مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال اول، شماره اول و دوم، پاییز و زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۸۸-۷۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۰۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۸/۱۲/۰۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۱

تغییرات محتوای آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین در برگ گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.) از رویشگاه واز- شمال ایران، در ارتباط با برخی عوامل فنولوژیکی و محیطی

فرح کریمی[۱*]، طیبه امینی اشکوری[۲]، امینه زینالی[۳]
[۱] دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام مازندران، نوشهر، ایران
[۳] پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، تهران

چکیده

آلکالوئیدها موادی بسیار متنوع هستند و برحسب خصوصیات بیوشیمیایی و شیمیایی در گروه‌های مختلفی قرار می‌گیرند. از میان آلکالوئیدهایی که از مشتقات اورنیتین هستند می‌توان از آلکالوئیدهای گروه تروپان، مانند آتروپین و اسکوپولامین نام برد که از آلکالوئیدهای عمده در گیاه شاهبیزک هستند. در این پژوهش گیاه *A. belladonna* از سه ایستگاه مختلف از منطقه واز- چمستان جمع‌آوری شد و عصاره متانولی آلکالوئید از پودر برگ این نمونه‌ها با سه تکرار تهیه گردید. مقدار آلکالوئید تام برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ اندازه‌گیری شد. به منظور سنجش تغییرات محتوای آتروپین و اسکوپولامین موجود در عصاره‌های آلکالوئیدی در فصول و ارتفاعات مختلف، بررسی HPLC روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با سه تکرار صورت گرفت. مطالعه نمونه‌های خاک ایستگاه‌ها بیشترین تخلخل و نفوذپذیری خاک و بیشترین نسبت کربن به نیتروژن را در ایستگاه سوم و کمترین آنها را در ایستگاه اول نشان داد. خاک هر سه ایستگاه فاقد شوری و از نظر pH، قلیایی ضعیف تشخیص داده شد. تأثیر ارتفاع بر محتوای آلکالوئید تام زیر سطح احتمال ۰/۱ معنی‌دار و همچنین تأثیر مشترک عوامل ارتفاع و فصل نیز زیر سطح احتمال ۰/۰۰۱ کاملاً معنی‌دار بود. محتوای آتروپین همواره بیش از اسکوپولامین بوده، بین برخی عوامل خاک و حضور این مواد رابطه‌ای معنی‌دار مشاهده شد. رابطه بین محتوای آلکالوئید تام و هر یک از آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در تمام موارد معنی‌دار بود.

واژه‌های کلیدی: آتروپین، اسکوپولامین، بلادون، تروپان آلکالوئید، شاهبیزک

مقدمه

شاهبیزک گیاهی‌است علفی، چند ساله، با ریشه‌های ضخیم، به ارتفاع ۱ تا ۲ متربا شاخهٔ زاویه‌دار و از قاعده منشعب که در حاشیه جنگل‌ها و زیر درختان می‌روید (خاتم‌ساز،۱۳۷۷). این گیاه از تیره سیب‌زمینی و مانند سایر گیاهان این تیره حاوی تروپان آلکالوئیدهاست.

نویسنده مسؤول مکاتبات
* fkarimi@shahed.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

آلکالوئیدها در انسان واکنش‌های فیزیولوژیک قوی همراه اثرات مخصوص ایجاد می‌کنند و به ویژه برسیستم عصبی اثر دارند. این مواد بسیار متنوع بوده، بر حسب خصوصیات بیوشیمیایی و شیمیایی در گروه‌های مختلفی قرار می‌گیرند. در میان آلکالوئیدهایی که از اورنیتین مشتق می‌شوند، می‌توان از آلکالوئیدهای گروه تروپان مانند آتروپین و اسکوپولامین نام برد (امید بیگی،۱۳۷۴).

به طور کلی، اثرات مهم این گیاه، ضد اسپاسم عضلات صاف، تخدیرکننده، کاهش عرق و مسکن است و در طب سنتی به عنوان آرام بخش معده و روده به کار می‌رود. در بیماری پارکینسون برای کاهش لرزش و سختی اعضا و افزایش قدرت تکلم و حرکت، همچنین به عنوان داروی بیهوشی تجویز می‌شود. خواص شل کنندگی عضلات صاف، این گیاه را در طب سنتی مفید کرده است (میرحیدر،۱۳۷۵).

از این گیاه برای کاهش تعرق شبانه در افراد مسلول استفاده می‌شود و از اثر گشادکنندگی مردمک چشم (میتری داتیسم) آتروپین در آزمایش‌های چشم پزشکی استفاده می‌گردد (زمان،۱۳۷۳).

هیوسیامین (آتروپین) یکی از ترکیبات اساسی آلکالوئید شاهبیزک با اثر قوی آنتی‌کولینرژیک است و به همین علت، در درمان قولنج کودکان (دردهای حاد شکمی) به کار می‌رود (Chevalier,1996). ماهیچه‌های صاف مسیر تنفسی در پاسخ به تحریک الکتریکی منقبض می‌شوند و این انقباض توسط گیاه شاهبیزک بر طرف می‌شود (Lotvall, 1994).

این گیاه همچنین از دیرباز در درمان افسردگی‌ها کاربرد داشته است. به علاوه، از آن در درمان زیادی بزاق و تهوع در دوران بارداری استفاده شده است (Freeman *et al*., 1994). شاهبیزک دارای خاصیت تخدیرکنندگی نیز هست (Perlik, 1997). تأثیر عصاره آبی گیاه شاهبیزک در التیام و رفع التهاب زخم‌ها نشان داده شده است (Gal *et al*., 2009).

سه آنزیم مهم در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها شامل هیوسیامین- ۶- بتا هیدروکسیلاز (H6H) تروپینون ردوکتاز I (TRI) و پوترسین N- متیل ترانسفراز (PMT) هستند. انتقال ژن هیوسیامین - ۶- بتا- هیدروکسیلاز از *هیوسیاموس نیجر* (بنگ دانه) تحت کنترل پروموتور ۳۵S ویروس موزائیک کلم به گیاه شاهبیزک که غنی از هیوسیامین است، موجب می‌شود که در گیاه تراریخت شدهٔ مزبور محتوای آلکالوئیدی تقریباً به طور کامل متشکل از اسکوپولامین باشد (Yun *et al*., 1992). فرابیان (over expression) هر یک از آنزیم‌های تروپینون ردوکتاز I و II می‌تواند به ترتیب موجب افزایش آلکالوئید گروه‌های تروپان و نیکوتین در کشت ریشه گیاه شاهبیزک شود (Richter *et al*., 2005).

با اینکه PMT اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه تروپان و نیکوتین در گیاهان تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) است، انتقال ژن آن، پس از تاگسازی از تنباکو به شاهبیزک و به عبارت دیگر، فرابیان آن در این گیاه موجب تغییر در محتوای آلکالوئیدی گیاه نمی‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد این آنزیم در گیاه شاهبیزک، محدودکننده سرعت بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان نباشد (Rothe *et al*., 2003).

با توجه به ارزش دارویی آلکالوئیدهای گیاه شاهبیزک، در این پژوهش، به منظور بررسی کمی و کیفی آلکالوئید نمونه‌هایی از این گیاه که در رویشگاه‌های طبیعی ایران می‌رویند و همچنین مطالعه اثرعوامل محیطی و فنولوژیکی بر کمیت و کیفیت این مواد، نمونه‌هایی از گیاه در مراحل

Archive of SID

www.SID.ir

مختلف دوره رویش، از ایستگاه‌های مختلف و در ارتفاعات مختلف مطالعه و بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی

ماده گیاهی مورد مطالعه برگ‌های گیاه *Atropa belladonna* L. بوده است که طی سه فصل بهار، تابستان و پاییز از ارتفاعات ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر جنگل واز در بخش چمستان از توابع نوشهر جمع‌آوری و تحت شرایط سایه و در دمای اتاق خشک شد و پس از آسیاب شدن مورد استخراج آلکالوئید تام (Total alkaloid) قرار گرفت.

مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

جنگل واز در طول ´۳۵ و °۵۲ شرقی و عرض ´۲۰ و °۳۶ شمالی قرار دارد. این منطقه در جنوب شهرستان نور و بخش چمستان واقع شده است. سه ایستگاه با مشخصات زیر در این منطقه انتخاب گردید:

ایستگاه ۱ : در فاصله بین روستاهای جوربند و وازتنگه در کناره جادهٔ جنگلی با ارتفاع ۵۰۰ متر، جهت دامنه شرقی، خاک دانه درشت برنگ قهوه‌ای روشن تا خاکستری با سنگ مادر آهکی؛

ایستگاه ۲: با ارتفاع ۱۰۰۰ متر در داخل جنگل، جهت دامنه غربی، خاک آن به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای و سنگ مادر آهکی؛

ایستگاه ۳ : با ارتفاع ۱۵۰۰ متر در کنار جادهٔ جنگلی، جهت دامنه غربی با خاکی به رنگ زرد تا قهوه‌ای بسیار روشن.

تهیه اطلاعات هواشناسی منطقه

اطلاعات مربوط به دما، رطوبت و بارندگی محدوده ایستگاه‌های فوق‌الذکر با استفاده از نرم‌افزار ایستگاه‌یابی سازمان هواشناسی کشور مربوط به ایستگاه‌های کلیماتولوژی، سینوپتیک و باران‌سنجی به دست آمد (آمار نامه‌های هواشناسی سال‌های ۱۹۸۶ تا ۱۹۹۸ سازمان هواشناسی کشور). شایان ذکر است از آنجایی که ایستگاه‌های سازمان هواشناسی دقیقاً در طول و عرض جغرافیایی مربوط به منطقه نمونه‌برداری مورد نظر وجود نداشت، اطلاعات مربوط به ایستگاه‌های هواشناسی اطراف آن استخراج شد و برای ترسیم منحنی آمبروترمیک استفاده گردید.

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری به صورت فصلی از برگ‌های گیاه صورت گرفت. همچنین در مراجعات انجام شده خاک ریزوسفر گیاه برای انجام بررسی‌های خاک‌شناسی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. اطلاعات فنولوژی گیاه نیز در مراجعات ماهانه یادداشت گردید.

تهیه عصارهٔ تام آلکالوئیدی

آلکالوئیدها از نمونه‌های آسیاب شدهٔ برگ گیاه با تلفیقی از روش‌های Kaufman *et al.*, 1999; Ashek *et al.*, 1997; DeAlbuquerque *et al.*, 1997 عصاره‌گیری شد. در روش به کار گرفته شده، نمونه‌ها ابتدا ۲۴ ساعت در اتانول ۵۰٪ رفلاکس شدند. سپس الکل توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تبخیر شد. عصاره حاصل در اسیدسولفوریک ۵٪ w/v حل شد و توسط دی اتیل اتر بیرنگ گردید. سپس pH عصاره توسط سدیم هیدروکسید N ۱۰ تا حدود ۱۰ افزایش یافت. در نهایت، عصارهٔ حاصل در سه مرحله درون دکانتور با کلروفرم شستشو داده شد. فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئیدها جمع‌آوری و توسط روتاری اواپوراتور کاملاً خشک شد. ته مانده عصاره توسط متانول حل شد و به حجم نهایی mL ۱۰ رسید.

Archive of SID

www.SID.ir

شایان ذکر است که استخراج آلکالوئید از هر نمونه سه بار تکرار گردید.

تعیین محتوای آلکالوئید تام در واحد وزن خشک برگ

برای تعیین محتوای آلکالوئید تام عصاره های گیاهی از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. به این منظور، از آلکالوئید آتروپین با مشخصات Fluka Art. 11320 به عنوان استاندارد استفاده شد و منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف این ماده در طول موج ۲۵۸ nm ترسیم گردید. با استفاده از منحنی استاندارد غلظت عصاره‌ها در طول موج ۲۵۸ nm به دست آمد (هاربون، ۱۳۵۸). به منظور محاسبهٔ دقیق مقدار آلکالوئید نسبت به وزن خشک برگ، میزان رطوبت بافت برگ نیز به دست آمد و از وزن بافت مورد آزمایش کسر گردید. به این منظور، مقدار معینی از پودر برگ خشک شده در دمای اتاق به دقت توزین شد و به مدت ۴۸ ساعت درون دستگاه آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دید و مجدداً توزین گردید. کاهش وزن حاصل مربوط به رطوبت بافت است که از وزن اولیه کسر شد.

روش سنجش کیفی HPLC

آنالیز HPLC به منظور سنجش تغییرات محتوای آتروپین و اسکوپولامین موجود در عصاره‌های آلکالوئیدی در فصول و ارتفاعات مختلف در مورد نمونه‌های جمع‌آوری شده با سه تکرار صورت گرفت. به این منظور، ابتدا محلول‌های استاندارد متانولی از آتروپین و اسکوپولامین با غلظت‌های ۰/۲ , ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و طیف آنها توسط دستگاه ترسیم گردید. با استفاده از سطح زیر منحنی به دست آمده برای غلظت‌های فوق الذکر منحنی استاندارد سطح/غلظت توسط نرم‌افزار Excel رسم شد. منحنی‌های به دست آمده خطی بود و از فرمول خط به دست آمده برای محاسبهٔ غلظت آتروپین و اسکوپولامین عصاره‌های آلکالوئیدی تزریق شده به دستگاه با استفاده از سطح زیر منحنی حاصل استفاده شد. آنالیز HPLC به روش Roos و همکاران (۱۹۸۶) انجام گرفت. ستون مورد استفاده C18 با طول ۲۵۰ nm و قطر داخلی ۴ nm بود. سرعت جریان حلال ۱ mL/min تنظیم شد و از فاز متحرک شامل متانول، اسیداستیک، تری اتیل آمین و آب به نسبت‌های ۱۵ : ۱/۵ : ۰/۵ : ۸۳ استفاده گردید.

نتایج

اطلاعات هواشناسی

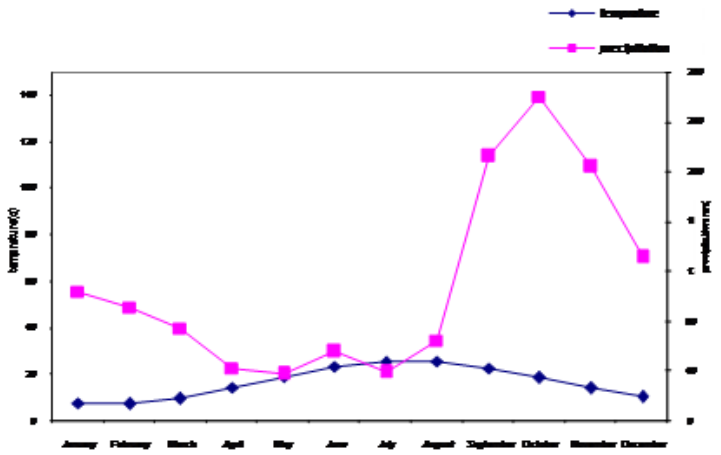
پراکندگی نزولات آسمانی در طول سال و تغییرات دما دو عنصر ویژهٔ غیرقابل تفکیک را در زندگی گیاهان تشکیل می‌دهند و بسیاری از کارشناسان سعی کرده‌اند تا به کمک ضرایب و نمودارهایی روابط موجود بین گیاه و عوامل مختلف اقلیمی را مشخص سازند. سیستم نمودارهای باران ـ گرما (منحنی‌های آمبروترمیک) که به وسیلهٔ گوسن پیشنهاد شده، بسیار ساده و قابل استفاده در کلیهٔ مناطق جهان است. بر روی این نمودارها میانگین ماهانهٔ دما و میانگین ماهانهٔ نزولات آسمانی به گونه‌ای نشان داده می‌شوند که مقیاس نزولات آسمانی دوبرابر مقیاس دما باشد. در هر ماه که نزولات آسمانی کمتر از دوبرابر دما باشد، آن ماه خشک محسوب می‌شود. به عبارت دیگر، وقتی منحنی بارندگی در زیر منحنی دما قرار گیرد، آن ماه خشک است (بیرنگ و همکاران، ۱۳۶۸).

بر اساس اطلاعات سازمان هواشناسی، ایستگاه کلیماتولوژی چمستان با مشخصات ۹َ ،۵۲ْ :E و ۲۹َ ،۳۶ْ :N و ایستگاه سینوپتیک نوشهر با مشخصات ۳۰َ ،۵۱ْ

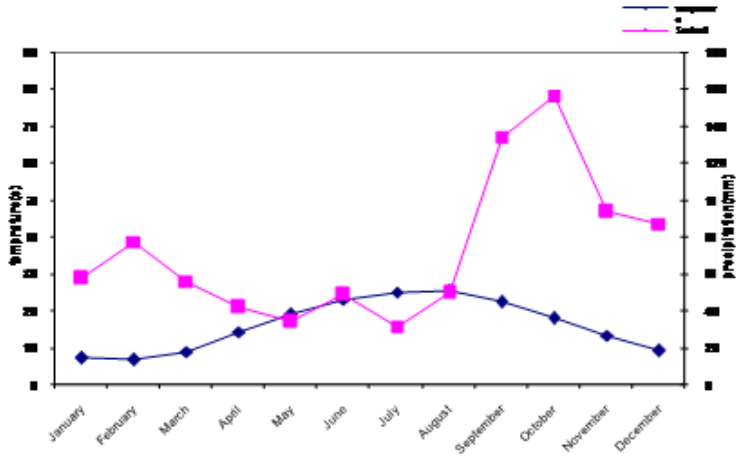
Archive of SID

www.SID.ir

E و ´ ۳۹ ،° ۳۶ : N در اطراف جنگل واز به دست آمد. بررسی منحنی‌های آمبروترمیک ایستگاه‌های فوق‌الذکر نشان می‌دهد که منطقه نمونه‌برداری بین نیمه اردیبهشت تا نیمهٔ مرداد نسبتاً کم باران بوده، ولی در سایر ماه‌های سال (به خصوص در فصل پاییز) از بارندگی در خور توجهی برخوردار است (شکل ۱).



الف



ب

شکل ۱- الف) منحنی آمبروترمیک ایستگاه کلیماتولوژی چمستان؛ ب) منحنی آمبروترمیک ایستگاه سینوپتیک نوشهر (بر اساس اطلاعات سال‌های ۱۹۸٦ - ۱۹۹۸)

آنالیز خاک

آنالیز نمونه‌های خاک توسط آزمایشگاه آب و خاک مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام مازندران ـ ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع نوشهر انجام شد. این نتایج نشان می‌دهد که در ایستگاه ۱ (ارتفاع ۵۰۰ متر) بافت خاک لومی بوده، در ایستگاه ۲ (ارتفاع ۱۰۰۰ متر) لوم رسی سیلتی و در ایستگاه ۳ (ارتفاع ۱۵۰۰ متر) ماسه‌ای است. بنابراین، بیشترین تخلخل و نفوذپذیری خاک در ایستگاه سوم مشاهده می‌شود. بیشترین نسبت C/N در ایستگاه ۳ و کمترین در ایستگاه ۱ مشاهده می‌شود. خاک هر سه ایستگاه فاقد شوری با pH قلیایی ضعیف است (جدول ۱).

www.SID.ir

جدول ۱- برخی ویژگی‌های خاک ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ایستگاه	(EC) ms/m	pH	C (%)	N (%)	C/N	ماسه (%)	سیلت (%)	رس	بافت
۱	۰/۴۴۰	۷/۴۰	۱/۶۴	۰/۱۲	۱۳/۶۷	۳۳	۵۸	۹	لوم
۲	۰/۶۱۴	۷/۳۴	۱/۴۵	۰/۱۲	۱۲/۰۸	۱۴	۶۸	۱۸	لوم رسی/سیلتی
۳	۰/۳۹۰	۷/۷۴	۰/۱۹	۰/۰۱	۱۹	۹۵	۳	۲	ماسه‌ای

سنجش کمی آلکالوئید تام (اسپکتروفتومتری)

سنجش عصاره‌های آلکالوئیدی برگ شاهبیزک در طول موج ۲۵۸ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد آتروپین برای تکرارهای مختلف نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر ایستگاه صورت گرفت و میانگین مقادیر حاصل در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) نشان داد که تأثیر ارتفاع بر میزان آلکالوئید تام زیر سطح احتمال $\alpha \leq$ ۰/۱ معنی‌دار است. به علاوه، تأثیر عامل فصل (به عبارت دیگر، مراحل دوره رویش) و همچنین تأثیر مشترک عوامل ارتفاع و فصل (AB) زیر سطح احتمال $\alpha \leq$ ۰/۰۰۱ کاملا معنی‌دار بود.

جدول ۲- مقدار آلکالوئید تام برگ شاهبیزک

مشخصات نمونه			میانگین آلکالوئید تام (total alkaloid) (mg بر گرم وزن خشک برگ)	گرم درصد آلکالوئید تام (% total alkaloid) (w/w)
فصل	ارتفاع (متر)	نام ایستگاه		
بهار	۵۰۰	۱	۳۱/۰۱۴	۳/۱۰۲
	۱۰۰۰	۲	۲۴/۸۸۷	۲/۴۸۹
	۱۵۰۰	۳	۲۳/۷۸۵	۲/۳۷۹
تابستان	۵۰۰	۱	۱۳/۹۲۴	۱/۳۹۲
	۱۰۰۰	۲	۲۵/۰۸۱	۲/۵۰۸
	۱۵۰۰	۳	۲۰/۹۹۶	۲/۱۰۰
پاییز	۵۰۰	۱	۱۶/۸۱۱	۱/۶۸۱
	۱۰۰۰	۲	۹/۷۴۲	۰/۹۷۴
	۱۵۰۰	۳	۷/۷۱۷	۰/۷۷۲

جدول ۳- آنالیز واریانس (ANOVA) **مربوط به مقادیر آلکالوئیدتام برگ بلادون جمع‌آوری شده از ارتفاعات و فصول مختلف**

منبع	درجه آزادی	جمع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	مقدار F	احتمال
تکرار	۲	۱۰/۱۶۵	۵/۰۸۳	۰/۷۶۴۶	-
فاکتور A (ارتفاع)	۲	۴۷/۲۴۶	۲۳/۶۲۳	۳/۵۵۳۷	۰/۰۰۰۰
فاکتور B (فصل)	۲	۱۰۳۷/۴۵۰	۵۱۸/۷۲۵	۷۸/۰۳۳۳	۰/۰۰۰۰
AB	۴	۳۷۱/۷۳۴	۹۲/۹۳۴	۱۳/۹۸۰۳	-
خطا	۱۶	۱۰۶/۳۶۰	۶/۶۴۷	-	-
جمع	۲۶	۱۵۷۲/۹۵۶			

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های آلکالوئید تام برگ بلادون زیر سطح احتمال $\alpha \leq ۰/۰۵$ در نمونه‌های جمع‌آوری شده از ارتفاعات و فصول مختلف نشان می‌دهد که در فصل بهار بین مقدار کل آلکالوئید برگ بلادون مربوط به ارتفاع ۵۰۰ متر نسبت به ارتفاعات ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر تفاوت معنی‌دار بوده، ولی بین مقادیر میانگین مربوط به ارتفاعات ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین، این نتیجه در مورد فصل‌های تابستان و پاییز نیز به چشم می‌خورد. به علاوه، بین مقادیر میانگین حاصل از ارتفاعات ۵۰۰ و ۱۵۰۰ متر بین فصول بهار، تابستان و پاییز اختلاف معنی‌داری وجود دارد، ولی در مورد مقادیر میانگین حاصل از ارتفاع ۱۰۰۰ متر فقط بین دو فصل بهار و پاییز اختلاف معنی‌دار است.

جدول ٤- میانگین محتوای آتروپین و اسکوپولامین در برگ شاهبیزک
(مقادیر بر اساس میلی‌گرم آلکالوئید بر گرم وزن خشک برگ)

فصل	بهار		تابستان		پاییز	
ارتفاع(متر)	آتروپین	اسکوپولامین	آتروپین	اسکوپولامین	آتروپین	اسکوپولامین
۵۰۰	trace*	trace	۱/۰۰۰	۰/۳۸۰	۰/۸۴۰	۰/۴۲۵
۱۰۰۰	۱/۴۱۰	۰/۳۸۰	۳/۸۶۳	۱/۶۴۰	trace	۰/۴۷۰
۱۵۰۰	۲/۷۸۵	۰/۵۵۵	۲/۱۰۰	۰/۸۲۰	trace	Trace

* سطح زیر منحنی مربوط به قدری کم بوده که توسط دستگاه قابل اغماض در نظر گرفته شده است.

آنالیز واریانس داده‌های مربوط به مقادیر آتروپین نشان داد که تأثیر فاکتورهای فصل، ارتفاع و اثر متقابل این دو فاکتور (AB) زیر سطح احتمال $\alpha \leq ۰/۰۰۱$ کاملاً معنی‌دار است (جدول ۵). همچنین مقایسه میانگین‌های مربوط در دو فصل بهار و تابستان اختلاف معنی‌داری بین مقدار آتروپین در سه ارتفاع ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر زیر سطح احتمال $\alpha \leq ۰/۰۵$ نشان داد. در فصل پاییز اختلاف بین ارتفاع ۵۰۰ متر با دو ارتفاع ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر معنی‌دار بود، ولی بین دو ارتفاع اخیر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین، مقایسه مقادیر آتروپین هر یک از ارتفاعات در سه فصل بین مقدار آتروپین حاصل در ارتفاع ۵۰۰ متر در فصل بهار با پاییز اختلاف معنی‌داری نشان نداد، ولی این اختلاف بین دو فصل بهار و پاییز با فصل تابستان معنی‌دار بود. در مورد ارتفاعات ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر بین هر سه فصل بهار، تابستان و پاییز اختلاف معنی‌دار بود.

سنجش کیفی آلکالوئیدها (آنالیز HPLC)

با استفاده از مواد استاندارد، زمان باز داری به دست آمده برای آتروپین ۲۱/۵ دقیقه و برای اسکوپولامین ۸/۵ دقیقه به دست آمد. جدول ۳- ۵ مقادیر آتروپین و اسکوپولامین به دست آمده از برگ شاهبیزک را در ارتفاعات و فصول مختلف جنگل واز نشان می‌دهد. شایان ذکر است که از هر یک از نمونه‌ها سه بار عصاره‌گیری شد و هر یک از تکرارها به طور مجزا مورد آنالیز HPLC قرار گرفت و سطح زیر منحنی و غلظت مربوطه محاسبه گردید. مقادیر مندرج در جدول ۴ میانگین غلظت تکرارهای مذکور است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- آنالیز واریانس مقادیر آتروپین حاصل از برگ شاهبیزک در فصول و ارتفاعات مختلف

منبع	درجه آزادی	جمع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	مقدار F	احتمال
تکرار	۲	۰/۰۳۶	۰/۰۱۸	۰/۱۸۵۳	-
فاکتورA (فصل)	۲	۱۸/۶۲۸	۹/۳۱۴	۹۶/۵۶۸۷	۰/۰۰۰۰
فاکتورB (ارتفاع)	۲	۷/۲۰۰	۳/۶۰۰	۳۷/۳۲۷۷	۰/۰۰۰۰
AB	۴	۱۸/۶۰۳	۱۴/۶۵۱	۴۸/۲۲۱۳	۰/۰۰۰۰
خطا	۱۶	۱/۵۴۳	۰/۰۹۶	-	-
جمع	۲۶	۴۶/۰۱۰			

آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اسکوپولامین تولید شده توسط برگ بلادون در فصول و ارتفاعات مختلف نشان داد که عوامل فصل، ارتفاع و اثر متقابل این دو فاکتور (AB) زیر سطح احتمال $\alpha \leq$ ۰/۰۵ تأثیر معنی‌داری بر تغییرات مقدار اسکوپولامین برگ داشتند (جدول ۶). با مقایسه میانگین‌های مربوط مشاهده شد که در فصل بهار بین مقدار اسکوپولامین حاصل از برگ نمونه ۵۰۰ متری و ۱۵۰۰ متری اختلاف معنی‌داری زیر سطح احتمال $\alpha \leq$ ۰/۰۵ مشاهده وجود داشت، ولی بین مقادیر مربوط به این دو ارتفاع با ارتفاع ۱۰۰۰ متر اختلاف معنی‌دار نبود. در فصل تابستان این حالت مشاهده می‌شد؛ یعنی بین مقادیر حاصل از ارتفاع ۵۰۰ متر و ۱۵۰۰ متر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید، ولی اختلاف این دو ارتفاع با ارتفاع ۱۰۰۰ متر معنی‌دار بود. در فصل پاییز هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین سه ارتفاع فوق‌الذکر مشاهده نشد. بین مقادیر به دست آمده در ارتفاع ۵۰۰ متر در سه فصل مذکور اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در ارتفاع ۱۰۰۰ متر بین مقادیر به دست آمده در فصل تابستان با دو فصل بهار و پاییز اختلاف معنی‌دار بود، ولی بین مقادیر حاصل از ۱۰۰۰ متر در دو فصل بهار و پاییز اختلاف معنی‌داری به چشم نخورد. در مورد مقادیر اسکوپولامین نمونه‌های ارتفاع ۱۵۰۰ متری بین دو فصل بهار و تابستان اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی بین این دو فصل با فصل پاییز اختلاف معنی‌دار بود.

جدول ٦- آنالیز واریانس مقادیر اسکوپولامین حاصل از برگ شاهبیزک در فصول و ارتفاعات مختلف

منبع	درجه آزادی	جمع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	مقدار F	احتمال
تکرار	۲	۰/۱۲۱	۰/۰۶۱	۰/۸۱۹۹	-
فاکتورA(فصل)	۲	۲/۴۸۸	۱/۲۴۴	۱۶/۸۴۵۷	۰/۰۰۰۱
فاکتورB (ارتفاع)	۲	۱/۴۷۴	۰/۷۳۷	۹/۹۷۹۶	۰/۰۰۱۵
AB	۴	۱/۸۷۷	۰/۴۶۹	۶/۳۵۴۹	۰/۰۰۲۹
خطا	۱۶	۱/۱۸۲	۰/۰۷۴	-	-
جمع	۲۶	۷/۱۴۲			

همبستگی بین عوامل محیطی و آلکالوئید

همبستگی بین pH، هدایت الکتریکی خاک (EC)، کربن آلی، نیتروژن، نسبت C/N و بافت خاک با مقدار آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین برگ گیاه توسط نرم‌افزار Excel محاسبه گردید. نتایج نشان داد در فصل بهار بین میزان آتروپین از یک سو با pH خاک و از سوی دیگر، با کربن آلی خاک رابطه منفی و معنی‌داری وجود

Archive of SID

www.SID.ir

داشت. همچنین pH خاک در فصل پاییز با اسکوپولامین برگ گیاه رابطه منفی معنی‌دار نشان داد. بین میزان اسکوپولامین در همین فصل، با میزان کربن آلی و ازت خاک رابطه مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. رابطه بین میزان آلکالوئید تام با هر یک از آلکالوئیدهای آتروپین واسکوپولامین در هر سه فصل بهار، تابستان و پاییز معنی‌دار است، به طوری که در فصل بهار این همبستگی منفی و در دو فصل تابستان و پاییز مثبت است. این پدیده می‌تواند در اثر افزایش فعالیت آنزیم TR2 نسبت به TR1 حاصل شود. بین میزان آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین در فصول مختلف و نسبت کربن به نیتروژن خاک (C/N) در یک مورد رابطه معنی‌دار منفی دیده می‌شود (جدول ۷). بین مقدار آتروپین و اسکوپولامین با آلکالوئید تام به استثنای یک مورد همبستگی معنی‌دار است (جدول ۸).

جدول ۷- ضریب همبستگی بین مقادیر آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین با عوامل خاک در فصول مختلف رویشگاه واز

	فصول	Clay	Silt	Sand	C/N	N	C	Ec	pH
آلکالوئید تام	بهار	۰/۰۶۸۴۷۷	۰/۴۹۷۵۹۷	-۰/۴۲۴۱۱	-۰/۴۲۸۶۹	۰/۶۱۶۴۰۹	۰/۷۰۶۸۳۷	-۰/۱۶۷۹۷	-۰/۵۰۰۹۱
	تابستان	۰/۴۲۸۰۰۶	-۰/۰۱۰۰۱	-۰/۰۷۲۷۷	-۰/۰۶۷۷۳	-۰/۱۵۲۷۶	-۰/۲۷۰۷۸	۰/۶۲۸۴۷	۰/۰۱۳۸۳۳
	پاییز	۰/۱۴۱۱۷۲	۰/۵۵۹۶۳۱	-۰/۴۸۹۱۳	-۰/۴۹۳۵۴	۰/۶۷۲۲۸۲	۰/۷۵۶۶۲۲	-۰/۰۹۵۵۱	-۰/۵۶۲۸
آتروپین	بهار	-۰/۴۲۹۸۳	-۰/۷۸۱۲۱	۰/۷۲۶۸۶۶	۰/۷۳۰۳۳	-۰/۸۶۲۳۷	-۰/۹۱۷۱۲*	-۰/۲۰۵۵۲	-۰/۹۳۰۲۳*
	تابستان	۰/۶۶۵۷۹۲	۰/۲۷۲۷۵۹	-۰/۳۵۱۴۴	-۰/۳۴۶۷۰	۰/۱۷۱۵۴۱	۰/۰۱۲۰۶۸	۰/۸۲۲۵۳۵	-۰/۲۶۹۰۸
	پاییز	-۰/۰۷۱۹۸	۰/۳۷۱۱۵۴	-۰/۲۹۳۰۴	-۰/۲۹۷۸۷	۰/۵	۰/۶۰۰۷۵۳	-۰/۳۰۴۴۳	-۰/۳۷۴۷
اسکوپولامین	بهار	-۰/۲۳۹۱۱	-۰/۶۳۹۴۲	۰/۵۷۳۶۰۱	۰/۵۷۷۷۳۷	-۰/۷۴۲۷	-۰/۸۱۸	-۰/۰۰۴۱۵	۰/۶۴۲۳۵۴
	تابستان	۰/۶۹۴۷۲۴	۰/۳۱۰۵۲۱	-۰/۳۸۸۱۲	-۰/۳۸۳۴۵۰	۰/۱۷۱۵۴۱	۰/۸۴۴۳۴۲	۰/۸۴۴۳۴۲	-۰/۳۰۶۸۸
	پاییز	۰/۸۷۳۳۴۲	۰/۹۹۰۳۱***	۰/۹۹۰۳۱***	-۰/۹۹۱۰۰***	۰/۹۹۶۲۲۹***	۰/۹۷۸۵۰۶**	۰/۷۳۴۳۵۸	-۰/۹۹۸۶۱***

*** همبستگی معنی‌دار است (۰/۱ ≥ α)** همبستگی معنی‌دار است (۰/۰۵ ≥ α)* همبستگی معنی‌دار است (۰/۰۲ ≥ α)

جدول ۸- ضریب همبستگی بین اجزای آلکالوئیدی با آلکالوئید تام

		آلکالوئید تام
آتروپین	بهار	-۰/۹۳۰۲۳*
	تابستان	۰/۹۵۹۳۰۴**
	پاییز	۰/۹۷۷۲۵۵**
اسکوپولامین	بهار	-۰/۹۸۵۰۴***
	تابستان	۰/۹۴۷۴۱۱*
	پاییز	۰/۶۰۵۵۲۱

*** همبستگی معنی‌دار است (۰/۱ ≥ α)** همبستگی معنی‌دار است (۰/۰۵ ≥ α)* همبستگی معنی‌دار است (۰/۰۲ ≥ α)

بحث

از بررسی‌های میدانی انجام گرفته در این پژوهش مشخص شد که نور از عوامل بسیار مهم مؤثر بر پراکنش گیاه شاهبیزک است. این گونه هرگز در داخل توده‌های انبوه و بستهٔ جنگل دیده نمی‌شود و در داخل توده‌های جنگلی فقط در مناطقی که به عللی، از قبیل عملیات بهره‌برداری، جنگل از حالت توده‌ای و انبوه بیرون آمده و از حالت تعادل خارج شده باشد، گیاه شاهبیزک قادر به

Archive of SID

www.SID.ir

رشد و نمو خواهد بود. همچنین در بخش‌هایی از جنگل که درختان به صورت انفرادی و لکه‌ای و یا گروهی در اثر عوامل طبیعی نظیر باد سقوط کرده باشند و شرایط نوری مناسب فراهم آمده باشد، این گونه می‌تواند رشد و نمو یابد.

به طوری که از نقشه پراکنش گونه بر می‌آید (خاتم‌ساز ۱۳۷۷)، این گیاه در ایران در مناطق شمالی ارتفاعات البرز از غرب در گیلان تا شرق گرگان انتشار دارد. بررسی‌های انجام شده در مشاهدات میدانی حضور این گیاه را در ارتفاعات مختلف جنگل‌های شمال ایران که از رویشگاه‌های اصلی این گونه به شمار می‌رود، نشان داده است، ولی این حضور به گونه‌ای است که به ندرت در ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر مشاهده می‌شود. در صورت مشاهده گونه مذکور در ارتفاعات پائین‌تر، علت را می‌توان به شرایط خاص برخی از رویشگاه‌ها نسبت داد. بنابراین، پراکنش و انتشار طبیعی این گونه نشان می‌دهد که این گیاه یک عنصر کلیماتیک و وابسته به اقلیم و شرایط آب و هوایی خاص است، چرا که حضور آن در دامنه وسیعی از شرایط خاکی و استقرار آن در انواع خاک‌ها حاکی از دامنه وسیع بردباری و انعطاف‌پذیری و در نتیجه سازش اکولوژیک آن نسبت به تغییرات خاک است، به طوری که این گیاه در انواع خاک‌ها و اراضی سنگلاخی، آهکی، سیلیسی، واریزه‌ای، ... یافت می‌شود (Brower *et al.*, 1997;Mueller-Dombois,1974).

به علاوه، عکس‌العمل این گیاه نسبت به خصوصیات اقلیمی رویشگاه‌های مناطق مرتفع و کوهستانی نیز در خور توجه است و انتشار آن وابسته به یک دامنه ارتفاعی ما بین ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ متری است که از شرایط اقلیمی متفاوتی نسبت به ارتفاعات پائین‌تر برخوردار است. به طور کلی، حضور و انتشار جغرافیایی این گونه، رابطهٔ نزدیکی با رطوبت بالا و بارندگی قابل ملاحظه دارد. همچنین، در مناطقی که دارای تابستان‌های خنک و باران‌گیر و زمستان‌های سرد و برفی است، به خوبی می‌روید.

بررسی مقدار آلکالوئید تام در فصول و ارتفاعات مختلف ایستگاه‌های نمونه‌برداری نشان داد که مقادیر به دست آمده با نتایج Zarate و همکاران (۱۹۹۷) همخوانی دارد. ارتفاع، فصل و تأثیر متقابل این دو تأثیر معنی‌داری بر تغییرات میزان آلکالوئید برگ گیاه دارد و در فصل بهار با افزایش ارتفاع مقدار آلکالوئید کاهش یافته، در فصل تابستان با افزایش ارتفاع مقدار آلکالوئید افزایش می‌یابد. در فصل پاییز نیز افزایش ارتفاع موجب کاهش میزان آلکالوئید می‌گردد. این مشاهده می‌تواند نشان دهنده ارتباط بین دمای محیط با محتوای آلکالوئیدی برگ گیاه باشد که نیازمند مطالعه و بررسی بیشتر است. با مطالعه فنولوژی گیاه شاهبیزک و مطابقت آن با نتایج به دست آمده از نظر میزان آلکالوئید در فصول و ارتفاعات مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که در طی یک دورهٔ رویش مقدار آلکالوئید ابتدا کم بوده، سپس بتدریج افزایش می‌یابد و پس از رسیدن به یک مقدار ماکزیمم مجدداً شروع به کاهش می‌نماید و زمان رسیدن مقدار آلکالوئید به ماکزیمم درست با ابتدای گلدهی و ظهور اولین گل همزمان است. این تغییرات با تغییراتی که به طور عمومی در محتوای متابولیت‌های ثانوی در ارتباط با دوره رویش و مراحل نموی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی صورت می پذیرد، مطابقت دارد.

نتایج مربوط به آنالیز HPLC نشان می‌دهد که مقدار آتروپین همواره ۲ تا ۵ برابر اسکوپولامین است. بیشترین درصد آتروپین و اسکوپولامین نسبت به آلکالوئید تام در نمونه تابستان در ارتفاع ۱۰۰۰ متر مشاهده می‌شود که از نظر دوره رویش مقارن با اوج گلدهی است. روند تغییرات

Archive of SID

www.SID.ir

اجزای آلکالوئیدی آتروپین و اسکوپولامین مطابقت نسبتاً کاملی با تغییرات میزان آلکالوئید تام دارد ولی این رابطه همواره در یک جهت نیست (جدول ۸). این امر نشان می‌دهد که نسبت بین اجزای آلکالوئیدی کاملاً تابع متابولیسم گیاه است و هر گونه تغییری در مقدار این اجزا نیازمند دستکاری‌های ژنتیکی گیاه است؛ به این معنی که در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها در بعضی نقاط مسیر دوشاخه می شود و فعالیت نسبی هر یک از آنزیم‌های ابتدای این دو راهی‌ها بر این که ترکیب نهایی آلکالوئید تام متشکل از چه اجزای آلکالوئیدی باشد، مؤثر است. برای مثال، تروپینون توسط دو آنزیم تروپینون ردوکتاز ۱ و ۲ به ترتیب به سمت تولید آلکالوئیدهای گروه تروپان و نیکوتین هدایت می‌شود که اثبات شده سرعت نسبی فعالیت آنها در ترکیب نهایی آلکالوئید تام اثر دارد (Roth *et al.*, 2003, Richter *et al.*, 2005). مطالعات متعددی با هدف دستورزی ژنتیکی گیاه شاهبیزک در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها صورت گرفته و موفقیت‌هایی در این زمینه کسب شده است (Sato *et al.*, 2001, Roth *et al.*, 2003, Richter *et al.*, 2005).

مقدار ازت خاک در این مطالعه فقط در یک مورد با مقدار اسکوپولامین، ارتباط معنی‌دار نشان داده است (جدول ۷). در بررسی انجام شده توسط Bensaddek و همکاران (۲۰۰۰) با توجه به اینکه منبع ازت به صورت نیترات آمونیوم و نسبت‌های مختلف آنها بررسی شده است، اهمیت این ماده در بیوسنتز آلکالوئیدها با وضوح بیشتری به چشم می‌خورد. قضاوت در مورد نقش تغییرات غلظت عناصر بر محتوای آلکالوئیدی این گیاه نیازمند بررسی دقیق‌تر در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی است.

منابع

بیرنگ، ن.، جوانشیر، ع. و مجتهدی، ی. (۱۳۶۸) پوشش گیاهی زمین، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

خاتم‌ساز، م. (۱۳۷۷) فلورایران شماره ۲۴ تیره سیب‌زمینی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

امیدبیگی، ر. (۱۳۷۴) رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی، انتشارات فکر روز، تهران.

زمان، س. (۱۳۷۰) گیاهان دارویی، انتشارات ققنوس، تهران.

میرحیدر، ح. (۱۳۷۵) گیاهان دارویی، جلد ۸، دفتر نشر فرهنگی ، تهران.

Bensaddek, L., Gillet, F., Edmundo, J., Saucedeo, N. and Fliniaux, M. A. (2001) The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots; Journal of Biotechnology 85: 35 – 40.

Brower, J. E., Zar, J. H., Von Ende, C. (1997) General Ecology, Mc Graw Hill Publications, pp.63-76.

Chevallier, M. A. (1996) The encyclopedia of medicinal plants; Dorling kindersly; pp. 336.

De Albuquerque Lucio, R., Maria E., Viana, C., Luiz, C., De Andrade, F. ,Jose, F., Marcello, B., Giber to, B. (1997) Process for the extraction and purification of alkaloid; U. S. Patent No. 5, 684, 155.

Freeman, J. J., Altieri, R. H., Babtiste, H. J., Kuo, T., Crittenden, S., Fogarty, K., Moultrie, M., Goney, E., Kanegis, K. (1994) Evolution and management of sialorrhea of pregnancy with concomitant hypermesis; Journal of National Medicine Association 86: 704-708.

Gal, P., Toporecer, T., Grendle, T., Vidova, Z., Smetana, K., Dvorankova, B., Gal, T., Mozes, S., Lenhardt, L., Longauer, F., Sabol, M., Sabo, J. and Backor, M. (2009) Effect of *Atropa belladonna* L. on skin wound healing, Wound Repair and Regeneration 17: 378- 386.

Archive of SID

www.SID.ir

Kaufman, B., Cseke, L. J., Warber, S., Duke, J. A. and Brielmann, H. L. (1999) Natural Products from Plants; CRC Press, London, pp. 30-35.

Lotvall, J. (1994) contractility of lung and air-tubes: experiments performed in 1840 by charles J. B. Williums; Europian Respiration Journal 7: 592-595.

Mueller-Dombois, D., Ellenberg, H. (1974) Aims and methods of vegetation ecology, John Wiley, New York, 547p.

Perlik Gattner, I. (1997) *Atropa belladonna* poisoning Suggesting severe post – traumatic brain damage; Przegl Lek, pp. 464-465.

Richter,U., Rothe, G., Fabian, A. K., Rahfeld B. and Drager, B. (2005) overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures, Journal of Experimental Botany 56: 645- 652

Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T. and Drager, B. (2003) Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine *N*-methyltransferase, Journal of Experimental Botany 54: 2065- 2070.

Roos, R. W., Lau - Cam, C. (1986) General reversed phase HPLC method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base, Journal of Chromatography 370: 403-418.

Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K. I., Choi, K. B., Morishige, T., Fujimoto, H., Yamada, Y. (2001) Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98: 367-372.

Zarate, R., Hermosin, B., Cantos, M. and Troncosa, A. (1997) Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica* plants, Journal of Chemical Ecology 23: 2059-2066.

Archive of SID

www.SID.ir