زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره دوم، (پیاپی ۴) تابستان ۱۳۸۹، صفحه ۵۵ -۶۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۲۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۴/۰۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۸/۱۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۸/۲۹

اثر اکسین و سایتوکینین بر تولید کالوس، اندام‌زایی و تغییرات محتوای آلکالوئید تام در تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*)

الهام ختایی و فرح کریمی*
*گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

چکیده

تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) از تیره سیب‌زمینی، حاوی تروپان آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی است. در این بررسی، از کشت رویان‌های جنسی بذر این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای گیاهچه به دست آمد و قطعات جداکشت حاصل از آن، شامل یک میان گره و دو جوانه جانبی به منظور بررسی اثر برخی از هورمون‌های رشد بر تولید کالوس، اندام زایی و محتوای آلکالوئید تام، در محیط کشت B5 حاوی غلظت‌های مختلف IAA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر)، BA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شد. غلظت‌های دو هورمون اخیر به صورت متقابل نیز به کار رفتند. محتوای آلکالوئید تام کالوس‌ها پس از استخراج به‌وسیله اسپکتروفوتومتر در ۲۵۸ نانومتر به‌دست آمد و با محتوای آلکالوئید تام گیاهچه مقایسه شد. نتایج تشکیل کالوس را در حضور بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید، نشان داد و افزایش غلظت نفتالن استیک اسید موجب افزایش معنی‌دار وزن ترکالوس و همچنین افزایش محتوای آلکالوئید تام آن شد. در حضور ایندول استیک اسید افزایشی در تولید کالوس و اندام‌زایی مشاهده نشد. مقایسه محتوای آلکالوئید تام کالوس با اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های تاتوره تماشایی در محیط کشت B5 فاقد هورمون نشان داد که در محیط فاقد هورمون، کالوس‌ها نسبت به بافت‌های تمایز یافته حاوی آلکالوئید کمتری بودند، ولی استفاده از هورمون‌های NAA و BA موجب افزایش آلکالوئید تام کالوس نسبت به اندام‌های کشت یافته در شیشه شد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، تاتوره تماشایی، تروپان آلکالوئید، سیتوکینین، کشت کالوس

مقدمه

تیرهٔ سیب‌زمینی (Solanaceae) دارای جنس‌های متعددی، نظیر: *Atropa*، *Hyoscyamus*، *Duboisia*، *Scopolia* و *Datura* است (Boitel-Conti *et al* 2000; Zhang *et al.*, 2004). ترکیبات فعال بیولوژیک که در همهٔ این گیاهان تولید می‌شود، از نوع تروپان آلکالوئیدها هستند که وجود آنها در رده‌بندی شیمیایی (کموتاکسونومی) تیرهٔ سیب‌زمینی نیز استفاده می‌شود

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: fkarimi@shahed.ac.ir، شماره تماس: ۵۱۲۱۲۶۲۴-۰۲۱

Archive of SID
www.SID.ir

(Berkov and Zayed, 2004). تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) گیاهی علفی، ایستاده، به بلندی یک متر و بعضاً بیشتر، یکساله و یا به صورت درختچه‌هایی چند ساله با ساقه بسیار منشعب است. دارای کپسول‌های تخم مرغی شکل که حدود ۳ سانتی‌متر قطر دارند و با خارهای نازک و محکمی به طول ۲- ۴ میلی‌متر پوشیده شده‌اند (شایا، ۱۳۶۹). برگ‌ها متناوب، بیضی شکل، دندانه‌دار و بدبو هستند. از بغل شاخه‌ها یا در قسمت‌های انتهای شاخه، گل‌های بزرگ قیفی شکل به رنگ سفید یا بنفش می‌روید. میوه آن به صورت کپسولی است که محتوی دانه‌های قهوه‌ای رنگی است (زمان، ۱۳۷۰). این گونه مثل سایر گونه‌های جنس تاتوره بیش از ۵۰ نوع تروپان آلکالوئید سنتز می‌کند و به همین دلیل، یکی از گیاهان دارویی ارزشمند با استفاده‌های متعدد در طب سنتی به شمار می‌رود. (Berkov and Zayed, 2004). هیوسیامین یکی از تروپان آلکالوئیدهای اصلی تیرهٔ سیب‌زمینی است که دارای آثار ضد کولینرژیک، ضد اسپاسم و اثر بر اعصاب پاراسمپاتیک است. اسکوپولامین نیز به علت فعالیت زیستی مشابه و بالایی که دارد، با ارزش است و البته آثار جانبی کمتری بر سیستم اعصاب مرکزی دارد و این امر بر ارزش آن می‌افزاید (Verpoorte *et al.*, 2007). تروپان آلکالوئیدهایی نظیر هیوسیامین و اسکوپولامین، از نظر ساختمانی به یکدیگر شباهت دارند و از حدواسطی مشترک که کاتیونی از N- متیل پیرولینیوم (N-methylpyrrolinium) است، مشتق می‌شوند (Berkov and Zayed, 2004). این دو آلکالوئید عمدتاً در سلول‌های جوان ریشه سنتز شده، به بخش‌های هوایی گیاه انتقال می‌یابند. در بیشتر گیاهان تیرهٔ سیب‌زمینی معمولاً هیوسیامین آلکالوئید عمده است، در حالی‌که اسکوپولامین فقط به مقدار کمی تولید می‌شود. در گیاه تاتوره تماشایی تجمع تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها، گل‌ها و دانه‌ها دیده می‌شود (Zayed *et al.*, 2006). بیشترین قسمت مورد استفاده این گیاه در طب سنتی، برگ‌ها و دانه‌ها هستند (صمصام شریعت، ۱۳۸۳). دو تروپان آلکالوئید اصلی ذکر شده در این گیاه توزیع مشابهی در اندام‌ها ندارند؛ به طوری که در ساقه بیشتر اسکوپولامین و در ریشه بیشتر هیوسیامین یافت می‌شود (Zayed *et al.*, 2006).

ترکیبات مؤثره این گیاه دارای آثار پاراسمپاتیک (مشابه دستگاه عصبی) و بیهوش‌کنندگی هستند و بنابراین، از برخی از آنها مانند آتروپین در ایست قلبی و کند کاری سینوس‌های قلب و قبل از بیهوشی برای کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد استفاده می‌شود. از هیوسین برای تخفیف اسپاسم های عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش استفاده می‌شود (شهراز و غازیانی، ۱۳۸۱). این گیاه برای درمان لاغری، تنگی نفس و اسهال به‌کار می‌رود و همچنین مسکن، کنترل‌کنندهٔ تب و ضد انگل نیز هست. تحقیق برای افزایش بازده تولید آلکالوئیدهای تروپانی در سیستم کشت در شیشه به تجربه متغیرهای بسیاری، نظیر: تأثیر هورمون‌های گیاهی، عناصر پرمصرف و کم مصرف، قندها و سایر عوامل فیزیکی منجر شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

اکسین‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که در غلظت‌های مختلف باعث طویل شدن ساقه و میان گره، فعال سازی تقسیم سلولی، طویل شدن سلول‌ها، تروپیسم، چیرگی رأسی و ریشه‌زایی می‌شوند (لاهوتی، ۱۳۷۶). سیتوکینین‌ها نیز گروهی دیگر از هورمون‌ها با اثر محرک رشد به شمار می‌روند و به ویژه فرآیند تقسیم را در سلول‌ها تحریک می‌کنند. این هورمون‌ها فعالیت‌های زیادی را در ریخت‌زایی گیاه تنظیم می‌نمایند و معمولاً باعث تقسیم سلولی، حذف چیرگی رأسی، تمایز ساقه و به تأخیر انداختن پیری می‌شوند (Arteca, 1996). مطالعه آثار هورمون‌های رشد و ترکیبات مختلف دیگر بر تولید اندام و کالوس گیاه تاتوره در گذشته نیز صورت گرفته است (Ajungla *et al.*, 2009; Iranbakhsh *et al.*, 2007; Zayed *et al.*, 2007).

یکی از زمینه‌های پژوهشی مورد توجه در ارتباط با گیاهان دارویی، اعمال تیمارهایی برای افزایش ترکیبات مؤثره آنها در شرایط درون شیشه‌ای است. در این پژوهش نیز با توجه به اهمیت دارویی گیاه تاتوره تماشایی، ابتدا به بررسی شرایط تشکیل اندام و کالوس از قطعات جداکشت حاصل از رشد رویان آن در شیشه با استفاده از محیط‌کشت B5 پرداخته شد. به این منظور، اثر غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های بنزیل آدنین (BA)، نفتالن استیک اسید (NAA) و ایندول استیک اسید (IAA) بر قطعات جداکشت حاصل از گیاهچه‌های به‌دست آمده از رویان بررسی گردید. به منظور بررسی اثر این هورمون‌ها بر محتوای آلکالوئید تام کالوس، استخراج آلکالوئید صورت گرفت و بهترین مکمل هورمونی (با استفاده از این سه هورمون) در شرایط درون‌شیشه‌ای برای تولید کالوس‌هایی با محتوای آلکالوئیدی بالاتر مشخص شد.

مواد و روش‌ها

کشت رویان و قطعات جداکشت حاصل از آن

بذر گیاه تاتوره تماشایی از پایه‌های خودروی این گیاه در شمال غربی تهران (طول "۵۲ ´۲۲ °۵۱ شرقی و عرض "۲۱ ´۴۶ °۳۵ شمالی) جمع‌آوری شد. بذرها پس از جمع‌آوری در سایه و دمای اتاق خشک شدند و سپس توسط الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و آب ژاول ۲۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. رویان‌ها از بذرهای سترون جدا و برای رشد در محیط‌کشت B5 حاوی ۳۰٪ سوکروز و یک میلی‌گرم در لیتر GA3 کشت داده شدند (Gamborg *et al.*, 1968). شایان ذکر است که کشت بذر در همین محیط، به دلیل سختی پوسته آن موفقیت‌آمیز نبود و به همین دلیل به کشت رویان مبادرت گردید. پس از گذشت ۴ هفته از رشد، قطعات جدا کشت شامل یک میان گره، به همراه دو جوانه جانبی از گیاهچه‌های حاصل به محیط‌های کشت B5 حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم ایندول استیک اسید (IAA) انتقال یافتند. اثر غلظت‌های دو هورمون NAA و BA به صورت متقابل نیز بررسی شد. کشت در همه تیمارهای هورمونی با سه تکرار انجام شد و پس از گذشت ۴ هفته تمامی نتایج حاصل از کشت قطعات جداکشت رشد کرده

Archive of SID

www.SID.ir

در محیط‌های مذکور از نظر وزن کالوس، وزن اندام هوایی و وزن ریشه بررسی شد. محتوای آلکالوئید تام در کالوس‌های حاصل از کاربرد همزمان دو هورمون NAA و BA سنجیده شد. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار MSTAT-C مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD انجام شد.

استخراج و سنجش آلکالوئید تام

آلکالوئید تام از یک گرم از بافت تر مورد بررسی پس از ساییده شدن در ۵۰ میلی لیتر اتانل به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق روی شیکر استخراج شد. تفاله بافت توسط کاغذ صافی از عصاره جدا شد و تبخیر اتانول به وسیلهٔ دستگاه تبخیر در خلأ (Rotary Evaporator) صورت گرفت. با افزودن سولفوریک اسید ۵٪ v/v و دی اتیل اتر به تهماندهٔ عصاره با نسبت مساوی، فاز آبی حاوی آلکالوئید جدا شد و شست و شو با دی اتیل اتر به منظور رنگ‌بری عصاره انجام گرفت. سایر مراحل با افزایش pH تا ۱۰ توسط هیدروکسید سدیم ۱۰N، انتقال به قیف جداکننده (decanter) و افزودن ۱۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم در سه مرحله (۳۰+۴۰+۴۰) و هر بار جمع کردن فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئید، تبخیر کلروفرم توسط دستگاه تبخیر در خلأ تا خشک شدن کامل ادامه یافت (Dashek, 1997). در نهایت، آلکالوئیدهای موجود در ته مانده توسط متانول حل شد. عصارهٔ حاصل توسط اسپکتروفتومتر بررسی گردید. به این منظور، منحنی استاندارد توسط ماده استاندارد آتروپین سولفات در طول موج ۲۵۸ نانومتر رسم گردید و چگالی نوری (OD) هر یک از نمونه‌ها در همین طول موج خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول خط منحنی استاندارد، مقدار آلکالوئید تام در هر نمونه بر حسب میلی گرم بر گرم وزن‌تر بافت محاسبه شد. شایان ذکر است که به منظور قابلیت انجام بررسی آماری، استخراج آلکالوئید از سه تکرار از هر نمونه به طور مجزا انجام شد.

نتایج

پس از گذشت چهار هفته در تمامی کشت‌های حاوی غلظت‌های به‌کار رفته از NAA بدون حضور BA و همچنین در کشت‌های حاوی غلظت‌های به‌کار رفته از BA بدون حضور NAA، کالوس تشکیل شد، ولی تغییر غلظت این دو هورمون تأثیر معنی‌داری بر وزن تر کالوس نداشت. به کارگیری همزمان این دو هورمون نیز موجب تشکیل کالوس گردید و تغییرات غلظت آنها آثار معنی‌داری بر وزن تر کالوس گذاشت؛ به طوری که در حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از BA، افزایش غلظت NAA تا ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس و بیش از آن موجب کاهش معنی‌دار آن شد، ولی در تمام غلظت‌ها، NAA در حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از BA موجب افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس نسبت به شاهد شد. در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA موجب افزایش وزن و غلظت‌های بیش از آن موجب کاهش وزن تر کالوس شد. در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تغییر معنی‌داری در وزن تر کالوس نسبت به شاهد ایجاد نکرد،

Archive of SID

www.SID.ir

ولی غلظت‌های بیش از آن موجب افزایش معنی‌دار وزن تر کالوس گردید. شایان ذکر است حتی در مواردی که NAA اثر کاهشی بر وزن کالوس داشت، باز هم وزن آن نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود. به عبارت دیگر، اثر افزایشی بر تولید کالوس با استفاده از هورمون NAA در حضور BA بر قطعات جداکشت میانگره تاتوره تماشایی کاملاً مشهود است (جدول ۱).

تشکیل ریشه فقط در محیط فاقد هورمون و در حضور هورمون NAA به تنهایی مشاهده شد. هورمون BA به تنهایی ریشه‌زایی بسیار اندکی را نشان داد و کاربرد همزمان این دو هورمون مانع از تشکیل ریشه گردید. به کار بردن هورمون NAA و BA اختلاف معنی‌داری در وزن ریشه نسبت به شاهد ایجاد نکرد (جدول ۱).

افزایش غلظت هورمون‌های BA و NAA هر یک به تنهایی به طور معنی‌داری باعث کاهش وزن تر اندام هوایی شد. در غلظت‌های متقابل، در بیشتر موارد اندام هوایی تشکیل نشد و فقط تشکیل کالوس مشاهده گردید، فقط در غلظت‌های ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA که در مقابل غلظت‌های مختلف NAA به کار رفت، تشکیل برگ‌های کوچک روی کالوس مشاهده شد که وزن آنها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود (جدول ۱).

کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون IAA اثر معنی‌داری بر وزن تر کالوس، وزن تر اندام هوایی و وزن ریشه نشان نداد (جدول۲).

محتوای آلکالوئید تام در کالوس‌های تشکیل شده در حضور غلظت‌های مختلف هورمون NAA نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. در حضور غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA که به صورت همزمان با غلظت‌های مختلف NAA به کار رفت، در همه موارد تفاوت معنی‌داری در محتوای آلکالوئید تام کالوس نسبت به شاهد مشاهده شد. در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA افزایش غلظت NAA باعث ابتدا افزایش و سپس کاهش آلکالوئید تام شد، در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، افزایش غلظت NAA باعث کاهش محتوای آلکالوئید تام شد ولی در تمام موارد محتوای آلکالوئید نسبت به شاهد بیشتر بود (جدول ۳).

میانگین محتوای آلکالوئید تام اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های حاصل از کشت رویان تاتوره تماشایی در محیط کشت B5 فاقد هورمون به ترتیب ۰/۰۴۵ و ۰/۰۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به‌دست آمد (جدول ۴). از مقایسه این مقادیر با محتوای آلکالوئید تام کالوس در محیط کشت فاقد هورمون مشخص می‌شود که کالوس‌ها نسبت به بافت‌های تمایز یافته حاوی آلکالوئید کمتری بودند، ولی استفاده از هورمون‌های NAA و BA موجب افزایش آلکالوئید کالوس نسبت به اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های رشد یافته در شیشه شد.

آنالیز واریانس داده‌ها بیانگر اثر معنی‌دار حضور هورمون‌های IAA و BA بر وزن تر کالوس، وزن تر ریشه، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی، طول اندام هوایی و مقادیر آلکالوئید تام کالوس زیر سطح احتمال ۰/۰۱ بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر هورمون‌های NAA و BA بر تولید کالوس و اندام‌زایی قطعات جداکشت. حروف نامشابه علامت وجود تفاوت معنی‌دار هستند. (آزمون LSD با $P\leq 0.05$).

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	وزن تر کالوس (g)	وزن تر ریشه (g)	طول ریشه (mm)	وزن تر اندام هوایی (g)	طول اندام هوایی (mm)
	۰	hi۱/۳ ±۰/۰۳۴	b۰/۲۴±۰/۲۲۳	a۲۷/۰۱ ±۸۲/۳۹	a۰/۲۴ ±۰/۶۶۵	d۰/۲۴±۱۳/۷
	۰/۵	ghi۱/۳ ±۰/۲۵۸	b۰/۲۴±۰/۱۳۰	e۲۷/۰۱ ±۹	cde۰/۲۴±۰/۰۶۱	e۰/۲۴±۱
۰	۱	ghi۱/۳ ±۰/۲۶۹	b۰/۲۴±۰/۲۲۳	c۲۷/۰۱ ±۳۰/۵۵	bcd۰/۲۴ ±۰/۳۰۷	b۰/۲۴±۲۷/۷
	۱/۵	ghi۱/۳ ±۰/۲۸۲	b۰/۲۴±۰/۲۵۰	b۲۷/۰۱ ±۴۲	bc۰/۲۴ ±۰/۳۲۲	d۰/۲۴±۱۳/۷
	۲	gh۱/۳ ±۰/۷۰۲	b۰/۲۴±۰/۰۹۷	d۲۷/۰۱ ±۱۴	de۰/۲۴ ±۰/۰۳۶	e۰/۲۴±۰/۵
	۰	i۱/۳±۰/۰۰۸	b۰/۲۴±۰/۰۱۷	c۲۷/۰۱±۳۱/۷۷	bcde۰/۲۴±۰/۲۴۳	d۰/۲۴±۱۴/۳۳
	۰/۵	ef۱/۳ ±۱/۵۵۳	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
۰/۵	۱	bcd۱/۳ ±۲/۴۲۶	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
	۱/۵	de۱/۳ ±۱/۹۱۳	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
	۲	fg۱/۳ ±۰/۹۴۲	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴±۰	e۰/۲۴±۰
	۰	hi۱/۳ ±۰/۱۱۵	b۰/۲۴±۰/۰۰۱	e۲۷/۰۱ ±۸	ab۰/۲۴ ±۰/۴۳۵	c۰/۲۴± ۱۷/۶۶
	۰/۵	a۱/۳±۳/۱۴۴	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
۱	۱	cde۱/۳ ±۲/۱۹۹	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
	۱/۵	cd۱/۳ ±۲/۳۵۷	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴±۰	e۰/۲۴±۰
	۲	abc۱/۳ ±۲/۸۳۳	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰	e۰/۲۴±۰
	۰	hi۱/۳±۰/۱	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰/۳۳	bcde۰/۲۴±۰/۲۶۹	a۰/۲۴±۳۴/۵
	۰/۵	ghi۱/۳±۰/۶۶۷	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	bcde۰/۲۴±۰/۱۷۷	e۰/۲۴±۰
۱/۵	۱	abc۱/۳ ±۲/۸۰۶	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	e۰/۲۴ ±۰	e۰/۲۴±۰
	۱/۵	ab۱/۳ ±۳/۰۹	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱±۰	cde۰/۲۴ ±۰/۱۳۹	e۰/۲۴±۰
	۲	abcd۱/۳±۲/۴۶۹	b۰/۲۴ ±۰	f۲۷/۰۱ ±۰	cde۰/۲۴ ±۰/۰۷۲	e۰/۲۴±۰

www.SID.ir

جدول ۲- اثر هورمون IAA بر تولید کالوس، ریشه‌زایی و اندام زایی قطعات جداکشت. حروف مشترک عدم تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (آزمون LSD با $P\leq0.05$).

IAA (mg/L)	وزن تر کالوس (g)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن تر ریشه (g)
۰	۰/۰۳۴±۰/۲a	۰/۶۶۶±۰/۵۸a	۰/۲۲۳±۰/۵۸a
۰/۵	۰/۰۹۵±۰/۲a	۰/۸±۰/۵۸a	۰/۶۲۰±۰/۵۸a
۱	۰/۰۷۶±۰/۲a	۰/۴۹۵±۰/۵۸a	۰/۶۰۷±۰/۵۸a
۱/۵	۰/۱۴۸±۰/۲a	۰/۴۲۹±۰/۵۸a	۰/۱۴۵±۰/۵۸a
۲	۰/۳۷۹±۰/۲a	۰/۵۰۹±۰/۵۸a	۰/۱۸۳±۰/۵۸a

جدول ۳- محتوای آلکالوئید تام در کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت‌های حاوی BA و NAA. حروف نامشابه علامت وجود تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون LSD با $P\leq0.05$).

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	محتوای آلکالوئید تام (mg/g Fw)
	۰	۰/۰۳۴ ±۱/۳۳d
۰	۰/۵	d±۱/۳۳ ۰/۲۵۷
	۱	۰/۲۶۹±۱/۳۳d
	۱/۵	۰/۲۸۲±۱/۳۳d
	۰/۵	۱/۵۵۲±۱/۳۳C
۰/۵	۱	۲/۸۷۳±۱/۳۳a
	۱/۵	۰/۶۳۳±۱/۳۳d
	۰/۵	۳/۱۴۴±۱/۳۳a
۱	۱	۲/۱۹۹±۱/۳۳bc
	۱/۵	۲/۳۵۷±۱/۳۳abc

جدول ۴- محتوای آلکالوئید تام در اندام‌های هوایی و ریشه تشکیل شده در محیط کشت‌های فاقد BA و NAA.

اندام مورد بررسی	محتوای آلکالوئید تام (mg/g Fw)
اندام هوایی	۰/۰۴۵ ±۰/۰۱
ریشه	۰/۰۵۱ ±۰/۰۱

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در مطالعه انجام شده توسط Dessouky و همکاران (۲۰۰۱) اثر غلظت‌های مختلف ۲ و ۴- دی کلرو بنزن، کاینتین، نفتالن استیک اسید و بنزیل آدنین در کشت تعلیقی *Datura stramonium* و *D. metel* بررسی و بهترین ترکیب هورمونی برای تولید کالوس در محیط کشت مایع MS غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BA و NAA پیشنهاد شده است. در پژوهش حاضر نیز بیشترین وزن تر کالوس در حضور ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BA و NAA به دست آمد که از نظر نوع هورمون‌های به کار رفته و نسبت آنها با نتایج فوق مطابقت دارد. البته، در این پژوهش، گونهٔ مورد بررسی و محیط کشت به کار رفته متفاوت است که می‌تواند دلیل تفاوت غلظت هورمون‌ها در دو بررسی باشد. در مطالعه‌ای دیگر Ajungla و همکاران (۲۰۰۹) با کشت ریشهٔ *D. metel* دریافتند که غلظت‌های مختلف IAA برای ریشه‌زایی این گیاه مناسب است، در حالی که در این مطالعه IAA اثر معنی‌داری بر ریشه‌زایی در بن اندام‌های هوایی تاتوره تماشایی نداشت. در عوض، محیط B5 فاقد هورمون، ریشه‌زایی را تحریک نمود و حضور NAA به تنهایی نیز موجب ریشه‌زایی شد. به نظر می‌رسد عدم تطابق این نتایج ناشی از تفاوت ژنوتیپ دو گونه تاتوره باشد. تشکیل کالوس‌های نیمه شفاف گیاه *D. stramonium* در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA و کاینتین (Kin) توسط Iranbakhsh و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شد. این امر به همراه نتایج حاصل از مطالعه Dessouky و همکاران (۲۰۰۱) و نیز پژوهش حاضر پیشنهاد می‌کند که جنس تاتوره برای تولید کالوس به حضور همزمان اکسین و سایتوکینین نیاز دارد. Shirin و همکاران (۲۰۰۷) نیز محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA را به عنوان بهترین محیط برای ایجاد کالوس از قطعات جداکشت برگ سیب‌زمینی معرفی نمودند. این نتیجه احتمال تعمیم پیشنهاد فوق را به تیره سیب‌زمینی تقویت می‌کند، اما Zayed و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی بر روی اندام‌زایی و تولید آلکالوئیدها در تاتوره تماشایی از قطعات جداکشت ساقه در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA کالوس به‌دست آوردند. در پژوهش حاضر، اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و IAA بررسی نشده است، ولی این نتایج نیز از نظر لزوم کاربرد همزمان اکسین و سایتوکینین برای تولید کالوس با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت بافت بستگی زیادی به ترکیب محیط کشت دارد. اثر فاکتورهای مختلف مثل منابع تغذیه‌ای، هورمون‌های رشد و شرایط رشدی مختلف بر تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت بافت مطالعه شده است (Iranbakhsh *et al*., 2007). مشخص شده است که انواع و غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد مثل اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها آثار مختلفی بر رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. کشت کالوس‌های برگی گیاه *D. stramonium* توسط EL-Bahr و همکاران (۱۹۸۹)، افزایش رشد و محتوای آلکالوئیدی را در در حضور غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، NAA، Kin و BA به تنهایی یا

Archive of SID

www.SID.ir

به صورت متقابل نشان داد. نقش مستقیمی برای اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها در مسیر متابولیسمی تروپان آلکالوئیدها گزارش نشده است، ولی نتایج مطالعات، وجود نقشی غیرمستقیم را برای این هورمون‌ها تأیید می‌کند. در این پژوهش نیز در حضور BA با افزایش غلظت هورمون NAA افزایش محتوای آلکالوئید تام نسبت به شاهد مشاهده شد.

بررسی اندام‌زایی گیاه *D. stramonium* و تولید آلکالوئیدها توسط Zayed و همکاران (۲۰۰۶) در شیشه انجام شد و اعلام گردید که محتوای آلکالوئیدی در اندام‌های باززایی شده بیشتر از کالوس‌های سازمان نیافته است. به عبارت دیگر، تمایز بافت‌ها موجب افزایش میزان تولید تروپان آلکالوئیدها می‌گردد. این نتایج با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که نشان دهنده بیوسنتز مقادیر کمتر آلکالوئید در کالوس‌ها نسبت به اندام هوایی و ریشه در محیط فاقد هورمون است، مطابقت دارد.

منابع

زمان، س. (۱۳۷۰) گیاهان دارویی با روش کشت، برداشت و داشت. انتشارات ققنوس، تهران.

شایا، ا. (۱۳۶۹) رُستنی‌های دارویی در پزشکی معاصر. انتشارات گوتنبرگ، تهران.

شهراز، س. و غازیانی، ط. (۱۳۸۱) ایران فارما، انتشارات تیمورزاده، تهران.

صمصام شریعت، س. ه. (۱۳۸۳) گزیده گیاهان دارویی. انتشارات معانی، تهران.

لاهوتی، م. (۱۳۷۶) اصول فیزیولوژی گیاهی، جلد ۲. مؤسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد.

Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B. and Nikam, T. D. (2009) Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyosyamine and scopolamine in root culture of *Datura metel* L.. Indian Journal of Biotechnology 8: 317-322.

Arteca, R. (1996) Plant growth substances. Chapman and Hall Press, New York.

Berkov, S. and Zayed, R. (2004) Comparisons of tropane alkaloids spectra between *Datura innoxia* grown in Egypt and Bulgaria. Zeitschrift Naturforschung 59: 184-186.

Boitel-Conti, M., Laberche, J. C., Lanoue, A., Ducrocq, C. and Sangwan- Norreel, B. S. (2000) Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 131-137.

Dashek, W. V. (1997) Methods in plants biochemistry and molecular biology. CRC Press, London.

Dessouky, M., Taha, H. and El-Bahr, M. (2001) Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L.. Biotechnology 4: 23-30.

El-bahr, M. K., Ghanem, S. A., Saker, M. M. and badr, A. (1989) Tissue culture of *Phaseolus vulgaris* L.. Plant Biosystems 130: 717-727.

Archive of SID

www.SID.ir

Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Iranbakhsh, A., Oshaghi, M. and Ebadi, M. (2007) Growth and Production of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(8): 1236-1242.

Verpoorte, R., Alferman, A. W. and Johnson, T. S. (2007) Applications of plant metabolic engineering. Springer, The Netherlands.

Shirin, F., Hossein, M., Kabir, M. F., Roy, M. and Sarker, S. R. (2007) Callus induction and plant regeneration from intermodal and leaf exolants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. World Journal of Agricultural Science 3: 1-6.

Zayed, R., Winkb, M. and EI-Shamy, H. (2006) *In vitro* Organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia*. Zeitschrift Naturforschung 61: 560-564.

Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E. and Oksman caldentey, M. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* Hairy root cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 6786-6791.

Archive of SID

www.SID.ir