Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

افزایش تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین در گیاهان اتوتتراپلوئید پایدار بذرالبنج مصری

اسماعیل دهقان[1]*، الناز قطبی راوندی[2]، حسنعلی نقدی‌بادی[3]، عباس تنهاییان[4]، بهمن حسینی[5]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد سلولی تکوینی گیاهی، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۳- دانشیار پژوهش، گروه کشت و توسعه گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
٤- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
٥- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه، ارومیه
*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی
کدپستی: ۹۱۷۷۹٤۸۹۷۸، تلفن: ۸۷۹٦۸۱۸ (۰۵۱۱) نمابر: ۸۷۸۷٤۳۰ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: es.dehghanshahreza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/٦ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۳/۱۹

چکیده

مقدمه: دستورزی سطح پلوئیدی گیاهان همواره با بروز تغییرات چشمگیر در خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی همراه می‌باشد و از آن به عنوان راهبردی مؤثر جهت اصلاح الگوی کمی و کیفی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مختلف استفاده شده است. بذرالبنج مصری نژاد قاهره از منابع مهم تولید آلکالوئیدهای تروپانی مخصوصاً هیوسیامین و مقدار اندکی اسکوپولامین بوده که در دهه‌های اخیر مطالعات مختلفی جهت بهبود تولید این ترکیبات، مخصوصاً اسکوپولامین به روی آن انجام شده است.

هدف: بررسی پایداری سطح پلوئیدی پس از القاء تتراپلوئیدی در گیاه بذرالبنج مصری (***Hyoscyamus muticus***) و بررسی تغییرات کمی و کیفی الگوی تولید آلکالوئیدهای تروپانی پس از دستورزی سطح پلوئیدی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، ابتدا گیاهان اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری جهت تأیید پایداری سطح پلوئیدی با استفاده از روش‌های مورفولوژیک، میکروسکوپی و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج آلکالوئیدهای تروپانی از برگ‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به عمل آمد و غلظت هیوسیامین، اسکوپولامین و تروپین توسط دستگاه **GC-MS** اندازه‌گیری شد.

نتایج: مقایسات مورفولوژیک، میکروسکوپی و فلوسایتومتری پنج نسل پس از القاء تتراپلوئیدی، در راستای یکدیگر نشان‌دهنده پایداری سطح پلوئیدی بودند. هر چند با تغییر سطح پلوئیدی غلظت تروپین تغییر نیافته بود ولی نتایج نشان‌دهنده افزایش تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین در برگ و ریشه گیاهان تتراپلوئید بود به نحوی که الگوی تولید آلکالوئیدهای تروپانی به سمت اسکوپولامین تغییر یافته بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به ارزش تجاری بیشتر اسکوپولامین نسبت به سایر آلکالوئیدهای تروپانی، تغییر سطح پلوئیدی می‌تواند روش مناسبی جهت اصلاح و بهبود کیفیت تولید در گیاه بذرالبنج مصری باشد.

گل‌واژگان: آلکالوئیدهای تروپانی، بذرالبنج مصری، پلی‌پلوئیدی، تتراپلوئیدی، فلوسایتومتری، **GC-MS**

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

مقدمه

بذرالبنج مصری با نام انگلیسی Egyptian henbane و نام علمی *Hyoscyamus muticus* از گیاهان دارویی بسیار مهم خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) با ۲۸= ۲x = ۲n می‌باشد که از منابع ارزشمند آلکالوئیدهای تروپانی مانند هیوسیامین و به میزان کمتری اسکوپولامین (هیوسین) و آتروپین است [۱]. این آلکالوئیدها از تمام بخش‌های هوایی این گیاه قابل استخراج بوده و دارای خواص آنتی‌کلینرژیک با تأثیر بر سیستم عصبی پاراسمپاتیک می‌باشند. این ترکیب‌ها برای آرام نمودن علایم بیماری پارکینسون، گشاد نمودن مردمک چشم (در جراحی چشم)، افزایش ضربان قلب و کاهش ترشح عرق و اسید معده مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱،۲،۳]. بذرالبنج مصری بومی مناطق نیمه بارانی مصر، سودان، عربستان، ایران، افغانستان و شمال هند است و در ایران در نواحی مرکزی، جنوبی و جنوب شرقی گزارش شده است [۱۳].

بذرالبنج مصری می‌تواند به عنوان یک محصول تجاری مهم در مناطق خشک حاره‌ای آفریقا مورد استفاده قرار گیرد و از طرفی علاوه بر تأمین هیوسیامین و اسکوپولامین صنایع داروسازی محلی، سهمی نیز در صادرات داشته باشد. بذرالبنج مصری دارای آلکالوئید بسیار بیشتری نسبت به *H. niger* می‌باشد که در حدود ۹۰ درصد آن را هیوسیامین تشکیل داده است. هر چند این گیاه بیشتر از طبیعت مخصوصاً از مصر جمع‌آوری می‌شود، ولی به عنوان یکی از منابع تجاری مهم تولید آلکالوئید محسوب می‌شود. همچنین کشت و کار تجاری اندکی از این گیاه در کالیفرنیا انجام می‌شود [٤].

اهمیت پلی پلوئیدی در کشاورزی به خوبی شناخته شده است. گیاهان پلی پلوئید دارای سازگاری اکولوژیکی بیشتری می‌باشند و امکان استقرار و بقاء تحت شرایط سخت را دارند. همچنین به نظر می‌رسد که پلی پلوئیدی باعث افزایش فعالیت ژنی و تنوع آنزیمی، سرعت فتوسنتز بالاتر همگام با تنفس کمتر، تأخیر در گلدهی اما تداوم بیشتر آن، سرعت رشد کمتر اما تحمل بیشتر به تنش‌های شوری، خشکی و تغذیه‌ای و سبب افزایش مقاومت به بیماری‌ها می‌شود [٥،٦]. پلی پلوئیدی اغلب با افزایش اندازه سلولی و تغییرات قابل ملاحظه در متابولیسم ثانویه همراه می‌باشد. زمانی که مانند اکثر گیاهان دارویی، اندام‌های رویشی گیاه منبع متابولیت‌های ثانویه باشند، دستورزی سطح پلوئیدی مانند مضاعف‌سازی مستقیم کروموزومی (اتوپلی پلوئیدی) یا آلوپلی‌پلوئیدی روشی سریع در بهبود تولید ترکیب‌های ارزشمند دارویی می‌باشد [٦]. معمولاً برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌های گیاهان پلی پلوئید نسبت به دیپلوئید همتای خود بزرگ‌تر بوده و با توجه به اینکه در اغلب گیاهان دارویی فقط از برگ، ساقه و ریشه‌ها استفاده می‌شود، عقیمی و عدم تولید بذر ناشی از القاء پلی‌پلوئیدی به اندازه گیاهان زراعی در آنها اهمیت ندارد [۷].

محققین با تیمار کلشی‌سین موفق به تولید گیاهان اتوتتراپلوئید *H. niger* با اندازه ظاهری بزرگ‌تر شدند. گیاهان تتراپلوئید به دست آمده نسبت به گیاهان شاهد، ۲۲/۵ درصد آلکالوئید بیشتری تولید می‌کردند [۸]. همچنین تولید گیاهان اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری با پتانسیل تولید آلکالوئید حدود یک و نیم برابر نسبت به گیاهان شاهد گزارش شده است [۱]. مطالعه‌های قبلی نیز نشان داده که اتوپلی‌پلوئیدی در گیاهانی از قبیل بنگدانه (*Hyoscyamus spp*)، شابیزک (*Atropa belladonna*) و تاجریزی (*Solanum nigrum*) با افزایش شدید متابولیت‌های ثانویه به ازاء واحد وزن خشک همراه بوده است [۹]. با این وجود، تاکنون استفاده از تکنیک القاء پلی‌پلوئیدی فقط در مورد تعداد اندکی از گیاهان دارویی گزارش شده است [۱۰].

روش‌های سنتی شمارش کروموزومی به ویژه در گیاهانی مانند بذرالبنج مصری تتراپلوئید (٥٦= ٤x = ٢n) که عدد کروموزومی آن بالاست با مشکلات زیادی همراه است. از سوی دیگر روش‌های مورفولوژیک و میکروسکوپی و غیره نیز از دقت بالایی در غربالگری گیاهان تتراپلوئید برخوردار نمی‌باشند. در این راستا از تکنیک رو به پیشرفت فلوسایتومتری به صورت فزاینده‌ای جهت جدا نمودن گیاهان

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

با سطوح پلوئیدی مختلف استفاده شده است [۱۱،۱۲]. این تکنیک قادر به شناسایی تیپ‌های مختلف سلولی با سرعت و دقت بالا و همچنین هزینه مناسب می‌باشد.

با توجه به عدم تحقیقات کافی در این زمینه و اهمیت زیاد و نیاز روزافزون جامعه به داروهایی با منشا گیاهی، هدف از این تحقیق، بررسی ثبات و پایداری افزایش سطح پلوئیدی، همچنین تأثیر تتراپلوئیدی در الگوی تولید آلکالوئیدهای تروپانی به منظور امکان استفاده اصلاحی از این تکنیک در گیاه دارویی بذرالبنج مصری می‌باشد. پروفیل فلوسایتومتری بخش‌های مختلف بذرالبنج مصری و مقایسه آن با گونه خویشاوند بذرالبنج سیاه نیز مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور دیپلوئید و اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری (نژاد قاهره) که قبلاً در اثر تیمار کلشی‌سین (۲/ درصد) از ناحیه مریستم انتهایی (در مرحله ۸ – ٦ برگچه‌ای به مدت ٢٤ ساعت) به روش اتصال پنبه به دست آمده بودند [۱۳] در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که بذور اتوتتراپلوئید پس از القاء برای حداقل پنج نسل متوالی، کشت شده بودند. بذور پس از جوانه‌زنی در پتری‌دیش به گلدان‌های بزرگ حاوی رس – ماسه – هوموس به نسبت ۱:۱:۱ منتقل و در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط فتوپریود ۸ :١٦ نور و تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدود بیست روز پس از آغاز گلدهی و زمانی که میوه‌ها شروع به رسیدن کرده بودند نمونه‌برداری جهت استخراج آلکالوئید انجام شد. سه گیاه دیپلوئید و سه گیاه تتراپلوئید انتخاب و از برگ‌های مختلف آنها نمونه‌برداری به عمل آمد. برگ‌های جمع‌آوری شده توسط فریز درایر کاملاً خشک و پودر شده و در فریزر ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌گیری از ریشه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید نیز در نسل هفتم به همین طریق انجام شد.

مقایسه‌های مورفولوژیک و میکروسکوپی

مقایسه مورفولوژیک گیاهان تتراپلوئید و شاهد شامل مقایسه جثه، اندازه برگ، اندازه گل و بذر این گیاهان بود. همچنین از اپیدرم زیرین برگ گیاهان تتراپلوئید و شاهد به طور جداگانه نمونه‌هایی تهیه گردید و به روی لام در کنار یکدیگر قرار داده شدند و پس از چکاندن یک قطره آب مقطر و قرار دادن لامل بر روی آنها توسط میکروسکوپ نوری با عدسی شیئی × ٤٠، اندازه روزنه‌های آنها نیز مقایسه شد.

آزمایش‌های فلوسایتومتری

آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partec pA, Germany) مجهز به لامپ arc-UV بر طبق روش گا (Gu) و همکاران (۲۰۰۵) انجام پذیرفت. در این بررسی از برگ‌های کاملاً رشد یافته (حدوداً یک ماهه) همچنین سایر اندام‌ها مقاطعی به اندازه تقریباً ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) بر روی آنها ریخته شد و با تیغ تیز به نحوی که از له شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع موردنظر به خوبی خرد شد. محلول به دست آمده از فیلترهای مخصوص دستگاه با قطر منافذ ۳۰ میکرومتر عبور داده شد و ۱۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته ٤ و ٦– دی آمیدینو –۲ فنیل ایندول (DAPI، محلول B کیت) به آن اضافه شد و پس از ٦٠ – ۳۰ ثانیه برای شمارش به دستگاه داده شد [١٤]. به طور معمول برای هر نمونه تعداد حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه بررسی و پیک‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار Mode Fit LT 3.1 تفسیر شدند. آنالیزهای فلوسایتومتری برای نسل هفتم نیز با شرایط مشابه تکرار شدند.

استخراج آلکالوئیدهای تروپانی و شرایط دستگاه GC-MS

حدود ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های لیوفیلیز شده برگ گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید (نسل ۵)، همچنین ریشه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید (نسل ۷) توزین شده و با ۲ میلی‌لیتر پترولیوم اتر لیپیدزدایی شدند. بعد از ورتکس و سانتریفوژ (۳۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه) فاز حلال تخلیه شد و باقیمانده نمونه با استفاده از جریان نیتروژن خشک شد. پس از اضافه نمودن ۵۰ میکروگرم هموآتروپین (Sigma) به عنوان استاندارد داخلی، نمونه‌ها قلیایی (pH 9) شده

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

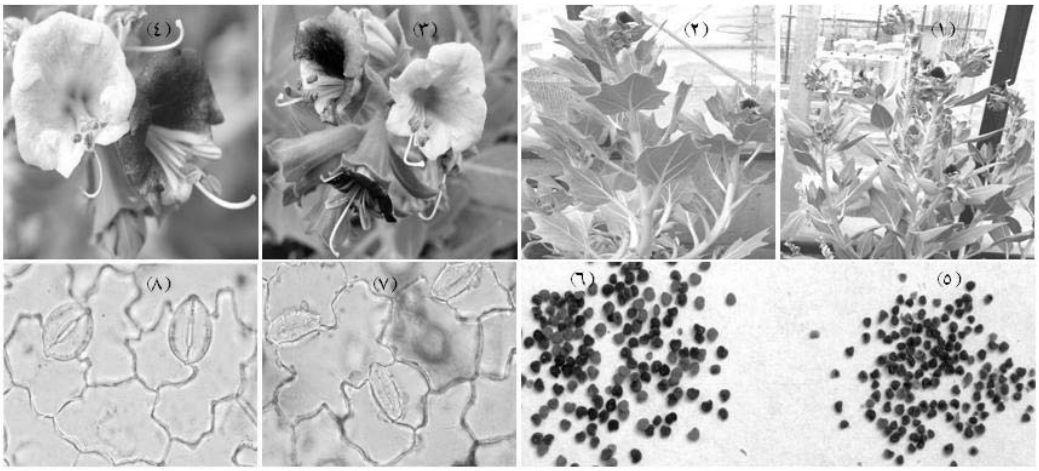
و آلکالوئیدها برای دو بار توسط Cl2CH2 استخراج شدند. قبل از آنالیز GC-MS نمونه‌های خشک در ٤٠ میکرولیتر Cl2CH2 حل شده و مشتق‌سازی آنها توسط (N-methyl-N-trifluoroacetamide) MSTFA (Pierce) انجام شد [١٥].

آنالیز GC-MS بر اساس روش هاکینن و همکاران (٢٠٠٥) به این شرح بود. ٣ میکرولیتر از نمونه‌ها به کروماتوگراف گازی ٥٨٩٠ (Hewlett–Packard) متصل به یک آشکارساز انتخابی جرمی کوآدروپول (quadrupole detector mass selective) ٥٩٧٠ (Hewlett–Packard) تزریق شد. آنالیز بر روی ستون مویینه سیلیکا فیوز شده NB-54 (NB-54 fused silica capillary column) (١٥ متر طول، ٠/٢٠ میلی‌متر قطر داخل؛ HNU-Nordion، Helsinki) انجام شد. دمای آون نیز از ١٠٠ تا ٢٥٠ درجه سانتی‌گراد با تغییر ٧ درجه سانتی‌گراد به ازای هر دقیقه تنظیم شده بود. دمای تزریق کننده و آشکارساز ٢٥٠ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان هر آنالیز نیز ٣٠ دقیقه در نظر گرفته شده بود. برای هر نمونه سه مرتبه تزریق انجام شد و آلکالوئیدها و مشتقات آن طبق داده‌های طیفی GC-MS به دست آمده از مطالعات هارتمن (Hartmann) و همکاران (١٩٨٦) و ویته (Witte) و همکاران (١٩٨٧) شناسایی شدند [١٥،١٦،١٧]. هیوسیامین (Merck)، اسکوپولامین هیدروبروماید (Sigma) و تروپین (Sigma) نیز به عنوان ترکیب‌های استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

تفاوت‌های مورفولوژیک بین بذرالبنج مصری دیپلوئید و تتراپلوئید

ویژگی‌های مورفولوژیک گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به منظور امکان استفاده از آنها در تعیین تتراپلوئیدی احتمالی مورد ارزیابی قرار گرفت. هر چند که گیاهان تتراپلوئید جثه قوی‌تری داشتند ولی اندازه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید با هم تفاوت زیادی نداشت. به همین ترتیب گیاهان تتراپلوئید دارای ساقه، برگ، گل، بذر و سلول‌های نگهبان روزنه درشت‌تری نسبت به گیاهان دیپلوئید بودند به نحوی که مقایسه چشمی آنها به راحتی امکان‌پذیر بود (شکل شماره ١). در حقیقت یکی از اثرات عمومی القاء تتراپلوئیدی در بذرالبنج مصری همان‌طور که از سلول‌های محافظ روزنه (شکل شماره ١) مشخص است، افزایش اندازه سلولی می‌باشد. لازم به ذکر است که افزایش عقیمی و کاهش تولید بذر برای گیاهان تتراپلوئید در این مطالعه مشاهده شد، با این وجود این میزان کاهش تولید بذر مخصوصاً در مقایسه با مطالعه لاوانیا و همکاران (١٩٨٦) چشمگیر نبود به نحوی که مانع توسعه کشت و کار آن شود.



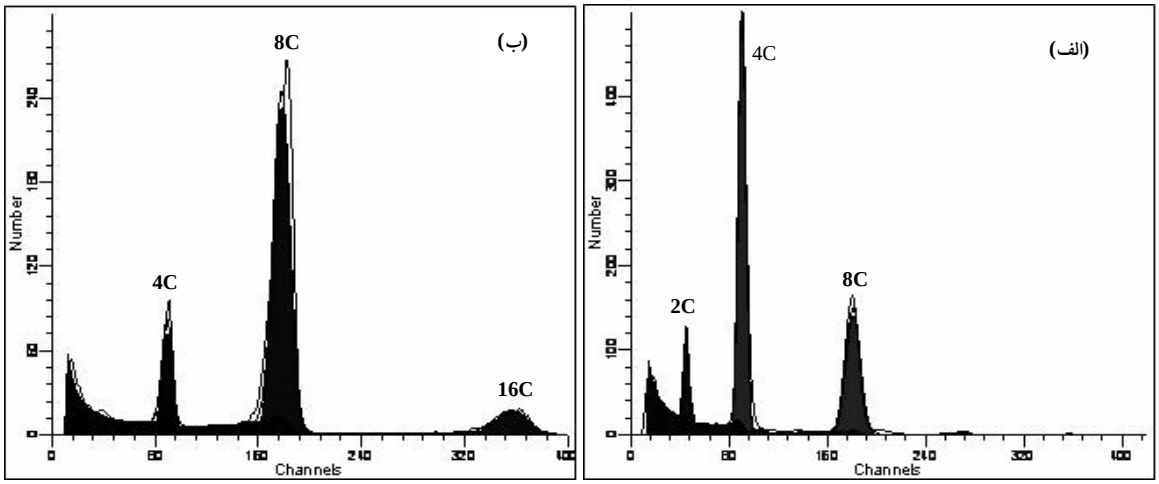
شکل شماره ١- مقایسه ظاهری جثه، گل، بذر و سلول‌های نگهبان روزنه (بزرگنمایی ٤٠×) گیاهان دیپلوئید [١،٣،٥،٧] و تتراپلوئید [٢،٤،٦،٨] بذرالبنج مصری نژاد قاهره

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

نتایج آزمایش‌های فلوسایتومتری

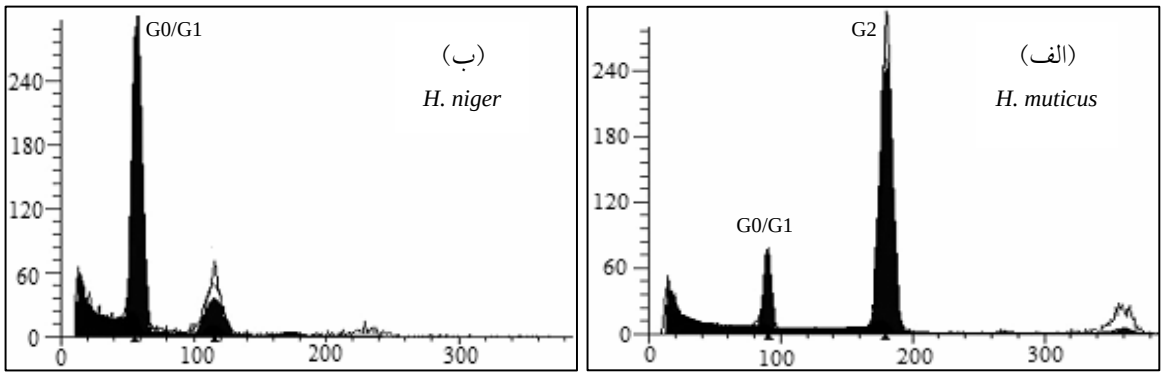
آنالیز فلوسایتومتری برای گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید انجام شد. لازم به ذکر است که آزمایش‌های فلوسایتومتری برای هفت نسل متوالی ادامه یافت به نحوی که از ثبات سطح پلوئیدی اطمینان کافی حاصل شد. همان‌طور که در شکل شماره ۲ دیده می‌شود ارزش تمام پیک‌ها در نمونه (ب) در نسل پنجم پس از القاء تتراپلوئیدی تقریباً دو برابر گیاه دیپلوئید بود. پیک G1 گیاهان تتراپلوئید تقریباً بر روی کانال ۸۵ قرار دارد در حالی که پیک G1 نمونه شاهد کانال ٤٠ را نشان می‌دهد. نمونه‌های دیپلوئید دارای پیک G2 روی کانال ۸۵ بودند که بیانگر هسته‌های با DNA مضاعف شده می‌باشد در حالی‌که وجود پیک G2 گیاهان تتراپلوئید بر روی کانال ۱۷۰ حاکی از مقدار DNA دو برابر آنها نسبت به نمونه‌های دیپلوئید است. نکته جالب در این شکل وجود یک پیک اضافی با ارزش ۸ C و ١٦ C در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید حاکی از وجود تعدادی از سلول‌های پلی‌پلوئید در نمونه‌های برگی است که نشان‌دهنده رخداد پدیده اندوردوپلیکیشن (مضاعف‌شدگی ژنوم بدون میتوز) در برگ‌های این گیاه است.

یکی از مشاهده‌های جالب در رابطه با بذرالبنج مصری توقف اکثر سلول‌ها در G2 فاز سلولی است. مطالعات فلوسایتومتری انجام شده بر روی گونه‌های مختلف گیاهی توسط مولف (برای مثال گیاهان زرشک، سرخدار، بابونه، ریحان، ذرت، نخود، بنفشه آفریقایی، گوجه‌فرنگی، کاسنی، نوروزک و غیره) و همچنین تحقیقات انجام شده توسط محققان مختلف نشان دهنده توقف اکثر سلول‌های برگی رشد یافته در فاز G0/G1 سلولی می‌باشد [٧،١١،١٢،١٤]. همان‌طور که در شکل شماره ٤ دیده می‌شود گیاه *H. niger* به عنوان گیاهی هم‌جنس و نزدیک به *H. muticus*، مانند سایر گیاهان از روندی کاملاً طبیعی در سیکل سلولی برخوردار بوده به نحوی که اغلب سلول‌های برگ‌های رشد یافته آن در فاز G1 متوقف شده و درصد کمی از آنها در G2 به سر می‌برند، که این روند کاملاً با گیاه بذرالبنج مصری در تضاد است (شکل شماره ۳).

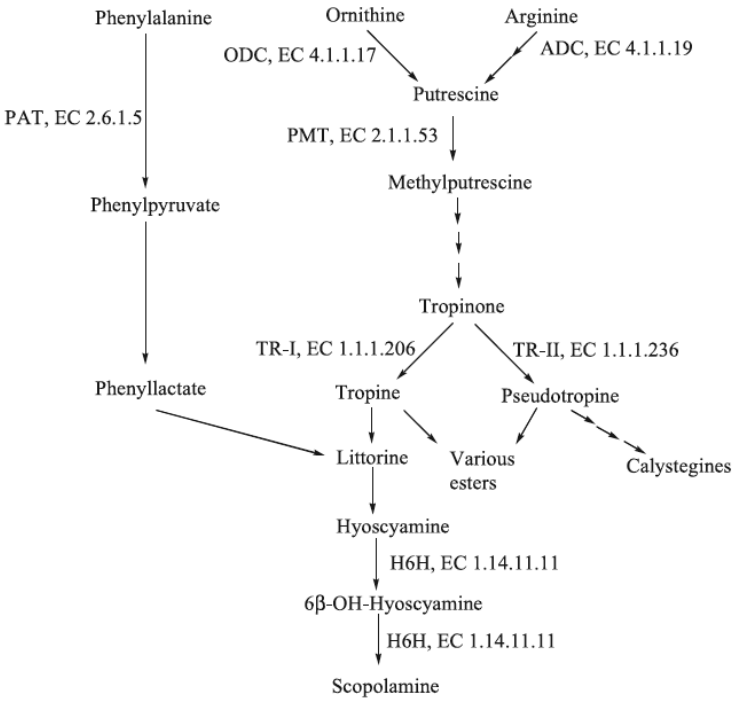


شکل شماره ۲- پروفیل فلوسایتومتری گیاهان دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) بذرالبنج مصری نژاد قاهره

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018



شکل شماره ۳- پروفیل فلوسایتومتری گیاهان بذرالبنج مصری (الف) در مقایسه با بذرالبنج سیاه (ب)



شکل شماره ٤- مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی

آنالیز سایر اندام‌های گیاه بذرالبنج مصری مانند ساقه، گل و ریشه در طول سه نسل نشان داد که این پدیده در برگ‌های محورهای گل‌دهنده گیاه (نزدیک گل آذین) در شدیدترین حالت بوده و در سایر اندام‌ها از شدت کمتری برخوردار است.

نتایج آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی

مطالعات مختلف، روش GC-MS را به عنوان یکی از بهترین روش‌های جداسازی و شناسایی ترکیب‌های پیچیده

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

آلکالوئیدهای تروپانی معرفی نموده است [۱۵،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱]. در مطالعه حاضر نیز سه ترکیب مهم اسکوپولامین، هیوسیامین و تروپین توسط روش GC-MS در برگ‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بذرالبنج مصری نژاد قاهره مورد آنالیز قرار گرفتند (جدول شماره ۱). بارزترین نتیجه تتراپلوئیدی افزایش حدود ۲۰۰ درصد اسکوپولامین به ازاء کاهش میزان تولید هیوسیامین می‌باشد. درصد اسکوپولامین به هیوسیامین در گیاهان تتراپلوئید شدیداً تغییر یافته و از حدود ٦ به ۳۸ درصد افزایش یافته است. آنالیز GC-MS نمونه‌های ریشه در نسل هفتم گیاهان تتراپلوئید و مقایسه آن با گیاهان شاهد نیز افزایش حدود ۵ برابری اسکوپولامین را نشان داد.

بحث

مطالعات نشان داده است که تأثیر پلی‌پلوئیدی می‌تواند وابسته به ژنوتیپ باشد و حتی یک آستانه محدودکننده تغییرات بیومس در برابر پلی پلوئیدی وجود داشته باشد [٦]. از سوی دیگر افزایش سطح پلوئیدی در گیاه *Mentha arvensis* که یک گونه پالئوپلوئید (پلی پلوئید اجدادی) است با مقاومت و برگشت پلی پلوئیدی به حالت پایه در طول زمان همراه بوده است که این امر به نوعی بیانگر وجود محدودیت در اتوپلی‌پلوئیدی است [٦]. بنابراین اثبات پایداری سطح پلوئیدی و حتی صفات تغییر یافته ناشی از آن در پروژه‌های دستورزی عدد کروموزومی، مسأله مهمی است که اصلاح‌گران بایستی به آن توجه کافی داشته باشند. در این تحقیق نیز بررسی پایداری سطح پلوئیدی با روش‌های مختلف شامل صفات ظاهری، اندازه سلولی و فلوسایتومتری پنج نسل پس از القاء تتراپلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت. افزایش اندازه سلولی یکی از اثرات عمومی القاء تتراپلوئیدی در این گیاه می‌باشد. به نظر می‌رسد که این یک اثر ژنتیکی است و افزایش اندازه را تقریباً در همه اندام‌ها به همراه دارد. همان‌طور که انتظار می‌رفت گیاهان تتراپلوئید اندام‌های رویشی و زایشی درشت‌تری داشتند که این نتیجه موافق با نتایج سایر محققان می‌باشد [۷،۸،۹،۱۰،١٤].

درشت‌تر بودن بذور گیاهان تتراپلوئید فاکتور بسیار مناسبی در جداسازی و گزینش این گیاهان در توده‌های مخلوط بذرالبنج می‌باشد به نحوی که با انتخاب بذور درشت‌تر، شانس به دست آوردن گیاهان تتراپلوئید افزایش خواهد یافت. همان‌طور که انتظار می‌رفت سلول‌های تتراپلوئید بذرالبنج مصری بزرگتر از نمونه‌های دیپلوئید بودند. این امر به وضوح در سلول‌های نگهبان روزنه مشخص بود (شکل شماره ۲). به طور کلی اندازه سلول‌های نگهبان روزنه از فاکتورهای بسیار مناسب در شناسایی گیاهان تتراپلوئید از دیپلوئید می‌باشد ولی فاکتور صد در صد مطمئن، مخصوصاً در شناسایی نمونه‌های شیمر (مخلوط دیپلوئید و تتراپلوئید) از تتراپلوئید خالص نمی‌باشد. افزایش اندازه سلولی یکی از سریع‌ترین و گسترده‌ترین پیامدهای پلی‌پلوئیدی می‌باشد [٦]. حجم سلول‌های تتراپلوئید معمولاً حدود دو برابر و سطح غشای آنها حدود یک و نیم برابر سلول‌های دیپلوئید می‌باشد که این باعث بزرگتر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی‌پلوئیدی می‌شود [۲۲].

جدول شماره ۱- غلظت تعدادی از آلکالوئیدهای تروپانی در برگ و ریشه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بذرالبنج مصری ۲۰ روز پس از آغاز گلدهی*

بافت گیاهی	سطح پلوئیدی	تروپین mg/g DW	هیوسیامین mg/g DW	اسکوپولامین mg/g DW	٪ اسکوپولامین به هیوسیامین
برگ	دیپلوئید (2x)	^{a}۰/۰۲ ± ۰/۰۵	^{a}۲/۰۲ ± ۰/۱۳	^{b}۰/۱۲ ± ۰/۱۳	^{c}۵/۷
برگ (نسل ۵)	تتراپلوئید (4x)	^{a}۰/۰۲± ۰/۰٦	^{c}۰/۹۵± ۰/۰٦	^{a}۰/۳٦± ۰/۰۸	^{a}۳۸/۱
ریشه	دیپلوئید (2x)	-	^{a}۲/۱۸ ±۰/۲٤	^{c}۰/۰٤ ±۰/۰۹	^{d}۱/۸
ریشه (نسل ۷)	تتراپلوئید (4x)	-	^{b}۱/٦۸ ±۰/۵٦	^{b}۰/۲±۰/۰۷	^{b}۱۲

*داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار بوده که به صورت SDMean± نشان داده شده است.

* حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

آزمایش‌های فلوسایتومتری حجم تقریباً دو برابر ژنوم (به صورت نسبی) گیاهان تتراپلوئید را نسبت به نمونه‌های شاهد اثبات نمود (شکل شماره ۲)، که به وضوح دلیل محکمی بر پایداری سطح پلوئیدی با گذشت زمان و تکثیر جنسی گیاه بذرالبنج مصری می‌باشد. به طور کلی نتایج مقایسه‌های مورفولوژیک در راستای نتایج فلوسایتومتری بود. بنابراین از آنها می‌توان به عنوان پارامترهای نسبتاً مناسبی جهت تعیین گیاهان تتراپلوئید استفاده نمود. در مجموع مشاهده‌های مختلف پایداری سطح پلوئیدی گیاهان تتراپلوئید را اثبات نمودند. لاوانیا و سریواستاوا (۱۹۸۸) با مطالعه بر روی کشت کالوس بذرالبنج مصری، پایداری نسبتاً بیشتر ژنوتیپ تتراپلوئید را نسبت به دیپلوئید گزارش نموده‌اند. در ضمن تحت شرایط درون شیشه، سلول‌های دیپلوئید تمایل زیادی به افزایش سطح پلوئیدی و رسیدن به تتراپلوئیدی نشان دادند [۲۳].

وجود هسته‌هایی با ارزش C ۸ و C ۱٦ ((Constant of DNA content) C= بیانگر ارزش C یا به عبارتی ارزش 1C که بیانگر مقدار DNA موجود در یک سلول هاپلوئید می‌باشد) نشان‌دهنده پدیده اندوردوپلیکیشن در برگ‌های دیپلوئید و تتراپلوئید بذرالبنج مصری می‌باشد. اندوردوپلیکیشن پدیده شایعی در سلسله گیاهی مخصوصاً نهاندانگان بوده که به جز سلول‌های گامت، مریستم و سلول‌های محافظ ممکن است در انواع مختلف سلول‌های گیاهی دیده شود [۲٤]. اغلب سلول‌های پلی‌پلوئید در بافت‌های در حال نمو مختلف مشاهده می‌شوند و با مرحله نموی آن‌ها در ارتباط می‌باشند، بنابراین به نظر می‌رسد که پلی‌پلوئیدی یکی از علایم تمایز می‌باشد [۲٥،۲٦]. با توجه به اینکه پدیده اندوردوپلیکیشن در گیاهان دیپلوئید و هم تتراپلوئید مشاهده شد، می‌توان به این نتیجه‌گیری رسید که سطح پلوئیدی تأثیری بر رخداد پدیده اندوردوپلیکیشن در این گیاه ندارد که با نتایج سایر محققان تطابق نداشته است [۲٥،۲۷،۲۸].

یکی از نکات جالب و منحصر به فردی که در مورد پروفیل فلوسایتومتری گیاه بذرالبنج مصری دیده شد زیادتر بودن درصد سلول‌های با DNA مضاعف شده (موجود در فاز G2 سیکل سلولی) در برگ‌های رشد یافته این گیاه است. در حالی که به طور طبیعی انتظار می‌رود اغلب سلول‌های یک بافت بالغ در فاز G1 متوقف شده باشند. این پدیده در برگ‌های مسن نزدیک انتهای محور گل گیاه شدیدتر بوده، به نحوی که به نظر می‌رسد یک عامل ناشناخته شدیداً سبب توقف سلول‌ها در فاز G2 و ممانعت از ورود آن‌ها به میتوز شده‌اند. هر چند طبق گفته تیم و اسلیوینسکا (Thiem and Sliwinska) (۲۰۰۳) فعالیت بیشتر سیکل سلولی و یا اندوردوپلیکیشن می‌توانند در تشدید این حالت مؤثر باشند [۲۹]، ولی در منابع، دلیل قاطعی برای این حالت ذکر نشده است. این فرآیند همچنین در بعضی از بافت‌های مسن و تمایز یافته، همچنین بافت‌های برگی در حال خواب بعضی از گیاهان (همچنین بعضی از گیاهان کشت شده این ویترو) دیده شده است. به هر حال وجود این پدیده در گونه بذرالبنج مصری می‌تواند ارائه دهنده موضوع جالبی برای تحقیقات فیتوشیمیایی، فیزیولوژیک و سیتولوژیک باشد. همان‌طور که در تحقیق حاضر دیده می‌شود تکنیک فلوسایتومتری نه تنها در تعیین سطح پلوئیدی و نشان دادن سیتوتایپ‌های مختلف کاربرد دارد، بلکه قادر به ارائه اطلاعات مفیدی در رابطه با وضعیت چرخه سلولی است.

همان‌طور که انتظار می‌رفت، پروفیل تولید آلکالوئیدهای تروپانی با افزایش سطح پلوئیدی تغییر یافت (جدول شماره ۱). بذرالبنج مصری گونه‌ای است که به میزان زیادی هیوسیامین و مقدار ناچیزی اسکوپولامین تولید می‌کند. این در حالی است که میزان تقاضای جهانی حدود ده برابر برای اسکوپولامین بیشتر می‌باشد [۳۰]. بنابراین تحقیقات زیادی بر روی بذرالبنج مصری (و سایر گیاهان دارای هیوسیامین زیاد) جهت افزایش تولید اسکوپولامین از طریق دستورزی کشت‌های ریشه مویین و مهندسی متابولیک انجام شده است [۳۰،۳۱،۳۲]. در تحقیق حاضر برای اولین بار، افزایش سه برابری تولید اسکوپولامین در برگ همچنین افزایش پنج برابری اسکوپولامین در ریشه در بذرالبنج مصری به واسطه اتوتتراپلوئیدی گزارش شده است. با توجه به اینکه آنالیز این

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

ترکیبات در نسل پنجم و هفتم پس از القاء تتراپلوئیدی انجام شده است، بر خلاف روش‌هایی مانند مهندسی متابولیک، انتظار می‌رود اثرات مشاهده شده پایدار باشد. در گیاهان تتراپلوئید هر چند غلظت تروپین، به عنوان پیش‌ساز هیوسیامین (شکل شماره ٤)، نسبت به نمونه دیپلوئید تغییری را نشان نمی‌دهد ولی تولید هیوسیامین کاهش یافته و در مقابل میزان اسکوپولامین بیشتری تولید شده است. به عبارت دیگر تتراپلوئیدی باعث تسریع و افزایش تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین در این گیاه می‌شود. لازم به ذکر است آنالیزهای صورت گرفته به روی گیاهان در نسل هفتم نیز افزایش تولید را نشان داد. نکته جالب دیگر افزایش چند برابری تولید اسکوپولامین در ریشه گیاهان تتراپلوئید در نسل هفتم بود. با توجه به ارزش تجاری بیشتر اسکوپولامین نسبت به سایر ترکیبات تروپانی، تغییر سطح پلوئیدی می‌تواند روش مناسبی جهت اصلاح و بهبود کیفیت تولید ترکیبات دارویی در گیاه بذرالبنج مصری در نظر گرفته شود.

افزایش محتوای اسکوپولامین در گیاهان تتراپلوئید می‌تواند به واسطه افزایش فعالیت ژن *h6h* باشد. تغییر در پروفیل متابولیتی در اتوپلی‌پلوئیدها را می‌توان به خاطر بر هم خوردن مکانیسم‌های متابولیک تنظیم‌کننده بیوسنتز ترکیبات منفرد توجیه نمود. اتوتتراپلوئیدی باعث افزایش فعالیت آنزیمی در سلول به ازای میلی‌گرم پروتئین در سیستم‌های مختلف شده است. در *Todea barbara*، رابطه مستقیم بین دز ژنی و فعالیت پراکسیدازی وجود دارد. به همین ترتیب، این رابطه برای الکل دهیدروژناز و استراز نیز در تعدادی از گیاهان گزارش شده است [٦].

همان‌طور که در شکل شماره ٤ دیده می‌شود مسیر بیوسنتزی هیوسیامین طوری می‌باشد که ابتدا اورنیتین به تروپین و فنیل آلانین به اسید تروپا تبدیل می‌شود و سپس از استریفیکاسیون تروپین با تروپا اسید، هیوسیامین تولید می‌شود که نهایتاً پس از اپوکسیده شدن به اسکوپولامین تبدیل می‌شود [٣٣]. پلی‌پلوئیدی باعث افزایش دز ژنی و فعالیت آنزیم‌ها به ازاء هر سلول می‌شود [٦]. بنابراین تغییر تولید آلکالوئیدهای تروپانی مخصوصاً اسکوپولامین می‌تواند به خاطر افزایش اپوکسیداسیون هیوسیامین به اسکوپولامین باشد.

بذرالبنج مصری گیاهی دگرگرده افشان و چند ساله بوده میزان عملکرد ماده خشک این گیاه در حدود ٢ تن بر هکتار و میزان عملکرد آلکالوئید آن ٣٠ – ٢٠ کیلوگرم در هکتار و بسته به ژنوتیپ (مخصوصاً در نژاد قاهره) حتی بالاتر نیز می‌باشد. نژاد (قاهره) مورد مطالعه در تحقیق حاضر از نژادهای پر تولید بوده که مخصوصاً با انجام گزینش در نمونه‌های تتراپلوئید می‌توان به گیاهان با عملکرد آلکالوئید و تولید بذر بالاتر دست یافت. کشت و کار این گیاه مخصوصاً در نواحی خشک می‌تواند حائز اهمیت باشد. از طرفی بذور بذرالبنج مصری حاوی مقادیری از اسیدهای چرب ضروری و ترکیبات زیست فعال محلول در چربی بوده که بر ارزش اقتصادی آن می‌افزاید.

منابع

1. Lavania UC Genetic improvement of Egyptian henbane, *Hyoscyamus muticus* L. through induced tetraploidy. *Theoretical and Applied Genetics* 1986; 73: 292 - 8.

2. Boulos L. Medicinal plants of North Africa. Reference Publication Inc, Michigan, 1983, 286 p.

3. Dehghan E, Ebadi MT, Naghdi Badi H, Shahriari F, Azizi M, Asghari GR. Review on new techniques in tropane alkaloids production (In Persian). *J. Medicinal Plants* 2010; 9 (33): 149 - 65.

4. Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach, third. Wiley, Chichester. 2009.

5. Levin DA. The Role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York. 2002, 240 p.

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018

6. Lavania UC. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources* 2005; 3: 170 - 7.

7. Koutoulis A, Roy AT, Price A, Sheriff L, Legget G. DNA ploidy level of colchicines – treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientica Horticulture* 2005; 105: 263 - 8.

8. Lavania, U.C., Srivastava, S. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Euphytica* 1991; 52: 73 - 7.

9. Dhawan OP, Lavania UC. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy. *Euphytica* 1996; 87: 81 - 9.

10. Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Xu DR. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Cell Tissue Culture* 1996; 47: 73 – 7.

11. Vanduren M, Dolezel J, Afza R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica* 1996; 88: 25 - 34.

12. Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. Flow cytometry with plants: An overview. In: Dolezel J, Greilhuber J, Suda J, editors. Flow Cytometry with Plant Cells. New York: Wiley; 2007, pp 41 – 66.

13. Dehghan E. Effects of artificial tetraploidy in transformed roots of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus*). MSc thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. 2009.

14. GU X.F, Yang A.F, Meng H, Zhang J. R. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Reproduction* 2005; 24: 671 – 6.

15. Häkkinen ST, Moyano E, Cusido RM, Palazon J, Pinol MT and Oksman-Caldentey KM. Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6β-hydroxylase. *J. Exp. Bot*. 2005; 420, 2611 - 8.

16. Hartmann T, Witte L, Oprach F, Toppel G. Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures. *Planta Medica* 1986; 52: 390 –5.

17. Witte L, Muller K, Arfmann H-A. Investigation of the alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gasliquid-chromatography-mass-spectrometry. *Planta Medica* 1987; 53: 192 – 7.

18. Berkov S, PavlovA, Kovatchevab P, Stanimirovaa P, and Philipov S. Alkaloid Spectrum in Diploid and Tetraploid Hairy Root Cultures of *Datura stramonium*. *Zeitschrift für Naturforschung* 2003; 58c: 42 – 6.

19. Christen P, Roberts M, Phillipson and Evans W. Alkaloids of hairy roots of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Rep*. 1990; 9: 101 - 4.

20. Ionkova I, Witte L and Alfermann HA. Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus* x gyorffii cultivated in vitro. *Planta Med*. 1994; 60: 382 - 4.

21. Witte L, Müller K and Alfermann HA. Investigation of alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gas-liquid-chromatography-mass spectrometry. *Planta Med*. 1987; 52: 192 - 7.

22. Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 1994; 264: 421 – 3.

23. Lavania UC and Srivastava S. Ploidy dependence of chromosomal variation in callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L. *Protoplasma* 1988; 145: 55 - 8.

24. Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Olah B, Roudier F, Kondorosi A, Kondorosi E. The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*. 1999; 18: 4476 – 87.

25. Mishiba K, Mii M. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandiflora*. *Plant Sci*. 2000; 156: 213 – 9.

26. Nagl W, Pohl J, Radler A. The DNA endoreduplication cycles. In: Bryant JA, Francis D, editors. The Cell Division Cycle in Plants, New York: Cambridge University Press; 1985, pp: 217 – 32.

27. Weber J, Georgiev V, Pavlov A and Bley T. Flowcytometric investigations of Diploid and tetraploid plants and in vitro cultures of *Datura Srtramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Cytometry A.* 2008; 73: 931 - 9.

28. Jovtchev G, Barow M, Meister A, Schubert I. Impact of environmental and endogenous factors on endopolyploidization in angiosperms. *Environ. Exp. Bot.* 2007; 60: 404 – 11.

29. Thiem B, Sliwinska E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. *Plant Sci*. 2003; 164: 129 – 34.

30. Palazon J, Navarro-Ocana A, Hernandez-Vazquez L and Mirjalili M. H. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules* 2008; 13: 1722 - 42.

31. Jouhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, Hiltunen R, H. Teeri T, Oksman-Caldentey K-M. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta*. 1999; 208: 545 - 51.

32. Zolala J, Farsi M, Gordan HR and Mahmoodnia M. Production a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agric. Sci.Technol*. 2007; 9: 327 - 39.

33. Oksman-caldentey, K.M. Production of scopolamine and hyoscyamine in some solanaceous plants and cell cultures. *Acta Fharm Finn*. 1986; 95: 49 - 58.

Downloaded from jmp.ir at 15:51 +0430 on Tuesday July 17th 2018