دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد علوم گیاهی
(فیزیولوژی گیاهی)

عنوان:

اثر الیسیتور های قارچی بر تولید آتروپین و اسکوپولامین و بیان ژن آنزیمهای کلیدی بیوسنتز آنها در کشت ریشه موئین شابیزک (*Atropa belladonna*)

نگارش:
نرگس درخشانی

استاد راهنما:
دکتر مظفر شریفی

فروردین ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد علوم گیاهی
(فیزیولوژی گیاهی)

عنوان:

اثر الیسیتور های قارچی بر تولید آتروپین و اسکوپولامین و بیان ژن آنزیمهای کلیدی بیوسنتز آنها در کشت ریشه موئین شابیزک (*Atropa belladonna*)

نگارش:
نرگس درخشانی

استاد راهنما:
دکتر مظفر شریفی

استاد مشاور:
دکتر ناصر صفایی

فروردین ۱۳۹۱

چکیده

گیاهان عالی تولید کننده طیف وسیعی از ترکیبات ثانویه، با ارزش داروئی هستند. دو ترکیب آتروپین و اسکوپولامین از تروپان آلکالوئیدهای مهم با خواص آنتی کولینژیک و اسپاسمولیتیک بوده که در گیاهان تیره سیب زمینی (Solanaceae) از جمله گیاه شابیزک (*Atropa belladonna* L.) تولید می شوند و به عنوان داروهای ضد انقباض و تشنج، تقویت کننده عضلات قلب و گشادکننده قرنیه در سنجش بینایی به کار برده می شوند. دو آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی این تروپان آلکالوئیدها، پوترسین N-متیل ترانسفراز (PMT) و هیوسیامین 6-β هیدروکسیلاز (H6H) است. پوترسین N-متیل ترانسفراز یک متیل ترانسفراز وابسته به S- آدنوزیل متیونین است و مونومتیلاسیون دی آمین پوترسین و تبدیل آن به N – متیل پوترسین را کاتالیز می کند و بعنوان اولین آنزیم محدود کننده سرعت در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها مطرح است. آنزیم H6H، بعنوان دی اکسیژناز وابسته به 2-اکسوگلوتارات در هیدروکسیلاسیون هیوسیامین و تبدیل آن به اسکوپولامین نقش دارد. کشت تعلیقی ریشه های موئین به دلیل سرعت بالا در تولید زی توده و تولید بیشتر تروپان آلکالوئیدها، ساز وکار مناسبتری نسبت به استخراج این ترکیبات از گیاه کامل است. در این تحقیق، از ریشه های موئین تراریخت شده با باکتری خاکزی *Agrobacterium rhizogenes* AR 15834 استفاده شد. ازآنجائیکه تنش با کمک الیسیتورهای قارچی، یکی از روشهائی است که برای افزایش متابولیتهای ثانویه بکار می رود، لذا در این تحقیق، اثر تنشی چهار عصاره قارچ، شامل *Fusarium graminearum*، *Rhizoctonia solani*، *Rhizopus stolonifer* و *Sclerotinia sclerotiorum* در چهار غلظت ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم درمیلی لیتر، بر میزان رشد و تولید تروپان آلکالوئیدها و بیان ژن آنزیمهای کلیدی مسیر بیوسنتز آنها (*h6h* و *pmt2*) در زمانهای ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در کشت تعلیقی ریشه موئین گیاه شابیزک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره قارچ*F. graminearum* بیشترین تاثیر و *S. sclerotiorum* کمترین تاثیر را در تجمع تروپان آلکالوئیدها، بویژه اسکوپولامین دارد. علاوه بر آن مطالعات مولکولی نشان داد، که بیان *pmt* نسبت به *h6h* تحت تیمار این الیسیتور قارچی بیشتر است و به بیشینه خود بعد از بیست و چهار ساعت می رسد.

کلمات کلیدی: شابیزک (*Atropa belladonna*)، آتروپین، اسکوپولامین، الیسیتور قارچی، پوترسین N-متیل ترانسفراز، هیوسیامین 6-β هیدروکسیلاز

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱ تیره سیب زمینی (Solanaceae) ۲

۱-۲ مشخصات گیاه شناسی شابیزک ۲

۱-۳ آلکالوئیدها ۴

۱-۴ اهمیت اقتصادی آلکالوئیدهای این تیره ۵

۱-۵ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۶

۱-۶ آنزیمهای کلیدی مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۹

۱-۶-۱ پوترسین N- متیل ترانسفراز(PMT) ۹

۱-۶-۲ آنزیم تروپینون ردوکتاز I و II ۱۰

۱-۶-۳ آنزیم هیوسیامین6-β هیدروکسیلاز ۱۰

۱-۷ کشت ریشه موئین ۱۲

۱-۷-۱ کشت ریشه موئین ۱۲

۱-۷-۲ ویژگیها و مزایای کشت ریشه موئین ۱۳

۱-۷-۳ تشکیل ریشه موئین ۱۴

۱-۷-۴ عوامل تأثیر گذار روی کشت ریشه موئین ۱۴

۱-۸ مروری بر اثر الیسیتورها بر متابولیتهای ثانویه ۱۵

۱-۹ مروری بر پژوهشهای انجام شده ۱۶

۱-۱۰ اهداف مورد نظر در این پژوهش ۱۷

فصل دوم: مواد و روشها ۱۸

۲-۱ تهیه نمونه گیاهی ۱۹
۲-۲ تکثیر ریشه‌های موئین ۱۹
۲-۳ تیمار عصاره قارچ ۲۰
۲-۳-۱ تهیه تیمارهای قارچی ۲۰
۲-۳-۲ تاثیر عصاره قارچی بر ریشه های موئین ۲۰
۲-۴ اندازه‌گیری بیوشیمیایی ۲۱
۲-۴-۱ استخراج الکالوئیدها ۲۱
۲-۴-۲ سنجش الکالوئیدها به وسیلهٔ HPLC ۲۲
۲-۵ بررسیهای مولکولی ۲۲
۲-۵-۱ محلولها و بافرها ۲۲
۲-۵-۱-۱ محلولها و بافر های مورد استفاده در استخراج Total RNA ۲۲
۲-۵-۱-۲ طرز تهیه محلولها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ۲۳
۲-۵-۲ استخراج Total RNA از ریشه موئین شابیزک *A. belladonna* ۲۴
۲-۵-۳ الکتروفورز ژل آگارز ۲۵
۲-۵-۴ واکنش رونویسی معکوس ۲۷
۲-۵-۵ طراحی آغازگر ۲۸
۲-۵-۶ آماده سازی آغازگرهای PCR ۲۹
۲-۵-۷ واکنش PCR ۲۹
۲-۵-۷-۱ طراحی واکنش PCR ۲۹
۲-۵-۷-۲ بررسی و تهیهٔ عکس از ژل آگارز ۳۰
۲-۶ تجزیه و تحلیل آماری ۳۰
فصل سوم: نتایج ۳۱

۳-۱ منحنی رشد کشت ریشه های موئین *A. belladonna* ۳۲
۳-۲ تاثیر تیمار عصاره قارچی روی کشت ریشه های موئین..... ۳۲
۳-۲-۱ تاثیر غلظتهای مختلف الیسیتور *F. graminearum* روی رشد و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین..... ۳۳
۳-۲-۲ تاثیر غلظتهای مختلف الیسیتور *R. solani* روی رشد و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین..... ۳۴
۳-۲-۳ تاثیر غلظتهای مختلف الیسیتور *R. stolonifer* روی رشد و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین ۳۶
۳-۲-۴ تاثیر غلظتهای مختلف الیسیتور *S. sclerotiorum* روی رشد و تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین ۳۷
۳-۳ نتایج بررسیهای مولکولی ۳۹
۳-۳-۱ استخراجRNA و سنتز cDND از بافتهای ریشه موئین *A.belladonna* ۳۹
۳-۳-۲ تاثیر عصاره *F. graminearum* بر بیان ژن *pmt* و *H6H* ۳۹
۳-۳-۳ تاثیر زمان بر بیان ژن *pmt* تحت تاثیر عصاره *F. graminearum* ۴۰
۳-۳-۴ تاثیر زمان بر بیان ژن *h6h* تحت تاثیر عصاره *F. graminearum* ۴۰
فصل چهارم: بحث ۴۲
۴-۱ تأثیر الیستیور قارچ روی رشد ۴۳
۴-۱-۱ تاثیر گونه های *F. graminearum* و *R. solani* روی رشد..... ۴۳
۴-۱-۲ تاثیر گونه *R. stolonifer* روی رشد ۴۴
۴-۱-۳ تاثیر گونه *S. sclerotiorum* روی رشد ۴۴
۴-۲ تأثیر الیستیورهای قارچی روی محتوای آلکالوئید ریشه های موئین..... ۴۴
۴-۳ تأثیر الیستیور *F. graminearum* روی بیان ژن آنزیمهای کلیدی بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۴۸
۴-۳-۱ تأثیر الیستیور روی بیان ژن *pmt* ۴۸
۴-۳-۲ تأثیر الیستیور روی بیان ژن *h6h*..... ۴۹
۴-۴ پیشنهادات ۵۱
منابع ۵۲

فصل اول- مقدمه

۱-۱ تیره سیب زمینی (Solanaceae)

تیره سیب‌زمینی(Solanaceae) دارای گیاهان علفی، درختچه‌ای یا بالارونده است و دارای آلکالوئیدهای متنوع می باشد. برگها متناوب و مارپیچی، فاقد گوشوارک و با گل آذین محدود است. گلها دو جنسی با تقارن شعاعی هستند، کاسبرگها معمولاً ۵ تائی، پیوسته، پایا و گاهی همراه با نمو میوه بزرگ می شوند. گلبرگها ۵ تائی، پیوسته، قیفی یا زنگوله‌ای، پرچمها معمولاً ۵ عدد و برچه معمولاً ۲ تاست. تخمکها، در هر خانه تخمدان، به تعداد زیاد وجود دارد، گاهی تحلیل رفته به یک عدد، در هر خانه است. میوه معمولاً سته یا کپسول میباشد (Judd *et al*. 2002).

۱-۲ مشخصات گیاه شناسی شابیزک

جنس شابیزک *Atropa* با ارتفاع ۱-۲ متر، با برگهائی متناوب و بیضی شکل، گلهائی با کاسبرگهای بلند در هنگام میوه‌دهی، ۲- ۳/۵ سانتیمتر طول، استوانه‌ای– فنجانی شکل، دمگل بلند، میوه سته با رنگ مشکی یا به ندرت زردست (Schonbeck-Temesy 1972) شکل۱-۱.

شکل۱-۱ گیاه شابیزک *Atropa belladonna* L.

۱-۳ آلکالوئیدها

آلکالوئیدها به گروهی از متابولیتهای ثانویه با وزن مولکولی کم گفته می شود که از آمینو اسیدها سنتز شده و دارای یک یا چند اتم نیتروژن در ساختار هتروسیکلیک خود هستند و غالباً بعنوان ترکیبات دفاعی در برابر حمله جانوران و میکروارگانیسمها می باشند (Facchini 2001 ؛ Heldth 2004). از آنجائی که آلکالوئیدها ترکیباتی قلیائی اند، به شکل نمک در واکوئلها، با pH اسیدی، ذخیره می شوند. در تروپان آلکالوئیدها، حلقه تروپان، یک هتروسیکل (ناجور حلقه) است و اتم نیتروژن در ساختار دو حلقه واقع می شود (Heldth 2004) و مجموعه‌ای از متابولیتهای ثانویه در این دسته قرار می‌گیرند (کوکائین، آنیزودامین، هیوسیامین، اسکوپولامین و آنیزودین و ....). از اینرو پراکندگی و کموتاکسونومی تروپان آلکالوئیدها در تیره‌های Solanaceae، Convolvulaceae، Erythroxylaceae، Proteaceae، Euphorbiaceae، Rhizophoraceae و Cruciferaea مورد بررسی قرار گرفته است (Griffin and Lin 2000). تروپان آلکالوئیدها در خانواده‌های مختلفی از گیاهان یافت می شوند که از نظر تاکسونومی نزدیک بهم نیستند ولی استرهای تروپیک اسید از مشتقات هیدروکسی تروپان (مثل هیوسیامین و اسکوپولامین) به تیره Solanaceae محدود می شود (Hashimoto and Yamada 1986). البته Biastoff و همکاران وجود نورتروپانها (فرم متیله تروپان آلکالوئیدها) مثل کالیستژین رادر راسته Solanales (Solanaceae و Convolvulaceae) گزارش کردند (Biastoff *et al*. 2009). محل تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین در همه اندامهای گیاه و بیشترین تجمع در ایدئوبلاستهای برگها و ساقه در مرحله رویشی در گیاه *Datura stramonium* گزارش شده است (Facchini 2001 ؛ Iranbakhsh *et al*. 2006 ؛ آشناگر و همکاران ۱۳۷۹) و غیر از تأثیر مراحل مختلف رشد ونمو عوامل محیطی مانند ارتفاع منطقه، میزان نیتروژن، فسفر و پتانسیم خاک روی میزان تولید آلکالوئیدهای تروپان در گیاه *Hyoscymus pusillus* نیز تأثیر می گذارد (بهمن زادگان جهرمی و همکاران ۱۳۸۷).

۱-۴ اهمیت اقتصادی آلکالوئیدهای این تیره

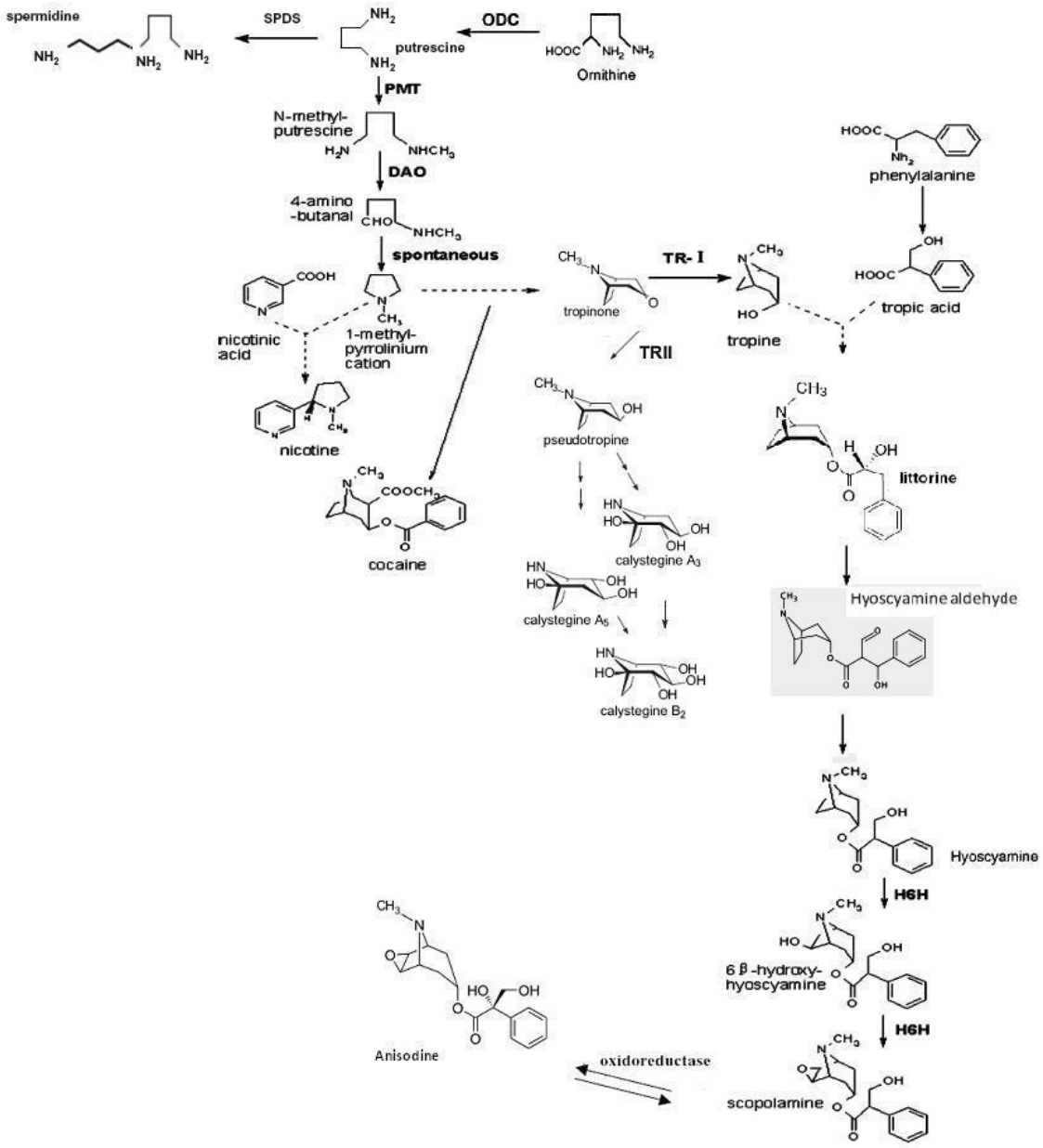
در تیره سیب زمینی Solanaceae جنسهائی مثل *Datura*، *Atropa*، *Anisodus*، *Hyocyamus*، *Scopolia* و *Brugmansia* به لحاظ دارا بودن تروپان آلکالوئیدها جزو منابع داروئی محسوب می شوند(Kai *et al*.2011 b ؛ Judd *et al*. 2002).

این دسته از آلکالوئیدها بدلیل آن که آنتاگونیست رقابتی برای گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین محسوب می شوند و روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک اثر می گذارند (Matsuda *et al*. 1991)، فعالیت اعصاب پاراسمپاتیکی که به عضلات و غده‌ها می رسند را کاهش می دهند. آتروپین (مخلوط راسمیک D و L هیوسیامین) در درمان بیماریهای اعصاب و روان و همچنین در تهیه داروهای ضد تهوع و ضد دریازدگی، همچنین در گشاد کردن مردمک چشم کاربرد دارد (بهمن زادگان جهرمی و همکاران ۱۳۸۷). آتروپین همچنین در خنثی کردن گازهای شیمیایی ارگانوفسفاتی نظیر توبان، سارین، سومان و VX استفاده می شود. بدلیل عوارض نامطلوب هیوسیامین روی دستگاه عصبی مرکزی، اسکوپولامین را در تسکین ناراحتیهای معده (Saidon 2008)، ناراحتیهای عصبی، پارکینسون، صرع، آسم و سیاه سرفه تجویز می کنند (بهمن زادگان جهرمی و همکاران ۱۳۸۷). ترکیبات دیگری نظیر آنیزودامین، به اندازه آتروپین سمی نیست و نسبت به اسکوپولامین اثرات منفی کمتری روی دستگاه عصبی مرکزی دارد (Kai *et al*.2011 b). همچنین در کنترل شوکهای سمی، عفونی، گلومرولونفریت (نوعی نفریت مویرگهای کلیه)، آرتریت روماتیسمی، درد شکم وابسته به قولون به کار می رود (Cardillo *et al*. 2008). از سوی دیگر آنیزودامین و آنیزودین اثر حفاظتی روی آسیب شدید ریوی ناشی از اولئیک اسید دارد (Kai *et al*.2011 b).

۱-۵ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها

از آنجائی که پوترسین پیش ساز پلی آمینها (مثل اسپرمیدین و اسپرمین) و تروپان/پیریدن آلکالوئیدهاست (Zhang *et al*. 2007)، لذا مراحل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها (متابولیتهای ثانویه) با متابولیسم پلی آمینها (متابولیتهای اولیه) مشترک است (Facchini 2001؛ Biastoff *et al*. 2009). پوترسین N – متیل ترانسفراز (PMT) یک متیل ترانسفراز وابسته به S- آدنوزیل متیونین است که مونومتیلاسیون دی آمین پوترسین و تبدیل آن به N – متیل پوترسین را کاتالیز می کند. N – متیل پوترسین اکسید و به صورت خود به خودی حلقوی شده و به کاتیون فعال N – متیل پیرولیدیوم تبدیل می شود. این ترکیب که حلقه پیرولیدین در نیکوتین و تروپان آلکالوئیدها را تشکیل می دهد، سپس با استواستیک ترکیب و هایگرین را بعنوان پیش ساز حلقه تروپان بوجود می آورد، یا با نیکوتینیک اسید ترکیب و نیکوتین را تشکیل می دهد، هر چند آنزیم شناسی این مراحل شناخته شده نیست. تروپینون که در نقطه انشعاب مسیر تروپان آلکالوئیدها قرار گرفته توسط آنزیم تروپینون ردوکتازI (TRI) به α-3- تروپین و توسط آنزیم تروپینون ردوکتازII (TR II) به β- 3- تروپین (سودوتروپین یا ψتروپین) احیا می شود که β- 3- تروپین پیش ساز انواع کالیستژینها است (Facchini 2001؛ Biastoff *et al*. 2009 ؛ Richter *et al*. 2005 ؛ Zhang *et al*. 2007). لیتورین یک استر از تروپین و فنیل لاکتیک اسید (تروپیک اسید مشتق شده از فنیل آلانین) به هیوسیامین تبدیل می شود. دو مکانیسم برای تبدیل لیتورین به هیوسیامین وجود دارد: یکی تبدیل وابسته به S آدنوزیل متیونین و دیگری فرآیند دو مرحله‌ای که با دخالت سیتوکروم P450 و الکل دهیدروژناز صورت می گیرد. ممکن است مسیر اصلی تروپان آلکالوئیدها تبدیل مستقیم لیتورین به هیدروکسی لیتورین باشد و هیدروکسی لیتورین پیش ساز هیوسیامین، اما کمتر بودن محتوای هیدروکسی لیتورین نسبت به لیتورین و هیوسیامین پیشنهاد می کند که مسیر دیگری با نوآرائی لیتورین به هیوسیامین بایستی وجود داشته باشد. در این مسیر در ساختار لیتورین به واسطه سیتوکروم P450 مونواکسیژناز اکسیداسیون و نوآرائی صورت می گیرد و تبدیل به هیوسیامین آلدهید می شود و سپس با هیدروکسیلاسیون به هیوسیامین تبدیل می گردد و می تواند مسیر اصلی برای تشکیل هیوسیامین باشد(Al

Balkhi *et al*. 2011). هیوسیامین سپس با هیدروکسیلاسیون توسط آنزیم هیوسیامین6-β هیدروکسیلاز (H6H) به 6-β هیدروکسی هیوسیامین (آنیزودامین) تبدیل و آنیزودامین دوباره توسط فعالیت اپوکسیداسیون آنزیم H6H به اسکوپولامین تبدیل می شود (Cardillo *et al*. 2008 ؛Facchini 2001). درنهایت اسکوپولامین طی یک واکنش اکسیداسیون احیا هیدروکسیکه شده و به آنیزودین تبدیل می گردد (Kai *et al*. 2011 b) شکل ۱-۲.



شکل۱-۲ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها

۱-۶ آنزیمهای کلیدی مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها

۱-۶-۱ پوترسین N- متیل ترانسفراز(PMT)

توالی cDNA آنزیم پوترسین N- متیل ترانسفراز(PMT, EC 2.1.1.53) مشابه اسپیرمیدین سنتاز گیاهی است و مشابهت کمتری با دیگر متیل ترانسفرازها دارد. پوترسین N – متیل ترانسفراز با ۴ موتیف آمینو اسیدی با اسپرمیدین سنتاز(SPDS) و اسپیرمین سنتاز(SPMS) تفاوت دارد. تشابه توالی *pmt* و *spds*، ساختار مشابه اگزون -اینترون پیشنهاد می کند که طی تکامل متابولیسم آلکالوئیدها، *pmt* از *spds* مشتق شده است و ژنهای *pmt* بصورت مضاعف شدگی و تغییر در عملکرد ژن تکامل یافته اند. در گیاهان خارج از Solanaceae مثل Brassicaceae، Proteaceae هیچ آنزیم یا ژنی که دلیل بر تکامل بیوسنتز آلکالوئیدها در این خانوادهها باشد، وجود ندارد. تحقیقات نشان داده است که با افزایش بیان ژن *pmt* در کشت ریشه موئین، گیاه تراریخت و کشت ریشه *Atropa belladonna* افزایشی در میزان هیوسیامین و اسکوپولامین مشاهده نشده ولی در کشت ریشه *Hyoscyamus muticus* هیوسیامین ۲ برابر شد. افزایش بیان *pmt* وابسته به گونه است و حتی در دو گونه نزدیک بهم نیز مسیر متابولیسمی مشابه بطور متفاوت تنظیم می شود. *pmt* بعنوان اولین آنزیم محدود کننده سرعت در بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها شناخته شده است (Biastoff *et al*. 2009؛ Zhang *et al*. 2007).

آنالیز الگوی بیان وابسته به اندام گیاهی در گیاه *Anisodus acutangulus*، مشخص کرد که AaPMT1 بویژه در ریشه است و در ساقهها و برگها با غلظت کمتر حضور دارد. در حالی که AaPMT2 با بیان کمتر در اندامهای مذکور، نسبت به AaPMT1 است و نشان می دهد که *pmt* جزو ژنهای مستقل از اندام و در واقع یک ژن نهادی است و بیشترین بیان را در ریشه، نسبت به ساقه و برگ دارد (Kai *et al*. 2009). مکان یابی هیستوشیمیایی فعالیت GUS در گیاهان تراریخت *A. belladonna* نشان می دهد که بیان *pmt* تنها به دایره محیطیه ریشه محدود می شود که دسترسی بیشینه به پوترسین و اورنیتین با بارگیری از فلوئم را فراهم میکند (Facchini 2001).

۱-۶-۲ آنزیم تروپینون ردوکتاز I و II (TR I و TR II)

ترویپنون ردوکتاز I بعنوان اولین آنزیم مهم محدود کننده سرعت بیوسنتز تروپان آلکالوئیدهاست، وقتی در کشت ریشه گیاه *A. belladonna* ، ژن *tr I* مورد افزایش بیان قرار گیرد، میزان تروپین بیشتر و سودوتروپین کمتری تجمع پیدا می کند. البته با وجود افزایش تروپین، استری شدن و تشکیل تروپیک اسید یک عامل محدود کننده در تشکیل هیوسیامین می باشد. بهرحال، بیش بیانی این ژن موجب افزایش چشمگیر در تجمع هیوسیامین و افزایش پنج برابری در تولید اسکوپولامین شده است (Richter *et al.* 2005). در مقابل افزایش بیان ژن *tr II* سبب افزایش سودوتروپین و انواع کالیستژینها می گردد و در عین حال بدلیل عدم تغییر در غلظت تروپین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین نیز بدون تغییر می ماند (Richter *et al.* 2005). مکان یابی هیستوشیمیایی فعالیت گلوکورونیداز در گیاه تراریخت *A. belladonna* و ریشه *Hyoscyamus niger* نشان داده است که آنزیم TR I در اندودروم و پوسته خارجی و آنزیم TR II در دایره محیطیه، اندودرم و پوسته داخلی وجود دارد. مکان یابی TR I در سلولهای مختلف نسبت به PMT و H6H نشان می دهد که حد واسطهای بین PMT و TR I از دایره محیطیه به اندودرم رفته و همان حد واسط بین TR I و H6H به دایره محیطیه بر می گردد (Facchini 2001 ؛ Richter *et al.* 2005).

۱-۶-۳ آنزیم هیوسیامین6-β هیدروکسیلاز (H6H)

مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که هیوسیامین6-β هیدروکسیلاز(H6H, EC 1.14.11.11) متعلق به خانواده دی اکسیژناز وابسته به ۲- اکسوگلوتارات است و آنزیم H6H با یک اتم از اکسیژن مولکولی، سبب دکربوسیله شدن ۲- اکسوگلوتارات شده و سوکسینات و CO_2 را تولید می کند و اتم دیگر اکسیژن، هیدروکسیلاسیون هیوسیامین را کاتالیز می کند. فعالیت اپوکسیداسیون H6H نسبت به هیدروکسیلاسیون کمتر است و احتمالاً علت آن جایگاه اتصال مشابه هیوسیامین و آنیزودامین می باشد. ساختار دوم آنزیم

بیشترمارپیچ آلفا است که با اتصال دو سوبسترای ۲- اکسوگلوتارات و هیوسیامین، تغییر ساختار می دهد و بیشتر صفحات β خواهد بود (Pramod *et al*. 2010). مطالعات نشان داده است که آنزیم H6H یک پروتئین ۳۸کیلو دالتونی است (Kai *et al*. 2007). سازماندهی اگزون – اینترون آنزیم H6H بسیار شبیه به آنزیمهای تشکیل اتیلن است که منشا تکاملی یکسانی را نشان می دهد. از طرف دیگر ژن فلاونون ۳- هیدروکسیلاز کد کننده اکسیژناز غیرهمی است و در ارتباط با بیوسنتز هورمونهای گیاهی و رنگدانه‌ها است و مشابه ژن H6H میباشد و ممکن است اجداد ژن *h6h* باشد (Kanegae *et al*. 1994). ارتباط تکاملی بین *Aah6h* و دیگر ۲- اکسوگلوتارات دی-اکسیژناز در گیاهان تیره Solanaceae نشان داده است که *h6h* در گیاهان تولید کننده اسکوپولامین در یک کلاد و دیگر ۲- اکسوگلوتارات دی-اکسیژناز از گونه‌های دیگر Solanaceae در کلاد دیگری قرار می گیرند (Kai *et al*. 2007). دو دسته نتیجه در مطالعات مکان یابی آنزیم H6H وجود دارد که بیانگر تفاوت در انحصاری بودن آنزیم H6H در بافت ریشه است. ۱- آنالیز نورترن بلات ژن *h6h* را در گیاه *A. belladonna* فقط در کشت ریشه این گیاه ثابت کرد و در ریشه، ساقه و برگ عدم حضور این آنزیم مشخص شد (Kanegae *et al*. 1994). همچنین در مطالعه‌ای دیگر آنالیز وسترن بلات پروتئین DmH6H با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال خرگوش ویژه HnH6H مشخص کرد که باند ۳۹ کیلو دالتونی فقط در ریشه وجود دارد، در ادامه آنالیز نورترن بلات mRNA ژن H6H ، فقط در ریشه شناسائی شد و نهایتcDNA از ریشه ساقه و برگ که باRT-PCR تقویت شده بود،cDNA ژن H6Hرا تنها در ریشه *Datura metel* آشکار کرد (Pramod *et al*. 2010). ۲- مطالعات Vakili و همکاران نسخه رونوشت H6H را هم در کشت بخش هوائی و هم در کشت ریشه *A. belladonna* تأیید کرد (Vakili *et al*. 2012). همچنین بیان نهادی و مستقل از بافت *Aah6h* در گیاه کامل *Anisodus acutangulus* گزارش شده است (Kai *et al*. 2007). مطالعات اینگونه تفسیر شده اند که در گیاه *A. belladonna*بیان ژن *h6h* در بخش هوائی و ریشه گیاه کامل کم است، لذا روشی مثل نورترن بلات برای تائید حضور و بیان ژن *h6h* کارآمد نیست و روشهای مولکولی جهت تقویت حضور و بیان ژن، مانند RT-PCRکارآمدی بهتری دارد.

مطالعات گروه اول تنها می تواند به محل اصلی سنتز تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در بافت ریشه و محل تجمع اصلی این آلکالوئیدها در بخش هوائی حکم کند و مطالعات گروه دوم به چند توانی بودن سلولهای گیاهی در کالوس و بیان بسیار کم ژن h6h در بخشهای هوائی گیاهان تولید کننده اسکوپولامین اشاره می کند.

مطالعات مکان یابی به روش ایمونو هیستوشیمیایی بافت برگ، ساقه و ریشه همچنین بافت کشت ریشه مؤئین پیشنهاد می کند که H6H تنها در سلولهای دایره محیطیه ریشه‌های جوان و ریشه موئینه حضور دارد و آنالیز هیستوشیمیایی نشان داد که بیان GUS هم در دایره محیطیه و هم در مریستم ریشه موئین تراریخت *H. niger* و *A. belladonna* در سلولهای آوندی دور و در ناحیه طویل شدن و در مریستم ریشه رخ می دهد (Kanegae *et al*. 1994).

۱-۷ کشت ریشه موئین

۱-۷-۱ کشت ریشه موئین

اگر چه اسکوپولامین از طریق شیمیایی نیز سنتز می گردد، اما بدلیل پیچیدگی ساختار شیمیایی و طولانی بودن مسیر سنتزی محصول کم و گرانقیمت تمام می شود (Kai *et al*.2007)، لذا جزو ترکیبات با منشاء طبیعی در نظر گرفته می شود. هیبریداسیون بین گونه‌ای در جنسهای *Datura*، *Brugmansia* و *Duboisia* نیز انجام شده است. در اکوادور از سال ۱۹۶۸ هیبریدهای *Brugmansia* و *Datura* برای تولید اسکوپولامین کشت شده است. اما بدلیل محدودیتهای جغرافیائی وکوتاه بودن عمر مفید کشتزار (Griffin and Lin 2000)، زراعی کردن گیاهان تولید کننده این دسته ترکیبات مقرون به صرفه نیست. از طرفی تولید متابولیتهای ثانویه غالباً در کشتهای غیر تمایز یافته کالوس و کشتهای تعلیقی کند و ناپایدارست و از طرف دیگر تولید تروپان آلکالوئیدها (بر خلاف برخی متابولیتهای ثانویه مثل شیکونین) وابسته به درجه‌ای از تمایز یافتگی ساختار سلول است (Sevon and Oksman-Caldentey 2002). همچنین بیشترین میزان آنزیم H6H در سلولهای دایره محیطیه ریشه می باشد (Pramod *et al*. 2010)