Archive of SID

بررسی اثر تغییرات غلظت اکسین همراه با کلسیم و نیترات بر مقدار زی توده و محتوای آلکالوئید تام در کشت بافت *H. arachnoideus Pojark*

مهدیس ابراهیم زاده معبود[1]* و مهری مهرابی[2]

[1] **ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی**

[2] **ایران، تهران، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه ، گروه زیست شناسی، علوم گیاهی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۴

چکیده

گیاهان دارویی منحصر به فرد ترین منابع حیات بخش درمانی برای اکثر مردم جهان می باشند. کشت بافت گیاهی می تواند به طور معمول با استفاده از جداکشت های گیاهی نظیر برگ، ساقه، ریشه و غیره، تحت شرایط سترون و به منظور دستکاری گیاهان و نیز استخراج متابولیت های ثانویه، راه اندازی گردد. گیاهان تیره سیب زمینی، نظیر سرده بنگ، به عنوان منابع غنی از تروپان آلکالوئیدهایی مورد توجه هستند. در پژوهش حاضر، گونه *H.arachnoideus* Pojark مورد بررسی قرار گرفت. دو نوع جداکشت (برگ و ریشه) که از دانه رست های این گونه به دست آمدند، بر روی محیط کشت MS حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار کشت داده شدند. اثرات غلظت های مختلف یون کلسیم(Ca^{2+})، نیترات(NO^{-}_{3}) روی محیط کشت MS حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، در جداکشت های برگ و ریشه با چهار غلظت از اکسین NAA(۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر)، در مقابل محیط کشت MS حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، به عنوان گروه شاهد، بررسی شد تا اثر این عوامل را بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام تعیین نماییم. یافته های ما نشان داد که افزایش غلظت یون کلسیم دارای اثرات مثبتی بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام می باشد. از طرف دیگر، نیترات، دارای اثرات متفاوتی بر مقدار زی توده و محتوای آلکالوئید تام کالوس بود، اما در برخی موارد مقدار زی توده را افزایش و محتوای آلکالوئید را کاهش داد.

واژه های کلیدی: بنگ، تنظیم کنند رشد، Ca^{2+}، NO_3^- ، آلکالوئید تام.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۳۰۴۶۴۳، پست الکترونیکی: m_ebr1974@yahoo.com

مقدمه

آلکالوئیدها گروهی از متابولیت های ثانوی می باشند که بطور پراکنده در قلمرو گیاهی منتشر بوده اند. متابولیت های ثانوی گیاهی به علت فعالیت های بیولوژیکی وسیعشان برای قرن ها در پزشکی سنتی بکارگرفته شده اند (۵). گذشته از سنتز شیمیایی تولید متابولیت ثانوی، برای مدت زمان طولانی، از طریق کشت مزرعه ای گیاهان داروئی رایج شده است. این گیاهان منشا گرفته از بیوتوپهای ویژه را به سختی می توان خارج از اکوسیستم محلشان رشد داد. بعلاوه چنین است که گیاهان یک شکل شده به این منظور به دلیل حساسیت به عوامل بیماریزا قادر به تحمل کشت مزارع بزرگ نیستند. این مشکل موجب شده دانشمندان و بیوتکنولوژیست ها به راه کشت یاخته ها، بافت ها و اندام ها به عنوان یک راه فرعی برای تولید متابولیت های ثانوی نگاه کنند(۱۵).

اثرات درمانی، سمی خلسه آور آمش های بنگ (Hyoscyamus) از زمان های قدیم برای انسان مشخص بود. این اثرات مربوط به آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین موجود در آنها می باشد که با اتصال به

www.SID.ir

Archive of SID

جایگاههای موسکارینی پذیرنده های عصبی کلینرژیک موجود در یاخته های عصبی نقش خود را اعمال می کنند. با توجه به اهمیت گیاهان این سرده بررسی و یافتن روشی که باعث افزایش ماده موثر دارویی می شود، اهمیت خاصی دارد. در این پژوهش بررسی اثرعوامل مختلف نظیر تغییر مقادیر هورمون گیاهی و منبع کربنی بر رشد و تمایز بافت و تغییر مقدار آلکالوئید انجام شد، تا با بکارگیری محیط کشت مناسب به مقادیر قابل توجه از این ماده دارویی دست یافت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این مطالعه، بذرهای گونه *H.arachnoideus* Pojark (35833.TUH)، از سرده بنگ به عنوان ماده ی اولیه برای کشت در شیشه (*In vitro*)، استفاده گردید. بذرهای *H.arachnoideus* از منطقه شهر تبریز مشتمل بر پارک ائل گلی، جاده وادی رحمت، ابتدای جاده باسمانج، جمع آوری شدند.

روشها:

محیط های کشت در شیشه: به منظور کالوس زایی و به دست آوردن ترکیبات مختلف مثل آلکالوئیدها از محیط کشت MS (۲۱) استفاده شد.

برای از بین رفتن خفتگی، بذرها به مدت ۱۲ ساعت در ژیبرلیک اسید(۳۵ میلی گرم بر لیتر) قرار داده شدند. بذرهای *H.arachnoideus* به علت داشتن پوسته سخت قادر به جوانه زنی نیستند. به منظور برطرف کردن این مانع، بذرها به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه در سولفوریک اسید غلیظ قرار گرفته و سپس چندین بار آبکشی شدند. بذرهای سترون شده پس از کشت در محیط های کشت MS تحت شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نوری ۳۲/۵ میکرو مول بر متر مربع درثانیه، قرار گرفتند. بذرها پس از مدت زمان تقریبی ۱۰ روز جوانه زدند. از دانه رست های ۴ هفته ای به منظور تهیه جداکشت های ریشه و برگ برای انجام آزمایش های بعدی، استفاده گردید.

اثر جداکشت های مختلف، تیمارهای متفاوت از عناصر غذایی و نیز غلظت های مختلف از هورمون نفتالن استیک اسید(NAA)، بر میزان زی توده ی کالوسی، و محتوای آلکالوئید تام در این گونه مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین قطعه های جداکشتی مختلف در محیط های مختلف به شرح جدول ۱ قرار داده شدند و اثرات مورد نظر، در سطوح مختلف از غلظت هورمونی(جدول ۲)، بررسی گردید.

جدول ۱ – تیمارهای مختلف به کار گرفته شده به منظور بررسی تاثیر کلسیم، نیترات و منبع کربنی بر تولید زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس ها

نام تیمار	محیط کشت
شاهد	MS^*
T_1	MS^* + 13.2gr ($CaCl_2$)
T_2	MS^* + 17.6gr ($CaCl_2$)
T_3	MS^* + 22gr ($CaCl_2$)
T_4	MS^* – 19gr (KNO_3) + 28.02gr (KCl)
T_5	MS^* + 31.98gr ($NaNO_3$)

* در تمامی موارد، به محیط کشت MS، ۳۰ گرم سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، اضافه شد.

جدول ۲ – سطوح مختلف هورمونی به کار گرفته شده به منظور بررسی مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس ها

ردیف	غلظت نفتالن استیک اسید(NAA) mgl^{-1}
۱	۰
۲	۰/۵
۳	۱
۴	۲

داده ها به وسیله آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد مقایسه بین دو گروه(دو نوع جداکشت)، تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون t- استیودنت در سطح $p\leq 0.05$ انجام شد. در مورد مقایسه بیش از دو گروه(مقایسه بین تیمارها)، داده ها، با استفاده از روش تجزیه واریانس

www.SID.ir

Archive of SID

یکطرفه، ANOVA، و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی در سطح $p\leq 0.05$ به منظور مقایسه میانگین ها، و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

استخراج آلکالوئید به منظوراستخراج آلکالوئید، کالوس های به دست آمده از محیط های حاوی تیمارهای مختلف،۸ هفته پس از کشت جداکشت ها، برداشت شدند. روش به کار گرفته شده برای استخراج آلکالوئید به شرح زیر می باشد(۲۰): پودرکالوس توزین شده با آمونیاک ۲۵٪ خیسانده شد. بر روی مخلوط اتانول ریخته شد به طوریکه روی آن را کاملا پوشاند. سپس با هم زن شیشه ای مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۵-۱۲ ساعت به حالت ساکن قرار گرفت.عصاره ی صاف شده ی حاصل، در معرض جریان هوا قرار گرفت و حلال آن پرانده شد. روی آنچه بر جداره ظرف باقی ماند، ۵ میلی لیتر هیدرو کلریک اسید یک نرمال ریخته شد و ته مانده ی ظرف در اسید کاملا حل گردید. داخل یک دکانتور ۵ میلی لیتر اتر نفت ریخته و محلول اسیدی بالا به آن افزوده شد. در این مرحله دکانتور به شدت به طرف بالا و پایین تکان داده شد و محلول اسیدی که در فاز زیرین قرار گرفته جمع آوری و فاز بالایی حاوی اترنفت دور ریخته شد. این مرحله سه بار تکرار گردید. pH محلول اسیدی جمع آوری شده با آمونیاک ۲۵٪ به ۱۱ رسانده شد. از آنجاییکه این واکنش به شدت گرما زاست، این کار در یخ انجام گردید. محلول حاصل در داخل یک دکانتور ریخته و بر روی آن کلروفرم اضافه شد. کلروفرم که حاوی آلکالوئید است در فاز پایینی قرار گرفت و جمع آوری گردید. این مرحله سه مرتبه تکرار گردید.محلول کلروفرمی جمع آوری شده، در معرض جریان هوا قرار گرفت تا حلال آن پرانده شود ماده باقی مانده در جداره ظرف، در یک میلی لیتر متانول حل شد و برای سنجش آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آلکالوئید تام :محلول متانولی حاوی آلکالوئید در حجم های یک میلی لیتری تهیه شد و برای سنجش آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت.سنجش آلکالوئید تام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV (UV-1601, UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)، مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

به این منظور منحنی استاندارد توسط ماده استاندارد آتروپین سولفات در طول موج ۲۱۰ نانومتر رسم گردید و چگالی نوری(OD) هر یک از نمونه ها در همین طول موج خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول خط منحنی استاندارد، مقدار آلکالوئید تام در هر نمونه بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر بافت محاسبه گردید.

معادله خط منحنی استاندارد:

$$Y= 0.2233\ X - 0.1167\ ,\ R^2 = 0.9442$$

در این معادله، Y نشان دهنده چگالی نوری(OD) و X، نشان دهنده غلظت آلکالوئید تام خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر است. و R^2 بیانگر دقت استاندارد است که هرچه به ۱ نزدیکتر باشد، دقت استاندارد تهیه شده بالاتر است.

نتایج

الف. بررسی اثر کلسیم بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در محیط کشت فاقد هورمون(mgl^{-1} NAA: 0): چهار گروه شاهد و تیمارهای کلسیمی به کار برده شد(جدول ۱).

اثر کلسیم در جداکشت برگ : افزایش کلسیم تا میزان ۲/۵ برابر(T_3) نسبت به محیط پایه، باعث کاهش معنی دارمیزان زی توده نسبت به نمونه شاهد شد.بعلاوه در این سطح هورمونی افزایش کلسیم یا تغییری در مقدار آلکالوئید تولید شده توسط کالوس ایجاد نکرد(تیمارT2) و یا باعث کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

معنی دارمقدار آن شد (تیمارهای T1 و T3)(نمودار الف-۱).

اثر کلسیم در جداکشت ریشه: زی توده کالوسی به دست آمده از گروه T_1، افزایش معنی داری را نسبت به بقیه گروه ها نشان داد در حالیکه بین سایر گروه ها اختلاف معنی دار نبود.

گروه شاهد افزایش معنی دار و T_3 کاهش معنی دار مقدار آلکالوئید تام را نسبت در گروه نشان دادند(نمودارالف-۲).

اثر جداکشت های برگ و ریشه، در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی: از نظر تولید مقدار زی توده، به جز در گروه شاهد که اختلاف معنی داری بین دو نوع جداکشت وجود نداشت، در سایر تیمارها، جداکشت ریشه نسبت به جداکشت برگ، به طور معنی داری کالوس بیشتری تولید کرد(نمودار الف-۳). نتایج مربوط به تولید آلکالوئید تام که در نمودار الف-۴ نشان داده شده، نشانه وجود اختلاف معنی دار بین جداکشت های برگ و ریشه در تمام نمونه ها بجز تیمارT1 می باشد.

ب. بررسی اثر کلسیم بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در سطح هورمونی $NAA: 0.5mgl^{-1}$: چهار گروه شاهد و تیمارهای کلسیمی به کار برده شد(جدول ۱).

اثر کلسیم در جداکشت برگ: تفاوت معنادار آماری بین تیمارها، از نظر مقدار زی توده وجود نداشت، درحالیکه افزایش تدریجی کلسیم باعث افزایش معنی دار مقدار آلکالوئید تام با افزایش مقدار کلسیم گردید(نمودار ب-۱).

اثر کلسیم در جداکشت ریشه:در جداکشت ریشه این گونه نیز تولید زی توده تحت تاثیر افزایش کلسیم قرار نگرفت و اختلاف معنی داری بین گروه های شاهد و تیمارهای کلسیمی وجود نداشت.تولید آلکالوئید تام در گروه T_2 افزایش معنی دار و گروه T_1 کاهش معنی دار مقدار تولید آلکالوئید تام را نشان دادند(نمودار ب-۲).

اثر جداکشت های برگ و ریشه در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی: به جز گروه تیماری T_1، سایر تیمارها از نظر مقدار زی توده تولید شده توسط کالوس اختلاف معنی داری را در بین دو نوع جداکشت برگ و ریشه نشان ندادند (نمودار ب-۳). در گروه های T_1 و شاهد اختلاف معنی داری بین مقدار آلکالوئید تام تولید شده تحت تاثیر نوع جداکشت وجود نداشت ولی در دو گروه دیگر یعنی T_2 و T_3، بین مقدار آلکالوئید تام حاصل از کالوس به دست آمده از دو نوع جداکشت برگ و ریشه اختلاف معنی داری مشاهده شد. (نمودار ب-۴).

پ. بررسی اثر کلسیم بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در سطح هورمونی $NAA: 1mgl^{-1}$: گروه شاهد و سه گروه تیمار کلسیمی به کار برده شد(جدول ۱).

اثر کلسیم در جداکشت برگ : از نظر مقدار زی توده بین گروه ها اختلاف معنی دار وجود نداشته و تنها گروه T_1 افزایش معنی دار مقدار زی توده را نشان داده است (نمودار پ-۱). درحالیکه افزایش معنی دار تولید آلکالوئید تام به تدریج با افزایش مقدارکلسیم مشاهده می شود (نمودار پ-۱).

اثر کلسیم در جداکشت ریشه:از لحاظ تولید زی توده کالوسی، اختلاف معناداری بین تیمارها وجود نداشت، در حالی که گروه T_2 توانست باعث افزایش معنی دار آلکالوئید تام شود و سایر تیمارها اختلاف معنی داری با گروه شاهد نداشتند(نمودار پ-۲).

اثر جداکشت های برگ و ریشه در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی : به جز گروه T_1 که جداکشت برگ افزایش معنی دار مقدار زی توده را نسبت به ریشه نشان داد در سایر گروه ها اختلف معنی داری بین جداکشت ها از نظر مقدار زی توده وجود نداشت (نمودار پ-۳). ولی، تولید آلکالوئید تام در دو نوع جداکشت در تمام گروه های تیمار

www.SID.ir

Archive of SID

کلسیمی و شاهد با هم تفاوت معنی داری را نشان داد (نمودار پ-۴).

ت. بررسی اثر کلسیم بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در سطح هورمونی NAA: 2mgl^{-1}: گروه شاهد و سه گروه تیمار کلسیمی به کار برده شد(جدول ۱).

اثر کلسیم در جداکشت برگ: افزایش کلسیم بر مقدار زی توده کالوسی تولید شده تاثیر معنی داری نداشت (نمودار ت-۱). ولیتولید آلکالوئید تام به وسیله گروه T_1 افزایش معنی داری نسبت به سایر گروه نشان داد و در کل بین همه گروه ها اختلاف معنی دار بود(نمودار ت-۱).

اثر کلسیم در جداکشت ریشه: افزایش کلسیم اثر معنی داری برمقداد زی توده کالوسی تولید شده در این جداکشت نداشت، ولی گروه T_3، افزایش معنی دار مقدار آلکالوئید تام را نشان داد(نمودارت-۲).

ابین جداکشت های برگ و ریشه از نظر تولید آلکالوئید اختلاف معنی دار وجود دارد، در حالی که، هر دو نوع جداکشت مقدار زی توده کالوسی یکسانی تولید کردند و اختلاف معنی داری بین آن ها در هر گروه وجود ندارد(نمودارهای ت-۳ و ت-۴).

ث. بررسی اثر نیترات بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در محیط کشت فاقد هورمون(NAA: 0mgl^{-1}) سه گروه شاهد و تیمارهای نیتراتی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر نیترات در جداکشت برگ: زی توده کالوسی به دست آمده از گروه شاهد، نسبت به گروه های T_4(کاهش نیترات) و T_5(افزایش نیترات)، بطور معنی داری بیشتر بود (نمودار ث-۱). مقدار آلکالوئید تام تولید شده در دو گروه شاهد و گروه T_5، اختلاف معنی داری نداشته ولی نسبت به تیمار کاهش نیترات بطورمعنی داری بیشتر بود (نمودار ث-۱).

اثر نیترات در جداکشت ریشه : تغییر نیترات محیط بر مقدار زی توده تاثیری نداشت ولی باعث کاهش معنی دار آلکالوئید تام گردید (نمودار ث-۲).

اثر جداکشت های برگ و ریشه در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی : در هر دو تیمار بین دو جداکشت اختلاف معنی داری از نظر مقدار زی توده کالوسی وجود داشت ولی تنها در تیمارافزایش نیترات،نظیر شاهد، اختلاف بین دو جداکشت معنی دار بود (نمودارهای ث-۳ و ث-۴).

ج. بررسی اثر نیترات بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}:سه گروه شاهد و تیمارهای نیتراتی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر نیترات در جداکشت برگ: تولیدزی توده کالوسی، تحت تاثیر تیمارهای نیتراتی قرار نگرفت(نمودار ج-۱). ولی افزایش نیترات محیط باعث افزایش معنی دار تولید آلکالوئید تام گردید (نمودار ج-۱).

اثر نیترات در جداکشت ریشه: افزایش نیترات سبب افزایش معنی دار زی توده و کاهش معنی دارآلکالوئید تام نسبت به گروه شاهد شد (نمودار ج-۲).

اثر جداکشت های برگ و ریشه در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی: در تمامی گروه ها، مقدار زی توده کالوسی تولید شده توسط جداکشت های برگ و ریشه، یکسان بود و تفاوت معناداری با هم نداشتند (نمودار ج-۳). در گروه شاهد، مقدار آلکالوئید تام تولید شده توسط کالوس، تحت تاثیر نوع جداکشت قرار نگرفت. در گروه های T_4 و T_5، مقدار آلکالوئید تام تولید شده توسط کالوس حاصل از جداکشت برگ بطورمعنی داری بیشتر از این مقدار در جداکشت ریشه بود (نمودار ج-۴).

چ. بررسی اثر نیترات بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه

www.SID.ir

Archive of SID

در سطح هورمونی $NAA: 1mgl^{-1}$: سه گروه شاهد و تیمارهای نیتراتی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر نیترات در جداکشت برگ: تیمار حاوی مقادیر کاهش یافته نیترات به طورمعنی داری مقدار زی توده کالوسی بیشتری تولید نمود، در حالی که بین دو گروه شاهد و گروه T_5، اختلاف معنی دار نبود. آلکالوئید تام به دست آمده از تیمار حاوی مقادیر افزایش یافته نیترات و مقادیر کاهش یافته، به ترتیب افزایش و کاهش معنی دار آلکالوئید را نسبت به گروه شاهد نشان داد. (نمودار چ-۱).

اثر نیترات در جداکشت ریشه : تولید زی توده کالوسی در این جداکشت تحت تاثیر تیمارهای نیتراتی قرار نگرفت ولی هر دو تیمار کاهش و افزایش نیترات، باعث افزایش معنی دار مقدار آلکالوئید تام شدند (نمودار چ- ۲).

تاثیر جداکشت های برگ و ریشه، در گروه های شاهد وتیمارنیتراتی : مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه در هر سه گروه ، اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند(نمودار چ- ۳). بر عکس، مقدار آلکالوئید تام، در هر سه گروه، در جداکشت های برگ و ریشه، اختلاف معنی داری را نشان داد (نمودار چ- ۴).

ح. بررسی اثر نیترات بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت های برگ و ریشه در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$: گروه شاهد و دو گروه تیمار نیتراتی به کار برده شد(جدول ۱).

اثر نیترات در جداکشت برگ: زی توده کالوسی در جداکشت برگی این گونه، تحت تاثیر نوع تیمار نیتراتی قرار نگرفت ولیتولید آلکالوئید تام در گروه T_5، بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود و گروه T_4 (کاهش نیترات)کاهش معنی دار تولید آلکالوئید تام نسبت به گروه شاهد را نشان داد (نمودار ح- ۱).

اثر در جداکشت ریشه: مقدار زی توده کالوسی و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه تحت تاثیر تیمارهای نیتراتی قرار نگرفت و تفاوت معنی داری وجود نداشت.

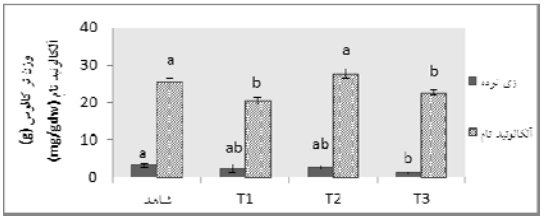
اثر جداکشت های برگ و ریشه، در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی : مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه اختلاف معنی داری نداشتند(نمودار ح-۳). مقدار آلکالوئید تام کالوس حاصل جداکشت برگ و ریشه بجز در تیمار کاهش نیترات اختلاف معنی داری وجود داشت(نمودار ح-۴).

با توجه به عدد sig(بزرگتر از ۰/۰۵)، فرض نرمال بودن داده ها تایید می گردد.

* در تمامی نمودارها، ستون ها بیانگر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشند.

- در نمودارهایی که مربوط به هر کدام از جداکشت ها به طور جداگانه است (مقایسه بین تیمارها)، مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح آماری $p\leq0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون های مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین ها می باشد.

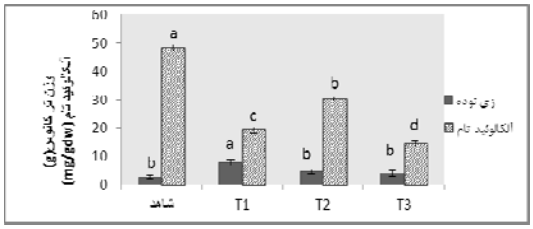
- در نمودارهایی که مقایسه بین دو نوع جداکشت است، تجزیه و تحلیل داده ها، با استفاده از آزمون t - استیودنت و در سطح آماری $p\leq0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون های غیر مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین ها است.



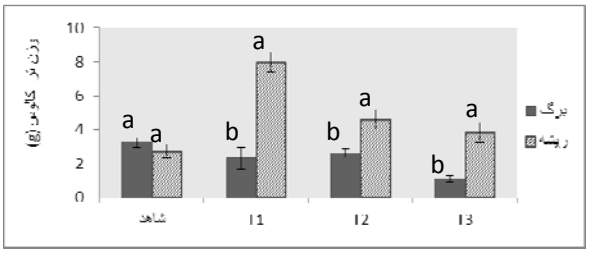
نمودار ۱- الف - مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus*، درگروه های شاهد و تیمار کلسیمی فاقد هورمون($NAA:0\ mgl^{-1}$)

www.SID.ir

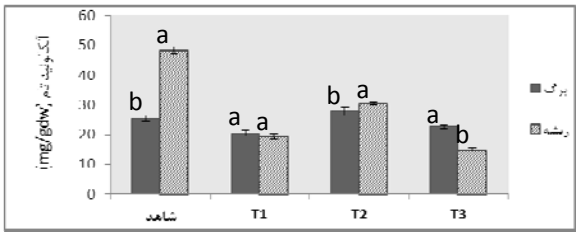
Archive of SID



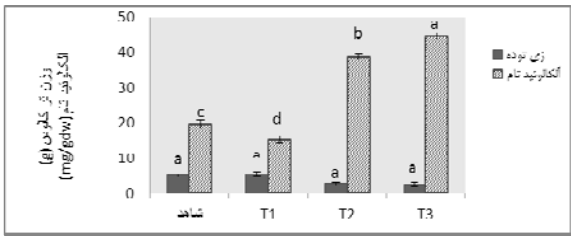
نمودار۲ – الف– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arahnoideus*، درگروه های شاهد و تیمار کلسیمی فاقد هورمون($NAA:0\ mgl^{-1}$)



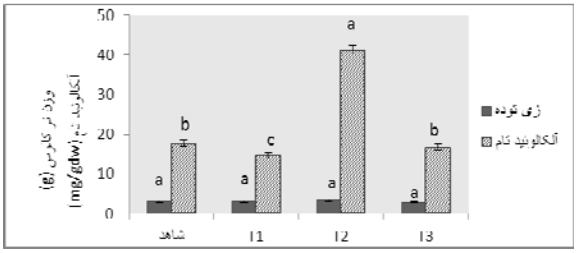
نمودار۳– الف– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* ، درگروه های شاهد و تیمار کلسیمی فاقد هورمون($NAA:0\ mgl^{-1}$)



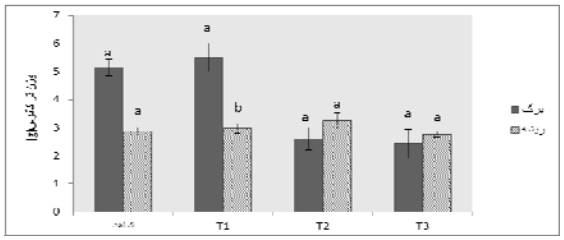
نمودار۴– الف– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus*، درگروه های شاهد و تیمار کلسیمی فاقد هورمون($NAA:0\ mgl^{-1}$)



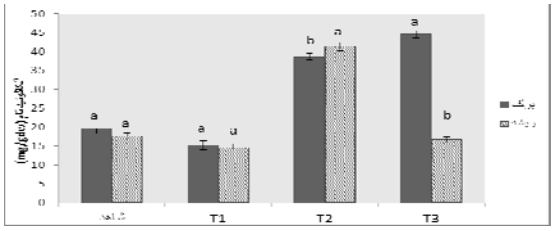
نمودار۱– ب– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:0.5\ mgl^{-1}$



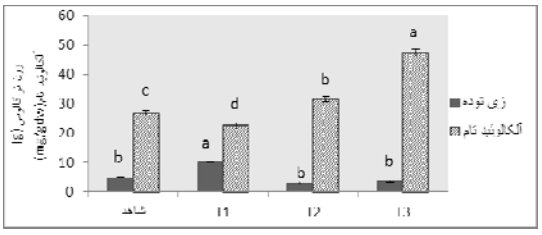
نمودار۲– ب– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:0.5\ mgl^{-1}$



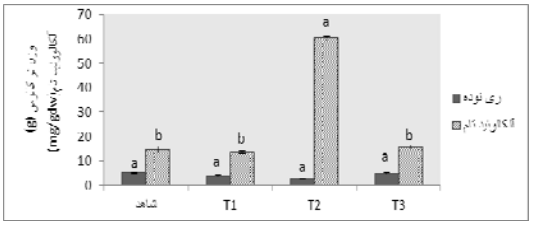
نمودار۳– ب– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:0.5\ mgl^{-1}$



نمودار۴–ب– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:0.5\ mgl^{-1}$



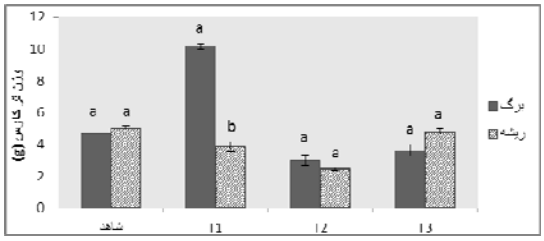
نمودار۱–پ– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:1mgl^{-1}$



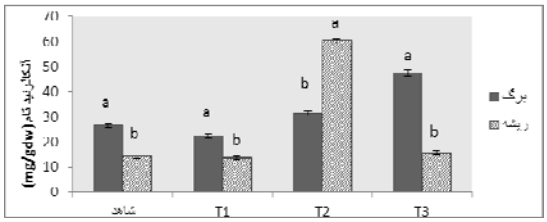
نمودار۲–پ– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:1mgl^{-1}$

www.SID.ir

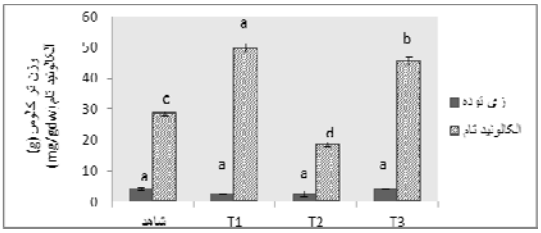
Archive of SID



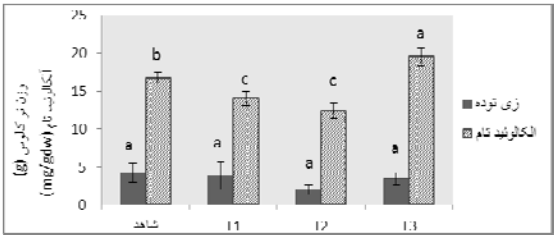
نمودار۳–پ– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:1mgl^{-1}$



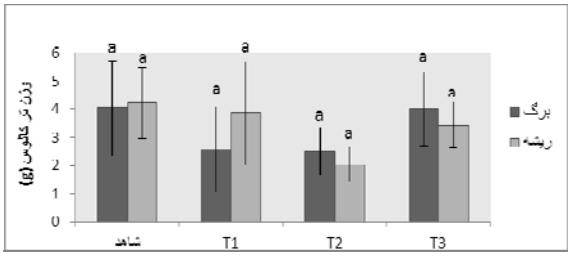
نمودار۴–پ– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA:1mgl^{-1}$



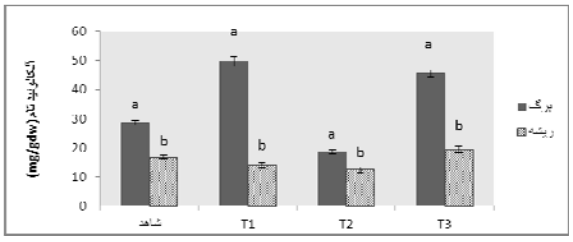
نمودار۱–ت– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$



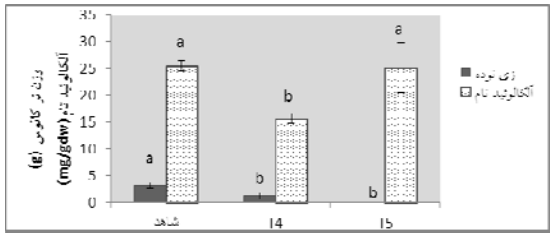
نمودار۲–ت– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$



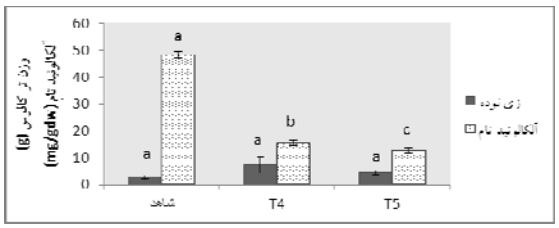
نمودار۳– ت – تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$



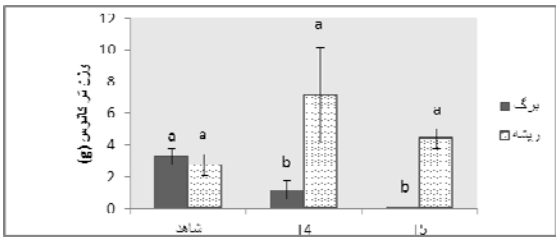
نمودار۴–ت – تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار کلسیمی در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$



نمودار ۱–ث – مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در محیط فاقد هورمون($NAA: 0mgl^{-1}$)



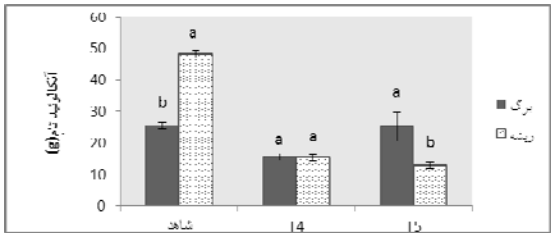
نمودار ۲– ث – مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در محیط فاقد هورمون($NAA: 0mgl^{-1}$)



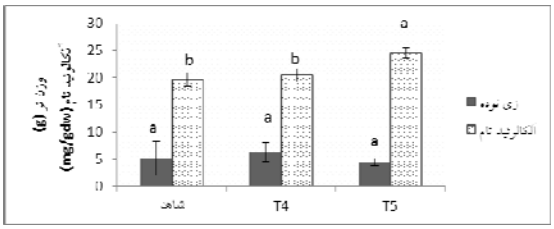
نمودار ۳ – ث– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در محیط فاقد هورمون($NAA: 0mgl^{-1}$)

www.SID.ir

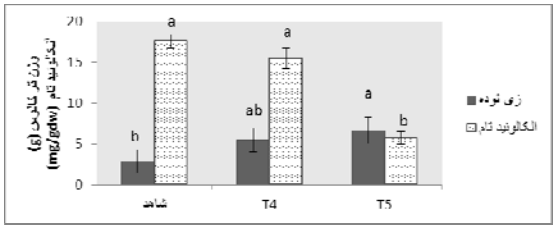
Archive of SID



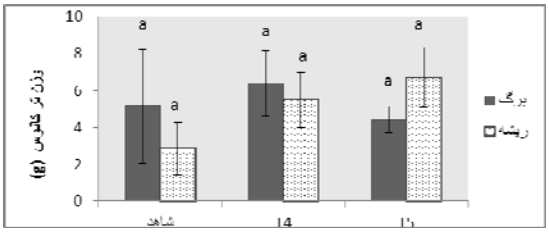
نمودار ۴ – ث– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در محیط فاقد هورمون(NAA: 0mgl^{-1})



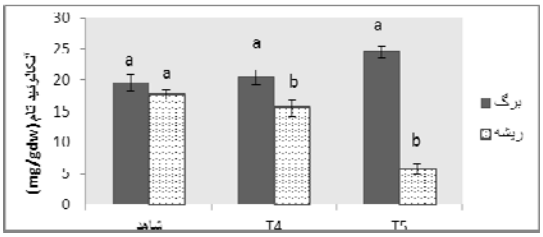
نمودار ۱ – ج– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}



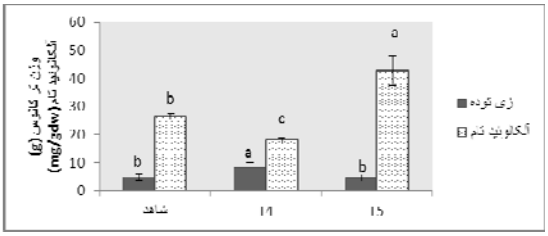
نمودار ۲– ج– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}



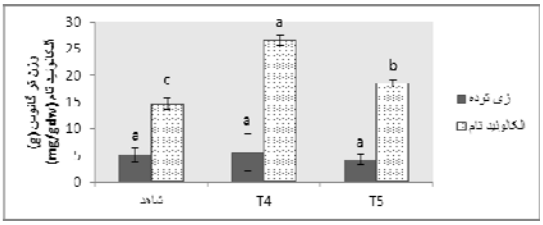
نمودار ۳– ج– تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}



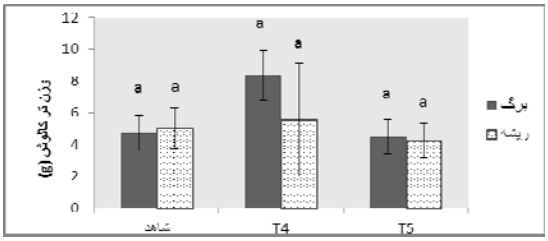
نمودار ۴ – ج– تاثیر جداکشتهای برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}



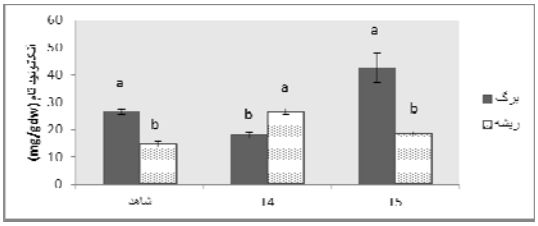
نمودار ۱– ج– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 1mgl^{-1}



نمودار ۲– ج– مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 1mgl^{-1}



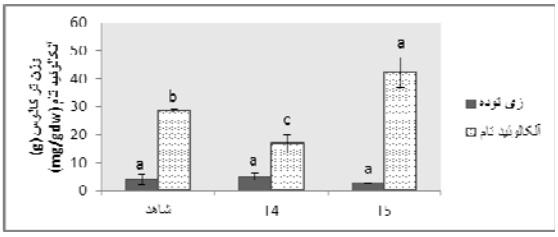
نمودار ۳– ج– تاثیر جداکشتهای برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 1mgl^{-1}



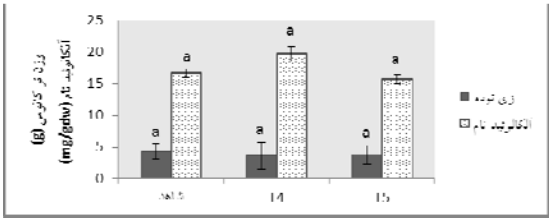
نمودار ۴ – ج– تاثیر جداکشتهای برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: 1mgl^{-1}

www.SID.ir

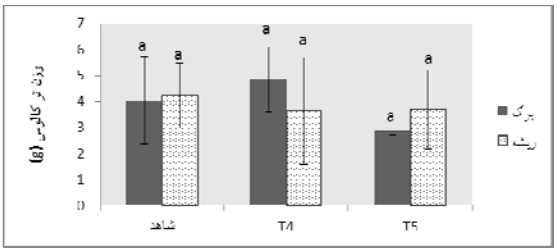
Archive of SID



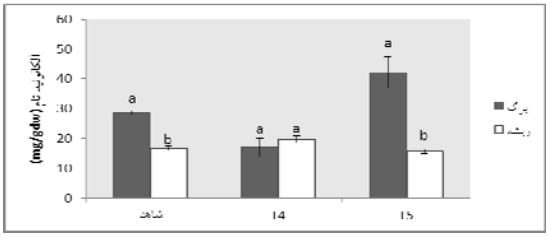
نمودار ۱- ح- مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: $2mgl^{-1}$



نمودار ۲- ح- مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: $2mgl^{-1}$



نمودار ۳- ح - تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: $2mgl^{-1}$



نمودار ۴- ح - تاثیر جداکشت های برگ و ریشه بر آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمار نیتراتی در سطح هورمونی NAA: $2mgl^{-1}$

بحث

بررسی اثر کلسیم: کاتیون کلسیم(Ca^{2+}) به عنوان یک پیام رسان ثانویه در پاسخ هایی که به وسیله تازن ها تولید می‌شود، شناخته شده است(۲، ۲۴ و ۲۵). به علاوه در غلظت های بالا، Ca^{2+} می تواند باعث افزایش فشار اسمزی گردد. بنابراین این کاتیون به عنوان یک عامل تنشی و یا تازن غیر زیستی شناخته می شود(۲۴).

محققان زیادی اثر کلسیم را بر تولید تروپان آلکالوئید ها مورد مطالعه قرار داده اند(۱۱؛ ۶). پنول و همکاران(۲۳)، اثر غلظت های یونی مختلف کلسیم محیط کشت را بر تجمع تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه های مویین *Datura stramonium* L.(تیره سیب زمینی) مطالعه کردند و در یافتند که کاهش در غلظت کلسیم بر رشد ریشه اثری ندارد اما باعث کاهش فعالیت پراکسیداز می گردد که احتمالا در تولید متابولیت های ثانویه نقش دارد. پودرسل و همکاران (۲۶) بیان کردند که یک رابطه کاملا مثبت بین محتوای کلسیم در محیط کشت و تولید اسکوپولامین وجود دارد.

به علاوه، گونتیر و همکاران(۱۰) گزارش کردند که کلسیم برای سنتز تروپان آلکالوئیدها در گیاه *Datura inoxia* P.Mill مفید است. طبق مطالعات ایرانبخش و همکاران (۱۲)، افزایش یون کلسیم در محیط کشت گیاه داتوره باعث افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها شد.

تمامی این یافته ها، منطبق با قسمتی از نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است، بدین ترتیب که در این پژوهش، تولید آلکالوئید تام در کالوس های به دست آمده از جداکشت برگی گونه *H.arachnoideus*، در سطوح هورمونی NAA: 0.5, $1mgl^{-1}$ ، با افزایش یون کلسیم محیط کشت، افزایش یافت. طبق گزارش ایرانبخش و همکاران (۱۲)، این امر به علت تجمع آلکالوئید در واکوئل هاست و به این معناست که تروپان آلکالوئید غذایی که می تواند جذب تونوپلاست شود، یونیزه می گردد و به صورت یونی ذخیره می گردد. این نتایج همچنین موافق با یافته های مجد و چلیبیان (۱۹) می باشد. لی و همکاران (۱۷) نیز گزارش کردند که تروپان آلکالوئید در تونوپلاست

www.SID.ir

Archive of SID

ذخیره می گردد. گونتیر و همکاران (۱۰)، اثرات کلسیم را بر رشد و مقدار تروپان آلکالوئیدها در لاین های تعلیقی یاخته ای *D.innoxia* بررسی کردند. آن ها نشان دادند که ۱۰ میلی مول کلسیم باعث افزایش ده برابری تولید می گردد. طبق گزارش آنها، کلسیم بر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها اثر دارد و این به دلیل تاثیرش بر تنظیم متابولیسم آمینو اسیدهای گهرمایه ی آلکالوئیدها می باشد. همچنین کلسیم بر عملکرد سایر آنزیم ها به منظور تغییر برای شکل گیری آلکالوئیدها تاثیر دارد.

در قسمت دیگری از یافته های به دست آمده از پژوهش حاضر، مشاهده شد که در جداکشت برگی گونه *H.arachnoideus* و در سطح هورمونی NAA: $2mgl^{-1}$ ، افزایش محتوای کلسیم محیط باعث افزایش تولید آلکالوئید تام در کالوس ها شد، اما این روند افزایشی، الگوی ثابتی را دنبال نکرد. بدین معنا که، با افزایش محتوای کلسیم به میزان ۱/۵ برابر نسبت به گروه شاهد، محتوای آلکالوئید تام در این جداکشت افزایش یافت، با افزایش بیشتر محتوای کلسیم تا میزان ۲/۵ برابر محتوای آن نسبت به گروه شاهد، محتوای آلکالوئید تام مجددا افزایش نشان داد ولی این افزایش کمتر از میزان افزایش در محیط حاوی غلظت ۱/۵ برابر نسبت به گروه شاهد بود. در جداکشت ریشه در سطوح هورمونی NAA: 0.5, $1mgl^{-1}$ تنها غلظتی از کلسیم که باعث افزایش محتوای آلکالوئید تام در کالوس ها شد، غلظت ۲ برابری کلسیم نسبت به گروه شاهد بود که این غلظت از یون کلسیم باعث افزایش محتوای آلکالوئید تام گردید.

آجونگلا (۱)، گزارش کرد که غلظت ۱۵-۱ میلی مول از $CaCl_2$ در محیط کشت، تجمع تروپان آلکالوئیدها را افزایش می دهد. غلظت بالاتر $CaCl_2$ (۱۵میلی مول) در محیط کشت باعث افزایش تجمع هیوسیامین و اسکوپولامین می گردد که ۲ تا ۳ بار بیشتر از گیاه شاهد بود. آنها بیان کردند که غلظت های یون کلسیم در محیط کشت گیاهی، فعالیت آنزیم پوترسین متیل ترانسفراز را تنظیم می کند و در نتیجه ظرفیت سنتز تروپان آلکالوئیدها افزایش می یابد. همچنین آنها گزارش کردند که غلظت $CaCl_2$ بیش از ۳۰ میلی مول در محیط کشت، مانعی برای تجمع تروپان آلکالوئیدها بود. به عقیده این محققان، سطوح بالای یون کلسیم در محیط کشت، پراکسیداز را فعال می کند که در تجزیه متابولیت های ثانویه درگیر می باشند که در نتیجه باعث کاهش محتوای تروپان آلکالوئید در غلظت های بیش از حد کلسیم می گردد.

از طرف دیگر، اگرچه سهم عمده ای از محتوای تروپان آلکالوئید تولید شده در کالوس ها در پژوهش حاضر، مربوط به ترکیبات محیط کشت است، اما کیفیت و چگونگی این تغییرات علاوه بر ترکیب محیط کشت، به عوامل دیگری از جمله نوع جداکشت و غلظت اکسین مورد استفاده نیز بستگی داشت، به طوری که همواره مجموعه ای از این عوامل در افزایش یا کاهش محتوای تروپان آلکالوئید تولید شده، موثر خواهند بود. به این ترتیب که، در سطوح مختلف از غلظت هورمون به کار گرفته شده، تفاوت هایی در محتوای آلکالوئید تام در جداکشت های مختلف مشاهده شد. یعنی، در محیط کشت فاقد هورمون، در تمام موارد، محتوای آلکالوئید تام در جداکشت های ریشه بیشتر از جداکشت های برگ بود. از آنجائیکه در شرایط طبیعی، مقدار آلکالوئید در ریشه بیشتر از برگ است(۱۴)، به نظر می رسد که علت بالا بودن محتوای آلکالوئید تام در کالوس های حاصل از ریشه نسبت به کالوس های به دست آمده از برگ، قابل توضیح باشد.

در سطوح بالاتر از غلظت هورمون، به تدریج از میزان همگنی و یکنواختی در پاسخ ها کاسته شد و نوع پاسخ ها در اکثر موارد با محیط فاقد هورمون اختلاف داشت. یعنی، در گروه های مختلف شاهد و تیمار کلسیم، کالوس های حاصل از جداکشت برگ نسبت به کالوس های به دست

www.SID.ir

Archive of SID

آمده از جداکشت های ریشه، محتوای آلکالوئید تام بیشتری داشت. طبق گزارش کادی (۱۳)، تیمار با هورمون، یک مولفه مهم برای افزایش آلکالوئید در گیاه بنگ می باشد و نیز اینکه تیمار با هورمون باعث افزایش محتوای آلکالوئید تام در برگ به میزان بالاتری نسبت به ریشه می گردد؛ بنابراین می توان یافته های به دست آمده از تحقیق حاضر را چنین توضیح داد که، با بالا رفتن غلظت هورمون از ۰ به ۰/۵میلی گرم بر لیتر، افزایش محتوای آلکالوئید در جداکشت برگ نسبت به جداکشت ریشه، برتری می یابد.

به این ترتیب مشاهده شد که با بالا رفتن غلظت هورمون در محیط کشت از ۰به ۰/۵، علاوه بر متفاوت بودن پاسخ ها، در بین گروه های مختلف شاهد و تیمار کلسیمی نیز نوعی غیر یکنواختی از نظر عملکرد جداکشت ها به وجود آمد. به نحوی که با افزایش غلظت اکسین به ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر، حتی این ناهمگنی بیشتر شد و مثلا در یک گروه تیماری، جداکشت برگی و در گروه تیماری دیگر جداکشت ریشه ای عملکرد بیشتری پیدا کرد. به نظر می‌رسد، افزایش غلظت اکسین در افزایش تنوع سوماکلونی در کالوس ها موثر باشد(۷) و به همین علت است که یکنواختی پاسخ ها در جداکشت ها کاهش پیدا می کند. تغییرات سوماکلونال، تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در گیاهان را توضیح می دهد که در طول یا پس از کشت در شیشه ی سلول ها، کالوس یا اندام های گیاهی ظاهر می شوند (۹).

از طرف دیگر، بررسی تاثیر محتوای کلسیم محیط کشت بر مقدار زی توده کالوسی تولید شده نشان داد که به طور کلی، در اکثر موارد، افزایش محتوای کلسیم در محیط کشت تاثیر چشمگیری بر مقدار کالوس تولید شده نداشت.که از اینجا می توان به بهینه بودن تقریبی محیط کشت MS از نظر محتوای کلسیم پی برد. اما تولید زی توده کالوسی در جداکشت برگی بیش از سایر جداکشت ها تحت تاثیر محتوای کلسیم محیط کشت قرار گرفت. در غلظت هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر، افزایش ۱/۵ برابری غلظت کلسیم نسبت به گروه شاهد، باعث افزایش مقدار کالوس تولید شده در این جداکشت گردید. اما، در محیط کشت فاقد هورمون افزایش ۲/۵ برابری غلظت کلسیم نسبت به گروه شاهد باعث کاهش مقدار کالوس شد.

این نتایج تا حدودی مطابق با نتایج گزارش شده توسط علاقه‌مند و همکاران (۳) است که بیان کردند، مقدار زی توده تولید شده در گیاه *H.niger* تنها در سطوح پایین یا متوسط کلسیم افزایش می یابد و غلظت های بالای کلسیم تاثیر معکوسی بر مقدار زی توده دارد.

بررسی اثر نیتروژن: غلظت نیتروژن، شکل آن (نیترات در مقابل آمونیوم) و نسبت آن ها، ممکن است بر تقسیم و تمایز یاخته ها تاثیر بگذارد. شکل های مختلف نیتروژن در محیط کشت باعث تغییر در سطوح متابولیت های یاخته ای و نیز پروتئین ها، اسیدهای آلی و هورمون های گیاهی می شود (۲۸). نیتروژن نه تنها به عنوان یک سوبسترای متابولیک برای آسیمیلاسیون در نظر گرفته می شود، بلکه به عنوان یک علامت، برای تنظیم الگوی رشد و نمو، به وسیله تنظیم بیان ژن های مختلف نیز عمل می کند (۲۷).

طبق یافته های پاین و همکاران (۲۲)، با افزایش غلظت یون نیترات در محیط کشت، تولید هیوسیاموس در ریشه های مویین گیاه.*Datura stramnium* L، کاهش یافت و با توجه به گزارش ایرانبخش و همکاران (۱۲)، افزایش یون نیترات، باعث افزایش وزن تر و خشک در کشت تعلیقی یاخته ای در گیاه *D.stramnium* گردید. این نتایج منطبق با قسمتی از یافته های به دست آمده از پژوهش حاضر است که نشان داد، درجداکشت ریشه از گونه *H.arachonideus* در غلظت هورمونی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، افزایش نیترات محیط باعث افزایش مقدار زی توده کالوسی تولید شده و کاهش مقدار آلکالوئید تام گردید.

همچنین دیمیر و دیجاگر (۸)، گزارش کردند که افزایش غلظت نیترات در کشت ریشه های تراریخت

www.SID.ir

Archive of SID

D.stramonium، باعث افزایش زی توده می گردد، اما بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها را کنترل می کند. این محققان علل افزایش زی توده را با افزایش نیترات، از طریق گهرمایه ی آمینو اسیدها توضیح دادند. آن ها بیان کردند که هنگامیکه رشد به فاز ثابت می رسد، غلظت هیوسیامین افزایش می یابد، اما در زمان رشد و افزایش زی توده، غلظت آلکالوئید کاهش می یابد. بعلاوه، علت کاهش سطوح تروپان آلکالوئید در گیاه *H.niger*، هنگامیکه غلظت نیترات افزایش می یابد را به دلیل نیاز اضافی گیاهان جوان برای انرژی متابولیک به منظور جذب نیترات و احیاء و/یا مشارکت در ساختار آمینو اسیدها دانستند، تا اینکه پس از تامین کافی انرژی برای فرایندهای متابولیک، باعث فعالیت آنزیم های دکربوکسیلاز که مسئول تولید پوترسین هستند و متعاقبا غلظت تروپان آلکالوئیدها می شوند (۲۸).

از طرف دیگر، در تحقیق حاضر، علاه بر ترکیب غذایی محیط کشت گیاهی، عوامل مختلف دیگر نیز از جمله نوع جداکشت، نوع هورمون گیاهی مورد استفاده و نوع گونه نیز مقدار زی توده کالوسی و آلکالوئید تام تولید شده را تحت تاثیر قرار دادند. بنابراین، نتایج کاملا یکنواختی به دست نیامد. اگرچه در تحقیقاتی که به وسیله سایر محققان صورت گرفته است نیز موارد بسیار متناقضی در مورد تاثیر نیترات محیط کشت بر تولید زی توده و آلکالوئید به چشم می خورد. از جمله اینکه طبق مطالعات علاقه مند و همکاران(۳)، افزایش نیترات باعث کاهش زی توده و افزایش آلکالوئید در *H.niger* می شود که کاملا عکس یافته های بدست آمده در برخی پژوهش هایی که قبلا ذکر شده، بوده است (۸،۲۲،۱۲ و۲۸) می باشد.

شاید بتوان یکی از دلایل چنین تنوعاتی را با توجه به یافته های سالسدو- مورالز و همکاران(۲۷) توضیح داد. آن ها بیان کردند که دسترسی نیتروژن با بیوسنتز سیتوکینین مرتبط است(۳۰). اکسین باعث از بین رفتن اثرات سیتوکینین و پیچیدگی پاسخ ها به نیترات می گردد. بنابراین، طبق یافته های ما که تولید کالوس در محیط های کشت حاوی اکسین با غلظت های متفاوت صورت گرفت، ممکن است چنین پیچیدگی و تنوعاتی در بروز پاسخ ها قابل انتظار باشد.

آنچه مورد توجه است اینکه، با افزایش غلظت اکسین به کار گرفته شده در محیط کشت چنین تنوعاتی نیز افزایش یافته است که البته وجود یک رابطه مستقیم بین غلظت اکسین به کارگرفته شده در محیط و میزان تنوعات سوماکلونال به وجود آمده در کالوس ها می تواند دلیلی بر این ادعا باشد.

در مورد تاثیر نوع جداکشت، یافته های ما نشان داد که در محیط کشت فاقد هورمون، مقدار کالوس تولید شده در دو گروه افزایش و کاهش نیترات، در جداکشت ریشه بیشتر از جداکشت برگ بود و در گروه شاهد هر دو نوع جداکشت عملکرد مشابهی نشان دادند. در سطوح بالاتر هورمونی این تاثیر در جداکشت برگی تعدیل گردید، به نحوی که در تمام گروه ها، مقدار کالوس تولید شده در برگ برابر با این مقدار در جداکشت ریشه بود. سطوح بالاتر از غلظت اکسین، باعث افزایش تنوعات ایجاد شده در پاسخ ها شد و از یکنواختی آن ها کاست. این امر می تواند بر مبنای گزارش لاسکیاوو و همکاران (۱۸)، قابل توضیح باشد. آنها گزارش کردند که افزودن اکسین به کشت های کالوسی باعث افزایش تغییرات سوماکلونال از طریق افزایش میزان متیلاسیون DNA می گردد. سوارتز و همکاران(۲۹) نیز گزارش کردند که تحت شرایط غلظت های کم و یا در غیاب تنظیم کننده های رشد، یاخته ها پلوئیدی نرمالی نشان می دهند که با یافته های ما در غلظت های پایین و یا محیط های فاقد هورمون مطابقت دارد.

به طور کلی، در بین تمامی جداکشت های به کار گرفته شده در تحقیق حاضر، تنها جداکشت برگی از الگوی رفتاری ثابتی در تولید آلکالوئید تام تبعیت کرد. به این ترتیب که کالوس های حاصل از این جداکشت در اغلب

www.SID.ir

Archive of SID

موارد، با افزایش نیترات محیط، آلکالوئید تام بیشتری تولید کردند و با کاهش نیترات، آلکالوئید تام کمتری از این کالوس ها به وجود آمد. به علاوه بیشترین مقدار آلکالوئید تام در بین تمامی گروه ها و جداکشت ها و در کلیه سطوح غلظت هورمونی مربوط به جداکشت برگ و با تیمار افزایش نیترات بود که در غلظت های هورمونی ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. این یافته ها مطابق با گزارش ون هالای (۳۱) در گیاه *H.muticus* است. آنها بیان کردند که اکسین درونی جداکشت برای تجمع بیشینه تروپان آلکالوئیدها کافی نیست. بنابراین افزایش محتوای آلکالوئید تام با افزایش غلظت اکسین در محیط کشت، قابل انتظار خواهد بود.

در سایر موارد، جداکشت ها، الگوی ثابتی در افزایش یا کاهش آلکالوئید تام نشان ندادند. بنابراین می توان به این استنباط کلی رسید که میزان تنوع پذیری در جداکشت برگ نسبت به سایر جداکشت ها بسیار کمتر بود که این خود یک مزیت محسوب می شود. از طرف دیگر، مقدار کالوس تولید شده، در اغلب موارد در تمامی گروه های شاهد و کاهش و افزایش نیترات در یک گروه آماری قرار داشتند. به این معنا که زی توده کالوسی به میزان جزئی تحت تاثیر تیمار نیتراتی قرار گرفت. با اینحال بیشترین مقدار زی توده کالوسی از جداکشت برگی گونه *H.arachnoideus* در سطح هورمونی NAA: $1mgl^{-1}$ (در تیمار افزایش نیترات)، به دست آمد که با یافته های الی و همکاران (۴)، منطبق است. این محققان، بالاترین مقدار وزن خشک را در کشت تعلیقی یاخته های *H.muticus* و در غلظت هورمونی NAA: $1mgl^{-1}$ مشاهده کردند.

با توجه به یافته های به دست آمده می توان به نتایج زیر دست یافت:

۱- افزایش غلظت کلسیم در محیط کشت گیاهی دارای تاثیر مثبت بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام بود.

۲- افزایش نیترات در محیط کشت باعث افزایش زی توده کالوسی شد و دارای اثرات متفاوتی بر محتوای آلکالوئید تام بود.

منابع

1- Ajungla L,Patil PP, Barmukh RB, Nikam TD, 2009,Influence of Biotic and Abiotic Elicitors on Accumulation Hyoscyamin and Scopolamine in Root Culture of *Datura metel* L., Indian Journal of Biotechnology, 8:317-322.

2- Akula R., and Gokare A.R., 2011,Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants, Plant Signaling & Behavior 6(11): 1720-1731.

3- Alaghemand A, Ghorbanpour M, Eradatmand Asli D, Moghaddasian B, 2013,Influence of Urea Fertilization on Tropane Alkaloids Content of Henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under Hydroponic Culture Conditions, Advances in Environmental Biology, 7(2): 301-307.

4- Aly IU, El-Shabrawi HM, Hanafy M ,2010, Impact of Culture Condition on Alkaloid Production from Undifferentiated Cell Suspension Cultures of *Egiptian* Henbane, Australian Journal of Basic and Applied Science, 4(10): 4717-4725.

5- Bourgau D, , Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001.Production of plant secondary metabolites: historical prpective. Plant science, 161, 839-851.

6- Curtis, W . R., Wang, P. and Humphrey, A., 1995, Role of Calcium and Differentiation in Enhanced Sesquiterpene Elicitation from Calcium Alginate-Immobilized Plant Tissue. Enzyme and Microbal Technology, 17 , 554-557.

7- Deambrogio , E. and P.J. Dale, 1980. Effect of 2,4-D on th frequency of regenerated plants in Barly and on genetic variability between them. Cereal Res Comm., 8:417-423.

8- Demeyer, K. and R. Dejaegere, 1988,Influence of the Mineral Nutrition on Yield and Alkaloid Content in *Datura stramonium*. Medelingen van de Faculteit, 53: Ta, 1723-1725.

9- Ehsanpour A.A, Madani S, Hoseini M,2007, Detection of Somaclonal Variation in Potato Callus Induced by UV-C Radiation Using

www.SID.ir

Archive of SID

RAPD-PCR, Gen. Appl. Plant Physiology, 33 (1-2), 3-11.

10- Gontier E, Sangwan BS, Barbotin JN., 1994, Effects of calcium, alginate, and calcium-alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of a stable suspension cell line of *Datura-Innoxia* Mill. Plant Cell Rep;13:533-6.

11- Hilton,M.G. Wilson, P.D.G , Growth and the Uptake of Sucrose and Mineral Ions by Transformed Root Cultures of *Datura stramonium*, *Datura candida x aurea*, *Datura wrightii*, *Hyoscyamus muticus* and *Atropa belladonna,*1995, Planta Med.,61,345-350

12- Iranbakhsh A.R., Oshagi M.A., Ebadi M., 2007, Growh and Production Optimization of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium* Cell Suspension Culture, Pakistan Journal of Biotechnological Science, 10(8): 1236- 1242.

13- Kadi K,Yahia A,2007,Effect of Phyto-hormones 2,4-D and Kinetin, Applications on Alkaloids Accumulation in *H.albus* L., Sciences & Technologie C-N 25: 13-17.

14- Kartal M, Kurucu S, Alun L, Ceyhan T, Sayar E, Cevheroglu S, Yetkin Y,2003, Quantitative Analysis of L-hyoscyamine in *Hyoscyamus Reticulates L*. by GC-MS. Turkish Journal of Chemistry, 27: 565-569.

15- Karuppusamy S,2009, A review on Trends in Production of Secondary Metabolites from Higher Plants by *in vitro* tissue, Organ and Cell Cultures. Journal of Medical Plants Research, 3(13): 1222-1239.

16- Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Bri elmann HL (1999) Natural Products from Plants. (CRC Press, Boca Raton, FL).

17- Lie BA, Todd JA, Pociot F, Nerup J, Akselsen HE, Joner G, Dahl-Jorgensen K., 1999. The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. Am J Hum Genet 64:793–800

18- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M., 1989, DNA Methylation of Embryogenic Carrot Cell Cultures and its Variations as Caused by Mutation, Differentiation, Hormones and Hypomethylating Drugs. Theoretical and Applied Genetics , 77:325-331.

19- Majd A., Chalabian F., 2004. Influence of period of development of plant on the Tropan alkaloids content of Hyoscyamus reticulates L. And effect of micro and macro elements and carbohydrate of tissue culture in the same plant. Gyahan darooei, N (10).

20- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. Agric Biol Chem 50: 2715-2722.

21- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473–497.

22- Payne, J,.Hamill J.D,. Robines R.J ,and Rhodes M.J.C., 1987, Production of Hyoscyamine by Hairy Root Cultures of *Datura stramonium.* Plant Med., 53:474-478.

23- Piñol M.T., Palazo´n J., Cusido´ R.M. , Ribo´ M. ,1991, Influence of Calcium Ion-Concentration in the Medium on Tropane Alkaloid Accumulation in *Datura stramonium* Hairy Roots, Plant Science. 141 , 41–49.

24- Pitta–Alvarez S.I,, Spollansky T.C.,, Giulietti A. M.,2000, The Influence of Different Biotic and Abiotic Elicitors on the Production and Profile of Tropane Alkaloids in Hairy root Cultures of *Brugmansia candida* , Enzyme and Microbial Technology. 26 : 252–258.

25- Poovaiah B.W., McFadden J.J., Reddy A.S.N., 1987,The Role of Calcium Ions in Gravity Signal Perception and Transduction, Physiol. Plantarum 3 (71) : 401–407.

26- Pudersell K, Vardja T, Vardja R, Matto V, Arak E, Raal A, 2012, Inorganic Ions in the Medium Modify Tropane Alkaloids and Riboflavin Output in *Hyoscyamus niger* Root Cultures,Pharmacognosy magazine.8(29): 73-77.

27- Salcedo-Morales G, Rosas-Romero G, Nabor-Correa N, Bermúdez-Torres K, López-Laredo AR,Trejo-Tapia G ,2009, Propagation and Conservation of castilleja tenulflora benth.("Hierba del cancer") through in vitro Culture. Polibotanica. 28: 119-137

28- Srivsta N., Bhagyawant S.S. and Meshram A. 2019.Alkaloids isolation and applications. Educreation publishing. Shabham vihar,Mangla, Bilaspur, Chhattisgrh-495001. p:45.

29- Swartz H J., 1991, Post Culture Behaviour, Genetic and Epigenetic Effects and Related Problems In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.) Micropropagation: Technology and Application. Dodrecht : Kluwer Academic Publishers,p 95-122.

www.SID.ir

Archive of SID

30- Takei, K., T. Takahasi, T. Sugiyama, T. Yamaya, H. Sakakibara, 2002. Multiple routes Communicating nitrogen.

31- Vanhalai l, Eeva1 M , Winjoki S, Hiltunen r , and Oksman-caldentey KM,1998, Effect of Growth Regulators on Transformed Root Cultures of *Hyoscyamus muticus*, Journal of Plant Physiology. WJL 153: 475-481.

Assessing the effects of auxin along with calcium and nitrate concentration altrations on the biomass and alkaloids in *H. arachnoideus Pojark* tissue cultures.

Ebrahimzade M.[1] and Mehrabi M.[2]

[1] Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, I.R. of Iran

[2] Faculty of Basic Science, Payam Noor University, East Tehran Center, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Medicinal plants are the most exclusive source of life saving drugs for majority of the world's population. Plant tissue cultures can be established routinely under sterile conditions from explants, such as plant leaves, stems, roots, etc. Both for multiplication and extraction of secondary metabolites. Solanaceous plants, such as genus *Hyoscyamus*, are regarded as rich sources of tropane alkaloids. Present study, *H.arachnoideus* Pojark, were investigated. Three types of explants (leaf, root) derived from seedlings, were cultured on Murashige and Skoog's medium supplemented with 3% sucrose, 0.75% (w/v) agar. We investigated the effect of different concentrations of Ca^{2+}, NO^{-}_{3} on Murashige and Skoog's medium supplemented with 3% sucrose and 0.75% (w/v) agar in two explant types (leaf and root) of *H.arachnoideus* with four concentration levels of auxin naphthalene acetic acid(0, 0.5, 1, 2 mg/l), in compare with Murashige and Skoog's medium supplemented with 3% sucrose, 0.75% (w/v) agar as control, In order to determine callus biomass and total alkaloid content. Our findings showed that, increased concentrations of Ca^{2+} was found to have positive effect on callus biomass and total alkaloid content. NO^{-}_{3} had different effects on callus biomass and alkaloid production, but increased concentrations of NO^{-}_{3} could enhance callus biomass and decrease alkaloid content, in some cases.

Key words: *Hyoscyamus*, Callogenesis, Growth regulator, Ca^{2+}, NO_3^-, Total alkaloid.

www.SID.ir