اثر پوترسین بر رشد، فتوسنتز و ترکیبات آلکالوئیدی گیاه دارویی تاتوره (*Datura stramonium* L.) در پاسخ به تنش شوری تحت شرایط هیدروپونیک

مریم نیاکان[1*]، شیلا رضاپور محجوب[1] و مه لقا قربانلی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲)

چکیده

امروزه کشت گیاهان دارویی در شرایط گلخانه‌ای و استفاده از راهکارهای مناسب جهت بهبود پاسخ به تنش‌های محیطی از یک سو و افزایش رشد و ترکیبات دارویی از سوی دیگر، مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، اثر پوترسین برون‌زاد بر میزان مقاومت گیاه تاتوره به تنش شوری از طریق مطالعه پارامترهای رشد، رنگیزه‌های کلروفیل a و b، کربوهیدرات‌های محلول و ترکیبات آلکالوئیدی ریشه و اندام هوایی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای گیاه تاتوره ابتدا در مخلوط خاک و ماسه کشت شدند. بعد از گذشت ۳۵ روز، گیاهان از محیط خاک و ماسه به محلول غذایی هوگلند منتقل شدند. به محلول هوگلند، بسته به نوع تیمار، مقادیر مختلفی از نمک کلرید سدیم (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) در قالب ۱۰ تیمار به شکل مستقل و ترکیبی بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ روز، اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، طول، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و میزان کلروفیل a و b کاهش یافت. از سوی دیگر، وزن تر و خشک اندام هوایی، کلروفیل a و b و میزان کربوهیدرات‌های محلول و ترکیبات آلکالوئیدی با کاربرد پوترسین در محیط حاوی نمک روند صعودی معنی‌داری را طی نمود. این تحقیق، نقش مثبت کاربرد پوترسین برون‌زاد در بهبود شاخص‌های رشد و افزایش رنگیزه‌های کلروفیلی، قندهای محلول و ترکیبات آلکالوئیدی گیاه تاتوره در شرایط تنش شوری را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌آمین، شوری، فتوسنتز، آلکالوئید

مقدمه

تنش شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی است و خاک‌های شور اثرهای زیانباری بر بقا، تولید ماده زنده و بازده محصولات گیاهی دارند (۱۸). فرایندهایی نظیر جوانه‌زنی، رشد دانه‌رست و گیاه کامل شدیداً تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرند. شوری از طریق تنش اسمزی (کاهش آب قابل دسترس گیاه)، اثرهای سمی یون‌ها (مخصوصاً اثرهای ناشی از سدیم و کلر)، بر هم خوردن تعادل و جذب مواد مغذی ضروری، منجر به صدمه به گیاه و کاهش رشد می‌شود. افزایش شوری، بیومس ریشه، برگ و اندام هوایی را کاهش داده و متعاقب آن از طول ریشه و اندام هوایی کاسته می‌شود. بعلاوه، شوری موجب تغییرات بیوشیمیایی در سلول‌ها گشته، که کاهش توان فتوسنتزی گیاه از جمله این تغییرات می‌باشد (۲۶).

پلی‌آمین‌ها گروهی از ترکیبات آلی پلی‌کاتیونی با وزن مولکولی کم، دارای دو یا بیشتر گروه آمین می‌باشند که تقریباً در همه موجودات زنده یافت شده و شامل پوترسین (دی‌آمین)، اسپرمیدین (تری‌آمین) و اسپرمین (تترا‌آمین) می‌باشند. ماهیت پلی‌کاتیونی این مولکول‌ها در pH فیزیولوژیک از صفات مهمی است که در فعالیت‌های بیولوژیک آنها تأثیر می‌گذارد. پلی‌آمین‌ها می‌توانند نمو گیاهان، تحریک تقسیم‌سلولی، سنتز DNA و

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mnniakan@yahoo.com

پروتئین‌ها، کنترل ریشه‌زایی و جنین‌سازی و واکنش به تنش‌های محیطی (زنده و غیرزنده) نقش ایفا می‌کنند (۲۹). پلی‌آمین‌های معمولی به مولکول‌های آنیونی از جمله پروتئین‌ها، گروه فسفات اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدهای غشا و پلی‌ساکاریدهای پکتینی متصل می‌شوند. همچنین، پلی‌آمین‌ها می‌توانند در کلروپلاست پیوند کووالانس بین کمپلکس‌های پروتئینی کلروفیل و روبیسکو دراستروما ایجاد کنند. پلی‌آمین‌ها مولکول DNA را از تجزیه آنزیمی و نیز تخریب در اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در شرایط تنش محافظت می‌کنند. همچنین، این ترکیبات خاصیت بافری داشته و از تغییرات شدید pH جلوگیری می‌نمایند (۱۰).

تحقیقات نشان داده که ترکیبات پلی‌آمینی نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاهان بازی می‌کنند که به گونه گیاهی و نوع تنش بستگی دارد (۸ و ۲). تجمع پوترسین در اکثر گیاهان در واکنش به تنش‌های مختلف مانند فقدان آب (۸)، اسموزیته شدید (۲۲) اتفاق می‌افتد که افزایش فعالیت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز مسئول تجمیع این پلی‌آمین می‌باشد. بدین لحاظ، این آنزیم به عنوان آنزیم عمومی تنش و تجمع پوترسین به‌عنوان عمده‌ترین نشانه فعالیت آرژنین دکربوکسیلاز ناشی از تنش در گیاهان در نظر گرفته می‌شود (۲۲). افزایش بیوسنتز پلی‌آمین‌ها می‌تواند از گیاهان در برابر شوری به‌وسیله حذف رادیکال‌های آزاد، تثبیت غشایی و ساختارهای سلولی، ایجاد تعادل کاتیون و آنیون، تنظیم کانال‌های یونی و افزایش میزان انرژی سلول به‌وسیله تحریک سنتز ATP محافظت کند (۲۵).

گزارش شده که کاربرد پلی‌آمین‌ها به شکل اگزوژن سبب به حداقل رساندن اثر تنش بر کاهش رشد می‌شود. به‌عنوان مثال، این تنظیم‌کنندگان رشد موجب کاهش تجمع Na^+ و Cl^- در تنش شوری می‌گردند (۹). از سوی دیگر، در برخی مقالات به اثر ترکیبات پلی‌آمینی بر متابولیت‌های ثانویه نیز اشاره شده است. در این راستا، گزارش شده که پوترسین نقش یک پیش‌ساز را برای سنتز آلکالوئیدها بازی می‌کند (۱۴ و ۱۶).

گیاه تاتوره با نام علمی *Datura stramonium*، از تیره سیب‌زمینی، به‌واسطه داشتن ترکیبات آلکالوئیدی مختلف نظیر هیوسیامین، دارای خواص دارویی است. استعمال خارجی این گیاه موجب علاج زخم‌های سرطانی، سوختگی‌ها، رماتیسم‌های مفصلی، درد چشم یا پوست سر، دردهای عصبی سطحی مانند درد در ناحیه صورت، بیهوشی در جراحی‌ها و هنگام زایمان و استعمال داخلی آن ضد درد و مسکن، ضدعفونی‌کننده و مخدر، کاهنده درد کبد و دردهای دوران قاعدگی، ضد آسم، ضد تشنج، رفع نقرس و سرفه‌های عصبی است (۱).

در بررسی اثر شوری بر شاخص رشد، میزان کربوهیدرات‌های محلول و آلکالوئیدهای گیاه تاتوره در شرایط گلدانی گزارش شده که با افزایش سطح شوری، میزان وزن تر و خشک، میزان قندهای محلول و نامحلول و ترکیبات آلکالوئیدی در میوه افزایش یافت (۶). همچنین، گزارش شده که اعمال تنش شوری در کشت بافت دو رقم تاتوره، تجمع دو آلکالوئید اسکوپولامین و آتروپین را در کالوس به‌دنبال داشت (۳).

تحقیقات نشان داده که ترکیبات و مواد مؤثره گیاهان دارویی، از جمله آلکالوئیدها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه، در پاسخ به تنش‌های محیطی افزایش می‌یابند. از سوی دیگر، در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپان، یک پیش‌ساز پلی‌آمینی به نام پوترسین دخالت می‌کند (۱۲). با توجه به مطلب فوق و با عنایت به‌اینکه خواص دارویی تاتوره منوط به میزان ترکیبات آلکالوئیدی آن می‌باشد، یافتن روشی که بتواند میزان این ترکیبات را در گیاه افزایش دهد در صنایع داروسازی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر اعمال تنش‌های شوری در سطوح مختلف (تنش ملایم و شدید) به‌همراه کاربرد پوترسین برون‌زاد با توجه به نقش آن در مقاومت گیاهان به تنش از یک سو و دخالت آن

به‌عنوان پیش‌ساز در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی از طرف دیگر بر گیاه تاتوره بود. از آنجایی که مواد حاصل از فتوسنتز به‌عنوان متابولیت‌های اولیه، انرژی لازم برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تأمین می‌کنند، در این تحقیق اثر تنش‌های شوری به همراه پوترسین بر رشد، رنگیزه‌های کلروفیلی و کربوهیدرات‌های محلول (متابولیت‌های اولیه) و ترکیبات آلکالوئیدی (متابولیت‌های ثانویه) در گیاه تاتوره مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و اعمال تیمارها

بذر تاتوره (*Datura stramonium* L.) از شرکت پاکان اصفهان تهیه و در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک مزرعه و ماسه به نسبت ۲:۱ کشت داده شدند. بعد از گذشت ۳۵ روز، گیاهان از محیط خاک و ماسه به محلول غذایی هوگلند منتقل شدند. جهت اعمال تیمارهای شوری و پوترسین، نمک کلرید سدیم در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار به شکل مستقل و در ترکیب با پوترسین ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار در قالب ۹ تیمار در کنار شاهد (بدون نمک) به محیط کشت هوگلند بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی اضافه شد. سپس، گیاهان ۳۵ روزه از محیط خاک و ماسه به ظروف حاوی محیط کشت هوگلند که حاوی مقادیر مختلفی از نمک و نیز پوترسین بودند منتقل شدند. ظروف در شرایط کنترل شده شامل دمای ۲± ۲۳ درجه سلسیوس در روز، ۲±۱۸ درجه سلسیوس در شب و رطوبت نسبی ۶۰٪ قرار گرفتند. هر سه روز یکبار، محلول‌های قبلی دور ریخته شده و محلول تازه مطابق با نوع تیمار داخل ظروف ریخته و توسط پمپ هوادهی آکواریوم هوادهی شدند. پس از گذشت ۱۵ روز، اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری طول، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی

برای تعیین طول ریشه و اندام هوایی از خط‌کش استفاده شد. جهت تعیین وزن تر و خشک از ترازوی دیجیتال استفاده گردید. برای تعیین وزن‌خشک، گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در آون قرار داده شدند.

سنجش کلروفیل (a و b)

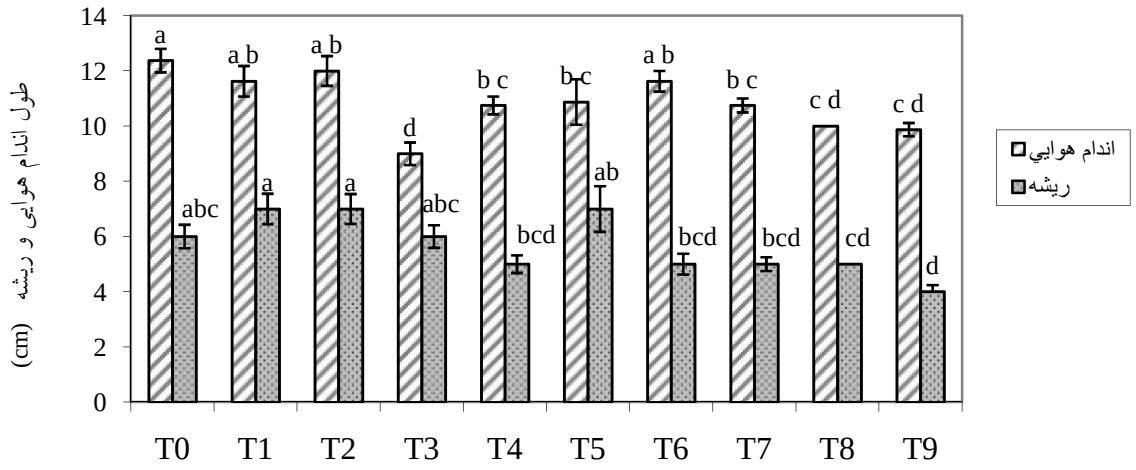
یک گرم وزن تر برگ جوان واقع در بخش فوقانی ساقه توزین و در هاون با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شد و با کاغذ صافی واتمن ۲ صاف گردید. سپس، در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر در مقابل شاهد، جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-۲۱۰۰ ساخت شرکت یونیکو آمریکا اندازه گیری گردید. مقدار کلروفیل‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (۱۹).

سنجش قندهای محلول

در ابتدا نمونه‌های گیاهی در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و وزن شدند. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به نمونه‌ها افزوده و به‌مدت یک هفته در یخچال نگه‌داری شدند. پس از گذشت زمان فوق، یک میلی‌لیتر از محلول با یک میلی‌لیترآب مخلوط و به آن یک میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد. پس از خنک شدن لوله‌های آزمایش، جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر در مقابل شاهد توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. برای یافتن غلظت قندهای محلول توسط منحنی استاندارد، از گلوکز با غلظت‌های مختلف استفاده گردید. پس از ترسیم منحنی استاندارد مقدار قند در گرم وزن خشک نمونه گیاهی محاسبه گردید (۲۰).

سنجش ترکیبات آلکالوئیدی

نمونه‌های گیاهی در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک و ۰/۱ گرم از آنها توزین شد. سپس، به نمونه‌ها ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۰٪ در اتانول اضافه و پس از ۴ ساعت مخلوط صاف گردید. در مرحله بعد، محلول داخل



شکل ۱: اثر غلظت های مختلف نمک (۰=شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی مولار) و پوتریسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی مولار) بر طول اندام هوایی و ریشه گیاه تاتوره .T0=شاهد، T1= نمک ۲۰ میلی مولار، T2=نمک ۲۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۱ میلی مولار،T3 = نمک ۲۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۵ میلی مولار، T4= نمک۴۰ میلی مولار، T5= نمک ۴۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۱ میلی مولار،T6= نمک ۴۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۵ میلی مولار، T7=نمک۶۰ میلی مولار،T8= نمک ۶۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۱ میلی مولار،T9= نمک ۶۰ میلی مولار+ پوتریسین ۰/۰۵ میلی مولار

بن ماری تا رسیدن حجم محلول به ۲/۵ میلی‌لیتر حرارت داده شد. سپس، قطره قطره هیدروکسید آمونیم غلیظ تا تشکیل رسوب اضافه شد. پس از سانتریفیوژ نمونه و دور ریختن محلول فوقانی، رسوب در اسید سولفوریک ۰/۱ مولار حل و جذب آن در طول موج ۳۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق واریانس دو عاملی و میانگین انجام گرفت. همچنین، مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ توسط برنامه آماری SPSS صورت گرفت. رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد. نمودارها نشانگر X±SE می‌باشند.

نتایج

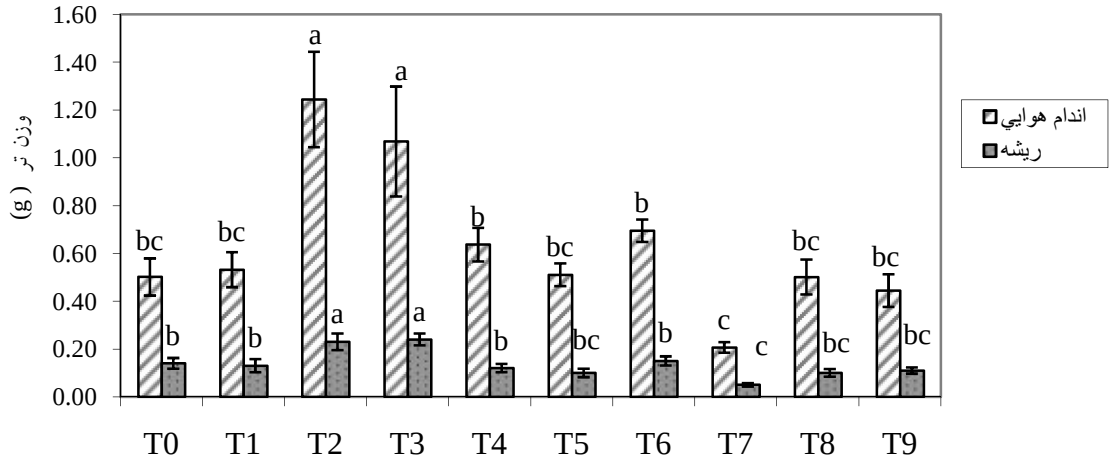
طول اندام هوایی و ریشه

بیشترین طول اندام هوایی در تیمار شاهد مشاهده شد. بین شاهد و تیمارهای نمک ۲۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۴۰ میلی‌مولار و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت؛ در حالی که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۱).

در این تحقیق، بیشترین طول ریشه در تیمار نمک ۲۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار با پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. طول ریشه در این تیمار تفاوت معنی‌داری با شاهد، نمک ۲۰ میلی‌مولار، ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۴۰ میلی‌مولار و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار نداشت (شکل ۱).

وزن تر گیاه تاتوره

در این تحقیق، بیشترین مقدار وزن تر اندام هوایی در ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار و پس از آن در تیمار ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار با پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که وزن تر گیاه بین دو تیمار ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌مولار پوترسین تفاوت معنی‌داری



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف نمک (۰= شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) بر وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه تاتوره. ستون‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. تیمارها در شکل ۱ معرفی شده‌اند.

نداشت. در حالی که اختلاف وزن تر در این دو تیمار با سایر تیمارها معنی‌دار بود. همچنین، کاهش وزن تر در بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲).

بیشترین میزان وزن تر ریشه در تیمارهای ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار با هر دو غلظت پوترسین ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. وزن تر ریشه در این دو تیمار تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. افزایش وزن تر ریشه در بین این دو تیمار با سایر تیمارها و شاهد معنی‌دار بود. همچنین، وزن تر ریشه در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

وزن خشک گیاه تاتوره

بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در ترکیب نمک ۲۰ میلی‌مولار با پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. لازم به ذکر است که مقدار وزن خشک در این تیمار با تیمار نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار و تیمارهای نمک ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳).

بیشترین مقدار وزن خشک ریشه در تیمار ترکیبی نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد. البته وزن خشک ریشه در این تیمار با تیمار ترکیبی نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. وزن خشک در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت و به کمترین میزان خود در نمک ۶۰ میلی‌مولار رسید. وزن خشک ریشه در تیمارهای ترکیبی نمک ۲۰ میلی مولار با هر دو غلظت پوترسین ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش یافت، که نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳).

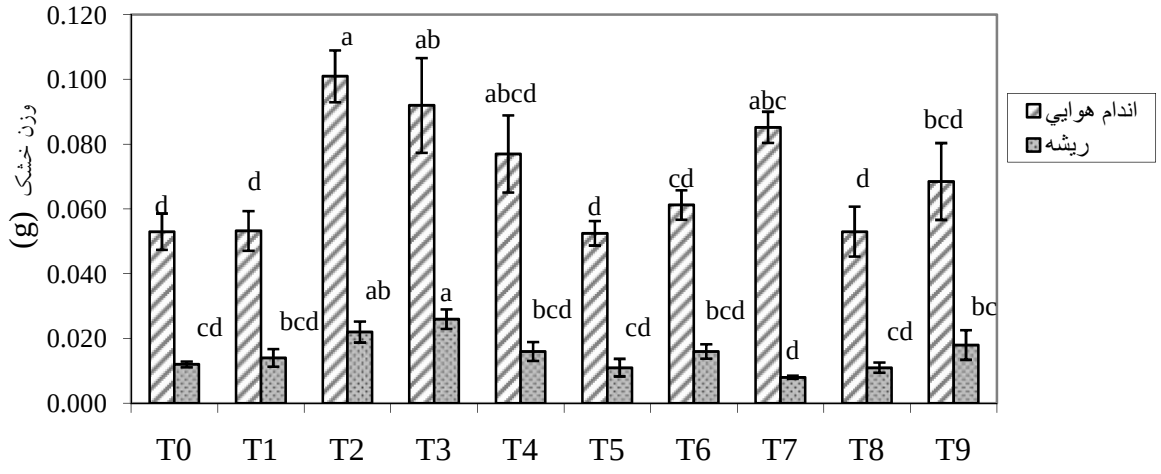
میزان کلروفیل a و b

بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار ترکیبی نمک ۲۰ میلی‌مولار با پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار بود و پس از آن به ترتیب در شاهد، نمک ۲۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار بیشترین مقدار کلروفیل a مشاهده شد. اختلاف بین این تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۴).

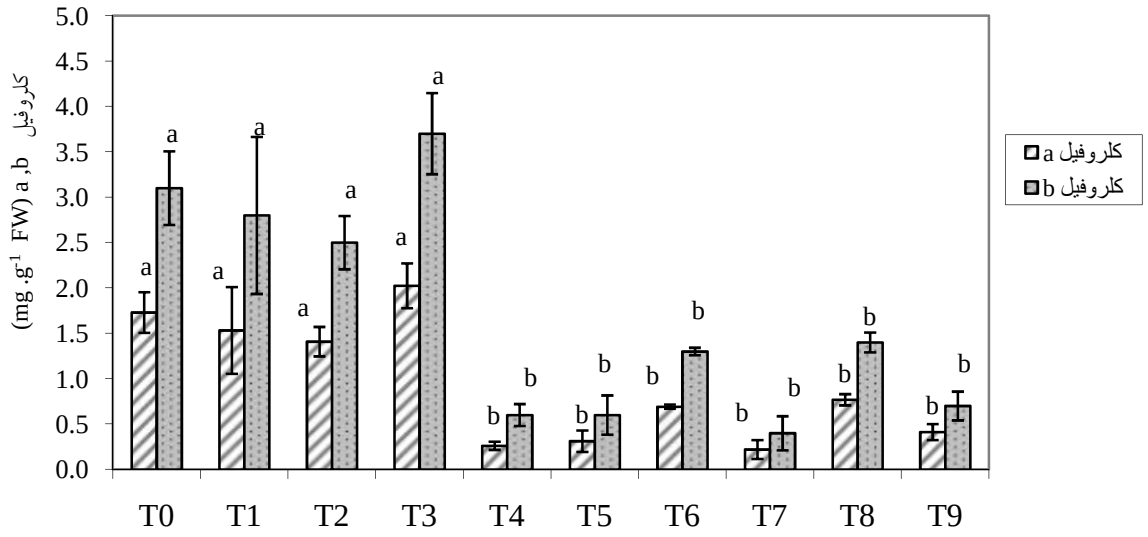
بیشترین میزان کلروفیل b در ترکیب نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار و سپس به ترتیب در شاهد، نمک ۲۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. میزان کلروفیل b در این تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری نبود، در حالی‌که نسبت به سایر تیمارها، تفاوت قابل ملاحظه و معنی‌دار بود (شکل ۴).

محتوای کربوهیدرات‌های محلول

بیشترین میزان قندهای محلول اندام هوایی در تیمار ترکیب



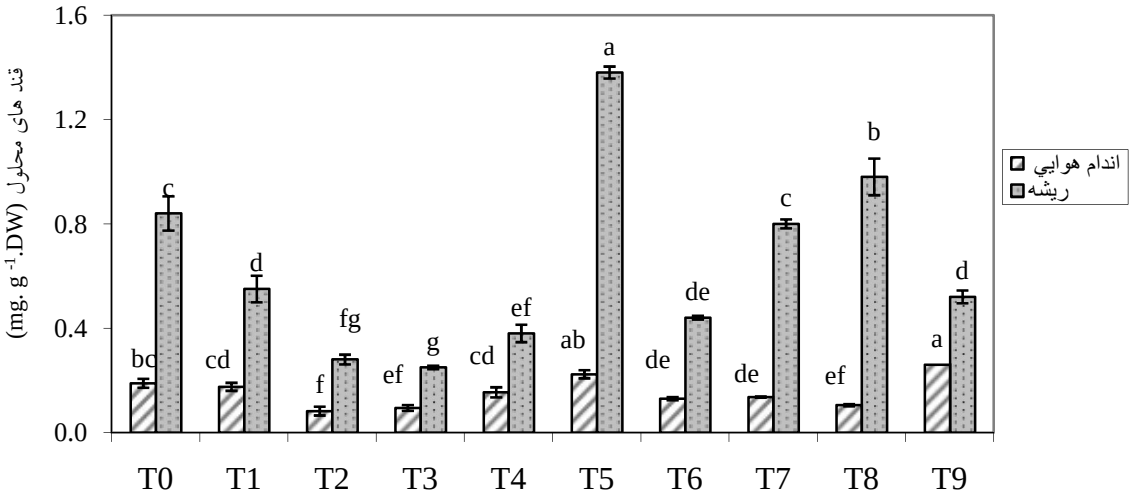
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف نمک (۰= شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه تاتوره. ستون‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. تیمارها در شکل ۱ معرفی شده‌اند.



شکل۴. اثر غلظت‌های مختلف نمک (۰= شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) بر میزان کلروفیل a و b. ستون‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. تیمارها در شکل ۱ معرفی شده‌اند.

نمک ۶۰ به همراه پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد. اختلاف میان این تیمار و سایر تیمارها معنی‌دار بود. کمترین میزان قندهای محلول نیز در تیمار ترکیب نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. در ترکیب نمک ۴۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار نسبت به تیمار نمک ۴۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۴۰ با پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار، میزان قندهای محلول افزایش یافت که این افزایش معنی‌دار بود. همچنین، میزان قندهای محلول در نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار نسبت به تیمار نمک ۶۰ میلی‌مولار و تیمار ترکیبی نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش یافت که این افزایش نیز معنی‌دار بود (شکل ۵).

در ریشه، بیشترین میزان قندهای محلول در ترکیب نمک



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف نمک (۰= شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) بر میزان قندهای محلول اندام هوایی و ریشه تاتوره. ستون‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. تیمارها در شکل ۱ معرفی شده‌اند.

۴۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. در تیمار نمک ۲۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۲۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار نسبت به شاهد،غلظت قندهای محلول کاهش معنی‌دار یافت. در تیمار نمک ۴۰ میلی مولار نسبت به ۲۰ میلی‌مولار نیز میزان قندهای محلول کاهش معنی‌داری یافت. همچنین، در ترکیب نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار نسبت به نمک ۶۰ میلی‌مولار و ترکیب نمک ۶۰ با پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری در میزان قندهای محلول مشاهده شد (شکل ۵).

محتوای ترکیبات آلکالوئیدی

در اندام هوایی تاتوره، بیشترین میزان آلکالوئیدها در ترکیب نمک ۴۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار و پس از آن در تیمار ترکیب نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد. کمترین میزان ترکیبات آلکالوئیدی نیز در تیمار ترکیب نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۶).

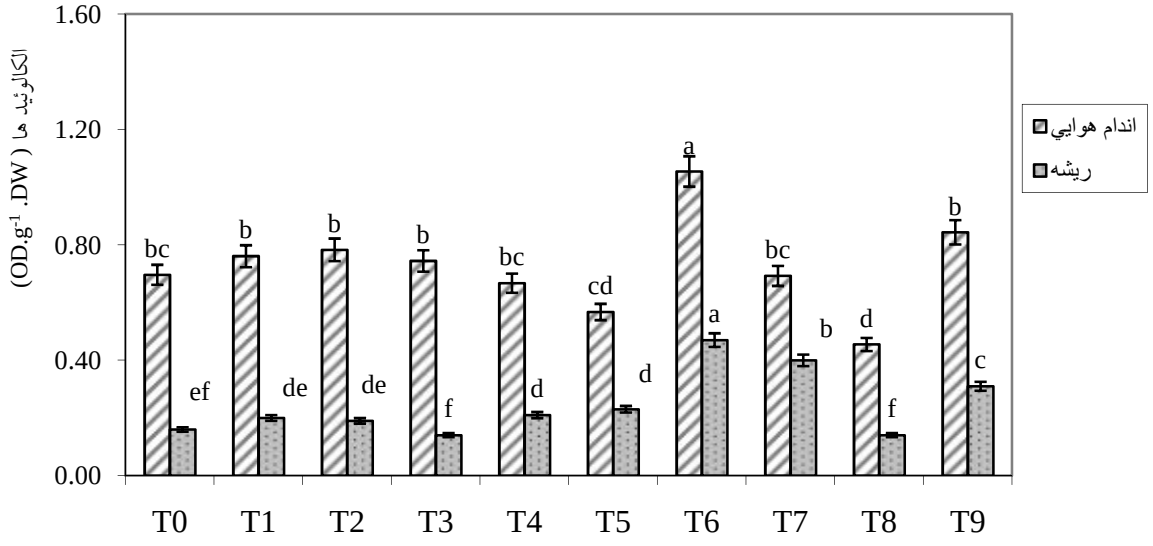
در ریشه تاتوره، بیشترین میزان آلکالوئیدها در تیمار ترکیب نمک ۴۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار، پس از آن در تیمار نمک ۶۰ میلی‌مولار و سپس در ترکیب نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد. میان این سه تیمار تفاوت معنی‌دار بود. کمترین میزان آلکالوئید در تیمار ترکیب نمک ۶۰ و پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۶).

بحث

اثر شوری و پوترسین بر شاخص‌های رشد

شوری از جمله تنش‌های محیطی است که رشد و نمو بسیاری از گیاهان حساس به نمک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اثرهای زیانبار شوری بر گیاهان ناشی از کاهش پتانسیل اسمزی خاک و ایجاد تنش آب در گیاه، عدم اعتدال یون‌ها و نامتعادل شدن جذب مواد مغذی است. در این راستا، گزارش شده که شوری با کاهش فعالیت هیدرولازهای پیوند شده به دیواره سلولی، منجر به کاهش انعطاف‌پذیری دیواره و در نهایت کاهش رشد گیاه می‌شود (۲۶ و ۲۷).

مطابق با نتایج این تحقیق، اعمال تنش‌های شوری به‌تنهایی و توأم با پوترسین بر طول اندام هوایی و ریشه گیاه تاتوره تأثیرگذار نبود. ولیکن تنش شدید شوری موجب کاهش وزن تر این گیاه شد. از سوی دیگر، کاربرد پوترسین در شوری ملایم، اثر بازدارندگی شوری بر وزن تر گیاه را بهبود بخشید و



شکل ۶. اثر غلظت‌های مختلف نمک (۰= شاهد، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار) و پوترسین (۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار) بر میزان آلکالوئیدهای ریشه و اندام هوایی تاتوره. ستون‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. تیمارها در شکل ۱ معرفی شده‌اند.

منجر به افزایش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه نسبت به شاهد و سایر تیمارها شد. در مورد وزن خشک نیز افزایشی در تنش ملایم و شدید شوری مشاهده شد و کاربرد پوترسین در کمترین مقدار خود در کنار شوری ملایم موجب افزایش پارامتر نامبرده شد.

عنوان شده که کاربرد پلی‌آمین‌های برون‌زاد می‌تواند در درجات مختلفی موجب بازگشت رشد یا کاهش مهار رشد طی تنش گردد که نشان‌دهنده تأثیر پلی‌آمین‌ها در کاهش آسیب سلولی ناشی از تنش است (۲۴). در این رابطه، نقش پوترسین در افزایش رشد گیاهان، به اثر آنتی‌اکسیداتیوی، کمک به تعادل کاتیون- آنیون و یا احتمالاً استفاده از آن به عنوان منبع نیتروژن نسبت داده می‌شود (۲۸). لیو و همکاران (۲۱) نشان دادند که کاربرد پلی-آمین‌های اگزوژن موجب به حداقل رسانیدن کاهش رشد در شرایط تنش می‌شود. ال- لتی و همکاران (۱۱) نیز به افزایش وزن تر و خشک گیاه کتان تیمار شده با پوترسین اشاره کرده‌اند.

اثر شوری و پوترسین برفتوسنتز

فتوسنتز یکی از اصلی‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی برای تولید مواد غذایی و رشد در گیاهان است که به مقادیر زیاد نمک بسیار حساس می‌باشد. عنوان شده که شوری منجر به تغییراتی در فراساختار کلروپلاست می‌گردد. از سوی دیگر، کاهش محتوای کلروفیلی برگ‌ها در غلظت‌های زیاد نمک ممکن است به ایجاد از هم‌گسیختگی در فعالیت‌های سلولی، تخریب غشا و صدمه به زنجیره انتقال الکترون در فتوسیستم‌ها مربوط باشد که این وقایع به‌دلیل تجمع یون‌ها و بی‌ثباتی و سست شدن اتصال پروتئین به رنگیزه، به علت افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز، صورت می‌گیرد (۲۳). در این راستا، طبق نتایج حاصله، میزان کلروفیل a و b در گیاه دارویی تاتوره نیز با افزایش شدت شوری، کاهش معنی‌داری یافت که می‌توان عوامل فوق را در این کاهش دخیل دانست.

همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد که در تنش شوری متوسط (۴۰ میلی مولار)، با افزودن پوترسین در بالاترین غلظت کاربردی (یعنی ۰/۰۵ میلی‌مولار)، میزان کلروفیل a و b نسبت به تیمار نمک ۴۰ میلی‌مولار افزایش یافت. یونال و همکاران (۳۱) مستنداتی را ارائه دادند که نشان می‌دهد پلی‌آمین‌ها نقش محافظت از کلروفیل و پروتئین را بر عهده

داشته و با کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها سبب ثبات در غشا می‌شوند. همچنین، گزارش شده که استعمال پوترسین برون‌زاد در گیاه Periwinkle، کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها را افزایش داد، که تأثیر پوترسین با غلظت ۰/۰۱ مولار در مقایسه با سایر مقادیر بیشتر بود (۲۸). به‌نظر می‌رسد در این پژوهش نیز پوترسین با نقش آنتی‌اکسیدانی خود موجب ثبات غشای تیلاکوئیدی وحفظ پروتئین‌ها و لیپیدهای آن در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری گشت که نتیجه آن به شکل حفظ کلروفیل a و b از صدمات ناشی از تنش مشاهده شد. از سوی دیگر، از آنجایی‌که تنش شوری با افزایش فعالیت کلروفیلاز موجب کاهش رنگیزه‌های کلروفیل a و b می‌گردد، شاید بتوان اثر حفاظتی ترکیبات پلی‌آمینی نظیر پوترسین را به کاهش فعالیت این آنزیم نیز نسبت داد که این مورد نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در اندام هوایی، تنها در تنش شدید شوری، میزان قندهای محلول نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت. در حالی که در ریشه، در حضور مقدار زیاد نمک، مقدار کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با سایر تیمارهای تنش شوری (ملایم و متوسط) افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت؛ تا حدی که میزان آن به مقدار شاهد رسید.

گزارش شده که مجموع کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان با افزایش شوری افزایش می‌یابد (۲۲). در شرایط تنش، ساکارز و پس از آن فروکتوز از جمله فراوان‌ترین قندهای محلول محسوب می‌شوند. ساکارز به عنوان محافظ اسمزی، نقش مهمی در سازگاری دارد و از غشاء سلولی محافظت و فشار تورگور را حفظ نموده و از آنجا که به‌آسانی به قندهای احیاکننده تبدیل می‌شود، به‌عنوان یک منبع انرژی فوری به‌کار می‌رود (۱۷). در گزارشی نیز اعلام شده که شوری، افزایش قندهای نامحلول را در میوه‌های تاتوره القا می‌کند. در حالی که محتوای قندهای محلول کاهش می‌یابد (۶).

در این تحقیق، به‌نظر می‌رسد کاهش قندهای محلول در اندام هوایی گیاه تاتوره در تنش شدید شوری مربوط به اثر تخریبی تنش بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی فتوسنتز نظیر روبیسکو و یا انتقال آنها از اندام هوایی به ریشه باشد که مورد دوم احتمال بیشتری دارد زیرا در ریشه میزان این ترکیبات در تنش شدید افزایش یافت.

همچنین، مطابق با نتایج به‌دست آمده، افزودن پوترسین، به‌ویژه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار، افزایش قندهای محلول در اندام هوایی و در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار، ازدیاد این ترکیبات را در ریشه به‌دنبال داشت. گزارش شده که کاربرد برون‌زاد پلی‌آمین‌ها، بخصوص اسپرمیدین، در حفظ فتوسنتز بسیار مؤثر است و موجب تثبیت pH جهت فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت کربوکسیلازی روبیسکو می‌شود (۳۱ و ۳۲). در این تحقیق نیز به‌نظر می‌رسد که افزودن پوترسین موجب حفظ آنزیم‌های کلیدی فتوسنتز از صدمات ناشی از نمک و افزایش تولید قندهای محلول در اندام هوایی گشت.

اثر شوری و پوترسین بر میزان آلکالوئیدها

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری تغییرات معنی داری در محتوای آلکالوئیدی اندام هوایی ایجاد نکرد، در حالی که در ریشه گیاه، تنش شوری منجر به افزایش محتوای آلکالوئیدی گشت، به‌طوری که در تیمار نمک ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار این افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار بود.

در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان آلکالوئیدها بر دو گیاه دارویی *Hyosyamus muticus* و *Datura stramonium* نشان داده شد که افزایش شوری، میزان آلکالوئیدها را در این دو گیاه افزود (۵). علی (۶) اظهار داشت که میزان آلکالوئیدها در میوه‌های تاتوره، با افزایش شوری تا ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش می‌یابد و افزایش شوری بیش از این میزان، از مقدار آلکالوئیدها می‌کاهد. در این راستا، اعلام شده که اورنیتین پیش‌ساز آلکالوئیدهای تروپان می‌باشد و اورنیتین و پرولین هر دو پیش‌ساز مشترکی به نام گلوتامیک اسید دارند. شوری می‌تواند از واکنش‌های

ترانس‌آمیناسیون جلوگیری نموده و موجب تجمع اسید گلوتامیک در سلول گردد، که آن نیز می‌تواند سایر ترکیبات نیتروژن‌دار نظیر اورنیتین را تولید نماید. اورنیتین نیز در نهایت قادر است به آلکالوئیدهای تروپان تبدیل گردد (۴). همچنین، مطابق با نتایج به‌دست آمده، افزودن پوترسین در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار به محیط کشت حاوی ۴۰ میلی‌مولار نمک (تنش متوسط) موجب افزایش معنی‌دار و قابل ملاحظه محتوای آلکالوئیدها، هم در ریشه و هم در اندام هوایی گیاه تاتوره، شد.

پلی‌آمین‌ها اغلب به‌عنوان پیش‌سازهای چندین گروه از آلکالوئیدها به‌خدمت گرفته می‌شوند (۱۴ و ۱۶). تحقیقات نشان داده که در گیاه تاتوره، ترکیبات پلی‌آمینی در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان دارای اهمیت می‌باشند (۲). تیمار دانه‌های *Atropa belladonna* با پوترسین ۰/۰۱ میلی‌مولار می‌تواند اثرهای مضر شوری بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌ها را تخفیف داده و منجر به افزایش آلکالوئیدها شود (۷). مطالعات بیوشیمیایی نشان داده که آنزیم پوترسین N- متیل‌ترانسفراز، متیلاسیون دی‌آمین‌پوترسین را کاتالیز می‌کند. سوبسترای اصلی این آنزیم پوترسین و سوبستراهای فرعی آن موادی مانند S- آدنوزیل‌متیونین (SAM) و S- آدنوزیل‌متیونین دکربوکسیله هستند. فرآورده حاصل از فعالیت این آنزیم ماده N- متیل‌پوترسین است که اولین متابولیت اختصاصی در مسیر سنتز آلکالوئیدهای نیکوتین، تروپان و نورتروپان به‌شمار می‌آید (۱۳).

بر اساس نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با آن که میزان آلکالوئیدها در اندام هوایی گیاه تاتوره نسبت به ریشه بیشتر است، ولیکن تجمع آلکالوئیدها در ریشه گیاه نسبت به اندام هوایی حساسیت بیشتری را نسبت به شوری نشان داده است و کاربرد پوترسین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار در شوری متوسط (۴۰ میلی‌مولار) در جهت افزایش میزان آلکالوئید، هم در ریشه و هم در اندام هوایی، سودمند بوده است.

سپاسگزاری

از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، به‌ویژه سرکار خانم‌ها دکتر الهه کیایی و ملیحه رسایی، مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقات و ژنتیک از بابت همکاری در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. امیدبیگی، ر. ۱۳۷۹. رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. طراحان نشر، ۳۴۵ صفحه.

2. Abdel Rahman, R., S.E. Gomaa, N. Abdelsalam, H. El-Din, M.F. El-Wakil, A.S. Khaled and H.M. Hassan. 2013. Effect of sodium chloride on tropane alkaloids accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 1(2): 197-210.
3. Ahmed, A. and E. Leete. 1970. Biosynthesis of tropine moiety of Hyoscyamine from δ-N methylornithine. Phytochem. 9: 2345-2347.
4. Ahmed, A.M., M.D. Heikal and R.M. Ali. 1988. Changes in amino acids and alkaloid contents in *Hyoscyamus maticus* and *Datura stramonium* in response to salinization. Phyton. 29:137-147.
5. Ali, R.M. 1991. Changes in chemical composition of fruits of salinized *Datura stramonium*. J. Islamic Acad. Sci. 4(4): 289-292.
6. Ali, R.M. 2000. Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. Plant Sci. 152: 173-179
7. Analía, I., H.S. Diego, F. Alejandro, F.T. Antonio, A. Ruben, C. Juan and A. Teresa. 2011. Homeostatic control of polyamine levels under long-term salt stress in Arabidopsis. Plant Signal. Behavior 6(2): 237-242.

8. Capell, T., L. Bassie and P. Christou. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proc. of the National Academy of Sciences of the USA, 101: 9909-9914.
9. Del Duca, S., V. Tidu, R. Bassi, C. Esposito and D. Serafani Fracassini. 1994. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. Planta 193: 283-289.
10. El-Lethy, S., H. Ayad and I. Talaat. 2010. Physiological effect of some antioxidant on flax plant (*Linum usitatissimum* L.). World J. Agric. Sci. 6(5): 622-629.
11. Evans, W.C. and J.F. Lampard. 1972. Alkaloids of *Datura suaveolens*. Phytochem. 11(11): 3293-3298.
12. Flores, H.E. and A.W. Galston. 2011. Polyamines and plant stress: Activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. Sci. 24(217): 1259-1261.
13. Flores, H.E., C.M. Protacio and M. Signs. 1989. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. PP. 329-393. *In:* Poulton, J.E., J.T. Romeo and E.E. Conn (Eds.), Plant Nitrogen Metabolism, Plenum Press, New York.
14. Foster, S.A. and D.R. Walters. 1991. Polyamine concentrations and arginine decarboxylase activity in wheat exposed to osmotic stress. Plant Physiol. 82: 185-190.
15. Harborne, J.B. 1973. Phytochemical methods. *In:* Harborne, J.B. (Ed.), A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, London.
16. Hashimoto, T. and Y. Yamada.1994. Alkaloid biogenesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 257-285.
17. Hepaksoy, S. 2004. Effect of salinity on some fruit quality attributes and sugar composition of *Satsuma mandarin* cv. Owari. Asian J. Plant Sci. 3(6): 660-665.
18. Hilal, M., A.M. Zennof, G. Ponessa, H. Moreno and E. Massa. 1998. Salinity stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. Plant Physiol. 117(2): 695-701.
19. Jenson, A. 1978. Chlorophyll and carotenoid. PP. 147-158. *In:* Hellebust, J.A. and J.S. Craigie (Eds.), Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods, Cambridge Univ. Press.
20. Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by phenol sulfuric acid method. PP. 56-97. *In:* Hellebust, J.A. and J.S. Craigie (Eds.), Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods, Cambridge Univ. Press.
21. Liu, J.H., H. Kitashiba, J. Wang, Y. Ban and T. Moriguchi. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnol. 24: 117-126.
22. Liu, J.H., K. Nada, C. Honda, H. Kitashiba, X.P. Wen, X.M. Pang and T. Moriguchi. 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: Importance of arginine decarboxylase pathway in stress response. J. Exp. Bot. 57: 2589-2599.
23. Mane, A.V., B.A. Karadge and J.S. Samant. 2010. Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. J. Chem. Pharm. Res. 2(3): 338-347.
24. Marco, F., R. Alcazar, A.F. Tiburcio and P. Carasco. 2011. Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses .OMICS 15(11): 775-781.
25. Rothe, G., A. Hachiya, Y. Yamada, T. Hashimoto and B. Drager. 2003. Alkaloides in plants and root cultures of *Atropa belladonna* over expressing putrescine N- methyltransferase. J. Exp. Bot. 54(390): 2065-2070.
26. Seiler, N. and F. Raul. 2005. Polyamines and apoptosis. J. Cell. Mol. Med. 9: 623-642.
27. Singh, A. and R. Prasad. 2009. Salt stress effects growth and cell wall bound enzymes in *Arachis hypogaea* L. seedlings. Int. J. Integ. Biol. 7(2): 117-123.
28. Talaat, I.M., M.A. Bekheta and M.H. Mahgoub. 2005. Physiological response of periwinkle plants

(*Catharanthus roseus* L.) to trypophan and putrescine. Int. J. Agric. Biol. 7(2): 210-213.

29. Tang, W. and J.R. Newton. 2005. Polyamines reduced salt induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. Plant Growth Regul. 46: 31-43.
30. Tassoni, A., M. van Buuren, M. Franceschetti, S. Fornale and N. Bagni. 2003. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. Plant Physiol. Biochem. 38: 383-393.
31. Unal, D., I. Tuney and A. Sukatar. 2007. The role of external polyamines on photosynthetic responses, lipid peroxidation, protein and chlorophyll a content under the UV-A (352 nm) stress in *Physica semipinnata*. J. Photochem. Phytobiol. 90: 64-68.
32. Wang, T., S. Wang, Sh. Guo and Y. Sun. 2008. Effect of exogenous spermidine on the photosynthesis of *Cucumis sativus* L. seedlings under rhizosphere hypoxia stress. Agric. China 2(1): 55-60.