

ارزیابی تغییرات نیکوتین در گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum* L.) جهش یافته با T-DNAسمانه ستار^۱، غلامرضا اصغری^۱، علی اکبر احسانپور^{۲*}، فریبا امینی^۲

۱- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی

۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

۳- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۳

چکیده

هدف: گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) حاوی مقدار زیادی آکالوئید نیکوتین است که برای سلامتی انسان مضر است. دست‌ورزی‌های ژنتیکی از جمله انتقال ژن‌های مسدود کننده مسیر بیوسنتز نیکوتین، القاء موتاسیون، ایجاد تغییرات سوماکلونال و انتقال T-DNA به منظور القاء تغییرات مناسب ژنتیکی برای کاهش بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر تولید نیکوتین می‌تواند موجب تغییر در میزان نیکوتین در این گیاه گردد، لذا این تحقیق با هدف بررسی تغییرات نیکوتین در گیاهان توتون جهش یافته با T-DNA طراحی و انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر گیاهان جهش یافته K4 حاوی (T-DNA)، گیاهان حاوی Ri-TDNA، گیاهان باززائی شده از برگ و گیاهان طبیعی روی محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین تکثیر یافتند. سپس برگ‌های گیاهان جهش یافته و طبیعی جداگانه خشک و آسیاب شدند. عصاره استخراج شده توسط هگزان از بافت برگ، توسط TLC و GC از نظر کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: آنالیز عصاره‌های حاصله کاهش میزان نیکوتین در گیاه جهش یافته K4 و افزایش آن را در گیاهان باززائی شده و جهش یافته Ri-TDNA نسبت به گیاهان طبیعی مادری نشان دادند.

نتیجه گیری: احتمالاً تغییر در میزان نیکوتین در گیاهان جهش یافته و باززائی شده به خاطر فعال‌سازی ژن‌های آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آکالوئید نیکوتین در مورد گیاه جهش یافته حاوی Ri-TDNA و بالعکس خاموش شدن و یا کاهش بیان این ژن‌ها در گیاه جهش یافته K4 حاوی (T-DNA) می‌باشند.

واژگان کلیدی: توتون، جهش یافته، نیکوتین

مقدمه

در مورد اثرات فیزیولوژیکی و خواص سمی نیکوتین در انسان مطالعات نسبتاً وسیعی صورت گرفته است و امروزه به طور قطع نیکوتین در ردیف سموم با اثرات بسیار مضر برای سلامتی انسان معرفی می‌گردد. مشخص شده که با ورود این ماده به بدن انسان اختلالات فیزیولوژیک شدید در بدن ایجاد شده و با مقادیر زیاد حتی می‌تواند موجب مرگ شود (۱). گزارشات نشان می‌دهند که در سطح جهانی از سال ۱۹۶۷ تا سال ۱۹۹۲ مصرف سیگارهای تولیدی بیش از دو برابر شده است یعنی از ۲/۸ تریلیون به ۵/۷ تریلیون (۵/۷ میلیون میلیون) عدد یعنی حدود ۲۵ درصد مصرف افزایش سرانه سیگار در همین دوره زمانی رسیده است. در کشورهای توسعه یافته نتایج افزایش مصرف سیگار که طی دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۷۰ گسترش یافت، اکنون دیده می‌شود. تقریباً ۲۰ درصد کل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته در سال ۱۹۹۰ ناشی از مصرف فرآورده‌های دخانیات بوده است. در گروه سنی ۳۵-۶۹ سال حدود ۳۵ درصد از مرگ‌ها در بین مردان و ۱۵ درصد در بین زنان به علت مصرف دخانیات گزارش شده است (۱). سازمان بهداشت جهانی برآورد کرده است که در دهه ۲۰۳۰-۲۰۲۰ دخانیات عامل مرگ ۱۰ میلیون نفر در سال خواهد بود که ۷۰ درصد از این تعداد در کشورهای در حال توسعه اتفاق خواهد افتاد (۲).

آلکالوئید اصلی گیاه توتون نیکوتین است (۳). نیکوتین آلکالوئیدی مایع، دارای حالت روغنی و بیرنگ است اما اگر در مجاورت هوا قرار بگیرد ابتدا زرد رنگ و سپس قهوه ای می‌گردد که ماده‌ای بسیار سمی است (۱). یکی از راه‌کارهای مهم برای کاهش خسارت‌های ناشی از نیکوتین به سلامت انسان این است که مقدار نیکوتین موجود در توتون کاهش یابد. این کار با توقف و یا کاهش بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز نیکوتین امکان‌پذیر است. بنابراین، با استفاده از سامانه انتقال ژن توسط باکتری آگروباکتریوم می‌توان ژن‌های خارجی را به گیاه وارد کرد و میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله نیکوتین را تغییر داد (۴، ۵، ۶).

در جریان انتقال ژن توسط این باکتری بخشی از پلاسمید Ti که T-DNA (T-DNA = Transferred DNA) نامیده می‌شود وارد سلول گیاه شده و سپس در ژنوم گیاه ادغام می‌گردد. T-DNA در سوش‌های وحشی (Wild type) آگروباکتریوم حاوی ژن‌های ایجاد کننده غده (gall) (ژن‌های مولد اکسین و سیتوکینین) و همچنین تولید کننده اسیدآمینه‌های تغییر یافته‌ای به نام Opines می‌باشد. اوپین توسط سلول‌های گیاهی تراریخت شده تولید می‌شود و منبع کربن و نیتروژن سلول‌های آگروباکتریوم محسوب می‌گردد (۵، ۶). باکتری با استفاده از

گروهی از ژن‌ها به نام Vir genes به سلول گیاهی متصل و سپس یک نسخه از T-DNA خود را با مکانیزم مولکولی پیچیده و دقیق به هسته سلول گیاهی منتقل می‌کند. انتقال T-DNA بدون ژن‌های مولد غده به سلول گیاه می‌تواند در بیان ژن‌های موجود در گیاه تغییر ایجاد نموده به عنوان مثال موجب افزایش یا کاهش بیان و یا حتی روشن نمودن ژن‌های خاموش در سلول گیاه شود (۷، ۸).

تاکنون گزارشات زیادی در زمینه انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم به گیاه توتون منتشر شده است. به عنوان مثال، Alvarez و همکاران (۹) از ریشه‌های جهش‌یافته گیاه *N. tabacum* جهت تولید آنتی بادی 14D9 استفاده نمودند. در این آزمایش آنها تأثیر DMSO (Dimethyl sulfoxide)، PVP (Polyvinylpyrrolidone) و ژلاتین بر میزان تولید آنتی بادی را بررسی نمودند. Altosaar و همکاران (۱۰) فاکتور رشد وابسته به انسولین انسانی (hIGF-1) که یک پروتئین ضروری جهت رشد و تکامل جنین انسان می‌باشد را توسط توتون جهش یافته ایجاد نمودند.

پس از انتقال ژن به گیاه، اولین مرحله، بهینه‌سازی شرایط بازرزائی گیاه از قطعات جدا کشت گیاه می‌باشد. به عبارت دیگر تعریف سامانه بازرزائی برای یک گیاه از ضرورت‌های اولیه است. بازرزائی نشان دهنده توان یا ظرفیت توارثی یک سلول گیاهی منفرد برای ایجاد یک گیاه کامل است که به این پتانسیل پرتوانی اطلاق می‌شود (۱۱). تغییرات ژنتیکی مشاهده شده بین نسل‌های گیاهان جدید حاصل از کشت سلول‌های سوماتیک در شرایط آزمایشگاهی به عنوان تنوعات سوماکلونال تعریف می‌شود. این نوع تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر از جمله تغییر در مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد که از یک طرف از مشکلات کشت بافت محسوب می‌شود و از طرف دیگر می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های اصلاح نباتات به کار رود (۱۲). یکی از منابع القاء کننده تنوعات سوماکلونال، انتقال T-DNA به سلول گیاهی است. بنابراین گیاه جهش یافته حاوی T-DNA می‌تواند دستخوش این نوع دگرگونی ژنتیکی شود. با توجه به اهمیت حفظ سلامت جامعه و اثرات ناشی از نیکوتین، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات آلکالوئیدهای موجود در گیاهان توتون جهش یافته با T-DNA حاوی ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین و ژن بتا گلوکورونیداز به عنوان ژن‌های گزینش کننده و ژن‌های گزارشگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بزرگیاهان مورد استفاده در این پژوهش از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. ابتدا بذر گیاهان جهش یافته لاین

تشخیص کمی آلکالوئید نیکوتین با روش GC: برای آزمایش GC بر اساس روش Stamfil و همکاران (۱۵) ابتدا استوک نیکوتین با غلظت ۴۸٪ در آب مقطر تهیه شد و ۱۰۰ میلی لیتر محلول استخراج و ۲۵ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۸ نرمال به آن افزوده شد و در دمای ۴-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس از این محلول به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵، ۳/۷۵، ۶/۲۵ و ۱۰ میلی لیتر به بالن ژوژه های ۲۵ میلی لیتری به طور جداگانه انتقال داده شد و با محلول استخراج به حجم رسانده شد. به این ترتیب غلظت های ۰/۴۵، ۰/۶۷۵، ۱/۱۲۵ و ۱/۸ میلی گرم بر میلی لیتر نیکوتین تهیه شد (۴) سپس از این غلظت ها و همچنین عصاره حاصله از گیاهان جهش یافته و غیر جهش یافته هر کدام ۰/۵ میکرولیتر به طور جداگانه سه بار به دستگاه GC مدل (Hewlett Pakar 5890) تزریق شدند. شرایط دستگاه GC عبارت بودند از: ستون مورد استفاده OV1-capillary column، نوع دتکتور FID، دمای دتکتور ۲۸۰ درجه سانتی گراد، فاز متحرک (گاز حامل) N2 (نیتروژن)، Ramp Rate به ازای هر یک دقیقه ۱۵ درجه سانتی گراد افزایش دما.

کلید آزمایشات بر اساس طرح کامل تصادفی با حد اقل ۳ تکرار انجام گردید. میانگین داده های بدست آمده مورد آنالیز ANOVA قرار گرفت و میانگین ها بر اساس آزمون Tukey در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار Sigmatat version 2 مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج آنالیز TLC

در TLC انجام شده لکه های با Rf (retention factor) دقیقاً مشابه با Rf استاندارد نیکوتین مشاهده شد (Rf=0.1) که این لکه ها در نور UV، ۲۵۴ نانومتر دیده شدند. هم چنین این لکه ها با معرف دراژندرف هم رنگ نارنجی ایجاد نمودند. بنابراین وجود نیکوتین در هر دو گیاهان جهش یافته و غیر جهش یافته توتون ثابت شد (شکل ۱).

K4 (حاوی T-DNA)، Ri-TDNA و گیاهان باززایی شده از قطعات جدا کشت برگ و گیاهان غیر جهش یافته (شاهد) در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog) (۱۳) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در pH معادل ۵/۸ کشت گردیدند و گیاهان در اطاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور ۹۰ مول بر مترمربع ثانیه رشد داده شد و با فاصله هر ۴ هفته واکشت شدند.

استخراج آلکالوئیدها از گیاه: مقدار ۱۰ گرم برگ گیاهان تکثیر یافته در شرایط کشت در شیشه جدا شد و در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت خشک گردید و به صورت پودر در آمد. سپس یک گرم پودر از هر لاین گیاهی فوق به دقت توزین و با ۴۰ میلی لیتر محلول استخراج با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر (۱۰۰۰ میلی لیتر n-هگزان با ۰/۵ گرم هپتادکان به عنوان استاندارد داخلی)، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۸ نرمال عصاره گیری شد (۴). عصاره حاصل سریعاً با روش Thin layer TLC (Gas chromatography) آنالیز شد.

تشخیص کیفی آلکالوئید نیکوتین با روش TLC: برای انجام TLC از روش Wagner و همکاران (۱۴) با حلال حاوی آب، متانول، اتیل استات به ترتیب با نسبت ۵ : ۶/۲۵ : ۵۰ جهت تفکیک مطلوب نیکوتین استفاده شد. کاشتن لکه ها روی پلیت ۲ سانتی متر بالاتر از لبه و از دو طرف پلیت نیز با فاصله ۲ سانتی متر انجام شد. روی پلیت TLC حاوی سیلیکاژل 60F254 لکه مربوط به گیاه شاهد (غیر جهش یافته)، جهش یافته K4، جهش یافته Ri-TDNA، باززایی شده از هر کدام ۱۰ میکرولیتر با فواصل ۲ سانتی متر کاشته شدند و خط حرکت حلال نیز مشخص شد. پس از اتمام TLC و خشک شدن پلیت در هوای آزاد ابتدا معرف دراژندرف و بلافاصله بعد از آن معرف نیتريت سدیم روی پلیت اسپری شد. سپس در دستگاه UV اسپکتروفتومتری لکه ها در طول موج ۲۵۴ نانومتر شناسایی شدند (۵). این آزمایش در دو تکرار مجزا انجام گردید.



شکل ۱: نتایج آنالیز TLC مربوط به میزان تراکم نسبی نیکوتین در نمونه استاندارد نیکوتین و گیاهان مختلف باززایی شده از برگ، جهش یافته حاوی Ri-TDNA، K4 (جهش یافته حاوی T-DNA)، گیاه غیر جهش یافته.

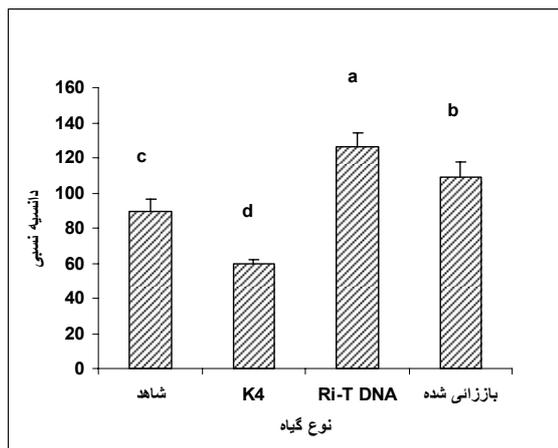
نتایج آنالیز GC

در بررسی آنالیز GC نمونه های استاندارد و عصاره های گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در مورد استانداردهای نیکوتین و نمونه های عصاره های گیاهی، قله مربوط به نیکوتین را به خوبی در طیف به دست آمده نشان داد. برای هر کدام از نمونه های استاندارد و عصاره های گیاهی سه تکرار انجام گرفت و میانگین گرفته شد و سپس نموداری براساس میانگین سطح زیر منحنی نیکوتین به استاندارد داخلی نسبت به غلظت نیکوتین رسم شد و از آنجا معادله ی خط به دست آمد. با استفاده از معادله خط به دست آمده و میانگین نسبت سطح زیر منحنی نیکوتین به استاندارد داخلی در عصاره های گیاهی غلظت نیکوتین در هر گیاه محاسبه گردید (شکل ۳). همانطور که شکل ۳ نشان می دهد مقدار نیکوتین در گیاه جهش یافته حاوی Ri-TDNA و گیاه باززایی شده نسبت به گیاه غیر جهش یافته افزایش معنی داری نشان داد ولی مقدار نیکوتین در گیاه جهش یافته حاوی K4 حاوی T-DNA نسبت به گیاه غیر جهش یافته به طور معنی داری کاهش یافت.

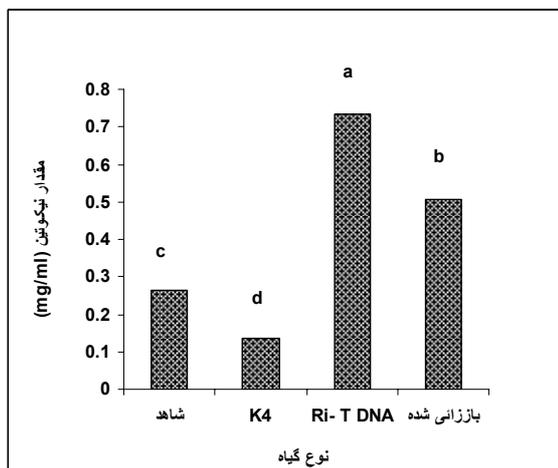
بحث

با توجه به اهمیت گیاه توتون از نظر مطالعات انتقال ژن و همچنین وجود نیکوتین در این گیاه (۸) در این تحقیق تغییر میزان آلکالوئید نیکوتین در گیاهان جهش یافته و غیر جهش یافته گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیزهای کمی آلکالوئیدها و همچنین بررسی دانسیته نسبی نیکوتین بیانگر وجود اختلاف معنی داری بین غلظت نیکوتین در اندام هوایی لاین های مختلف مورد بررسی می باشد. گیاهان باززایی شده و جهش یافته Ri-TDNA افزایش معنی داری در میزان نیکوتین نسبت به گیاه جهش یافته K4 و گیاهان غیر جهش یافته نشان دادند. به عبارت دیگر الگوی تغییرات دانسیته نسبی و میزان واقعی نیکوتین اندازه گیری شده توسط GC کم و بیش الگوی یکسانی را نشان داد. نتایج کاهش شدید و یا افزایش معنی دار نیکوتین را به ترتیب در گیاهان جهش یافته K4 و Ri-TDNA نشان داد. این طور استنباط می شود که در گیاهان جهش یافته K4 حاوی T-DNA و جهش یافته حاوی Ri-TDNA انتقال T-DNA به سلول های گیاهی احتمالاً بر میزان تولید نیکوتین اثر گذاشته است. نوع، شدت و میزان این تأثیر به عوامل مختلفی وابسته است که از جمله آنها می توان به نوع ژن، اندازه DNA انتقالی، تعداد نسخه T-DNA ادغام شده درون ژنوم سلول های گیاهی و به محل ادغام این نسخه ها اشاره کرد (۷، ۱۷، ۱۶، ۱۱). در حال حاضر در حد یک فرض می توان گفت احتمالاً انتقال DNA به ژنوم گیاه تنباکو از طریق

با استفاده از لکه های حاصل از کروماتوگرافی (TLC) دانسیته نسبی لکه های حاوی نیکوتین در همه ی نمونه ها با استفاده از نرم افزار ImageJ Version 4 محاسبه شد و نمودار مربوط رسم گردید (شکل ۲). همانطور که در شکل ۳ مشخص است دانسیته نسبی نیکوتین در گیاه جهش یافته K4 نسبت به گیاه غیر جهش یافته به طور معنی داری کاهش یافته و در گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA و گیاهان باززایی شده به طور معنی داری افزایش نشان داد.



شکل ۲: دانسیته نسبی نیکوتین در نتایج حاصل از آنالیز TLC. به ترتیب از راست: گیاهان باززایی شده از برگ، گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA، K4 (گیاهان جهش یافته حاوی T-DNA)، شاهد (غیر جهش یافته). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها بر اساس تست Tukey می باشد ($P < 0.05$).



شکل ۳: میزان آلکالوئید بر اساس آنالیز GC در گیاهان: به ترتیب از راست: گیاهان باززایی شده از برگ، گیاهان جهش یافته حاوی Ri-TDNA، K4 (گیاهان جهش یافته حاوی T-DNA)، گیاهان غیر جهش یافته. حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها بر اساس تست Tukey می باشد ($P < 0.05$).

منتشر نشده است)، انتخاب شدند بدیهی است برای توسعه دانش در این زمینه در آینده تعداد نسبتاً بیشتری از لاین‌های جهش یافته ارزیابی خواهد شد. در مجموع با توجه به وجود اطلاعات کم پیرامون اثرات ناشی از انتقال T-DNA مولد اکسین بر روی میزان آلکالوئیدهای گیاه توتون می‌توان به عنوان یک پیشنهاد اولیه برای بیان نحوه تأثیر انتقال ژن بر بیوسنتز آلکالوئیدها و ایجاد اختلاف معنی‌دار بین سطوح آلکالوئید در بین گیاهان مورد بررسی به این مورد اشاره نمود که اختلاف در میزان سنتز نیکوتین و انتقال آن به بخش هوایی در بین گیاهان مورد بررسی می‌تواند تا حدی علت بروز اختلاف سطح آلکالوئید را توجیه نماید (۱۱).

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Sabor ordobadi, A. [Cigaret and healty]. 1th Ed. Iran: Hoda company; 1366; 13-23. Persian.
2. Khaje daloei, M, Molavi nojomi, M. [Methods of control and checking of smoking]. 1th Ed. Iran: Seda company; 2003; 23-25. Persian.
3. Afsharipour, s. [Pharmacogenosy]. 1th Ed. Iran: University of Medical Science of Isfahan company; 2007. Persian.
4. Micheal T, Madigan J, John M, Parker J. Brock biology of micro oganisms prentice Hall International, Ine. Eight edition. UK; 1997.
5. Oietz A, Arndt N, Kay V, Bode J. Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in petunia. Transgenic Research. 2003; 12(1): 83-99.
6. Toth S, Scott P, Sorvari S, Toldi O. Effective and reproducibile protocols for *in vitro* culturing plant regeneration of the physiological model plant Ramonda myconi L. Plant Science. 2004; 12: 1027-1034.
7. Birch RG. Plant transformation. Problem and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. 1997; 48: 297-326.
8. Carl NMD. Rapid flowering Nicotiana tabacum L. Sex plant reproduction. 1999; 12: 123-124.
9. Alvarez MA, Giulietti AM, Martinez C, Petruccielli S. Expression of the antibody 14D9 in Nicotiana tabacum hairy roots. Electronic Journal of Biotechnology. 2005; 717-725.

فعال‌سازی مسیر رونویسی ژن‌های آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آلکالوئید نیکوتین در مورد گیاه جهش‌یافته Ri-TDNA و یا بالعکس، خاموش نمودن این مسیر در لاین K4، حاوی-T DNA عمل نموده است (۱۵، ۱۸).

از آنجائیکه در لاین حاوی Ri-TDNA، ژن‌های Aux که مولد هورمون اکسین است نیز وجود دارد بنابراین انتقال Ri-TDNA به گیاه توتون و افزایش میزان آلکالوئید در گیاه جهش یافته حاوی این ژن را شاید بتوان به اثرات فیزیولوژیک اکسین نیز نسبت داد چون اکسین در سلول‌های گیاهی باعث افزایش سنتز DNA، پروتئین‌ها و RNA و خصوصاً rRNA می‌شود و این مجموعه موجب تغییر بیان ژن‌ها می‌گردند بنابراین می‌توان استنباط نمود که این تغییر احتمالاً در میزان نیکوتین نیز موثر بوده است (۱۹). اگرچه در گزارش حاضر از انتقال T-DNA به گیاه توتون جهت القاء تغییرات میزان نیکوتین استفاده شده است ولی برخی پژوهشگران چنین تغییراتی را در میزان متابولیت‌های ثانویه با انتقال ژن‌های مسیر بیوسنتز این مواد گزارش نموده‌اند (۲۰، ۱۵).

در رابطه با علت اختلاف معنی‌دار بین سطح آلکالوئید گیاهان باززایی شده و گیاه جهش‌یافته K4 نیز می‌توان به این مسئله اشاره کرد که احتمالاً وقوع تغییرات ژنتیکی سوماکلونال در گیاهان باززایی شده با تأثیر بر ژن‌های مسیر بیوسنتز نیکوتین و یا با تأثیر در سایر فرایندهای فیزیولوژیک و کاتابولیسمی گیاه میزان تولید این آلکالوئید را تغییر داده است. تنوعات سوماکلونال نیز ممکن است منجر به تغییر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها از جمله نیکوتین شود که این تغییرات به صورت تصادفی رخ می‌دهد و ممکن است باعث افزایش یا کاهش تولید یک یا چند آلکالوئید شود. نظیر چنین تغییراتی قبلاً در سوسپانسیون سلولی گیاه یونجه نیز گزارش شده است به طوری که تنوعات سوماکلونال باعث افزایش میزان مقاومت به شوری در سوسپانسیون سلولی یونجه شده است که این کار با تغییر در بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پرولین صورت گرفته است (۱۲).

نتیجه گیری

قابل ذکر است که تاکنون در زمینه القاء جهش با استفاده از T-DNA به منظور تغییر میزان نیکوتین گزارشی در منابع علمی ارائه نشده است. بنابراین اولین سؤال این است که آیا اساساً چنین روشی می‌تواند در این تغییر موثر باشد؟ به همین منظور به عنوان یک کار مقدماتی و به منظور صرفه جویی در وقت صرفاً تعداد معدودی از لاین‌های جهش‌یافته که قبلاً از نظر برخی از صفات مورفولوژیک از جمله افزایش تعداد کرک برگ و تفاوت در الگوی رشد مطالعه شده بودند (داده‌های این مطالعه هنوز

10. Altosaar I, Belbaraka L, Belgoudi Y, Cheng X, Panahi M, Zaman A. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants. *Transgenic Research*. 2004; 13: 245-256.
11. Hille J, Wullems G, Schilperoot RA. Non oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* to transfer T-DNA into plant cells. *Plant Molecular Biology*. 1983; 2: 155-163.
12. Ehsanpour, AA, Amini, F. [Plant cell and tissue culture]. 2th Ed. Jahad University, Isfahan branch; 2003; 127-181. Persian.
13. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
14. Wagner H, Bladt S, Zaginski EM. *Plant drug analysis*. Translated by Scott. Berlin. Springer-Verlog. 1984; 86.
15. Stanfil SB, Jia LT, Ashley DJ, Watson CH. Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC/MS. *Journal Chromatography Science*. 2009; 47: 902-909.
16. Zupan JR, Zambryski PC. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cells. *Plant Physiology*. 1995; 107: 1041-1047.
17. Canel C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S, Vander Fits L, Pasquali G, Vander Heijden R, Hoge JH, Verpoorte R. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*. 1998; 205: 414-419.
18. Kuhelmeier C, Green PJ, Chua NH. Regulation of gene expression in higher plants. *Plant Physiology*. 1997; 38: 57-221.
19. Stanfill SB, Jia LT, Ashley DJ, Watson CH. Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC-MS. *J Chromatogr Sci*. 2009; 47(10): 902-909.
20. Altosaar I, Belbaraka L, Belgoudi Y, Cheng X, Panahi M, Zaman A. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants. *Transgenic Research*. 2004; 13: 245-256.

Evaluation of Nicotine Changes in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants Mutated by T-DNA

Sattar S¹, Asghari GHR¹, Ehsanpour AA^{2*}, Amini F³

1. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Medical Science of Isfahan, Isfahan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: ehsanpou@yahoo.com

Received: 4 Jul. 2011

Accepted: 27 Nov. 2011

Abstract

Aim: *Nicotiana tabacum* contains nicotine, which is used in cigarettes causing many health problems. Application of new technologies such as, plant tissue culture, genetic engineering in order to block the pathway of nicotine biosynthesis, and somaclonal variation can be used as tools to produce plants with a lower level of nicotine. The aim of this research is to evaluate nicotine changes in tobacco plants mutated by T-DNA.

Material and methods: In this research transgenic plants including K4 carrying T DNA, plants carrying Ri TDNA and regenerated plants from leaf and wild type plants (mother plants) were grown on MS medium containing kanamycin. Leaves were harvested and dried, and extracted with hexane as internal standard. Then analysed using TLC and GC.

Results: The analysis of the extracts showed that nicotine content decreased in line k4 (containing T-DNA) and increased in Ri-TDNA (plant containing Ri-TDNA) and regenerated plants compared to non mutated plants.

Conclusion: Variation of nicotine content in mutated plants might be related to the activation or inhibition of the key enzymes involved in nicotine biosynthesis pathway.

Keywords: Nicotine, Tobacco, Transgenic