پژوهش و سازندگی
شماره ۶۲، بهار۱۳۸۳
در زراعت و باغبانی

بهینه‌سازی رشد وتولید آلکالوئیدهای تروپانی درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه تاتوره (*Datura stramonium* L.)

• علیرضا ایرانبخش، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۳

چکیده

دراین پژوهش باتوجه به نقش اساسی آلکالوئیدهای تروپانی درصنایع داروئی وبه منظورزمینه سازی تولید نیمه صنعتی وصنعتی الکالوئیدها ، گیاه تاتوره (Datura stramonium) ازنظربهینه سازی رشد وتولید آلکالوئیدهای تروپانی به وسیله برخی عوامل فیزیکوشیمیایی مورد بررسی قرارگرفت . سوسپانسیون سلولی ازکالوس های نیمه شفاف حاصل ازجداکشت های برگی درمحیط MSدارای هورمون‌های کینتین (mg / lit ۰/۵) واسید نفتالن استیک (۲mg/lit) به دست آمد . نتایج حاصل ازبررسی غلظت های مختلف گلوکز نشان داد که در مقدار ۳۰ گرم بر لیتر بیشترین تولید آلکالوئید ودر۴۰ گرم برلیتر بیشترین مقدار زی توده به وجود می‌آید . بررسی نقش مقادیرمختلف سوکروز نشان داد که بیشترین میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی درغلظت ۲۰ گرم برلیتر و بیشترین زی توده درمقدار ۴۰ گرم برلیتر می‌باشد . نتایج آزمایش‌ها مشخص ساخت افزایش غلظت نیترات پتاسیم موجب کاهش بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی می‌گردد و مناسب ترین غلظت به کارگرفته شده میزان ۹/۴ میلی مولار است . بیشترین تولید زی توده درمحیط دارای ۳۷/۶ میلی مولار به دست آمد . همچنین مشخص شد که غلظت بهینه نیترات آمونیوم برای تولید آلکالوئید ۱۰/۳ میلی مولار و بیشینه زی توده در۴۱/۲۲ میلی مولار می‌باشد. درخصوص کلرید کلسیم بررسی‌ها نشان داد ازبین غلظت‌های به کارگرفته شده مقدارمناسب کلرید کلسیم برای رشد وتولید آلکالوئید ، ۷/۹۲ میلی مولار است. نتایج حاصل از بررسی اثردما نیزمشخص ساخت مناسبت ترین دما برای تولید آلکالوئید دمای ۲۰ درجه سانتی گراد است . بیشترین تولید زی توده دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد بدست آمد .

کلمات کلیدی: سوسپانسیون سلولی، *D.stromonium*، آلکالوئیدهای تروپانی .

Pajouhesh & Sazandegi No:62 pp: 25-34

Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture

By: A. Iranbakhsh.Assistant Professor of Islamic Azad University.Garmsar ,Iran.

Tropane alkaloids play vital roles in pharmaceutical industries . The researcher conducted the research in order to show the importance of these contents in industrial and semindustrial production of *D. stramonium* from solanaceae. The optimize situation for growth and production of tropane alkaloids via physicochemical factors

Archive of SID
www.SID.ir

were studied previously . Cell suspension from semiclear calli of leave explants in MS medium was obtained . MS medium contained kinetein (0.5 mg/ lit) and NAA (2mg / lit) hormones .The results obtained from the different concentrations of glucose specified that the highest level of most alkaloids production obtained by 30 g/ lit glucose . In 40 g/ lit glucose , the most biomass was produced . In different concentrations of sucrose study it was specified that the most rate of alkaloids production obtained by 20 g/ lit and the most rate of biomass production obtained by 40 g/ lit.The results showed that the concentration increased of nitrate led to the production decrease of tropane alkaloids .The best concentration of potassium nitrate for the production of tropane alkaloids was 9. 4 mM, and that of potassium nitrate for the production of biomass was 37.6 mM . Also it was evinced that the optimized concentration of ammonium nitrate for alkaloids production was 10 . 3 mM , and for the biomass was 41.22mM . The study of calcium choloride indicated that the best concentration for the growth and production of alkaloids was7.92 mM . The results obtained from the temperature study specified that the best condition for the most production of alkaloids was at 200°c and that of the most biomass production was at 250°c

Key words: Cell suspension , *Datura stramonium* , Tropane alkaloids.

مقدمه

گیاه تاتوره (*Datura stramonium* L.) از تیره سیب زمینی (Solanaceae) به دلیل غنی بودن از آلکالوئید های تروپانی در صنایع داروسازی از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد (۱). تاتوره گیاهی علفی، یکساله وبه ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی متر وگاه متجاوز از یک متر است . تاتوره ریشه ای به نسبت ضخیم وساقه گرد ودارای انشعابات دو شاخه ای دارد . برگها پهن و نوک تیز و دارای دمبرگهای دراز می‌باشند . گل ها بزرگ، منفرد ودارای دمگل های دراز هستند . موسم گلدهی ازخرداد تا مهرماه می‌باشد . تاتوره دارای میوه ای پوشینه ، خاردار ومحتوی حدود ۴۰۰ دانه است که در ۴ ردیف جای دارند وبا ۴ شکاف طولی باز می‌شوند .تاتوره به واسطه داشتن آلکالوئید های تروپانی هیوسیامین ، اسکوپولامین و آتروپین برروی چشم ، سیستم عصبی ، قلب ، جریان خون وترشحات بدن دارای اثرات عمیقی می‌باشد (۳) .

دراین پژوهش ، بهینه سازی شرایط تولید آلکالوئید های تروپانی به منظورایجاد زمینه تولید نیمه صنعتی وصنعتی آلکالوئیدهای تروپانی طراحی و اجرا گردید . تولید کالوس بابیشترین میزان تولید آلکالوئید به عنوان ماده اولیه سوسپانسیون سلولی ازدیگر اهداف این تحقیق بوده است. تحقیقات ایرانبخش وهمکاران (۲) نشان داد ،تولید کالوس حاصل از جداکشت‌های برگی ، بیش ازتولید کالوس بدست آمده ازجدا کشت ساقه است . همچنین در بررسی ایشان مشاهده شد بهترین محیط کالوس زایی جداکشت‌های برگی ، محیط کشت پایه MS با تیمارهورمونی NAA به میزان ۰/۵ میلی گرم برلیتر است (۳).

Chartwood و همکاران (۱۹۹۰) بیان داشتند برای به دست آوردن الکالوئیدهای تروپانی باید به کشت بافت های سازمان یافته توجه شود . این محققین اعلام داشتند بین تمایز بافت های ریشه و بیوستنتز آلکالوئیدهای تروپانی ارتباط وجود دارد . بنابراین ، کشت درشیشه ریشه رابه عنوان یک سیستم بیوتکنولوژی مناسب برای افزایش بازده تولید آلکالوئیدهای تروپانی اعلام نمودند .

تحقیق برای افزایش بازده تولید آلکالوئید های تروپانی درسیستم کشت درشیشه به تجربه متغیرهای بسیار نظیر تاثیر فیتوهورمون های اگزوژن ، ماکرو و میکرو المانها ، قندها ، ویتامین ها و سایرعوامل فیزیکی هدایت می‌شوند .

مجد، چلپیان، ضمن بررسی بیوستنترآلکالوئیدهای تروپانی درکشت های درون شیشه‌ای بنگدانه (*Hyoscyamus niger*)، تاثیر برخی از عناصر و قند سوکروز بر بیوستنتر آلکالوئیدهای تروپانی را مورد بررسی قرار داد و بیان نمود محیط کشت داری نیترات سبب افزایش رشد و سرعت تمایز ریشه می‌شود که باکاهش مقدارتولید آلکالوئید همراه است ولی کاهش نیترات، تولید آلکالوئید را افزایش می‌دهد. ایشان غلظت بهینه سوکروز را ۱۰ میلی مولار گزارش نمود. افزایش میزان سوکروز، تمایز و رشد ریشه را سریعترکرده و بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی رانیز افزایش می‌دهد (۴) .

Hilton وهمکاران اعلام نمودند درکشت بافت گونه های مختلف تاتوره۴ NH_4^+ po_3^- به طورکامل ازمحیط کشت جذب می‌شوند وبه احتمال NH_4^+ پیش ماده ای برای بیوستنتر آلکالوئید ها می‌باشد (۹) .

Gontier و همکاران به بررسی اثرهای کلسیم ، آلژینات و آلژینات کلسیم برروی رشد وسطوح میزان الکالوئیدهای تروپانی درلاین های سوسپانسیون سلولی *Datura innoxia* پرداختند و بیان نمودند که تاثیرکلسیم به میزان ۱۰ میلی مولار موجب افزایش به میزان ۱۰ برابر بازده تولید نسبت به سلول‌های کنترل درمحیط استاندارمی‌شود (۸) .

مجد، امیرجانی بیان داشت غلظت‌های ۲و۳ درصد سوکروز منجر

Archive of SID
www.SID.ir

بـه افزایش میزان آتروپیـن درگیاه شـابیزک (*Atropa belladonna*) ازتیره سـیب زمینـی می‌شـود ، همچنین این محقـق غلظت ۱۰ میلی مولارکلسیم را برای تولید بیشینیه آتروپین ، بهینه گزارش نمود(۱) .

Demeyer وهمکاران گزارش کردنـد ، تیمار نیتروژنی باعث افزایش میزان هیوسـیامین درکشـت های ریشـه *D. stramonium* می‌شود (۶) ، همچنین ایشـان درسـال ۱۹۸۸ بیان داشـتند کـه یون‌هایی NO_3^- موجب افزایش وزن خشـک وتولیـد هیوسـیامین در *D. stramonium* درشرایط گلخانه ای می‌شود (۵) .

Rhoton وهمکاران در۱۹۹۴ گزارش کردند مقدار آلکالوئیدهای برگ و ساقه *D. stramonium* در دمـای ۲۴ درجـه سانتیگـراد ، پنجاه درصد کمتـراز دمای ۱۴ درجه می‌باشد (۱۶) .

Hilton وهمـکاران بیان داشـتند درگیاه تاتوره ، تولید هیوسـیامین درکشـت بافت با دمای ۲۰ و۲۵ درجه نسـبت به کشت بافت دردمای ۳۰ درجه افزایش می‌یابد (۱۰).

مواد و روش‌ها

گیاه *D. stramonium* ازکیلومتر ۱۲ جاده رشـت - فومن (شـمال ایران) جمع آوری شد . گیاهان جمع آوری شده درگیاهکده فارابی (تهران، ایران) مورد شناسـایی و تایید قرار گرفت . بذرگیاه نیز از بانک بذر موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شد .

روش استخراج آلکالوئیدهای تروپانی

ازمراحل ذیل جهت استخراج وجداسازی آلکالوئیدها استفاده گردید که به ترتیب عبارتند از :

نمونه ها خشـک وتوزین گردیدند .به ماده خشک گیاهی (۵۰ گرم)، ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت دردمای ۲۵ درجه سـانتی گراد قرار گرفت .پس ازگذشـت زمان لازم ، حلال اتانل در رواواپراتور تبخیر گردید . به ماده خشـک شـده ۲۰۰ میلی لیتر اسـید سـولفوریک ۵ درصد اضافه شـد و به مدت ۸ ساعت درحالت چرخش آرام در دمای ۲۵ درجه سـانتی گراد قرار گرفت. درچهارمرحله وهربار ۵۰ میلی لیتـر کلروفرم به مخلوط اضافه وته نشسـت کلروفرمی‌دارای مواد رنگ دار خارج شـد. محلول اسیدی رونشسـت فیلتر وپس از آن pH محلول به ۱۰ رسـانده شـد .درچهار مرحله وهربار ۵۰ میلی لیترکلروفرم به محلول باقی مانده اضافه و ته نشست دارای آلکالوئیدها جدا شد . حلال تبخیر وباقیمانده آلکالوئیدی درمتانول حل گردید .

شناسایی آلکالوئید های تروپانی

۱ـ شناسـایی کیفـی: برای شناسـایی کیفـی از روش کروماتوگرافی روی لایه نازک (T.L.C) اسـتفاده شـد . فاز ثابت سیلیکاژل وفاز متحرک ، مخلوط حاوی کلروفرم ومتانول با نسـبت ترتیبی ۹ به ۱ بود . هنگامی‌که فـاز متحـرک به اندازه ۱۰ سـانتی متـر روی فاز ثابت حرکـت کرد آن را ازمخزن جدا کرده وبلافاصله بر روی آن معرف دراژاندروف افشـانه پاشـی شد . درصورت وجود آلکالوئید ، رنگ نارنجی معرف آلکالوئید است ، صفحه زمینه کرم رنگ می‌شود .

۲ـ شناسـایی کمـی: الـف - روش اسـپکتروفتومتری، دراین روش ازعصاره متانولی دارای آلکالوئید ودسـتگاه اسـپکتروفتـومتـر استفـاده شـد . طیف مورد نظر درمحدوده نوری ۲۶۵ـ ۲۴۵ نانومتر تنظیم گردید ، طیف های بدسـت آمده از اندام ها ونمونه های مختلف گیاهی وسـلولی با طیف های اسـتاندارد ومقایسـه ومیزان آلکالوئید آنها محاسبه گـردیـد

جدول۱-نتایج مربوط به تیمار گلوکز ۱۰٪ در محیط کشت MS با تیمارهورمونی Kin=۰/۵ و NAA=۲ میلی گرم بر لیتر در طی هشت هفته

مشخصات تعداد هفته	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
وزن تر	۲۵	۳۳	۱۲۱	۱۳۴	۱۴۲	۱۴۸	۱۴۴	۱۴۳
وزن خشک	۲/۸	۳/۸	۱۲/۴	۱۴	۱۴/۳	۱۵/۰۱	۱۴/۵	۱۴/۴
تعداد سلول	۱۰۰۰۰	۱۹۰۰۰	۷۰۰۰۰	۷۴۰۰۰	۷۸۰۰۰	۷۵۰۰۰	۷۱۰۰۰	۷۲۰۰۰
تولید آلکالوئید	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۲۲	۰/۰۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۲۵	۰/۰۲۳	۰/۰۲۱

جدول۲-نتایج مربوط به تیمار گلوکز ۲۰٪ در محیط کشت MS با تیمارهورمونی Kin=۰/۵ و NAA=۲ میلی‌گرم بر لیتر در طی هشت هفته

مشخصات تعداد هفته	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
وزن تر	۲۵	۳۸	۱۷۲	۱۸۵	۱۸۳	۱۸۴	۱۷۹	۱۷۵
وزن خشک	۲/۸	۵/۹	۱۷/۵	۱۹/۱	۱۸/۳	۱۸/۵	۱۸	۱۷/۴
تعداد سلول	۱۰۰۰۰	۲۸۰۰۰	۱۰۵۰۰۰	۱۱۵۰۰۰	۱۱۸۰۰۰	۱۱۶۰۰۰	۱۱۷۰۰۰	۱۱۵۰۰۰
تولید آلکالوئید	۰/۰۱۷	۰/۰۲۱	۰/۰۲۸	۰/۰۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۳۲	۰/۰۳۱	۰/۰۲۹

Archive of SID
www.SID.ir

ب- روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (H.P.L.C) ،دراین روش از ستون C۱۸ (۱۵۰ ۴/۶ mmID) با flow rate =۰/۷ استفاده شد .که فاز متحرک ایزو کراتیک شامل استونیتریل و آب بود . منحنی های بدست آمده با منحنی های استاندارد آتروپین سولفات واسکوپولامین کلراید مقایسه واندازه گیری شد .

برای تهیه جداکشت های برگی طبق روش ایرانبخش و همکاران برگ به سه بخش قاعده ای ، میانی و راسی تقسیم شد و سپس جداکشت‌ها به محیط کشت پایه MS با تیمارهورمونی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر انتقال داده شد (۲). پس از تولید ۴ تیپ کالوس (شفاف ، نیمه شفاف ، سبز و اندامزا) و انجام بررسی های بیوشیمیایی ،کالوس های نیمه شفاف ، دارای سلول ایدیوبلاست و همچنین آلکالوئیدهای تروپانی تشخیص داده شد (۳،۲) . بنابراین ،از کالوس های نیمه شفاف جهت تولید سوسپانسیون‌های سلولی وبهینه سازی شرایط تولید آلکالوئیدهای تروپانی استفاده گردید. کالوس‌های نیمه شفاف در این مرحله به محیط کشت پایه MS دارای انواع تنظیم کننده‌های رشد از جمله ترکیبات اکسینی ،جیبرلینی و سیتوکینینی با مقادیر متفاوت منتقل شدند . نتایج نشان داد که مناسب ترین تیمار، محیط کشت پایه MS دارای ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کینتین (KIN) و نفتالن استیک اسید(NAA) به میزان ۲ میلی گرم بر لیتر می‌باشد. شیکر نیز برروی ۱۲۰ rpm تنظیم شد .

جهت شناسایی نقش عوامل فیزیکو شیمیایی ، غلظت‌های مختلف ترکیباتی نظیر گلوکز، سوکروز ، نیترات پتاسیم ، نیترات آمونیوم ،کلرید کلسیم وعامل دما مورد بررسی قرارگرفت ، غلظت های هورمونی درتمام محیط‌های کشت ثابت بود . شاخص های مورد سنجش، میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی ، تعداد سلول ، وزن تر و خشک زی توده تعیین شد .

نتایج

دراین پژوهش ، نقش عناصر، ترکیبات و عوامل مختلف بر میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی مورد بررسی قرارگرفت، نتایج به دست آمده به شرح ذیل می‌باشد :

الف- گلوکز

ازقند گلوکز، باغلظت های ۱۰،۲۰،۳۰و۴۰ گرم برلیتر در محیط کشت پایه MS با تیمار هورمونیKIN به مقدار ۰/۵ و NAA به میزان ۲ میلی گرم برلیتر استفاده شد . نتایج مربوط به تیمارگلوکز در مقادیر ۱۰ ، ۲۰ ، ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر درجداول ۱،۲،۳و۴ نشان داده شده است . بررسی ها نشان داد:

۱- نقش مقادیرمختلف گلوکز بر تولید آلکالوئید

بیشترین میزان تولید آلکالوئید درمقدار ۳۰ گرم برلیتراست که پس ازآن به ترتیب مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۱۰ قراردارند . بیشترین مقدار تولید آلکالوئید در هفته ششم از زمان کشت است . زمان اوج تولید آلکالوئید درمقادیر ۲۰،۴۰و۱۰گرم برلیتر در هفته پنجم می‌باشد (تصویر۱).

۲- نقش مقادیر مختلف گلوکز بر تعداد سلول ها

نتایج نشان داد که بیشترین تعداد سلول مربوط به محیط دارای مقدار ۴۰ گرم برلیترگلوکز درهفته پنجم است . پس ازآن به ترتیب مقادیر۳۰،۲۰و۱۰درهفته های ششم ، پنجم وپنجم قراردارند (تصویر۲).

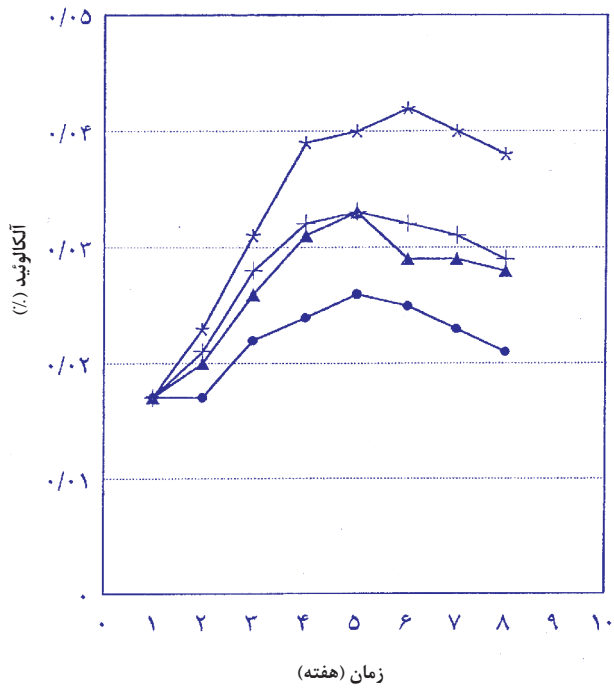
جدول۳-نتایج مربوط به تیمار گلوکز ۳۰٪ در محیط کشت MS با تیمارهورمونی Kin=۰/۵ و NAA=۲ میلی‌گرم بر لیتر در طی هشت هفته

مشخصات تعداد هفته	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
وزن تر	۲۵	۷۲	۲۲۱	۲۶۷	۲۵۳	۲۶۹	۲۶۳	۲۶۴
وزن خشک	۲/۸	۷/۴	۲۱/۷	۲۷/۳	۲۵/۸	۲۶/۱	۲۶/۸	۲۷/۱
تعداد سلول	۱۰۰۰۰	۳۵۰۰۰	۱۲۲۰۰۰	۱۴۰۰۰۰	۱۳۹۰۰۰	۱۴۲۰۰۰	۱۴۱۰۰۰	۱۴۰۰۰۰
تولید آلکالوئید	۰/۰۱۷	۰/۰۲۳	۰/۰۳۱	۰/۰۳۹	۰/۰۴۰	۰/۰۴۲	۰/۰۴۰	۰/۰۳۸

جدول۴-نتایج مربوط به تیمار گلوکز ۴۰٪ در محیط کشت MS با تیمارهورمونی Kin=۰/۵ و NAA=۲ میلی‌گرم بر لیتر در طی هشت هفته

مشخصات تعداد هفته	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
وزن تر	۲۵	۸۸	۲۵۳	۲۹۷	۳۰۲	۲۶۸	۲۷۳	۲۶۵
وزن خشک	۲/۸	۹/۳	۲۴/۷	۲۸/۳	۳۰/۹	۲۷/۳	۲۷/۹	۲۵/۸
تعداد سلول	۱۰۰۰۰	۴۲۰۰۰	۱۳۶۰۰۰	۱۵۴۰۰۰	۱۵۶۰۰۰	۱۴۸۰۰۰	۱۴۹۰۰۰	۱۴۳۰۰۰
تولید آلکالوئید	۰/۰۱۷	۰/۰۲۰	۰/۰۲۶	۰/۰۳۱	۰/۰۳۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	۰/۰۲۸

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر ۱- نقش مقادیر مختلف گلوکز بر تولید آلکالوئیدهای تروپانی

۳- نقش مقادیر مختلف گلوگز بر وزن تر زی توده

همانگونه که درتصویرشماره ۳ مشخص است بیشترین میزان وزن تر مربوط به محیط کشت دارای ۴۰ گرم بر لیترگلوگزدر هفته پنجم است وپس ازآن به ترتیب مقادیر۳۰،۲۰و۱۰درهفته های ششم ، چهارم وششم قراردارند (تصویر۳).

۴- نقش مقادیرمختلف گلوگزبروزن خشک زی توده

نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط کشت دارای ۴۰ گرم بر لیتر گلوگز درهفته پنجم است وپس ازآن به ترتیب مقادیر۳۰،۲۰،۱۰ در هفته های چهارم ، چهارم و ششم قرار دارند (تصویر۴).

ب ـ سوکروز

از قند سوکروز،باغلظت های ۱۰،۲۰،۳۰و۴۰ گرم برلیتر استفاده شد ، بررسی ها نشان داد :

۱- نقش مقادیرمختلف سوکروز بر تولید آلکالوئید

بیشترین میزان تولید آلکالوئید درمقدار۲۰ گرم بر لیترسوکروز درهفته پنجم است وپس از آن به ترتیب مقادیر ۳۰،۴۰و۱۰ گرم درهفته های ششم ، پنجم وپنجم پس از زمان کشت است .

۲- نقش مقادیرمختلف سوکروز برتعداد سلول ها

نتایج نشان داد ، بیشترین تعداد سلول ها مربوط به محیط دارای ۴۰ گرم برلیترسوکروز در هفته هفتم است پس ازآن به ترتیب مقادیر ۳۰،۲۰و۱۰گرم درهفته های هفتم ، پنجم و ششم قراردارند .

۳- نقش مقادیرمختلف سوکروز بر وزن تر زی توده

بیشترین میزان وزن ترمربوط به محیط دارای ۴۰ گرم بر لیتر سوکروز درهفته هفتم است وپس از آن به ترتیب مقادیر ۳۰،۲۰و۱۰ گرم بر لیتر در هفته هفتم قرار دارند .

۴- نقش مقادیر مختلف سوکروز بر وزن خشک زی توده

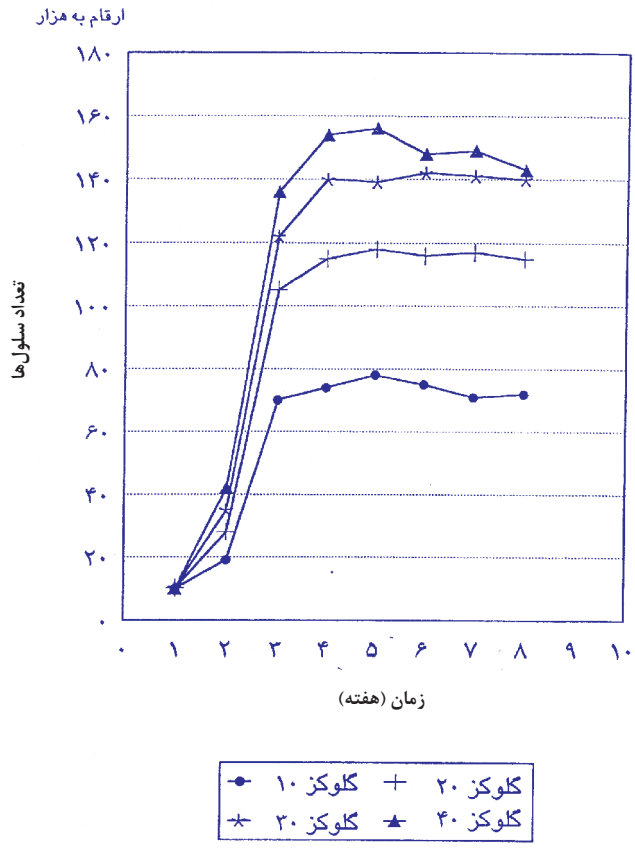
نتایج نشان داد ، بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط کشت دارای ۴۰ گرم بر لیتر سوکروز درهفته هفتم است و پس از آن به ترتیب مقادیر ۳۰،۲۰و۱۰ گرم بر لیتر درهفته های ششم ، پنجم وششم قراردارند .

ج- نیترات پتاسیم (KNO_3)

از نیترات پتاسیم باغلظت های ۰ ، ۹/۴، ۱۸/۸ و۳۷/۶ میلی مولاراستفاده شد .

۱- نقش غلظت های مختلف نیترات پتاسیم بر تولید آلکالوئید

بیشترین میزان تولید آلکالوئید ، مقدار ۹/۴ میلی مولار در هفته سوم است وپس از آن به ترتیب مقادیر ۱۸/۸، ۳۷/۶ وصفر میلی مولار



تصویر ۲- نقش مقادیر مختلف گلوکز بر تعداد سلول‌ها

www.SID.ir

در هفته های پنجم ، سوم و سوم پس از زمان کشت است .

۲- نقش غلظت های مختلف نیترات پتاسیم بر تعداد سلول ها

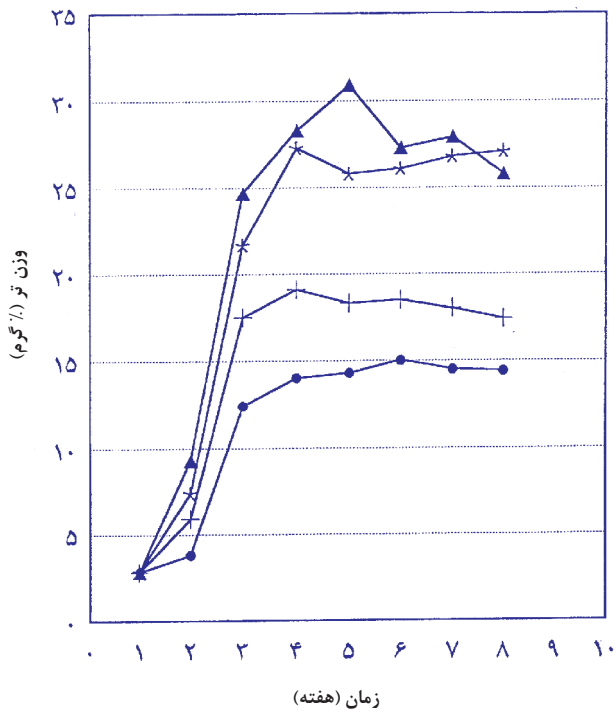
نتایج نشان داد ، بیشترین تعداد سلول ها مربوط به محیط دارای ۳۷/۶ میلی مولار نیترات پتاسیم درهفته هشتم است . پس ازآن به ترتیب مقادیر ۹/۴، ۱۸/۸ وصفر میلی مولار در هفته های پنجم ، هفتم وهشتم قراردارند .

۳- نقش غلظت های مختلف نیترات پتاسیم بر وزن تر زی توده .

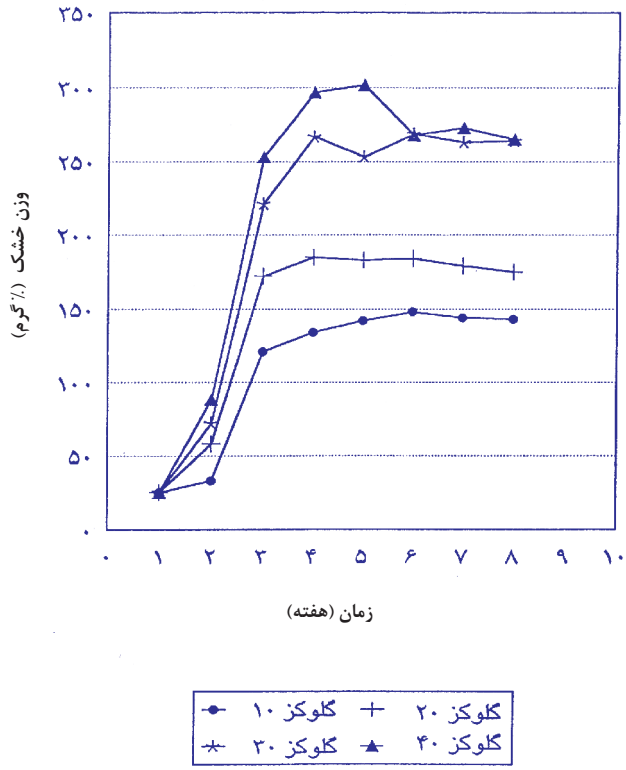
بیشترین میزان وزن تر مربوط به محیط دارای۳۷/۶ میلی مولار نیترات پتاسیم در هفته پنجم است و پس ازآن به ترتیب مقادیر۱۸/۸ ، ۹/۴ و ۰ میلی مولار در هفته های ششم ، هفتم و هشتم قرار دارند.

۴- نقش غلظت های مختلف نیترات پتاسیم بر وزن خشک زی توده

بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط کشت دارای ۳۷/۶ میلی مولار نیترات پتاسیم در هفته پنجم است و پس از آن به ترتیب مقادیر ۱۸/۸ ، ۹/۴ و صفر میلی مولار در هفته های پنجم ، هفتم و هشتم قرار دارند .



تصویر ۳- نقش مقادیر مختلف گلوکز بر وزن ترزی توده



تصویر ۴- نقش مقادیر مختلف گلوکز بر وزن خشک زی توده

د- نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)

ازنیترات آمونیوم با غلظت های ۰ ، ۱۰/۳۰ ، ۲۰/۶۱ ، ۴۱/۲۲ میلی مولار استفاده شد، نتایج نشان داد :

۱- نقش غلظت های مختلف نیترات آمونیوم برتولید آلکالوئید

بیشترین میزان تولید آلکالوئید مربوط به محیط دارای ۱۰/۳۰ میلی مولار نیترات آمونیوم درهفته سوم است پس ازآن به ترتیب مقادیر ۶۱/ ۲۰، ۴۱/۲۲ و ۰ میلی مولار درهفته های پنجم ، سوم وپنجم قراردارند .

۲-نقش غلظت های مختلف نیترات آمونیوم برتعداد سلول ها .

نتایج نشان داد ، بیشترین تعداد سلول ها مربوط به محیط دارای ۴۱/۲۲ میلی مولار نیترات آمونیوم در هفته هشتم است . پس ازآن به ترتیب مقادیر ۲۰/۶۱، ۱۰/۳۰ وصفر میلی مولاردرهفته های پنجم ، پنجم وهشتم قراردارند .

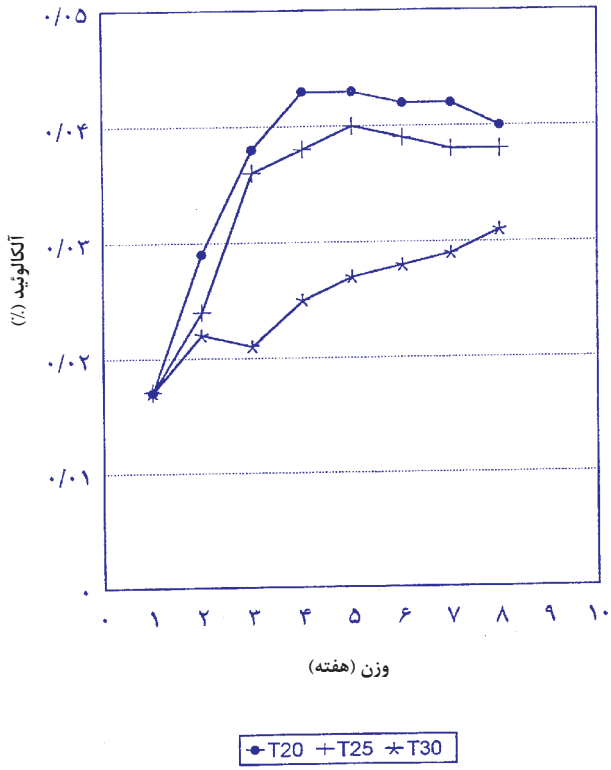
۳- نقش غلظت های مختلف نیترات آمونیوم بروزن تر زی توده .

بیشترین مقدار وزن تر مربوط به محیط دارای ۴۱/۲۲ میلی مولار نیترات آمونیوم درهفته پنجم است و پس ازآن به ترتیب مقادیر ۲۰/۶۱ ، ۱۰/۳۰ وصفر میلی مولار درهفته های ششم ، هشتم و ششم قرار دارند .

۴ـ نقش غلظت های مختلف نیترات آمونیوم بروزن خشک زی توده .

بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط کشت دارای ۴۱/۲۲

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر ۵- نقش دما بر تولید آلکالوئید

میلی مولارنیترات آمونیوم درهفته پنجم است وپس ازآن به ترتیب مقادیر ۲۰/۶۱، ۱۰/۳۰ وصفر میلی مولار در هفته‌های پنجم، هشتم و ششم قراردارند.

هـ کلرید کلسیم ($CaCl_2$)

ازکلرید کلسیم باغلظت‌های ۰، ۱/۹۸ و ۳/۹۶ و ۷/۹۲ میلی مولاراستفاده شد، نتایج نشان داد:

۱- نقش غلظت کلرید کلسیم برتولید آلکالوئید.

بیشترین میزان تولید آلکالوئید مربوط به محیط دارای ۷/۹۲ میلی مولار کلرید کلسیم درهفته چهارم است و پس ازآن به ترتیب مقادیر ۳/۹۶، ۱/۹۸ و ۰ میلی مولار در هفته چهارم قرار دارند.

۲- نقش غلظت های مختلف کلرید کلسیم برتعداد سلول ها

بالاترین تعداد سلول ها مربوط به محیط دارای ۳/۹۶ میلی مولارکلرید کلسیم درهفته هشتم است وپس ازآن به ترتیب مقادیر ۷/۹۲، ۱/۹۸ و ۰ میلی مولار درهفته های هشتم، هشتم و پنجم قرار دارند.

۳- نقش غلظت های مختلف کلرید کلسیم بروزن تر زی توده

بیشترین میزان وزن تر مربوط به محیط دارای ۷/۹۲ میلی مولار کلرید کلسیم درهفته هشتم است وپس ازآن به ترتیب مقادیر ۳/۹۶، ۱/۰ و ۰ میلی مولاردرهفته هشتم قرار دارند.

۴- نقش غلظت های مختلف کلرید کلسیم بروزن خشک زی توده

بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط کشت دارای ۷/۹۲ میلی مولار کلرید کلسیم درهفته هشتم است و پس از آن به ترتیب مقادیر ۳/۹۶، ۱/۹۸ وصفر میلی مولار درهفته هشتم قرار دارند.

وـ نقش دما

ازعامل دما در درجات مختلف ۲۵،۲۰ و ۳۰ درجه سانتی گراد استفاده شد، نتایج نشان داد.

۱- نقش دما برتولید آلکالوئید.

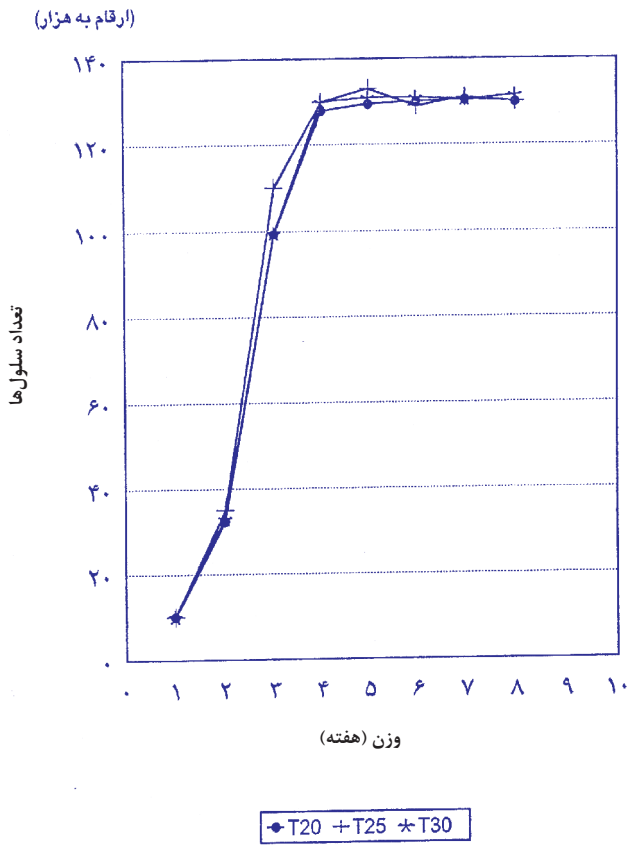
بالاترین میزان تولید آلکالوئید مربوط به محیط MS دردمای ۲۰ درجه سانتی گراد درهفته چهارم است و پس ازآن به ترتیب درجات ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد درهفته های پنجم و هشتم قرار دارند (تصویر ۵).

۲- نقش دما برتعداد سلول ها

بیشترین تعداد سلول ها مربوط به محیط MS دردمای ۲۰ درجه سانتی گراد درهفته هفتم است. پس ازآن به ترتیب دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد درهفته های پنجم و هشتم قرار دارند (تصویر۶).

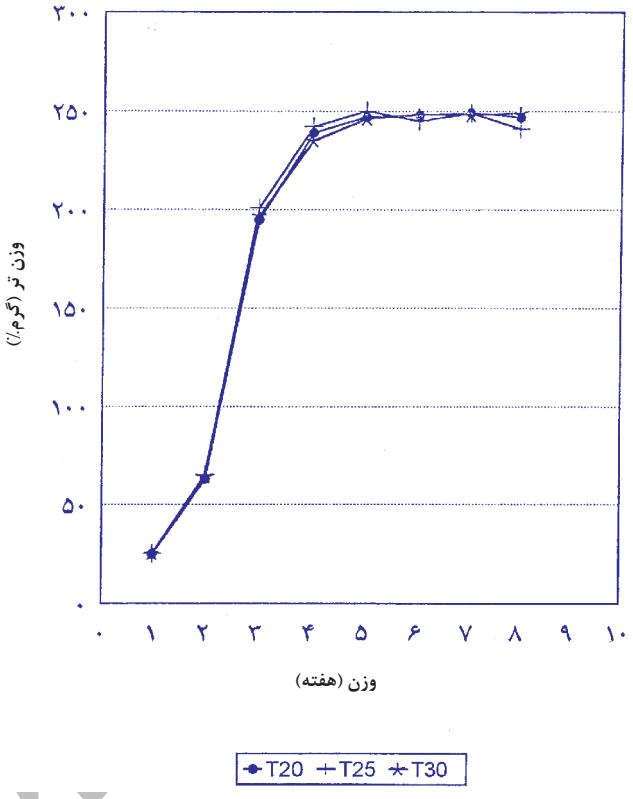
۳- نقش دما بر وزن تر زی توده

بالاترین میزان وزن تر مربوط به محیط MS دردمای ۲۵ درجه



تصویر ۶- نقش دما بر تعداد سلول ها

www.SID.ir



تصویر ۷- نقش دما بر وزن تر زی توده

سانتی گراد درهفته پنجم است و پس ازآن به ترتیب دمای ۲۰و۳۰ سانتی گراد درهفته های هفتم و هشتم قرار دارند (تصویر۷).

۴- نقش دما بروزن خشک زی توده

نتایج نشان داد ، بیشترین میزان وزن خشک مربوط به محیط MS دردمای ۲۵ درجه سانتی گراد درهفته پنجم است و پس از آن به ترتیب دمای ۳۰ و ۲۰ درجه سانتی گراد درهفته های هشتم و هفتم قرار دارند (تصویر۸) .

بحث وتفسیر

نتایج حاصل از بررسی غلظت های مختلف گلوگز برتولید آلکالوئیدهای تروپانی نشان داد ، غلظت گلوکز به مقدار ۳۰ گرم برلیتر بیشترین مقدارتولید آلکالوئیدهای تروپانی درهفته ششم از زمان کشت است و غلظت ۱۰ گرم برلیتر گلوگز درهفته پنجم باعث بیشترین تکثیرسلول ها می‌شود .

بیشترین وزن تر و وزن خشک نیز مربوط به مقادیرترتیبی ۳۰،۴۰و۲۰ گرم برلیتر گلوگز درهفته پنجم می‌باشد همانگونه که مشخص است بالاترین غلظت مونوساکارید موجب حداکثر تولید زی توده می‌شود .

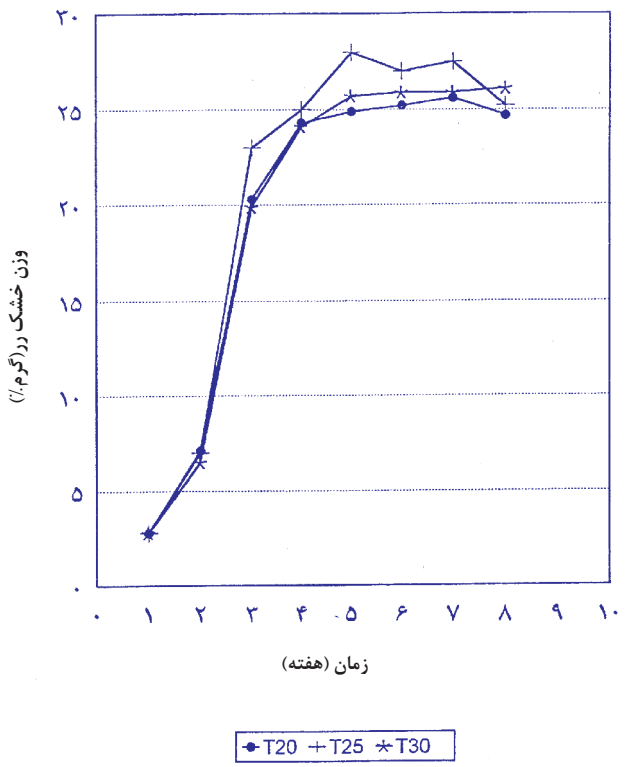
نقش مقادیرمختلف سوکروز بر روی تولید زی توده وآلکالوئیدهای تروپانی مورد بررسی قرارگرفت . نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی مربوط به غلظت ۲۰ گرم برلیتر سوکروز در هفته پنجم است . این نتیجه باگزارش امیرجانی درسال ۱۳۷۲ ، همسو است (۱) .

Jan schripsema وهمکاران درسال ۱۹۹۲ ، نشان دادند اگرچه تولید زی توده درمحیط دارای سوکروز بیشتر از محیط دارای مونوساکاریدها است اما درپژوهش ایشان برروی کشت ریشه ، تولید آلکالوئید درمحیط دارای مونوساکارید بیشتراست (۱۲) .

دراین پژوهش مشخص گردید ، بیشترین تعداد سلول ،وزن تر و وزن خشک مربوط به مقدار ۴۰ گرم بر لیتر سوکروز می‌باشد . در واقع با افزایش غلظت قند ، وزن زی‌توده افزایش می‌یابد .این نتایج باگزاش WOO وهمکاران درسال ۱۹۹۵ ، مطابقت دارد . این محققین با کار بر روی گیاه *Hyoscyamus niger* بیان داشتند ، افزایش سوکروز موجب افزایش زی توده و تحریک بیوسنتز آلکالوئید اسکوپولامین می‌شود (۱۷) .

Thicha و همکاران در۱۹۹۸ بیان داشتند که وجود سوکروز درمحیط کشت، سطح ترکیبات فتوسنتزی و فرآیند فتوسنتز را افزایش می‌دهد ، این محققین گزارش کردند، تغذیه از قندها وقوع بازدارندگی نوری رامانع می‌شود و ظرفیت فتوسنتزی به طور قابل توجهی درحضور قندها به خصوص سوکروز بیشتر می‌گردد و این ممکن است به دلیل افزایش ظرفیت گیاه به استفاده از نور جذب شده باشد .

Maldonado و همکاران در۱۹۹۳ گزارش نمودند ، فرآیند فتوسنتز



تصویر ۸- نقش دما بر وزن خشک زی توده

www.SID.ir

موجب فراهم شدن پیش سازهای اسید تروپیک وکوفاکتورهای آنزیمی‌شده و تخریب آلکالوئیدها را مهار می‌کند (۱۳).

Hilton و Rhodes در ۱۹۹۰ به بررسی رشد و تولید هیوسیامین درکشت ریشه مویی گیاه *D.stromonium* درون بیوراکتور پرداختند واعلام نمودند رشد ریشه با غلظت ۳ درصد سوکروز بهترین شکل را داراست (۱۱) .

نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت‌های متفاوت نیترات پتاسیم بر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی نشان داد ، افزایش غلظت نیترات موجب کاهش بیوسنتز آلکالوئیدها می‌شود و مناسبت ترین غلظت به کارگرفته شده مقدار ۹/۴ میلی مولارتعیین شد و مقدار پایین نیترات اثرتحریکی برتولید آلکالوئیدهای تروپانی دارد . بیشترین تعداد سلول ها ، بیشترین وزن تر و بیشترین وزن خشک درمحیط کشت دارای غلظت ۳۷/۶ میلی مولار نیترات پتاسیم تعیین شد . با افزایش غلظت نیترات پتاسیم ، افزایش زی توده مشاهده شد نتایج ما با گزارش Martina و همکاران در ۱۹۹۱ که اعلام نمودند افزاش KNO_3 تاثیرمعنی داری بر محتوای آلکالوئید ریشه ندارد، همسویی ندارد (۱۴).

ازت یک عنصرضروری درکشت سلول و بافت گیاهی است وهمچنین ازت درساختمان RNA، DNA ، اسید های آمینه و پروتئین ها ضروری می‌باشد و افزایش غلظت نیتروژن ، موجب افزایش رشد ریشه و سایر اندام‌های گیاه می‌شود .

نتایج ما با گزارش Hamill و Payne در ۱۹۸۷ برروی گیاه، *D.stromonium* (۱۵) و Christen و همکاران در ۱۹۹۲ ، بر روی گیاه *Hyoscyamus albus* ، همسو می‌باشد . مجد، چلپیان در ۱۳۷۸ با کار بر روی دوگونه گیاه بنگدانه بیان داشتند ، محیط دارای نیترات سبب افزایش رشد و سرعت تمایز ریشه می‌شود که باکاهش تولید آلکالوئید همراه است (۴) .

نیترات سبب افزایش رشد وسرعت تمایز ریشه می‌شود که با کاهش تولید آلکالوئید همراه است .

Demeyer و همکاران در ۱۹۹۸ گزارش نمودند ، افزایش غلظت نیترات درکشت ریشه های دگر ریخت گیاه *D.stromonium* ، باعث افزایش تولید زی توده می‌گردد ولی بیوسنتز آلکالوئید های تروپانی را مهار می‌کند (۷) .این محققین بیان داشتند، آلکالوئید ها دارای ازت هستند و درتغذیه گیاه به طور اساسی به شکل نیترات استفاده می‌شوند ، درگیاهان آنزیم نیترات رودکتاز اولین آنزیم درگیردرجذب نیترات می‌باشد . این پژوهشگران علت افزایش زی توده همزمان با افزایش غلظت نیترات را اینگونه توجیه می‌کنند که پیش سازهای اسیدهای آمینه برای متابولیسم اولیه مورد استفاده قرارمی‌گیرند و پیش سازهای مشترک در مسیرهای متابولیسمی‌اولیه و ثانویه ، برای تولید زی توده و پیگیری فرآیند رشد استفاده می‌شوند و عوامل محرک تولید زی توده ازجمله افزایش نیترات ، غلظت آلکالوئید ها را کاهش می‌دهند . زمانی که رشد به فاز ثابت می‌رسد غلظت هیوسیامین افزایش می‌یابد . نتایج بدست آمده در این خصوص باگزارش این محققین همسویی دارد (۷) .

نتایج حاصل ازبررسی تاثیر غلظت های متفاوت نیترات آمونیوم نشان داد بیشترین مقدار تولید آلکالوئیدهای تروپانی درمحیط ۱۰/۳ میلی مولارنیترات آمونیوم درهفته سوم بدست آمد . با افزایش مقدارنیترات آمونیوم ازتولید آلکالوئید های تروپانی کاسته شد . حداکثر تعداد سلول، بیشترین میزان وزن ترو وزن خشک زی توده درمحیط دارای مقدار ۴۱/۲۲ میلی مولار نیترات آمونیوم مشاهده شد که باکاهش مقدارنیترات آمونیوم، تولیدزی توده کم شد . Hilton وهمکاران در ۱۹۹۵ ، باکاربرروی کشت گونه‌های مختلف داتورا بیان داشتند NH_4^+ به طورکامل ازمحیط کشت جذب می‌شوند که به احتمال NH_4^+، پیش ماده ای برای بیوستنتز آلکالوئیدها باشد (۹) .

Demeyer وهمکاران در ۱۹۹۳ بیان داشتند ، میزان هوسیامین دربرگ‌ها و ساقه‌های گیاه *D.stromonium* (۴ تا ۱۲ هفته پس ازکشت) درتیمار با یونهای NO_3^- بالابوده و سپس کاهش می‌یابد . درصورتی که درتیمار با یونهای NH_4^+ و NO_3^- تا بیش از ۱۶ هفته پس ازکشت میزان هیوسیامین بالا باقی می‌ماند . همچنین نتایج این محققین حاکی از بالا بودن هیوسیامین دربالاترین زی توده است (۵) .

نتایج حاصل ازبررسی تاثیرغلظت های متفاوت کلسیم برتولید آلکالوئیدهای تروپانی نشان داد که بیوسنتز آلکالوئید های تروپانی با افزایش مقدارکلسیم محیط کشت ، افزایش می‌یابد . نتایج این تحقیق مشخص ساخت که بالاترین میزان کلرید کلسیم به کارگرفته شده دراین پژوهش (۷/۹۲ میلی مولار) درهفته چهارم بابیشترین تولید آلکالوئید همراه می‌باشد . حداکثرتولید زی توده نیز درمحیط کشت دارای ۷/۹۲ میلی مولارکلرید کلسیم مشاهده شد . بررسی ها نشان داد ، تغییر میزان کلسیم ، تاثیرمعنی داری بر روی سنتز آلکالوئیدهای تروپانی دارد به نظر می‌رسد این مسئله مربوط به تجمع آلکالوئیدها در واکوئل ها باشد ، یعنی فرم خنثی آلکالوئید های تروپانی راکه قدرت نفوذ ازغشاء واکوئل را دارند به حالت باردار درآورده و به صورت تله یونی باعث ذخیره آن می‌شود. این نتایج باگزارش های مجد، چلپیان در ۱۳۷۸ ومجد امیرجانی در ۱۳۷۲، همسویی دارد (۱، ۴) .

Lee و همکاران در ۱۹۸۸، گزارش نمودند آلکالوئید های تروپانی درواکوئل ذخیره می‌شوند : White و همکاران در ۱۹۸۸ بیان داشتند، سلول‌های منطقه رشد طولی ریشه برای حفظ قدرت رشد خود به غلظت بالای کلسیم سیتوپلاسمی‌نیاز دارند . وجود کانال های کلسیمی‌درسلول های درحال رشد باعث حفظ گرادیان غلظت کلسیم درون سیتوپلاسمی‌است و امکان اتصال وزیکول ها به غشاء و رشد را فراهم می‌کنند .

Gontier و همکاران در ۱۹۹۴به بررسی اثرات کلسیم برروی رشد ومیزان آلکالوئیدهای تروپانی درلاین های سوسپانسیون سلولی *D. innoxia* پرداختند وبیان داشتند تاثیرکلسیم به میزان ۱۰ میلی مولارموجب افزایش به میزان ۱۰ برابر بازده تولید نسبت به سلول های شاهد درمحیط استاندارد می‌شود (۸) .

Lovkova و همکاران در ۱۹۸۸ ، درخصوص اثرتنظیمی‌کلسیم برروی بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی بیان داشتند، یون کلسیم در تنظیم متابولیسم اسیدهای آمینه (پیش ساز آلکالوئید ها) وهمچنین فعالیت آنزیم‌های دیگرکه درتغییرشکل آلکالوئیدها نقش دارند، موثر می‌باشد.

نتایج حاصل ازبررسی اثردما برتولید آلکالوئیدهای تروپانی نشان داد، بیشترین میزان تولید آلکالوئیدها دردمای ۲۰ درجه و بیشترین وزن تر و خشک زی توده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد .Rhoton و

www.SID.ir

همکاران در سال ۱۹۹۴ بیان نمودند، هیوسیامین درکشت بافت با دمای ۲۰ یا ۲۵ درجه نسبت به کشت بافت دردمای ۳۰ درجه سانتی گراد درگیاه *D.stromonium* افزایش می‌یابد . یافته های ما با گزارش این محققین همسویی دارد (۱۶) .

منابع مورد استفاده

۱ـ امیرجانی، محمدرضا . ۱۳۷۲ ، کشت اندام گیاه شابیزک و بررسی عوامل موثربربیوستنتز آتروپین ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه تربیت مدرس .

۲ـ ایران بخش ، علیرضا . مجد احمد ، ۱۳۸۰ ،بررسی ساختمان و فراساختمان سلول های بیوستنتز کننده آلکالوئیدهای تروپانی درگیاه تاتوره ، پژوهش وسازندگی ، شماره ۵۳ ، ص ۲۲ - ۱۶ .

۳ـ ایرانبخش، علیرضا . ریاضی غلامحسین ، ۱۳۸۰ ، بررسی زمان وجایگاه بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی درگیاه تاتوره ، پژوهش وسازندگی ، شماره ۵۳ ص ۸۹ – ۸۲ .

۴ـ چلپیان، فیروزه. ۱۳۷۸ ، بررسی جایگاه ، زمان بیوستنتز وخواص ضد میکروبی آلکالوئیدهای تروپان درگیاهان طبیعی و نمونه های حاصل ازکشت درشیشه دوگونه ازسرده بنگدانه (Hyoscyamus)وبرخی عوامل موثر در افزایش میزان آلکالوئیدها، رساله دکتری ، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد علوم وتحقیقات .

5- Demeyer,k . and R. Dejaegere, . 1993 , Influence of nitrogen on the alkaloid content of *Datura stramonium* , Acta - Horti culture, 331, 35- 38.

6- Demeyer, k, R . Dejaegere , 1989 , Influence of the ion balance in the growth mediun in the yield and alkaloid contentt of *Datura stramonium* plant and soil , 114 : 2 , 289- 294.

7- Demeyer , k ., R ., Dejaegere ,1988, Influence of the mineral nutrition on yield and alkaloid content in *Darura stramonium*, medelingen van de Faculteit , 53 : Ta ,1723 - 1725 .

8- Gontier ,E , B.S, Sangwan , J .N. , Barbotin . ,1994 , Effects of calcium , alginate and calcium – alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of a stable suspension cell line of *Datura innoiax*, Plant cell Reports , 13 : 9 , 533 - 536.

9- Hilton , M.G . and M.J.C Rhodes , 1995 , Growth and the uptake of sucrose and mineral ions by transformed root cultures of *Datura stramonium*, *Datura candidna* , *Datura wrightii* , *Hyoscyamus mutivs* and *Atropa belladonna* , Plant Medical , 61, 345- 350 .

10- Hilton M.G . , M.J . C. Rhodes , 1994 , The effect of varying levels of gamborgs B5 salt and temperature on the accumulation of starch and Hyoscyamine in batch culture of transrormed roots of *Datura stramonium* , Plant cell - tissue and organ culture , 38: 1 , 45- 51.

11- Hilton , M.G., M.J.C., Rhodes , 1990 , Growth and Hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in modified stirred tank reactor , Applied Micro Biology and Biotechn ology , 33 : 2 , 132 - 138 .

12-Jan Schripsema and V., Robert , 1992 , Search of Factors related to the indole alkaloid production in cell suspension cultures of talernae montana divaicata ,Plant media , 245 - 249 .

13- Maldonado ,G. Alberts, 1993 , Stablishment of hairy root cultures of *Datura stramonium* characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. Plant cell - tissue and organ culture , 33:3 , 321- 329 .

14-Martina, Sauerwein and Koichiro , Shimomura , 1991 , Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* , Phyto chemistry , vol 30 , No :10 , 3271- 3280.

15-Payne ,J, J.D.Hamill, 1987, Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. Planta medica , 53(5) : 474 – 478 .

16- Rhoton , c. ,f. Bouteraouy , 1994 , Study of the effect of soil temperature and type of phosphorus fertilizer on growth and chemical composition of tobacco plants . Annales du tabac section . 26,51- 58 .

17- Woo , Hs ., J.M. , Park, and J.W. , Yang , 1998 , Production of scopolamine by normal root culture of *Hyoscyamus niger*, Biotechnology letters , 17: 9 , 921- 926 .

Archive of SID

www.SID.ir