

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

الهام ختایی و فرح کریمی*

*گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

چکیده

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

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

مقدمه

(Zhang *et al.*, 2004). ترکیبات فعال بیولوژیک که در

همه این گیاهان تولید می‌شود، از نوع تروپان آلکالوئیدها هستند که وجود آنها در رده‌بندی شیمیایی (کمو تاکسونومی) تیره سیب‌زمینی نیز استفاده می‌شود

تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) دارای جنس‌های متعددی، نظیر: *Duboisia*, *Hyoscyamus*, *Atropa* و *Scopolia* است (Boitel-Conti *et al* 2000);

جوان ریشه سنتز شده، به بخش‌های هوایی گیاه انتقال می‌یابد. در بیشتر گیاهان تیره سب‌زمینی معمولاً هیوسامین آلکالوئید عمده است، در حالی که اسکوپولامین فقط به مقدار کمی تولید می‌شود. در گیاه تاتوره تماشایی تجمع تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها، گل‌ها و دانه‌ها دیده می‌شود (Zayed et al., 2006). بیشترین قسمت مورد استفاده این گیاه در طب سنتی، برگ‌ها و دانه‌ها هستند (مصمصام شریعت، ۱۳۸۳). دو تروپان آلکالوئید اصلی ذکر شده در این گیاه توزیع مشابهی در اندام‌ها ندارند؛ به طوری که در ساقه بیشتر اسکوپولامین و در ریشه بیشتر هیوسامین یافت می‌شود (Zayed et al., 2006).

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

(Berkov and Zayed, 2004). تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) گیاهی علفی، ایستاده، به بلندی یک متر و بعضاً بیشتر، یکساله و یا به صورت درختچه‌هایی چند ساله با ساقه بسیار منشعب است. دارای کپسول‌های تخم مرغی شکل که حدود ۳ سانتی‌متر قطر دارند و با خارهای نازک و محکمی به طول ۲-۴ میلی‌متر پوشیده شده‌اند (شایا، ۱۳۶۹). برگ‌ها متناوب، بیضی شکل، دندانه‌دار و بدبو هستند. از بغل شاخه‌ها یا در قسمت‌های انتهایی شاخه، گل‌های بزرگ قیفی شکل به رنگ سفید یا بنفش می‌روید. میوه آن به صورت کپسولی است که محتوی دانه‌های قهوه‌ای رنگی است (زمان، ۱۳۷۰). این گونه مثل سایر گونه‌های جنس تاتوره بیش از ۵۰ نوع تروپان آلکالوئید سنتز می‌کند و به همین دلیل، یکی از گیاهان دارویی ارزشمند با استفاده‌های متعدد در طب سنتی به شمار می‌رود. (Berkov and Zayed, 2004). هیوسامین یکی از تروپان آلکالوئیدهای اصلی تیره سب‌زمینی است که دارای آثار ضد کولینرژیک، ضد اسپاسم و اثر بر اعصاب پاراسمپاتیک است. اسکوپولامین نیز به علت فعالیت زیستی مشابه و بالایی که دارد، با ارزش است و البته آثار جانبی کمتری بر سیستم اعصاب مرکزی دارد و این امر بر ارزش آن می‌افزاید (Verpoorte et al., 2007). تروپان آلکالوئیدهایی نظیر هیوسامین و اسکوپولامین، از نظر ساختمانی به یکدیگر شباهت دارند و از حدواسطی مشترک که کاتیونی از N-متیل پیرولینیوم (N-methylpyrrolinium) است، مشتق می‌شوند (Berkov and Zayed, 2004). این دو آلکالوئید عمدتاً در سلول‌های

گرفت و بهترین مکمل هورمونی (با استفاده از این سه هورمون) در شرایط درون‌شیشه‌ای برای تولید کالوس‌هایی با محتوای آلکالوئیدی بالاتر مشخص شد.

مواد و روش‌ها

کشت رویان و قطعات جداگشت حاصل از آن

بذر گیاه تاتوره تماشایی از پایه‌های خودروی این گیاه در شمال غربی تهران (طول $52^{\circ} 22' 51''$ شرقی و عرض $21^{\circ} 46' 35''$ شمالی) جمع‌آوری شد. بذرها پس از جمع‌آوری در سایه و دمای اتاق خشک شدند و سپس توسط الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و آب ژاول ۲۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. رویان‌ها از بذرهاسترون جدا و برای رشد در محیط کشت B5 حاوی ۳۰٪ سوکروز و یک میلی‌گرم در لیتر GA3 کشت داده شدند (Gamborg *et al.*, 1968). شایان ذکر است که کشت بذر در همین محیط، به دلیل سختی پوسته آن موفقیت‌آمیز نبود و به همین دلیل به کشت رویان مبادرت گردید. پس از گذشت ۴ هفته از رشد، قطعات جداگشت شامل یک میان‌گره، به همراه دو جوانه جانبی از گیاهچه‌های حاصل به محیط‌های کشت B5 حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم ایندول استیک اسید (IAA) انتقال یافتند. اثر غلظت‌های دو هورمون NAA و BA به صورت متقابل نیز بررسی شد. کشت در همه تیمارهای هورمونی با سه تکرار انجام شد و پس از گذشت ۴ هفته تمامی نتایج حاصل از کشت قطعات جداگشت رشد کرده

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

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

نوری (OD) هر یک از نمونه‌ها در همین طول موج خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول خط منحنی استاندارد، مقدار آلکالوئید تام در هر نمونه بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر بافت محاسبه شد. شایان ذکر است که به منظور قابلیت انجام بررسی آماری، استخراج آلکالوئید از سه تکرار از هر نمونه به طور مجزا انجام شد.

نتایج

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

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

استخراج و سنجش آلکالوئید تام

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

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

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

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

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

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

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

کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون IAA اثر معنی‌داری بر وزن تر کالوس، وزن تر اندام‌هوایی و وزن ریشه نشان نداد (جدول ۲).

محتوای آلکالوئید تام در کالوس‌های تشکیل شده در حضور غلظت‌های مختلف هورمون NAA نسبت به شاهد

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

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

جدول ۲- اثر هورمون IAA بر تولید کالوس، ریشه‌زایی و اندام‌زایی قطعات جداگشت. حروف مشترک عدم تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (آزمون LSD با $P \leq 0.05$).

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

جدول ۳- محتوای آلکالوئید تام در کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت‌های حاوی BA و NAA. حروف نامشابه علامت وجود تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون LSD با $P \leq 0.05$).

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

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

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

بحث

در مطالعه انجام شده توسط Dessouky و همکاران (۲۰۰۱) اثر غلظت‌های مختلف ۲ و ۴-دی کلرو بنزن، کاینیتین، نفتالن استیک اسید و بنزیل آدنین در کشت تعلیقی *Datura stramonium* و *D. metel* بررسی و بهترین ترکیب هورمونی برای تولید کالوس در محیط کشت مایع MS غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BA و NAA پیشنهاد شده است. در پژوهش حاضر نیز بیشترین وزن تر کالوس در حضور ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BA و NAA به دست آمد که از نظر نوع هورمون‌های به کار رفته و نسبت آنها با نتایج فوق مطابقت دارد. البته، در این پژوهش، گونه مورد بررسی و محیط کشت به کار رفته متفاوت است که می‌تواند دلیل تفاوت غلظت هورمون‌ها در دو بررسی باشد. در مطالعه‌ای دیگر Ajungla و همکاران (۲۰۰۹) با کشت ریشه *D. metel* دریافتند که غلظت‌های مختلف IAA برای ریشه‌زایی این گیاه مناسب است، در حالی که در این مطالعه IAA اثر معنی‌داری بر ریشه‌زایی در بن اندام‌های هوایی تاتوره تماشایی نداشت. در عوض، محیط B5 فاقد هورمون، ریشه‌زایی را تحریک نمود و حضور NAA به تنهایی نیز موجب ریشه‌زایی شد. به نظر می‌رسد عدم تطابق این نتایج ناشی از تفاوت ژنوتیپ دو گونه تاتوره باشد. تشکیل کالوس‌های نیمه شفاف گیاه *D. stramonium* در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA و کاینیتین (Kin) توسط Iranbakhsh و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شد. این امر به همراه نتایج حاصل از مطالعه Dessouky

همکاران (۲۰۰۱) و نیز پژوهش حاضر پیشنهاد می‌کند که جنس تاتوره برای تولید کالوس به حضور همزمان اکسین و سایتوکینین نیاز دارد. Shirin و همکاران (۲۰۰۷) نیز محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA را به عنوان بهترین محیط برای ایجاد کالوس از قطعات جداگشت برگ سیب‌زمینی معرفی نمودند. این نتیجه احتمال تعمیم پیشنهاد فوق را به تیره سیب‌زمینی تقویت می‌کند، اما Zayed و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی بر روی اندام‌زایی و تولید آلکالوئیدها در تاتوره تماشایی از قطعات جداگشت ساقه در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA کالوس به دست آوردند. در پژوهش حاضر، اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و IAA بررسی نشده است، ولی این نتایج نیز از نظر لزوم کاربرد همزمان اکسین و سایتوکینین برای تولید کالوس با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

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

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

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

بررسی اندام‌زایی گیاه *D. stramonium* و تولید آلکالوئیدها توسط Zayed و همکاران (۲۰۰۶) در شیشه

منابع

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

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

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

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

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

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

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

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

Boitel-Conti, M., Laberche, J. C., Lanoue, A., Ducrocq, C. and Sangwan-Norreel, B. S. (2000) Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an

abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 131-137.

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

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

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

- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Iranbakhsh, A., Oshaghi, M. and Ebadi, M. (2007) Growth and Production of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(8): 1236-1242.
- Verpoorte, R., Alferman, A. W. and Johnson, T. S. (2007) Applications of plant metabolic engineering. Springer, The Netherlands.
- Shirin, F., Hossein, M., Kabir, M. F., Roy, M. and Sarker, S. R. (2007) Callus induction and plant regeneration from intermodal and leaf exolants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *World Journal of Agricultural Science* 3: 1-6.
- Zayed, R., Winkb, M. and El-Shamy, H. (2006) *In vitro* Organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia*. *Zeitschrift Naturforschung* 61: 560-564.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E. and Oksman caldentey, M. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* Hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 6786-6791.

Auxin and cytokinin effects on callus and organ production and total alkaloid contents in *Datura innoxia* calli

Elham Khataee and Farah Karimi *

Department of Biology and Medicinal Plants Research Center, Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran

Abstract

Solanaceous plant, *Datura innoxia*, has valuable tropane alkaloids pharmaceutical effects. In this study, seed zygotic embryos were cultured *in vitro* and plantlets were produced and explants with single internodes and two auxiliary buds from the produced plantlets were cultured in B5 medium with different concentrations of IAA (0.5, 1, 1.5, 2 mg/L), NAA (0.5, 1, 1.5, 2 mg/L) and BA (0.5, 1, 1.5 mg/L) to investigate the effects of the growth regulators on callus production, organogenesis and total alkaloid contents. Concentrations of the last two hormones were used reciprocally. Total alkaloid concentrations of calli were identified by UV spectrophotometer at 258 nm and callus total alkaloid contents and were compared with the content of plantlets. Results showed that, in the presence of both NAA and BA, explants formed callus and increase of NAA concentrations, in turn, increased callus weights and total alkaloid contents as well. IAA had no significant effect on callus and organ induction. Comparison of total alkaloid contents of calli with shoots and roots of *Datura innoxia* plantlets in hormone free B5 medium, showed that the alkaloid contents of calli were lower than differentiated tissues in hormone free B5 medium, but the use of NAA and BA hormones caused an increase in alkaloid contents of calli as compared with *in vitro* cultured organs.

Key words: Auxin, *Datura innoxia*, Tropane alkaloid, Cytokinin, Callus culture