای اورنیتین و آرژنین آغاز می‌شود (۱۰). پوترسین N-متیل‌ترانسفراز آنزیم دخیل در برداشت پوترسین از مخزن پلی‌آمین می‌باشد و N-متیلاسیون دی‌آمین را به شکل N-متیل پوترسین کاتالیز می‌کند. این مرحله اولین مرحله مشترک در بیوسنتز تروپان الکالوئیدها و نیکوتین می‌باشد و منجر به تولید یک ترکیب حد واسط دارای بار مثبت (N- متیل‌پیرولینیوم) می‌گردد. سپس مسیر تروپان الکالوئیدها از مسیر تولید نیکوتین جدا می‌شود. ترکیب متیل‌پیرولینیوم با استواستیک اسید منجر به تولید تروپینون می‌گردد، که اولین ترکیب دارای حلقه تروپان می‌باشد و توسط آنزیم تروپینون ردوکتاز-I به تروپین تبدیل می‌شود و سپس با ترکیب شدن تروپین با یکی از مشتقات حاصل از فنیل آلانین به نام تروپیک‌اسید، هیوسیامین (آتروپین) تشکیل می‌شود (۹).

در آخرین مرحلهٔ مسیر بیوسنتزی تروپان الکالوئیدها، هیوسیامین توسط آنزیم هیوسیامین β-٦ هیدروکسیلاز (H_6H)، یک دی‌اکسیژناز وابسته به ۲-اکسوگلوتارات، هیدروکسیلاسیون هیوسیامین را به β-٦ هیدروکسی هیوسیامین و نیز اپوکسیداسیون β-٦ هیدروکسی هیوسیامین را به اسکوپولامین (هیوسین)، کاتالیز می‌کند.

سالیسیلیک اسید (SA) به عنوان یکی از مولکولهای علامت رسان تنش در گیاهان شناخته شده و نقش مهمی در پاسخ های گیاه به پاتوژنها و دیگر عوامل تنش زا ایفا می کند (٤). سالیسیلیک اسید همچنین موجب افزایش بیان ژنهای مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی از متابولیتهای ثانویه در گیاهان می‌شود (۱۲). به عنوان نمونه ایندول الکالوئیدها در کشتهای سلولی *Catharanthus roseus* و الکالوئیدها در کشتهای ریشه‌های مویی *Brugmansis candida* (۸) می‌توانند توسط استیل-سالسیلیک اسید، یک آنالوگ SA القا شوند (۱۵). از آنجایی که آنزیمهای H6H و PMT در مسیر تولید تروپان آلکالوئید ها نقش کلیدی دارند دراین تحقیق تأثیر SA بر بیان این دو ژن در اندامهای مختلف شابیزک تعیین شد.

مواد و روشها

بذرهای شابیزک (*Atropa belladonna*) از دو منطقه مختلف در استان مازندران جمع‌آوری شد و گیاهچه‌های شابیزک و ریشه‌های مویی به وسیلهٔ اگروباکتریوم ریزوژنز به دست آمد. ریشه های مویی در محیط کشت تعلیقی و گیاهچه ها در محیط جامد MS به ترتیب به مدت ١٤ و ۳۰ روز، تحت تأثیر غلظتهای مختلف ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید قرار گرفتند و سپس میزان تروپان آلکالوئیدها توسط HPLC سنجیده شد (۱).

واکنش زنجیره ایی ترانس کریپتاز معکوس (RT -PCR): RNA کل از ریشه های مویی، برگ و اندام هوایی گیاه شابیزک، 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 ٦۰۰ میکرولیتر از محلول RNX Plus به نمونه اضافه شد. پس از نگهداری مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ 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 ٤

Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، فاز رویی برداشته و به ویال جدید منتقل شد و هم حجم آن، ایزوپروپانول اضافه شد. نمونه ٦ ساعت در دمای ٢٠- درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن مجدد نمونه در١٢٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی گراد و خارج کردن محلول رویی، رسوب در ١ میلی لیتر اتانول ٧٠ درصد شستشو داده شد. سانتریفوژ نهایی نمونه ها در ٧٥٠٠g به مدت ٨ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از سانتریفوژ، محلول رویی خارج و رسوب مدتی در دمای اتاق قرار داده شد تا اتانول تبخیر شود. نمونه ها به فریزر ٨٠- درجه سانتی گراد منتقل شد.

سپس کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید. از ٥ میکروگرم RNA کل با استفاده از الیگومر تیمیدین ($Oligo - dT_{18}$) 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 تکثیر cDNA ژن توبولین (House keeping) در RT-PCR استفاده شد. آغازگرها با استفاده از توالیهای cDNA مربوط به ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1,2* و توبولین که از سایت NCBI به دست آمد، طراحی شدند (جدول ١). 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 ٣٢ 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 ٩٤ درجه سانتی گراد در ٢ دقیقه و ٩٣ درجه سانتی گراد در ٣٠ ثانیه بود. برای اتصال (Annealing) دماهای انتخاب شده مطابق جدول (١) به مدت ٤٥ ثانیه، تکثیر ٧٢ درجه سانتی گراد برای ١ دقیقه و تکثیر نهایی در ٥ دقیقه انجام شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (١درصد) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ٣٠ 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.

جدول ١- تعداد سیکل ها و طول توالی های تکثیر شده

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Tm (ºC)	Product size(bp)	Cycles
Tu	Fw	GCTTTCAACAACTTCTTCAG	54	700	32
	Rv	GGGGCGTAGGAGGAAAGC			
H6H	Fw	CACTTTGGCTCATGGTTGTCA	52	270	32
	Rv	CCATCATAGTGTCCTCCTGAACC			
PMT1	Fw	GTGTACTAACTCTATCAAGCC	54	317	32
	Fv	TAGTTGGGTAACGAGAGACCTCA			
PMT2	Fw	AACGAGTTCGGGTGTATTAAG	58	445	32
	Rv	ATGCAGCCCCATCACCAAGAACC			
PMT1.2	Fw	AGTCAGCAACTTATGGGAAGG	56	750	32
	Rv	GATGGCAAAATAAAAGCTGC			

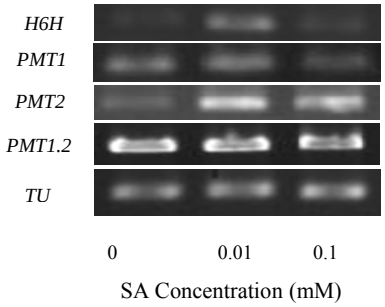
Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

جهت تعیین ماهیت و صحت عملکرد پرایمرها، قطعات حاصل از PCR ژن *H6H* و *ایزوفرمهای PMT1* و PMT2 با آنزیمهای *BamH*1، *Hinf*1 و *Tag*1، هضم شد. برای بررسی بیان ژن از هرگروه حداقل دو تکرار مستقل از هم صورت گرفت و میانگین بیان ژن در هردو 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 می‌کند (۵)، بررسی گردید.

بررسی بیان ژنها در ریشه های مویی شابیزک 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 شابیزک 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 یه 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 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).

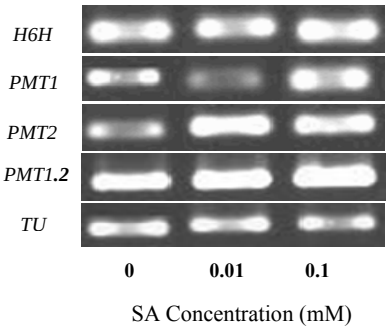


شکل ۱- تغییرات میزان بیان ژنهای *H6H*، *PMT1*، *PMT2* و *PMT1,2* تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در ریشه های موئی شابیزک، توبولین (TU):کنترل خارجی

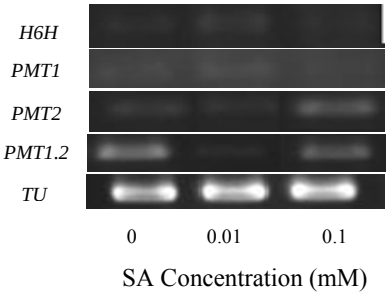
بیان ژن *H6H* در ریشه های شابیزک تیمار یافته با ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و کمترین بیان آن در تیمار با ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در غلظت ۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید، بیان ایزوفرم *PMT1* نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار به کمترین حد خود رسید. در حالی که بیان ایزوفرم *PMT2* به شدت تحت تأثیر غلظت ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک 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

Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

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 شابیزک، 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 هوائی شابیزک، توبولین (TU): کنترل خارجی

بررسی بیان ژن *H6H* و ایزوفرمهای *PMT1* و *PMT2* در غلظتهای ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار در اندام هوائی 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* (٦) ، *Atropa belladonna* (۱۱) و سپس در گیاهان تولید کنندهٔ Calystegine نظیر *Solanum lycopersicum*، *Calystegia sepiun* 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. نکتهٔ دیگری که نمی توان نادیده گرفت تأثیر غلظتهای متفاوت سالیسیلیک اسید بر بیان ژنهای مذکور در اندامهای مختلف شابیزک می باشد.

منابع

١. احمدیان، ن.؛ (١٣٨٧) بررسی میزان تروپان آلکالوئیدها تحت تأثیر غلظتهای مختلف نیترات، سالیسیلیک اسید و فنیل آلانین در قطعات جداکشت و اندامهای مختلف شابیزک ، پایان نامه کارشناسی ارشد، تربیت مدرس

٢. زرگری، ع.؛ (١٣٧٢) گیاهان داروئی؛ ج. ٣، انتشارات دانشگاه تهران، ص: ٥٤٦-٦٣٦

٣. قهرمان، ا.؛ (١٣٧٣) کروموفیتهای ایران؛ ج٣، تهران: مرکز نشر دانشگاهی.

4. Draper J.; (1997) Salicyliate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense, Trends Plant Sci. 2: 162–165.
5. Durner J., Shah J., Klessig D.F.; (1997) Salicylic acid and disease resistance in plant, Trends Plant Sci. 2: 1360–1385.
6. Hashimoto T., Tamaki K., Suzuki K., Yamada Y.; (1998) Molecular cloning of plant spermidine synthases. Plant Cell Physiol. 39: 73–79.
7. 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
8. 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.
9. Marcy NH., Timothy WA., Sung HK., Edward L.; (1996) 1-Methylpyrolidine-2-acetic acid is not a precursor of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 41: 767–773.
10. Stephen P., David O.H.; (2002) Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in *Datura stramonium*: Hyoscyamine is stable to *in vivo* oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process. *Phytochemistry*. 61: 323–329.
11. Suzuki K., Yamada Y., Hashimoto T.; (1999) Expression of Atropa belladonna putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. Plant Cell Physiol. 40: 289–297.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

Downloaded from ibs.org.ir at 6:46 +0330 on Friday October 19th 2018

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

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

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

[2]National 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 hyocyamin 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