

بررسی مقدار زی توده و محتوای آلکالوئید تام در کشت بافت *H. arachnoideus* Pojark تحت اثر متقابل تغییرات غلظت NAA و منبع کربنی

مهديس ابراهيم زاده معبود^{۱*}، مهري مهرايي^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

^۲ مجتمع علوم پایه کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران

E-mail: m_ebr1974@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳

چکیده

اثرات درمانی سرده بنگ (*Hyoscyamus*) به خاطر وجود تروپان آلکالوئیدهای مختلف موجود در آن می باشد. کشت بافت که در طی آن می توان با تغییر در محیط کشت به حجم بهینه ای از بافت های مناسب از نظر تولید متابولیت های ثانوی دست یافت، در مورد این نوع گیاهان دارویی کمیاب اهمیت خاصی دارد. در مطالعه حاضر، گونه *H. arachnoideus* Pojark مورد بررسی قرار گرفت. دو نوع جداگشت (برگ و ریشه) که از دانه رست های این گونه به دست آمدند، بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰.۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار کشت داده شدند. اثرات دو نوع منبع کربنی (سوکروز و مانیتول) را روی محیط کشت MS حاوی ۰.۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، در جداگشت های برگ و ریشه گونه *H. arachnoideus* با چهار غلظت از اکسین NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر)، در مقابل محیط کشت MS حاوی ۰.۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، به عنوان گروه شاهد، بررسی کردیم تا اثر این عوامل را بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام تعیین نماییم. یافته های ما، از نقش دو گانه سوکروز، هم به عنوان منبع تغذیه گیاه و هم به عنوان تنظیم کننده فشار اسمزی، حمایت کرد؛ و نیز اثر مثبت سوکروز را بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام، مورد تایید قرار داد.

کلیدواژه ها: آلکالوئید تام، بنگ، تنظیم کنند رشد، کالوس زایی، منبع کربن

مقدمه

کارخانه های بالقوه برای تولید متابولیت ها ثانویه متمرکز کرده است و راه را برای پژوهش های جدید در کشف و ظهور ترکیبات ثانویه هموار نموده است [۷].

تقاضای شدید و در حال افزایش در بازار کنونی برای تولیدات جدید و طبیعی، توجه را بر مواد گیاهی کشت داده شده در شرایط در شیشه، به عنوان

به علت هزینه بالای تولیدات صنعتی، آلکالوئیدهای تروپانی از گیاهان تیره سیب‌زمینی استخراج می‌شوند و هنوز هم جستجو برای یافتن منابع جدید ادامه دارد. گیاهان سرده بنگ^۱، از جمله این گیاهان دارویی‌اند که با توجه به دارا بودن مقادیر قابل توجهی از تروپان آلکالوئیدها، از سالیان دور در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار گرفته شده‌اند. این تروپان آلکالوئیدها شامل هیوسيامین، اسکوپولامین و آتروپین می‌باشند که در تهیه ده‌ها ماده دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به اهمیت فوق‌العاده‌ای که گیاهان دارویی این سرده دارند، شناسایی عواملی که باعث افزایش ماده موثر دارویی آنها، که همان آلکالوئیدهای تروپانی است، می‌گردد، می‌تواند گام بلندی در پیشرفت صنعت داروسازی و درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار آید. تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که نوع و مقدار آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف این سرده با هم اختلاف داشته و حتی در یک گونه که در مناطق جغرافیایی مختلف روئیده‌اند نیز این اختلاف وجود دارد.

بنابراین، در این تحقیق سعی بر آن است که اثر عوامل مختلفی همچون اثر تغییرات غلظت عناصر در محیط کشت، تغییر نوع و مقدار هورمون‌های گیاهی بر رشد و تمایز بافت در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و از نظر کمی و کیفی تغییرات آلکالوئیدهای آن شناسایی شوند، تا با به کارگیری عوامل موثر در بالا بردن این آلکالوئیدهای تروپانی، توجیه اقتصادی استخراج این مواد از گیاهان این سرده را به میزان قابل توجهی افزایش داد.

مزایای عمده سیستم کشت سلولی عبارتند از: ۱- ترکیبات مفید می‌توانند تحت شرایط کنترل شده غیر وابسته به تغییرات اقلیمی یا شرایط خاکی تولید شوند. ۲- سلول‌های کشت داده شده عاری از میکروب‌ها و حشرات خواهند بود. ۳- سلول هر گیاهی، گرمسیری یا سردسیری می‌تواند به راحتی به منظور به دست آوردن متابولیت‌های ویژه، تکثیر شوند. ۴- کنترل خودکار رشد سلولی و تنظیم منطقی فرآیندهای سوخت و ساز، هزینه‌های نیروی کار را کاهش داده و باعث افزایش تولید می‌گردد. ۵- مواد زیستی از کشت‌های کالوسی قابل استخراج هستند [۱۸].

به منظور دستیابی به عملکرد بالای مناسب برای بهره‌وری تجاری، تلاش‌ها بر جداسازی فعالیت‌های بیوسنتزی سلول‌های کشت شده متمرکز گردیده است که نیل به این هدف به وسیله بهینه‌سازی شرایط کشت، انتخاب نژادهای دارای تولید بالاتر و به کارگیری پیش‌سازها، روش‌های انتقال و نیز تکنیک‌های غیر متحرک سازی، امکان پذیر شده است [۱۸].

تولید آلکالوئیدهای مهم از طریق ابزار بیوتکنولوژیکی مختلف، یک جایگزین جالب برای کشت گیاهان در شرایط طبیعی است، زیرا می‌تواند ذخیره سالیانه یک‌دست که به تغییرات فصلی گیاهان رشد کرده در شرایط مزرعه‌غیروابسته است را ضمانت کند اما از طرف دیگر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف در شرایط کشت سلولی در شیشه، با محدودیت‌هایی مواجه است و کاربرد تازنده‌ها، راهکار موثری است که برای افزایش تولید آلکالوئیدهای مهم در کشت بافت و سلول به کار می‌رود [۲].

² *Hyoscyamus*¹ Elicitors

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

متر مربع درثانیه، قرار گرفتند. بذرها پس از مدت زمان تقریبی ۱۰ روز جوانه زدند. از دانه رست‌های ۴ هفته‌ای به منظور تهیه جداگشت‌های ریشه و برگ برای انجام آزمایش‌های بعدی، استفاده گردید.

بررسی اثر جداگشت‌های مختلف، تیمارهای متفاوت از عناصر غذایی و نیز غلظت‌های مختلف از هورمون نفتالن استیک اسید (NAA)، بر میزان زی توده ی کالوسی، و محتوای آلکالوئید تام انجام گردید. بنابراین قطعه‌های جداگشتی مختلف در محیط‌های 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 کالوس‌ها

نام تیمار	محیط کشت
شاهد	MS*
T ₁	MS* + 10 gr Monitol
T ₂	MS* + 10gr Sucrose

* 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 کالوس‌ها

ردیف	غلظت نفتالن استیک اسید (NAA) mg/l ^۱
۱	۰
۲	۰/۵
۳	۱
۴	۲

داده‌ها به وسیله آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد مقایسه بین دو گروه (دو نوع جداگشت)،

در این مطالعه، بذرهای گونه *H. arachnoideus* (Pojark (35833.TUH) از سرده بنگبه عنوان ماده ی اولیه برای کشت در شیشه^۱، استفاده گردید. بذرهای *H. arachnoideus* از منطقه شهر تبریز مشتمل بر پارک ائل گلی، جاده وادی رحمت، ابتدای جاده باسمانج، جمع آوری شدند.

روش‌ها

محیط‌های کشت در شیشه

برای کالوس‌زایی و به دست آوردن ترکیبات مختلف مثل آلکالوئیدها در این مطالعه، از محیط کشت MS [۱۴]. استفاده شد.

برخی از بذرها به دلایل مختلف فیزیولوژیکی قادر به رویش نیستند و به اصطلاح دچار خفتگی می‌باشند. از آن جاییکه بذرهای مورد استفاده در این مطالعه دو ساله بودند، برای از بین رفتن خفتگی، بذرها به مدت ۱۲ ساعت در ژئیرلیک اسید (۳۵ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داده شدند. بذرهای *H. arachnoideus* به علت داشتن پوسته سخت قادر به جوانه‌زنی نیستند. به منظور برطرف کردن این مانع، بذرهای این گونه به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه در سولفوریک اسید غلیظ قرار گرفته و سپس چندین بار آبکشی شدند.

بذرهای سترون شده با استفاده از پنس سترون در محیط‌های کشت MS توزیع شده در پتری دیش‌های سترون، قرار داده شدند. پتری دیش‌های حاوی بذرها، در اتاق کشت تحت شرایط دمایی 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نوری ۳۲/۵ میکرو مول بر

^۱ In vitro

۷- 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.

۸- 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.

۹- 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.

۱۰- محلول کلروفرمی جمع آوری شده، در معرض جریان هوا قرار گرفت تا حلال آن پرانده شود. ۱۱- 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^۱ UV، مورد بررسی قرار گرفت [۸].

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

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 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 منظور استخراج آلکالوئید، کالوس های به دست آمده از محیط های حاوی تیمارهای مختلف، ۸ هفته پس از کشت جداگشت ها، برداشت شدند. روش به کار گرفته شده برای استخراج آلکالوئید به شرح زیر می باشد [۱۳]:

۱- ابتدا ۰/۵ گرم از کالوس توزین و با استفاده از هاون به صورت پودر در آمد.

۲- پودر حاصل در آمونیاک ۲۵٪ خیسانده شد.

۳- بر روی مخلوط بالا اتانول ریخته شد به طوریکه روی آن را کاملاً پوشانند. سپس با هم زن شیشه ای مخلوط گردید.

۴- مخلوط حاصل به مدت ۱۵-۱۲ ساعت به حالت ساکن قرار گرفت.

۵- عصاره ی بالای پودر برداشته و از صافی عبور داده شد، روی پودر باقی مانده در ته ظرف اتانول ریخته و پس از مدتی مجدداً صاف گردید. این عمل چند بار تکرار شد تا پودر کاملاً به حالت بی رنگ درآمد. عصاره ی صاف شده ی حاصل، در معرض جریان هوا قرار گرفت و حلال آن پرانده شد.

۶- روی آنچه بر جداره ظرف باقی ماند، ۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید یک نرمال ریخته شد و ته مانده ی ظرف در اسید کاملاً حل گردید.

^۱ UV-1601, UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu

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.

یافته‌های به دست آمده از تاثیر تیمارهای منبع کربنی در محیط‌کشت MS، بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام در جداکشت‌های برگ و ریشه، در سطوح مختلف از غلظت‌های هورمونی داده‌های به دست آمده از مقادیر زی توده و آلکالوئید تام کالوسی در تیمارهای منبع کربنی، دارای توزیع نرمال بودند. نتایج به دست آمده از به کارگیری تیمارهای مختلف منبع کربنی در محیط کشت MS حاکی از وجود تفاوت‌هایی در مقدار زی توده تولید شده و محتوای آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های برگ و ریشه بود. در این مطالعه، دو نوع منبع کربنی به محیط‌کشت MS پایه به طور جداگانه اضافه شد که شامل مقادیر افزایش یافته ساکارز و نیز مقادیری از هیدروکربن مانیتول بود (جدول ۱). این تیمارهای غذایی در چهار سطح مختلف هورمونی به کار گرفته شد (جدول ۲) که به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

الف. اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در محیط‌کشت فاقد هورمون ($NAA: 0mg l^{-1}$)

اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: نتایج به دست

آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جداکشت برگ در گروه تیماری T_2 که حاوی هیدروکربن مانیتول بود نسبت به گروه T_1 که حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز بود، مقدار کالوس بیشتری تولید کرد، و زی توده کالوسی به دست آمده از این جداکشت در گروه شاهد، حد واسط این دو گروه بود. از طرف دیگر، تمامی گروه‌ها از نظر تولید آلکالوئید تام یکسان عمل کردند و از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین این سه گروه دیده نشد (نمودار الف-۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، تفاوت آماری قابل ملاحظه‌ای بین دو گروه T_1 و T_2 ، از نظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده، مشاهده نگردید. در حالی که گروه شاهد نسبت به دو گروه دیگر، مقدار زی توده کالوسی کمتری تولید نمود. کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ریشه، در گروه شاهد نسبت به محیط‌های دارای مقادیر افزایش یافته ساکارز (T_1) و محیط کشت حاوی مانیتول (T_2)، مقدار آلکالوئید تام بیشتری تولید نمود. به علاوه، محیط‌کشت حاوی مانیتول نسبت به محیط کشت حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز، از نظر تولید آلکالوئید تام برتری داشت (نمودار الف-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمار منبع کربنی

با توجه به اطلاعات به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t - استیودنت، تفاوت معناداری بین دو جداکشت ریشه و برگ گونه *H. arachnoideus* در دو گروه شاهد و T_7 ، از نظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده وجود نداشت، در حالی که مقدار زی توده حاصل کالوس مربوط به

گروه T₆، در جداكشت ریشه بیشتر از جداكشت برگ بود (نمودار الف-۳).

مقدار آلكالوئید تام تولید شده توسط كالوس‌های به دست آمده از جداكشت های برگ و ریشه در تمامی گروه‌ها تفاوت معناداری نشان داد. بدین صورت که، در دو گروه شاهد و T₂، مقدار آلكالوئید تام حاصل از كالوس‌های به دست آمده از جداكشت‌های ریشه بیشتر از جداكشت‌های برگ بود و در گروه T₁، كالوس‌های به دست آمده از جداكشت برگ نسبت به كالوس‌های حاصل از جداكشت ریشه مقدار آلكالوئید تام بیشتری تولید کردند (نمودار الف-۴).

ب. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلكالوئید تام به دست آمده از كالوس در جداكشت‌های برگ و

ریشه در سطح هورمونی NAA: 0.5mg l⁻¹

در این سطح از غلظت هورمونی نیز همانند سطح فاقد هورمون، گروه شاهد و تیمارهای منبع کربنی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر منبع کربنی در جداكشت برگ: با توجه به اطلاعات حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، در جداكشت برگ، هیچ تفاوتی بین سه گروه شاهد، T₁ و T₂، از نظر تولید زی توده كالوسی وجود نداشت. از نظر تولید آلكالوئید تام، دو گروه T₆ و T₇ به طور مشابه عمل کردند و مقدار آلكالوئید تام به دست آمده از این دو گروه بیشتر از گروه شاهد بود (نمودار ب-۱).

اثر منبع کربنی در جداكشت ریشه: جداكشت ریشه، در هر سه گروه شاهد، T₁ و T₂، مقدار زی توده كالوسی یکسانی تولید کرد. از نظر تولید آلكالوئید تام، گروه T₂، نسبت به دو گروه شاهد و T₆ بهتر عمل کرد و گروه شاهد نسبت به دو گروه دیگر مقدار آلكالوئید

تام کمتری تولید نمود (نمودار ب-۲).

اثر جداكشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمار منبع کربنی

با توجه به اطلاعات به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t-استیودنت، هر دو جداكشت برگ و ریشه، در سه گروه شاهد، T₁ و T₂ به طور یکسان عمل کردند؛ یعنی، تولید زی توده تحت تاثیر نوع جداكشت قرار نگرفت (نمودار ب-۳).

در گروه T₂، كالوس به دست آمده از جداكشت ریشه نسبت به كالوس حاصل از جداكشت برگ، آلكالوئید تام بیشتری تولید نمود و در سایر موارد اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد (نمودار ب-۴).

پ. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلكالوئید تام به دست آمده از كالوس در جداكشت‌های برگ و ریشه در سطح هورمونی NAA: 1mg l⁻¹

در این سطح هورمونی نیز مانند سطوح هورمونی قبل، گروه شاهد و دو گروه از تیمارهای منبع کربنی به کار برده شدند (جدول ۱).

اثر منبع کربنی در جداكشت برگ: اطلاعات به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گروه T₁ که حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز بود نسبت به دو گروه دیگر مقدار زی توده كالوسی بیشتری تولید نمود و دو گروه شاهد و T₂، از این نظر مشابه یکدیگر عمل کردند. تولید آلكالوئید تام در گروه شاهد بیشتر از دو گروه T₁ و T₂ بود و این دو گروه مقدار آلكالوئید تام یکسانی تولید نمودند (نمودار پ-۱).

اثر منبع کربنی در جداكشت ریشه: با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها،

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، تولید زی توده کالوسی در جداکشت برگی این گونه در سطح هورمونی $NAA: 2mg l^{-1}$ تحت تاثیر نوع منبع کربنی قرار نگرفت و جداکشت برگی در هر سه گروه به طور مشابه عمل کرد. اما، تولید آلکالوئید تام در کالوس‌های به دست آمده از جداکشت برگی، در گروه T_2 بیشتر از سایر گروه‌ها بود و گروه T_1 کمترین مقدار آلکالوئید تام را نشان داد (نمودار ت-۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: در جداکشت

ریشه این گونه، هر سه گروه از نظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده به طور یکسانی عمل کردند. به علاوه، گروه T_1 نسبت به دو گروه دیگر، آلکالوئید تام بیشتری تولید کرد و دو گروه دیگر، از این نظر، به طور مشابه عمل کردند (نمودار ت-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی

با توجه به اطلاعات مربوط به تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t -استیودنت، مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه در گونه *H. arachnoideus*، مقادیر یکسانی داشت (نمودار ت-۳).

در حالی که تولید آلکالوئید تام به شدت تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت، به این ترتیب که در دو گروه شاهد و T_2 ، کالوس‌های تولید شده در جداکشت برگ نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه، دارای عملکرد بیشتری بودند، اما در گروه T_1 ، عملکرد جداکشت ریشه از جداکشت برگ بهتر بود (نمودار ت-۴).

تولید زی توده کالوسی در این جداکشت تحت تاثیر تیمار منابع کربنی قرار نگرفت. آلکالوئید تام تولید شده در گروه T_2 ، بیشترین مقدار و در گروه شاهد، کمترین مقدار را نشان داد (شکل پ-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی

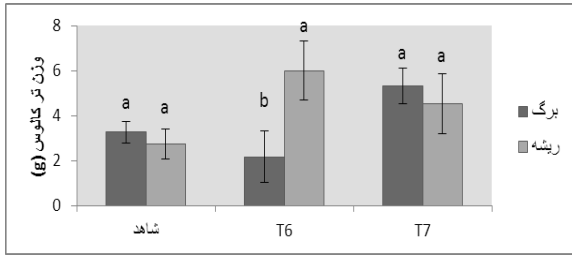
با توجه به اطلاعات حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t -استیودنت، مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه در گروه شاهد یکسان بود و تفاوت معناداری را در بین دو نوع جداکشت نشان نداد. اما در دو گروه دیگر، مقدار کالوس تولید شده تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت؛ به این ترتیب که تولید کالوس در هر دو گروه، در جداکشت برگ بیشتر از جداکشت ریشه بود (نمودار پ-۳).

تولید آلکالوئید تام نیز تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت. در گروه شاهد و T_1 ، کالوس‌های به وجود آمده از جداکشت برگ نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه، آلکالوئید تام بیشتری تولید کردند؛ در حالی که در گروه T_2 ، این مقدار در جداکشت ریشه بیشتر از جداکشت برگ بود (نمودار پ-۴).

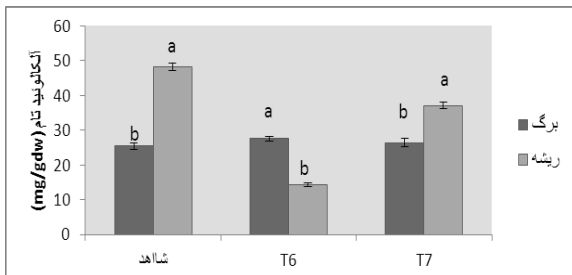
ت. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در سطح هورمونی $NAA: 2mg l^{-1}$

در این سطح هورمونی نیز مانند سطوح هورمونی قبل، گروه شاهد و دو گروه از منابع کربنی به کار برده شد (جدول ۱).

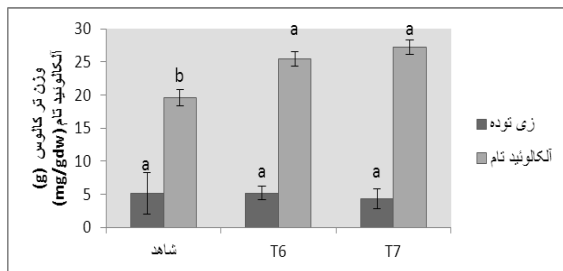
اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: با توجه به



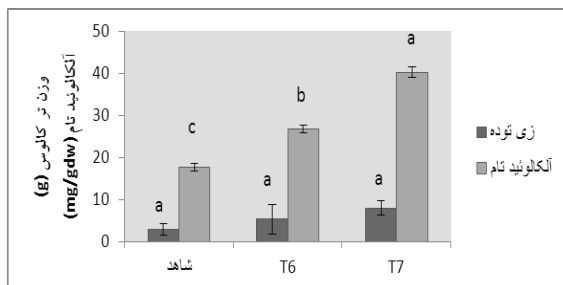
نمودار الف-۳: تأثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mg l^{-1}$)



نمودار الف-۴: تأثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mg l^{-1}$)



نمودار ب-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 0.5mg l^{-1}$

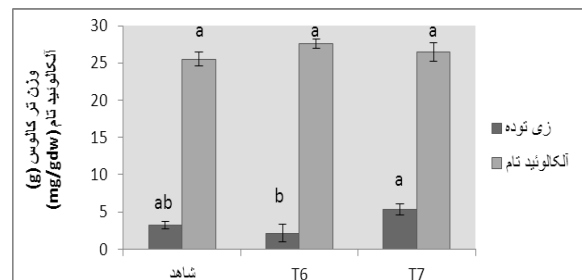


نمودار ب-۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 0.5mg l^{-1}$

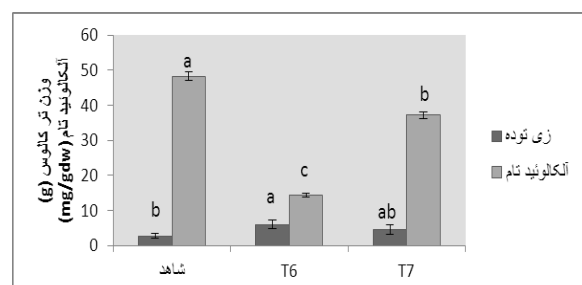
* در تمامی نمودارها، ستون‌ها بیانگر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند.

- در نمودارهایی که مربوط به هر کدام از جداکشت‌ها به‌طور جداگانه است (مقایسه بین تیمارها)، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح آماری $p \leq 0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون‌های مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین‌ها می‌باشد.

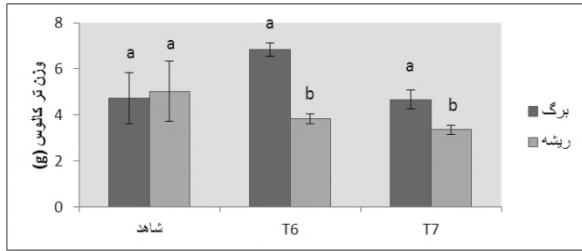
- در نمودارهایی که مقایسه بین دو نوع جداکشت است، تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از آزمون t - استیودنت و در سطح آماری $p \leq 0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون‌های غیرمشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین‌ها است.



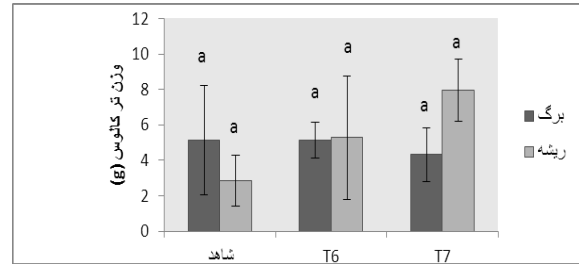
نمودار الف-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mg l^{-1}$)



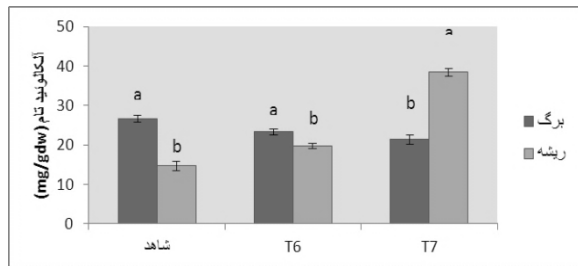
نمودار الف-۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mg l^{-1}$)



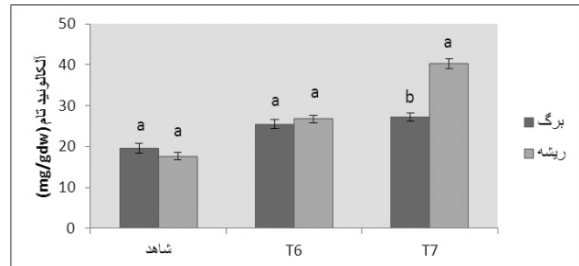
نمودار پ-۳: تاثیر جداگشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 1\text{mg l}^{-1}$



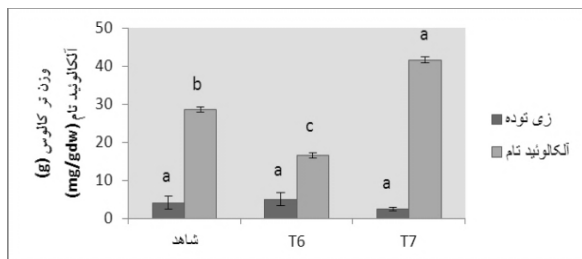
نمودار ب-۳: تاثیر جداگشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 0.5\text{mg l}^{-1}$



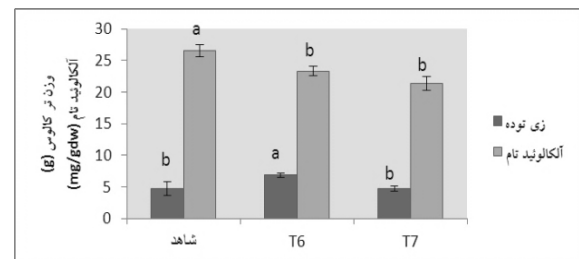
نمودار پ-۴: تاثیر جداگشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 1\text{mg l}^{-1}$



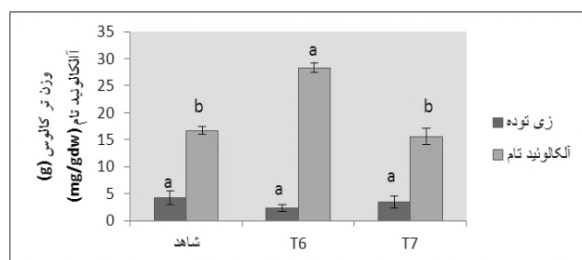
نمودار ب-۴: تاثیر جداگشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 0.5\text{mg l}^{-1}$



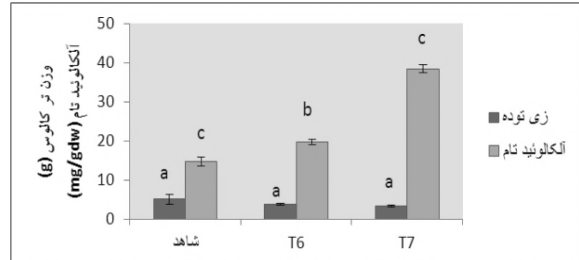
نمودار ت-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداگشت برگ گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 2\text{mg l}^{-1}$



نمودار پ-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداگشت برگ گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 1\text{mg l}^{-1}$



نمودار ت-۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداگشت ریشه گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 2\text{mg l}^{-1}$



نمودار پ-۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداگشت ریشه گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $\text{NAA: } 1\text{mg l}^{-1}$

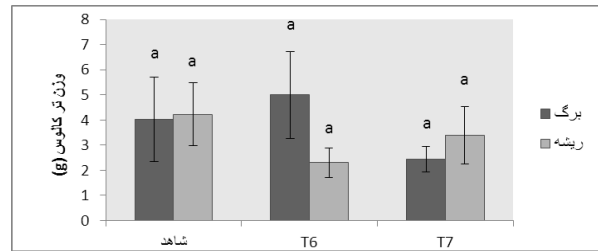
عنوان یک حلال فعال اسمزی در محیط کشت، قابل تمایز باشد [۹]. بنابراین در مطالعه حاضر، محیط کشت حاوی مانیتول برای شناسایی نقش سوکروز در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت.

به این منظور، بدون اینکه غلظت اولیه سوکروز در محیط کشت پایه MS (۳٪) تغییر کند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. در یک گروه تیماری ۱٪ مانیتول به محیط کشت پایه اضافه شد و در گروه دیگر غلظت سوکروز در محیط کشت پایه به میزان ۱٪ افزایش یافت.

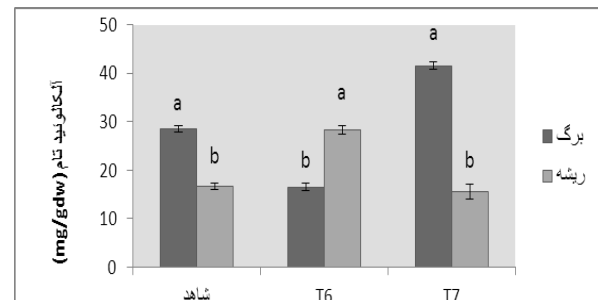
مانیتول، یک محصول اصلی حاصل از فرآیند فتوسنتزی در گیاهان سبز و جلبک‌ها می‌باشد و از طریق تنظیم اسمزی باعث بالا رفتن مقاومت گیاه به تنش کم آبی می‌گردد [۱۷]. این ماده اغلب یک منبع غیر فعال کربنی در کشت بافت گیاهی است و به عنوان یک افزودنی خنثی برای تنظیم اسمزی محیط کشت به کار می‌رود [۹].

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، حاکی از عدم تفاوت در مقدار زی توده کالوسی تولید شده بین دو گروه حاوی مانیتول و گروه حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز در اغلب موارد و در تمامی جداکشت‌ها بود. این نتایج منطبق با یافته Brown و همکاران (۱۹۷۹) می‌باشد که در مطالعه‌ای نشان دادند که در محیط‌های حاوی سوکروز جایگزین شده با مانیتول، تولید شاخساره در گیاه تنباکو کاهش پیدا نکرد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان چنین استنباط کرد که قسمتی از نقش ساکارز در محیط‌های غذایی کشت گیاه، به دلیل خاصیت اسمزی آن باشد.

طبق یافته‌های Swankar و همکاران (۱۹۸۶)، اثر سوکروز بر میزان القاء کالوس ممکن است به علت مشارکت آن در پتانسیل اسمزی محیط کشت باشد.



نمودار ت-۳: تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 2mg l^{-1}$



نمودار ت-۴: تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 2mg l^{-1}$

بحث:

بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت MS و بررسی تاثیر غلظت و نوع ترکیبات موجود در این محیط کشت، شامل بررسی منابع کربنی مورد استفاده در محیط کشت نیز می‌باشد. منبع کربنی بر هزینه مواد خام استفاده شده در کشت بافت گیاهی در مقیاس وسیع چیره می‌گردد و بنابراین از اهمیت بالایی در تجزیه و تحلیل فرایند های اقتصادی بر خوردار است [۹]. از مطالعات قبلی در زمینه کشت بافت مشخص می‌شود که غلظت ساکارز اولیه می‌تواند بر گستره‌ای از پارامترهای کشت نظیر سرعت رشد و عملکرد متابولیت‌های ثانویه و نیز نسبت وزن تر یاخته‌ای به وزن خشک یاخته‌ای تاثیر بگذارد. بنابراین تاثیر سوکروز به عنوان زیر لایه بیوشیمیایی و منبع تغذیه‌ای باید از نقش فیزیکی آن به

احتمالا این مکانیسم‌های حفاظتی در برداشت رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^\cdot) و/یا تثبیت ماکرو مولکول‌ها دخیل می‌باشند.

در پژوهش حاضر، تاثیر غلظت‌های افزایش یافته سوکروز نسبت به محیط‌کشت پایه MS نیز مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که افزایش غلظت سوکروز از ۳٪ به ۴٪ در اغلب موارد، آلکالوئید تام را افزایش داد. در مورد زی توده کالوسی، این تیمار، در اکثر موارد تاثیری در مقدار آن نداشت و در برخی موارد آن را افزایش داد.

سوکروز در محیط‌کشت باعث افزایش فتوسنتز می‌گردد. Maldonado و Loyola (۱۹۹۵) گزارش کردند که فتوسنتز باعث ساخت تروپیک اسید و مانع آسیب آلکالوئید می‌شود.

به علاوه، Rothe و همکاران (۲۰۰۱)، نشان دادند که با افزایش سوکروز در کشت ریشه گیاه *Atropa belladonna* (تیره سیب‌زمینی)، میزان آلکالوئید افزایش می‌یابد. همچنین تاثیرات سودمند سوکروز در کالوس‌زایی در بسیاری از گیاهان نیز گزارش شده است [۵ و ۶].

از بین چهار سطح از غلظت‌های هورمونی به‌کار برده شده در این پژوهش، غلظت هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، یکنواختی بیشتری را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. بدین معنی که، در این سطح از غلظت هورمونی، در کلیه جداکشت‌های برگ و ریشه از هر دو گونه، افزایش محتوای آلکالوئید تام حاصل از کالوس، در گروه حاوی مانتیول و گروه حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز مشاهده شد. در حالی که در سایر سطوح از غلظت هورمون، برخی از جداکشت‌ها در یک یا دو گونه، افزایش و گروهی نیز کاهش نشان دادند که با توجه به گفته‌های قبلی، ممکن است به

Last و Brettle (۱۹۹۰) گزارش کردند که، سوکروز در محیط کشت، هم به عنوان تنظیم کننده فشار اسمزی و هم به عنوان منبع کربنی عمل می‌کند که هر دو عملکرد برای تشکیل کالوس مهم هستند.

از طرف دیگر، مانتیول به کار گرفته شده در جداکشت‌های برگ، اغلب تغییری را در محتوای آلکالوئید تام موجود در کالوس‌ها، نسبت به تیمارهای حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز، به وجود نیاورد و یا باعث کاهش آن شد. اما در جداکشت‌های ریشه‌ای، در اغلب موارد، مانتیول نسبت به سوکروز، محتوای آلکالوئید تام را در کالوس‌ها افزایش داد. به علاوه در برخی موارد افزودن مانتیول به محیط‌کشت باعث افزایش زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت گردید. از آنجائیکه در هیچ کدام از گروه‌های تیماری کمبودی از لحاظ منبع تغذیه‌ای کربنی وجود نداشت، می‌توان علت افزایش محتوای آلکالوئید تام و مقدار زی توده کالوسی را در این موارد، به حضور مانتیول مربوط دانست. بدین معنا که مانتیول تاثیر مثبتی بر تولید کالوس و آلکالوئید تام داشت. افزایش مانتیول ممکن است فشار اسمزی بالایی به سیتوپلاسم یاخته وارد کند و بنابراین باعث القاء تنش و کالوس‌زایی و نیز افزایش محتوای آلکالوئید گردد. البته ممکن است این اثر، تنها به نقش مانتیول در تنظیم اسمزی مربوط نباشد.

طبق یافته‌های Abebe و همکاران ۲۰۰۳، معرفی ژن مانتیول دهیدروژناز (mtID) به درون گیاه گندم باعث بهبود عملکرد گیاه شد. به علاوه، تفاوت آماری معناداری در تنظیم اسمزی، بین گیاه تراژن و گیاه شاهد، چه در سطح کالوسی و چه در گیاه کامل، وجود نداشت. این امر بیانگر تاثیر سودمند مانتیول در مکانیسم‌های حفاظتی نسبت به تنظیم اسمزی می‌باشد.

منابع:

- [1] Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Chushman JC, 2003, Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and SALinity. *Plant Physiology*, 131:1748-1755.
- [2] 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.
- [3] Bayliss MW (1980) Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A: 113-144.
- [4] Brown D. C. W., Leung D. W. M, Thorpe T.A., 1979, Osmotic Requirement for Shoot Formation in tobacco callus, *Physiologia Plantarum*, 44 (1): 36-40.
- [5] Dhar U, Joshi M. 2005, Efficient Plant Regeneration Protocol through Callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew (Asteraceae): Effect of Explants Type, Age and Plant Growth Regulators. *Plant Cell. Reports*, 24: 195-200.
- [6] Gopi C. and Vatsala T. M. 2006. In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gynemasyvestre* R.Br. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (12), pp. 1215-1219.
- [7] 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.
- [8] Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Briellmann HL (1999) *Natural Products from Plants*. (CRC Press, Boca Raton, FL).
- [9] Keng C. L., Saidon N. A., and Bhatt A., 2009, Somatic Embryogenesis and Root Regeneration in *Hyoscyamus niger* L. for the Production of Hyoscyamine, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8 (24), pp. 6952-6960.
- [10] Last, D.J., and R.I.S. Brettell, 1990, Embryo Yield in Wheat Anther Culture is Influenced by the Choice of Sugar in the Culture Medium. *Plant Cell Rep.* 9: 14-16.
- [11] 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.
- [12] Maldonado, M.I.E. and Loyola V.V.M., 1995, Establishment and Characterization of Photosynthetic of Hairy Root Cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33:321-329.

دلیل افزایش تنوعات سوماکلوننی در اثر افزایش غلظت اکسین به کار برده شده باشد. طبق گزارش Bayliss (۱۹۸۰)، احتمال دارد که تنظیم کننده‌های رشد به‌طور ترجیحی میزان تقسیم یاخته‌های غیرطبیعی ژنتیکی را افزایش دهند و نیز طبق یافته‌های LoSchiavo (۱۹۸۹)، افزودن اکسین به کشت‌های کالوسی غیر سازمان یافته باعث افزایش تغییرات سوماکلونال از طریق افزایش میزان متیلاسیون DNA می‌گردد.

بنابراین می‌توان به این استنباط کلی دست یافت که تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کشت، وابسته به ترکیبی از عوامل مختلف ژنوتیپی و محیطی و گاه تأثیرات متقابل این عوامل و همچنین جهش‌های به وجود آمده در یاخته‌ها در اثر عوامل مختلف می‌باشد. وجود تمامی این عوامل کار را برای تفسیر نتایج به دست آمده از یک فرایند زیستی دشوار می‌سازد، به نحوی که در بسیاری از موارد نمی‌توان به نتایج کاملاً منسجمی دست یافت و یا با قاطعیت یک یا چند عامل را در این فرایندها دخیل دانست. آنچه مسلم است این که، تنها می‌توان به ارزیابی تأثیر این عوامل پرداخت و آن‌ها را در بهبود فرایندهای مطلوب به کار گرفت.

۱. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، نقش دو گانه سوکروز در محیط کشت گیاهی را هم به عنوان منبع تغذیه‌ای و هم به عنوان تنظیم کننده اسمزی، تأیید کرد.

۲. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مانیتول می‌تواند از طریق ایجاد تنش اسمزی باعث افزایش محتوای آلکالوئید تام در کالوس گردد.

۳. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، افزایش ساکارز دارای تأثیرات مثبتی بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام آن، بود.

- [13] Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of scopolia japonica. *AgricBiolChem* 50: 2715-2722.
- [14] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *PhysiologiaPlantarum* 15:473-497.
- [15] Roth G, Garske U, Drager B, 2001, Calystegines in root culture of *Atropa belladonna* Respond to Sucrose, not to Elicitation, *Plant Science*, 160: 1043- 1053.
- Swankar, P., S.P. Bohra, and N. Chandra. 1986, Biochemical Changes during Growth and Differentiation of the Callus of *Solanum surattense*. *J Plant Physiol.* 76: 75-81.
- [16] Valliyodan, B. & Nguyen, H.T. 2006, Biological mechanisms that influence soy protein concentration and composition. *USA* 103, 16666-16671.
- [17] Vijayasree N, Udayasri P, V.V Aswanikumar Y, Ravi Babu B, Phanikumar Y, Vijay Varma M. 2010, Advancements in the Production of Secondary Metabolites. *Indian Journal of Natural Products*, 3: 112-123.

