

اثر تغذیه نیتروژنی بر رشد، تولید برخی متابولیت‌های اولیه و ثانویه و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus pusillus L.*)

پیمان رجایی^۱، ندا محمدی^۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۴

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

بنگدانه (*Hyoscyamus pusillus L.*) یکی از گیاهان دارویی است که غنی از آلکالوئیدهای تروپان می‌باشد. در این تحقیق تأثیر نیترات و آمونیوم بر متابولیت ثانویه و سایر پارامترهای فیزیولوژیک، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد در شرایطی که هر دو یون نیترات و آمونیوم در محلول غذایی گیاه وجود داشته باشد به نحوی که غلظت آمونیوم پایین تر از نیترات باشد افزایش وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه مشاهده می‌شود. اما با افزایش غلظت آمونیوم از رشد گیاه و پارامترهای ذکر شده کاسته می‌شود. نسبت ریشه به بخش هوایی و مقدار کربوهیدراتهای محلول در بخش هوایی و ریشه با بالا رفتن غلظت آمونیوم به طور معنی داری کاهش می‌یابد. اما مقدار کلروفیل و محتوای پروتئین در هر دو بخش هوایی و ریشه افزایش نشان داد. در سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز مشخص شد که وجود آمونیوم در غلظت‌های پایین به همراه نیترات فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهد اما با بالا رفتن غلظت آمونیوم فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار آلکالوئیدهای تروپان در شرایطی حاصل شد که هر دو یون در محلول غذایی وجود داشت و غلظت آمونیوم کمتر از نیترات بود.

واژه‌های کلیدی: آمونیوم، نیترات، بنگدانه، آلکالوئید

۱. مربی گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان ppeyman 17@ yahoo.com

۲. دانشجوی دکتری علوم گیاهی-عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان

مقدمه

نیترژن یکی از مهم ترین فاکتورهای محدود کننده برای رشد گیاه محسوب می شود و گیاهان سازوکارهای متعددی برای افزایش کارایی نیترژن دارا هستند (Fernandes and Rossiello, 1995). گونه های گیاهی از نظر حساسیت به نوع تغذیه نیترژنی متنوع اند. به طور کلی نیترات به عنوان منبع اصلی برای تغذیه گیاهان در نظر گرفته می شود. (Barker, 1980). با در نظر گرفتن احتمال تجمع بالای نیترات در برگ ها و سمیت نیترات برای سلامت انسان و سایر جانداران، کودهای آمونیومی می توانند در شرایط خاصی به عنوان منبع تغذیه نیترژنی مطلوب در نظر گرفته شوند (Gangolli, 1994). اشکال عمده تغذیه آمونیومی در این است که آمونیوم به عنوان تنها منبع تغذیه ای می تواند برای رشد بسیاری گونه های گیاهی سمی باشد (Krogmann and Jagendorf, 1959). جذب یون آمونیوم باعث شارش یون های هیدروژن از ریشه ها شده که اسیدیته ریزوسفر را بالا می برد و همچنین آمونیوم یک قطع کننده مسیر فسفریلاسیون نوری محسوب می شود و تجمع آن می تواند از طریق کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گردد (Krogmann and Jagendorf, 1959). رشد بهینه بیشتر گونه ها مربوط به شرایطی است که هر دو فرم نیترات و آمونیوم در محیط موجود می باشد. یکی از عوامل کلیدی در تغذیه نیترژنی، آنزیم نیترات ردوکتاز می باشد که به عنوان یک عامل محدود کننده رشد، نمو و تولید پروتئین در گیاهان محسوب می شود. این آنزیم به شدت تحت تأثیر

شرایط محیطی قرار دارد. بخش بندی آن بین ریشه و اندام هوایی بسته به گونه گیاه، سن و فاکتورهای محیطی متغیر است. در بیشتر گیاهان علفی مانند بنگدانه احیاء نیترات در برگها صورت می گیرد درحالیکه در گونه های چوبی احیاء نیترات در ریشه ها انجام می گیرد (Botella et al., 1993). سهم ریشه و اندام هوایی در احیاء نیترات در یک گیاه کامل به اندازه نسبی آن اندام، سن بافت و در کل توانایی ریشه در انتقال نیترات به اندام هوایی بستگی دارد (Carelli and Fahl, 2005). در شرایطی که از نیترات به عنوان منبع تغذیه نیترژنی استفاده شود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می یابد. در مورد آمونیوم، محققان معتقد به دخالت یک مرحله تنظیمی در رابطه با فعالیت آنزیم می باشند. ثابت شده است که آمونیوم در تره، *lemnaceae* و جلبکهای های *Neurospora* و *Chlorella* باعث بازدارندگی فعالیت نیترات ردوکتاز می شود. اما در بیشتر گیاهان عالی این ترکیب یا تأثیری در فعالیت آنزیم ندارد یا باعث افزایش آن می گردد (Sym, 1984).

از طرفی بنگدانه گیاهی علفی و متعلق به خانواده سیب زمینی می باشد که به دلیل وجود تروپان آلکالوئیدها (هیوسیامین و اسکوپولامین) دارای مصارف دارویی است (زرگری، ۱۶۶۶). مطالعه با استفاده از کشت بافت گیاه نشان داده است که تروپان آلکالوئیدها در ریشه بنگدانه سنتز و به اندام هوایی منتقل می شوند (Ulrich, 1992). اسکوپولامین یا هیوسین اولین بار در سال ۱۸۸۱ از

مواد و روش ها

بذرهای گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus pusillus* L) از بخش رایین در استان کرمان جمع آوری شد. بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد به مدت ۴ دقیقه ضد عفونی گردیدند و به منظور جوانه زنی درون پتری دیش های محتوای کاغذ صافی مرطوب و ضد عفونی شده قرار داده شدند. دانه رسته های یکنواخت انتخاب شده و به گلدان های حاوی ماسه منتقل گردید. در هر گلدان ۴ گیاهچه قرار داده شد. گلدان ها تحت شرایط نوری (۱۶:۸) (تاریکی/ نور) و متوسط دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

دانه رست ها به مدت ۲۱ روز از مرحله ۵ برگی تحت تیمار قرار گرفتند. گیاهان شاهد با محلول غذایی هوگلند (Hogland and Arnon, 1960) حاوی ۱۵ میلی مول نیتروژن به صورت نیترات پتاسیم (KNO_3) تغذیه شدند. در سایر تیمارها به ترتیب ۱۰ میلی مول نیترات توام با ۵ میلی مول آمونیوم (بصورت $(NH_4)_2SO_4$) (تیمار ۱)، ۷/۵ میلی مول نیترات توام با ۷/۵ میلی مول آمونیوم (تیمار ۲)، ۵ میلی مول نیترات توام با ۱۰ میلی مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی مول آمونیوم (تیمار ۴) به کار برده شد. در طول تیمار دهی سه روز یکبار گلدانها با محلول غذایی مورد نظر آبیاری و برای جلوگیری از انباشته شدن یونهای اضافی هنگام آبیاری نیمی از محلول مورد استفاده از ته گلدانها خارج شد و در فواصل تیمار دهی گلدانها با آب مقطر آبیاری و سطح خاک با استفاده از آب فشان مرطوب نگه داشته شد.

گیاه *Scopolia atropides* و *Hyoscyamus*

muticus جدا شد (Hashimoto and Youn, 1993). مسیر سنتز متابولیت های ثانویه به فاکتورهای متعددی بستگی دارد که از همه مهمتر شرایط تغذیه ای می باشد. زمانیکه سطح تغذیه گیاه تغییر کند یک سری مکانیزم های دفاعی القا میشوند. کورتیس و دانولوپ نشان دادند که solavetivone تولید شده در تارکشنده *Hyoscyamus muticus* به شکل سینرژیسیم با کاهش فسفات کاهش می یابد. در تحقیق انجام شده توسط آمودون و همکاران تاثیر سه عنصر نیترات، فسفات و کلسیم بر تجمع هیوسیامین در گیاه داتوره مورد آزمایش قرار گرفت و در این آزمایش نیترات عنصر تاثیر گذارتری بر رشد و تولید آلکالوئید بود (Amdoun, 2009). از آنجا که بسیاری از آلکالوئیدها فرآورده های فرعی و بی اهمیت متابولیسم نیتروژن هستند و از طرفی در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپان یک پیش ساز پلی آمینی به نام پوترسین دخالت دارد، غلظت و نوع نیتروژن مصرفی و همچنین نسبت کربن/ نیتروژن در محیط تغذیه گیاه تأثیر عمده ای در سنتز آلکالوئیدها خواهد داشت (Evans and Lampard, 1972).

از آنجا که آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژنی محیطی تأثیر متفاوتی روی رشد و پارامترهای فیزیولوژیکی چون مقدار قند و پروتئین و کلروفیل و آنزیم نیترات ردوکتاز داشته و از طرف دیگر به علت نقش آن ها در سنتز آلکالوئیدها، این مطالعه به بررسی غلظت های نیترات و آمونیوم بر رشد گیاه و مقدار آلکالوئیدها پرداخته است.

Lowry et al., (آلبومین گاوی) استفاده شد (1951). غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد.

اندازه گیری کلروفیل b و a: بر اساس روش Arnon ۰/۲ گرم بافت تازه برگ را با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی سائیده سپس محلول حاصل توسط کاغذ صافی واتمن ۱ صاف گردید. حجم محلول با استون به ۲۰ میلی لیتر رسانده و جذب محلول حاصل در طول موج های ۶۶۳ و ۶۴۵ با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu, Kyoto, UV-۰۲، ۱۲۰ خوانده شد (Arnon, 1949). نتایج به دست آمده بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه ارائه شد.

$$a_{663} - 0.00269A_{645} = \text{Chl. a (غلظت کلروفیل a)}$$

$$b_{663} - 0.00468A_{645} = \text{Chl. b (غلظت کلروفیل b)}$$

$$\text{Chl. Tot} = \text{غلظت کلروفیل کل سنجش}$$

$$0.0202A_{645} + 0.00802A_{663}$$

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز: سنجش آنزیم با روش Sym (۱۹۸۴) صورت گرفت (۰/۲ درصد گرم ماده تر بخش هوایی وزن شد. نمونه های گیاهی در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محلولی که غلظت نیترات پتانسیم در آن ۱۵۰ میلی مولار، پروپانول ۰/۳ درصد و تامپون فسفات ۱۰۰ میلی مولار باشد، قرار داده شد. لوله ها در آون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند سپس محلول صاف گردید. ۲ میلی لیتر از محلول بالا برداشته، ۱ میلی لیتر گریس I (۰/۵ گرم اسید سولفانلیک در ۵۰ میلی لیتر اسید استیک حل و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) و گریس II (۰/۲ گرم آلفا نفتیل آمین در ۵۰ درصد میلی لیتر اسید

pH محلول غذایی در حدود ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. مجموعاً ۵ تیمار غذایی با ۴ تکرار در نظر گرفته شد. -آنالیز شد: هنگام شروع تیمارها ۴ گیاه انتخاب و ریشه آن ها توسط آب مقطر شستشو داده شد. پس از خشک کردن آب سطحی ریشه ها وزن تر ریشه و بخش هوایی اندازه گیری شد و در آون در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک گردیدند (W1). ۲۱ روز پس از اعمال تیمارها از هر تیمار ۴ گیاه به عنوان ۴ تکرار مجدداً وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی (W2) و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی (R/S) اندازه گیری شد.

اندازه گیری قند محلول: مقدار قند های احیاء کننده مطابق روش Somogy-Nelson اندازه گیری شد. (Somogi, 1952) در این روش ۱/ گرم بافت خشک برگ را با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر سائیده بعد از افزودن محلول سولفات مس و اسید مولیبدیک، شدت جذب محلولها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز بر حسب mg/lit محاسبه شد.

اندازه گیری مقدار پروتئین: مقدار پروتئین در برگ و ریشه با استفاده از روش Lowry (۱۹۵۱) اندازه گیری شد. در این روش ۰/۰۲ گرم ماده خشک از ریشه و بخش هوایی وزن و به هر یک با فر تریس اسید کلریدریک با pH=۸ اضافه گردید. بعد از سانتیفریوژ، فاز رویی به عنوان عصاره پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله، از محلول واکنش لوری و محلول فولن استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت پروتئین ها از منحنی استاندارد

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری طبق طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار صورت گرفت. بررسی های آماری طبق آنالیز واریانس یک طرفه آزمون LSD توسط نرم افزار SPSS 11.5 در سه سطح معنی داری ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ انجام شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCELL صورت گرفت.

نتایج

وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه تحت تاثیر غلظت های بالای آمونیوم کاهش یافت، که این کاهش در تیمارهای ۳ و ۴ در سطح $P < 0/01$ معنی دار بود. در غلظت های پایین آمونیوم در گیاهان در تیمار ۱ پارامترهای فوق افزایش یافت اما این افزایش معنی دار نبود. نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی (R/S) در غلظت های بالای آمونیوم کاهش یافت که این کاهش در تیمار ۲، ۳ و ۴ در سطح $P < 0/01$ معنی دار بود (نمودارهای ۱، ۲، ۳).

با بالا رفتن نسبت آمونیوم به نیترات غلظت قند در برگ گیاه کاهش یافت که این کاهش در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ در سطح $P < 0/01$ معنی دار بود. اما قند ریشه در مقایسه با برگ به میزان کمتری در کلیه تیمارها کاهش یافت (نمودار ۴).

مقایسه پروتئین در برگ گیاه بنگدانه نشان داد که مقدار پروتئین در غلظت های بالاتر آمونیوم افزایش یافت و این افزایش در کلیه تیمارها در سطح $P < 0/01$ معنی دار بود. محتوای پروتئین ریشه نیز الگوی افزایشی مشابهی با پروتئین برگ نشان داد (نمودار ۵).

استیک حل و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) به آن اضافه و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای یافتن غلظت نیتريت حاصل از احیاء نیترات تحت تأثیر آنزیم نیترات ردوکتاز (C) از غلظت های متفاوت نیتريت سدیم برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش کمی آکالوئیدها: این اندازه گیری با استفاده از روش Torrsell & Mulrin به نقل از یعقوب آئینه چی (۱۳۵۸) انجام شد. ۳ گرم پودر گیاهی را در ظرف در بسته ای با ۵cc آمونیاک ۲۵ درصد خیسانده و به آن ۲۰ میلی لیتر اتانول افزوده شد. سپس عصاره اتانولی خارج و تغلیظ شد عصاره باقیمانده در HCl ۲ نرمال حل شد. عصاره اسیدی با همان حجم اترنفت در قیف جداکننده شستشو داده شد (فاز زیرین حاوی آکالوئید است). محلول اسیدی را داخل آب و یخ گذاشته و توسط آمونیاک ۲۵ درصد قلیایی شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر اتانول افزوده شد. محلول قلیایی به قیف جداکننده منتقل و ۳-۴ بار با هم حجم خود توسط کلروفرم شستشو داده شد. سپس با سدیم سولفات انهیدرید آبگیری و از صافی گذرانده شد. پس از تبخیر عصاره کلروفرمی ماده به جا مانده در بشر در سه میلی لیتر اتانول مطلق حل شد و با دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید. ماکزیمم طول موج محلول استاندارد اسکوپولامین در اتانول ۲۱۸ نانومتر و برای محلول استاندارد آتروپین در اتانول ۲۱۰ نانومتر بود.

های گیاه می‌شود. استناد اکثر دانشمندان بر این است که سمیت ناشی از تجمع این یون می‌تواند تأثیر باز دارنده ای روی مراحل فتوسنتز و به تبع آن رشد و تولید بیوماس داشته باشد (Crawford, 1995). نتایج این تحقیق در راستای مطالعه Lasa و همکاران در سال ۲۰۰۱ روی سه گیاه اسفناج، آفتابگردان و نخود می‌باشد در تحقیق اخیر تولید ماده خشک گیاه بطور معنی‌دار در تغذیه آمونیومی نسبت به تغذیه نیتراتی کاهش می‌یابد و این کاهش به ترتیب در اسفناج، آفتابگردان و نخود ۸۶ درصد ۴۵ درصد و ۱۳ درصد بوده است (۲۱).

از آنجا که در تیمار نیتراتی قندهای موجود در بخش هوایی جهت تثبیت نترات بکار رفته و قندهای ریشه صرف رشد ریشه می‌شوند در نتیجه نسبت وزن بخش هوایی به ریشه کاهش می‌یابد ولی در تغذیه با آمونیاک کربوهیدرات‌های موجود در ریشه جهت تثبیت آمونیاک به کار می‌روند و در نتیجه رشد ریشه نسبت به بخش هوایی کاهش می‌یابد (Aslam, 1996).

Cramer در سال ۱۹۹۳ با آزمایش روی گیاه گندم و ذرت مشاهده کرد که تغذیه آمونیاکی در گیاه ذرت تفاوت معنی‌داری در نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی (R/S) ایجاد نمی‌کند که در تقابل با نتایج به دست آمده از این تحقیق است علت آن به این دلیل است که ذرت یک گیاه C₄ است و با فراهم کردن اسکلت کربنی در ریشه، اثر آمونیوم را بر رشد به حداقل می‌رساند (Cramer and Lewis, 1993). اما در گندم که یک گیاه C₃ می‌باشد، نسبت R/S در تغذیه آمونیاکی بالاتر از تغذیه

غلظت‌های بالاتر آمونیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل a و b نسبت به تیمار شاهد شد که این افزایش در تیمارهای ۳ و ۴ معنی‌دار بوده است. نتایج مربوط به کلروفیل کل بیانگر آن است که با افزایش غلظت آمونیوم میزان کلروفیل کل بالا رفته و این افزایش در کلیه تیمارها معنی‌دار بود (نمودار ۶).

فعالیت آنزیم نترات ردوکتاز در تیمار ۱ افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نسبت به شاهد نشان می‌دهد. در حالی که در سایر تیمارها با کاهش فعالیت آنزیم مواجه هستیم که این کاهش در تیمار ۳ و ۴ در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (نمودار ۷).

غلظت آلکالوئید هیوسامین در تیمار ۱ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نشان می‌دهد اما در سایر تیمارها مقدار هیوسامین کاهش می‌یابد و این کاهش در تیمارهای ۳ و ۴ در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (نمودار ۸).

نتایج و بحث

نتایج اثر غلظت‌های مختلف نترات و آمونیوم بر پارامترهای رشد نشان می‌دهد که کاربرد آمونیوم به عنوان تنها منبع تغذیه نیتروژنی منجر به کاهش رشد شده و بیشترین مقدار رشد مربوط به زمانی است که هر دو فرم نیتروژن در محیط تغذیه ای موجود باشد. در اغلب موارد بازدارندگی رشد ناشی از تغذیه آمونیاکی را مربوط به افت pH خاک میدانند که در اثر جذب آمونیوم ایجاد می‌شود (Alan, 1989). بررسی‌های مختلف نشان داده است که اغلب گیاهان قادر به همانندسازی کل آمونیوم جذب شده نیستند و این امر منجر به تجمع یون مزبور در بافت-

جذب و تثبیت آمونیاک نسبت به نیترات با سرعت بیشتر و صرف انرژی کمتر انجام می شود. آمونیاک با ورود به چرخه فعالیت گلوتامین سنتتاز و گلوتامات سنتتاز و تولید گلوتامات که پیش ساز آمینولولینیک اسید می باشد خیلی سریع میزان کلروفیل را بالا می برد (Harborne and Dey, 1997). این نتیجه در برگ گیاه کلزا هم ثابت شده است (Ulrich, 1992). کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی تحت تیمار آمونیومی در آزمایش انجام شده توسط Harborn و همکاران در سال ۱۹۹۷ و Ulrich در سال ۱۹۹۱ ثابت شده است. نتایج حاصل از این آزمایش نیز این نتیجه را تأیید می کند. از طرف دیگر تغذیه آمونیومی باعث کاهش سطح برگ می شود. کاهش سطح برگ منجر به پایین آمدن میزان فتوسنتز خالص شده و در نتیجه گیاه با افزایش محتوای کلروفیل برگها در غلظت های بالاتر آمونیوم مانع از کاهش فتوسنتز می شود (Mojerowicz et al., 2000).

طی تحقیقات متعدد نقش نیترات در القاء سنتز نیترات ردوکتاز (اولین آنزیم در مسیر تثبیت نیترات) ثابت شده است اما در ارتباط با نقش آمونیوم بر فعالیت این آنزیم نظرات متفاوتی ابراز شده است. نتایج Ponnachit و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. این محققین با بررسی فعالیت نیترات ردوکتاز در بافت ریشه گیاه *Vaccinum* نشان دادند در شرایطی که از نیترات به عنوان منبع تغذیه نیتروژنی استفاده شود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می یابد (Poonacchita, 2004). نتایج Botella و همکاران

نیتراتی بوده است و این نشان دهنده آن است که آمونیوم تأثیر سمی بیشتری بر ریشه اعمال کرده است (Lewis, 1989).

از آنجا که در گیاهان از نیتراتی نسبت به ازت آمونیاکی با سرعت کمتری جذب و تثبیت می شود و در نتیجه کربوهیدرات کمتری در گیاه کاهش می یابد (۳۲). غلظت های بالای آمونیوم در بخش هوایی باعث کاهش کربوهیدرات ها می شود (Crame and Lewis, 1993) و به همین دلیل در دسترس بودن اسکلت کربنی برای جلوگیری از سمیت آمونیوم ضروری است انتقال نیتروژن آمینی از گلوتامین به کتواسیدها نیازمند وجود انرژی و اسکلت کربنی است (Mojerowicz et al., 2000).

نتایج حاصل از بررسی تغذیه نیتروژنی روی پروتئین ها نشان داد که در گیاهان کشت شده در محیط آمونیومی، اسیدهای آمینه و آمیدها در ریشه (از آمونیوم) تولید شده و سپس به برگها انتقال می یابند (Baranein et al., 1996). آمونیوم جذب شده به سرعت به وسیله گلوتامین سنتتاز و گلوتامات سنتتاز به گلوتامین و گلوتامات تبدیل می شود در نتیجه نسبت به تغذیه نیتراتی مقدار بیشتری اسید آمینه آزاد در بافتهای گیاه تولید خواهد شد (Baranein et al., 1996). بررسی Lasa و همکارانش در سال ۲۰۰۱ روی سه گونه اسفناج، نخود و آفتابگردان در راستای این تحقیق بوده و نشان داد که افزایش پروتئین های محلول در تیمار آمونیاکی، در اسفناج ۵۰ درصد و در نخود و آفتابگردان ۲۰ درصد بیش از تیمار نیتراتی بوده است (Lasa et al., 2001).

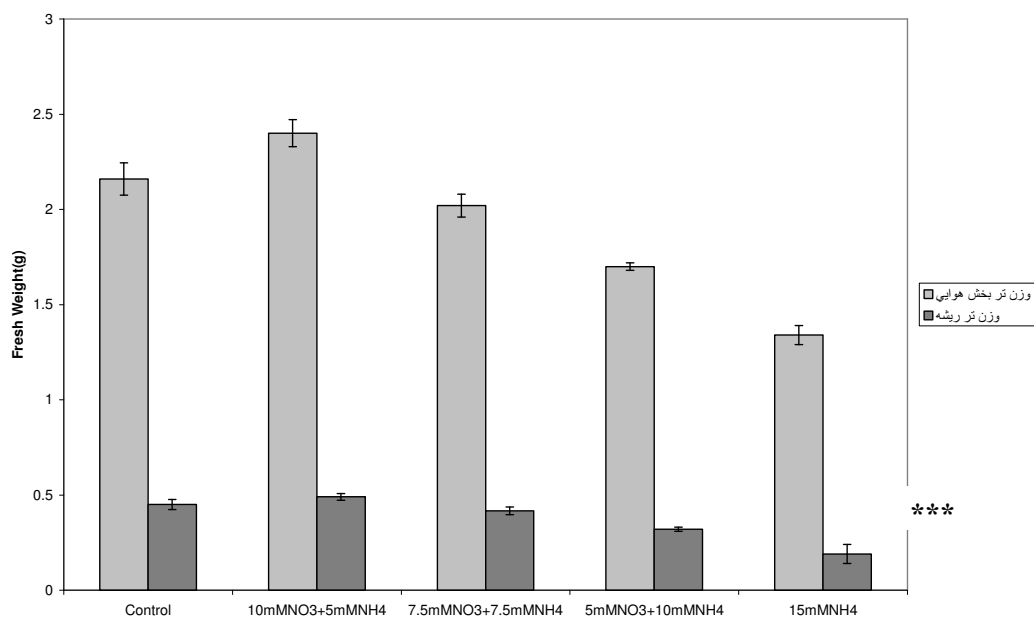
اضافه کردن آمونیوم در القاء و سنتز پروتئین نیترات ردوکتاز تأثیر دارد.

در این آزمایش افزایش غلظت آمونیوم در مقایسه با کنترل بدون اینکه روی نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین تأثیر داشته باشد محتوای آلکالوئید را کاهش داد و بیشترین مقدار آلکالوئید مربوط به زمانی بود که هر دو فرم نیتروژن در محیط وجود داشت. غلظت بهینه نیترات ۱۰ mM و غلظت بهینه آمونیوم ۵ mM برای بیشترین میزان رشد و تولید آلکالوئید برگ تعیین شد. غلظت نیتروژن و نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت روی سنتز آلکالوئیدها تأثیر می گذارد (Payne et al., 1984). نتایج Bensaddek و همکارانش در سال ۲۰۰۱ روی گیاه *Atropa belladonna* نشان داد که در تیمار نیتراتی ریشه و تار کشنده (محل بیوسنتز آلکالوئیدها) رشد بیشتری دارند و این مسأله روی محتوای آلکالوئید هم تأثیر گذار است (Benshaddac et al., 2001). افزایش نیتروژن به صورت نیترات در خاک منجر به افزایش این یون در گیاه می شود که خود عاملی است برای تولید بیشتر تروپان آلکالوئیدها در گیاه سالم (Barker and Mills, 1980). در آزمایش انجام شده به وسیله Amdoun و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر گیاه داتوره مشخص شد که در شرایط تغذیه بهینه نیتراتی رشد تار کشنده بیشتر بوده و باعث می شود گیاه به سمت مسیر دیگر متابولیسمی و تولید آلکالوئید برود (Amdoun, 2009). این نتیجه با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در آزمایش دیگری که به وسیله Oksman-Caldentey در

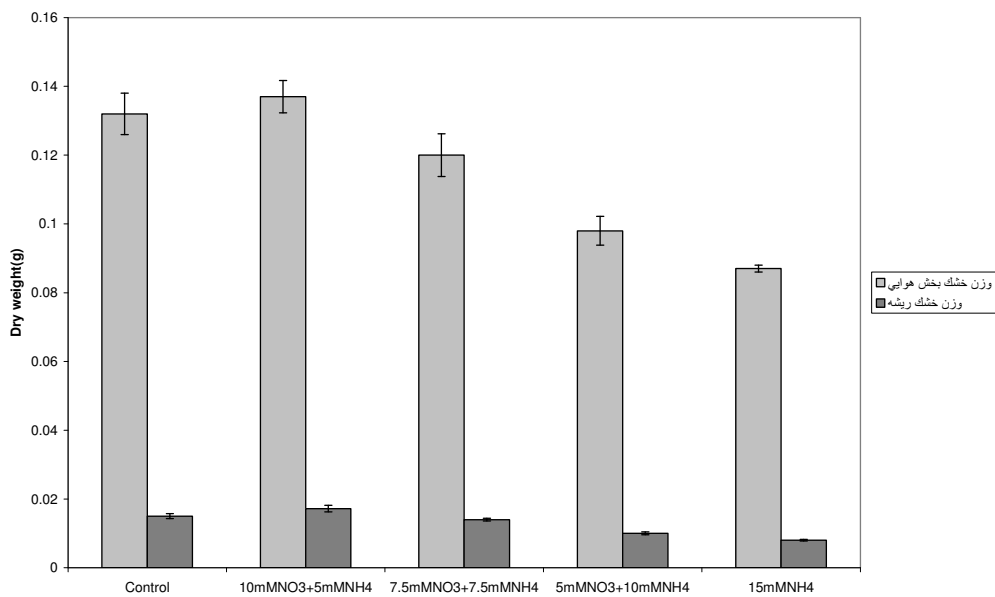
در سال ۱۹۹۳ روی گیاه گندم دال بر این بود که بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به شرایطی است که محلول غذایی واجد نیترات به تنهایی و نه آمونیوم باشد. این تحقیق نشان می دهد که آمونیوم تأثیر بازدارنده بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز دارد (Botella et al., 1993) که در تقابل با نتایج تحقیق حاضر است. در آزمایش Lewis در سال ۱۹۸۹ روی گیاه جو، حضور آمونیوم منجر به افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز شد. در این آزمایش میزان رشد و فعالیت نیترات ردوکتاز در گیاهان منتقل شده به محیط کشت حاوی آمونیوم و نیترات بیشتر از گیاهانی بود که در محیط فاقد آمونیوم رشد یافته بودند (Lowry et al., 1951). در این بررسی نتیجه ای مشابه این آزمایش حاصل شد و حضور غلظت کم آمونیوم منجر به افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز شد. تأثیر تحریکی آمونیوم بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز احتمالاً در نتیجه افزایش سنتز آن است تا اثر بر روی خود آنزیم (Lowry et al., 1951). شایان ذکر است که مکانیزم توجیه سنتز آنزیم نیترات ردوکتاز توسط آمونیوم مختص گیاهان عالی می باشد و در مورد قارچها و جلبکها صدق نمی کند. در آزمایش دیگری که روی تأثیر آمونیوم بر القاء پروتئین نیترات ردوکتاز (NRP) انجام گرفت معلوم شد که در حضور ۵ میلی مول آمونیوم، یک باند پروتئینی ظاهر شد اما هیچ فعالیتی در آنزیم نیترات ردوکتاز دیده نشد. هنگامی که به محیط غذایی نیترات پتاسیم اضافه شد، پروتئین نیترات ردوکتاز فعال گردید (Oak and Valerie, 1982). نتایج حاصل از آزمایش فوق نشان داد که

نامناسب بودن آمونیوم تنها تغییر pH محیط کشت تا کمتر از ۵ توضیح داده شده است و این افت pH عامل محدود کننده استفاده از نیتروژن بوده. باید توجه داشت که بین سلولهای بافتهای گونه های گیاهی مختلف در توانایی استفاده از نیتروژن تفاوت وجود دارد. به عنوان مثال غلظت بهینه در تارهای کشنده *D. stramonium*، ۲۰mM و بوده است در حالیکه محیط کشت سلولی گیاه *Holarrhena antidysenterica* برای تجمع conessine به ۶۰mM نیتروژن نیاز دارد (Oksman-Caldentey, 1994).

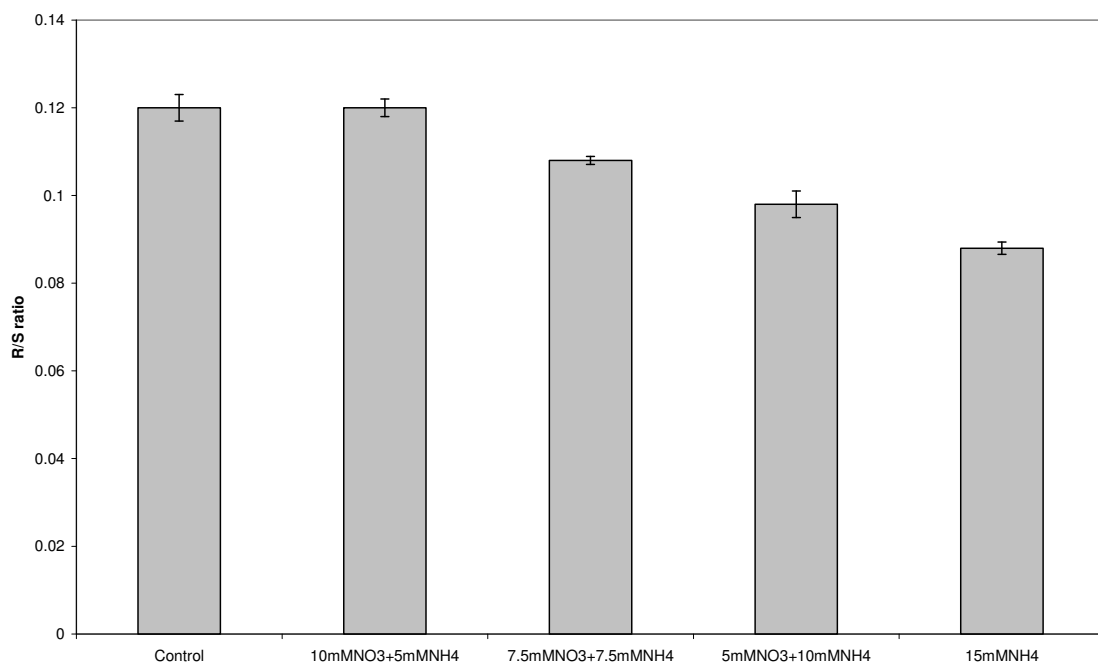
سال ۱۹۹۴ بر روی *Hyoscyamus muticus* انجام شد مشخص شد، در شرایطی که غلظت نهایی نیتروژن بیش از ۱۰ mM شود، رشد گیاه و تولید هیوسیامین زیاد خواهد شد اما به تدریج با افزایش غلظت نیتروژن تا ۷۵ mM، رشد همچنان افزایش اما تولید هیوسیامین کاهش نشان خواهد داد (Oksman-Caldentey, 1994). در این آزمایش مشابه آنچه در تحقیق حاضر نشان داده شد، ریشه های *Hyoscyamus muticus* قادر به استفاده از آمونیوم به عنوان تنها منبع تغذیه نیتروژنی نبودند و نسبت نیترات به آمونیوم تاثیر مهمی در رشد و تولید هیوسیامین داشت. بهینه غلظت آمونیوم در این آزمایش ۲mM گزارش شده است. دلیل



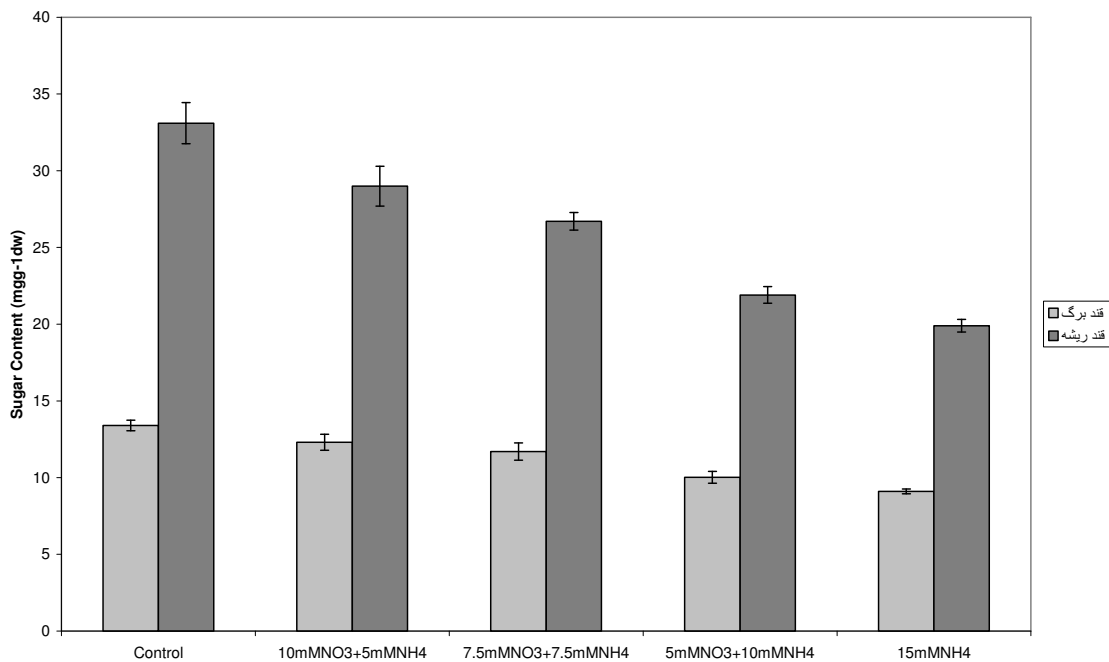
شکل ۱. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن تر بخش هوایی و ریشه (g)



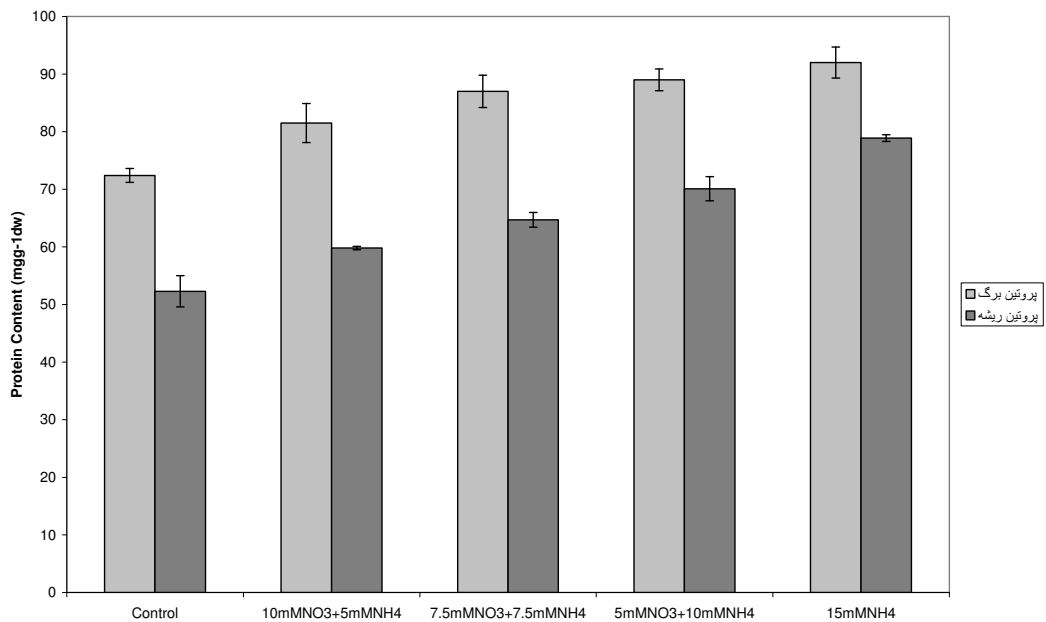
شکل ۲. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه (g)



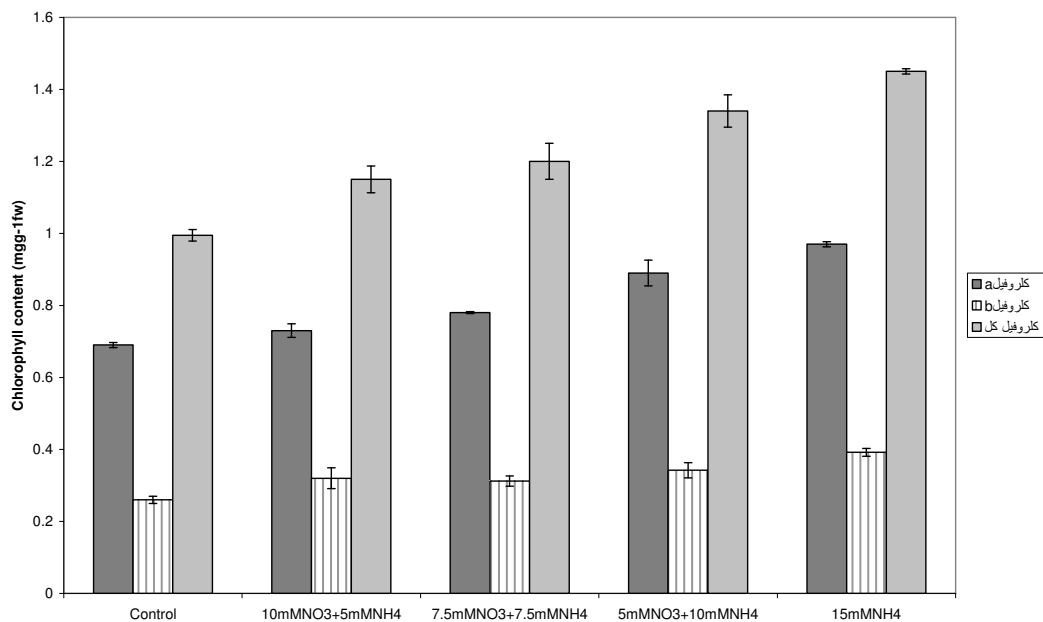
شکل ۳. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر نسبت ریشه به بخش هوایی



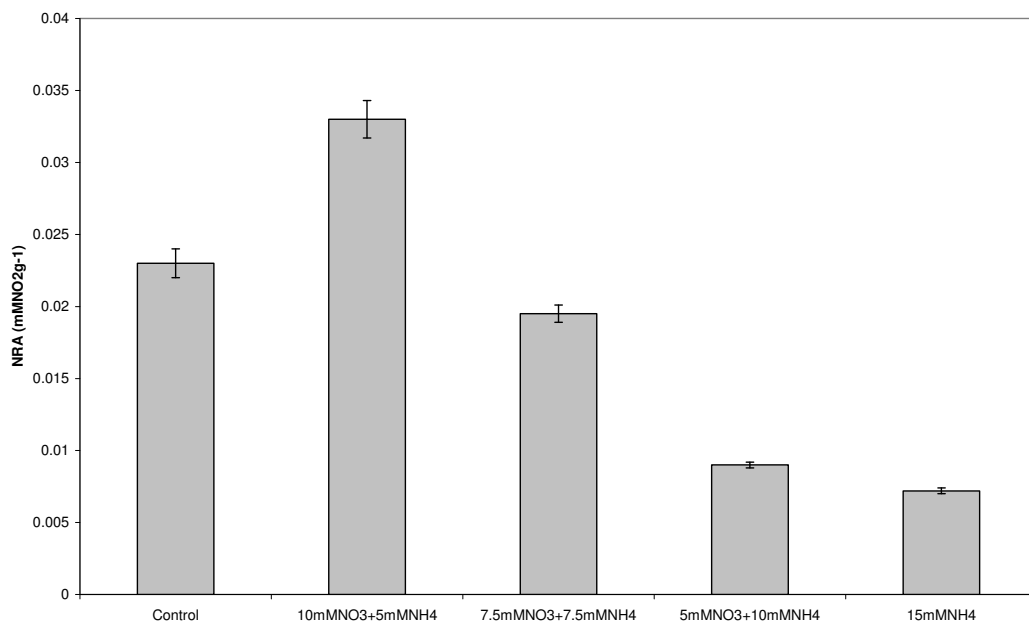
شکل ۴. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر مقدار قند (mgg⁻¹dw)



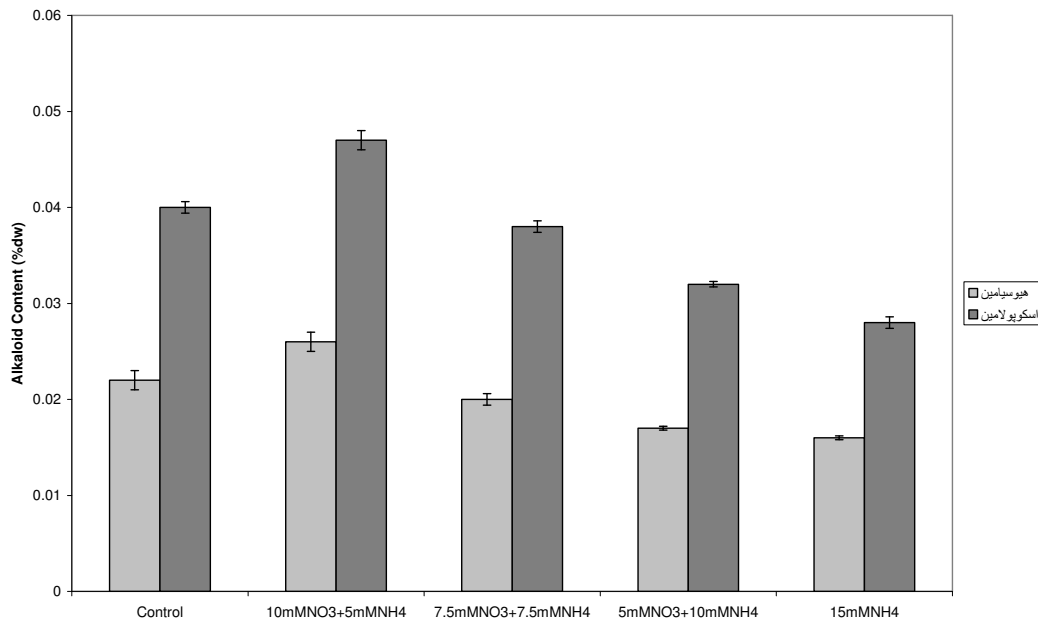
شکل ۵. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر مقدار پروتئین (mgg⁻¹dw)



شکل ۶. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر محتوای کلروفیل (mgg⁻¹fw)



شکل ۷. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان فعالیت نیترات ردوکتاز (mMNO₂g⁻¹)



شکل ۸. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان آلکالوئیدهای برگ (%dw).

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$

منابع

- production: Modelization of the in vitro biochemical response. *Plant sci* 177:81-87
- Arnon D.I.(1949)copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiol.*24:1-15.
- Aslam M.(1996)Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport system in roots of intact barley seedlings. *Planta*. 200:58-63
- Baranein A.J; Causin H.F.(1996)The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth.*J.Plant physiol.*149:358-362.
- آئینه چی، یعقوب، (۱۳۵۸). "روشهای نوین تجزیه شیمیایی گیاهان". انتشارات دانشگاه تهران ۲۳۵-۲۴۵.
- زرگری، علی، (۱۳۶۶). گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران ۵۴۶-۵۸۰.
- Alan R.(1989)The effect of nitrogen nutrition on growth chemical composition and response of cucumbers (*Cucumber sativus* L.) to nitrogen forms in solution culture. *J. Hort. Sci.* 64:467-474.
- Amdoun R.(2009) Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid

- Barker A.V; Mills H. A. (1980) Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. Hort. Rev. 2:395-423.
- Benshaddac L; Gillet F; Saucedo J; Fliniaux M. (2001) The effect of nitrate and ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology. 85:35-40.
- Botella M; Cruze C; Martins M; Cerda A. (1993) Nitrate reductase activity in wheat seedlings of affected by NO_3/NH_4 ratio and salinity. J. plant phys. 142:531-536.
- Carelli M. L.C; Fahl J. I. (2005) Partitioning of nitrate reductase activity and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. Environ. Exp. Bot. 120:65-72.
- Cramer M.D; Lewis O. A. M. (1993) Influence of nitrate and ammonium nutrition on growth of wheat and maize plant. Annal of Botany. 72:359-365.
- Crawford N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant cell. 7:859-868.
- Evans W; Lampard J. (1972) Alkaloids of *Datura suaveolens*. Phytochemistry. 11:3293-3298.
- Fernandes M.S; Rossiello R. O. P. (1995) Mineral nutrition in plant physiology and plant nutrition. Critical Reviews in Plant. Sci. 14: 111-148.
- Gangolli S.D; Van Den Brandt P.A. (1994) Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Eur. J. Pharm. Environ. Section 292:1-38.
- Harborne J; Dey P. M. (1997) Plant biochemistry academic press. New York .chapter.7.283-286.
- Hashimoto T; Youn D. (1993) Production of tropane alkaloid in genetically engineered root culture. Phytochemistry. 32:713-718.
- Hogland D.R; Arnon D.I. (1960) The water culture for growing plant without soil. Univ of California. Agri. Exptn. Cir. 374:52-60.
- Krogmann D.W; Jagendorf A. T. (1959) Uncouples of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. Plant Physiol. 34:272-277.
- Lasa B; Frechilla S; Lamsfus C; Aparicio-Tego P. M. (2001) The sensitivity of ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. Scientia Horticultur. 91:143-152.
- Lewis O.A.M; Leidi E.O; Lips S. H. (1989) Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. Phytologist. 11:115-160.
- Lowry O.H; Rosebrough N.J; Farr A.L; Randall R. G. (1951) Protein measurement with the phenol reagent. J. Biochem. 193:265-273.
- Oksman-Caldentey K; Sev6n N. (1994) Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism

- of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell issue and Organ Culture 38: 263-272.
- Mojerowicz N; Kerbauy G.B; Nievola C.C; Suzuki R.M.(2000)Growth and nitrogen metabolism of *catasetum fimbriatum (Orchidacea)*growth with different nitrogen source. Trends. Plant. Sci. 23:453-460.
- Oak A; Valerie M.(1982)The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. Plant. Physiol. 88:1067-1072.
- Payne J; Hamill J.D; Rodes J. C. (1984) Production of hyoscyamin by hairy root culture of *Datura stramonium*. Planta. Medica. 53:474-478.
- Poonacchita U; Darnell R. (2004) Effect of ammonium and nitrate of chellate reductase and nitrate reductase in *vaccinium* species. Annual of Botany. 93:399-405.
- Somogi M.(1952)Notes on sugar determination. J. Biol. chem. 195: 19-29.
- Sym G.D.(1984)Optimization of the in vivo assay condition for nitrate reductase in barley(*Hordeum vulgare* L.). J. sci. food Agric. 35:725-730.
- Ulrich W.R.(1992)Inorganic nitrogen in plants and microorganism uptake and metabolism. Springer. New York. 21:81-93.