



دانشگاه علوم کشاورزی
و منابع طبیعی ساری

12th Iranian Horticultural Science Congress
September 05-08 2021
۱۴ لغایت ۱۷ شهریورماه ۱۴۰۰

همینکست کمره علوم
دوازی



مطالعه متابولیت های کالوس بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus Niger L.*) تحت تیمار کیتوزان توسط

دستگاه کروماتوگرافی طیف سنج جرمی

روح اله نیک فکر^۱، راضیه بیگلری فراش^{۲*}

۱- هیئت علمی دانشگاه پیام نور واحد یاسوج

۲- دانشجوی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی ساری

نویسنده مسئول: razibiglari65@gmail.com



نتایج و بحث

جدول ۱) ترکیبات مربوط به پیک های بارز حاصل از GC/MS عصاره ی کالوس های تیمار شده با کیتوزان

ردیف	نام ترکیب	نوع ترکیب	ویژگی	کاربرد
1	4کلرو 2متیل فنوکسی استیک اسید	اسید	مایع شفاف و بی رنگ با بوی تند و سوزاننده	علف کش انتخابی علف های هرز
2	بنزالدهید	آلئید معطر(بنزن)	مایع شفاف و بی رنگ تا زرد با بوی تلخ بادام	عطر و طعم دهی به غذاها، لوازم آرایشی، صنعت پلاستیک، رنگهای آکریدین
3	4 کلرو 2 متیل فنول	فنل	کریستال سفید رنگ	حشره کش، علف کش، رنگ، دارو
4	هگزا دکانونیک اسید (پالمیتیک اسید)	استر اسید چرب	مایع روغنی	از ترکیبات روغن و اسانس
5	متوکسی تری متیل سیلان	سیلان	مایع بی رنگ	ابگریز نمودن سطوح و مواد
6	هیدروکسی متیل فورفورال	الدهید حلقوی	جامد بی رنگ و حلالیت زیاد در آب	به عنوان شاخص واکنش میلارد

جداول زیر غلظت های ثابت را در تمام بازه های زمانی و تاثیر آن بر تغییر ترکیبات در مقایسه با شاهد مورد بررسی قرار داده است.

جدول ۲) مقایسه تغییرات ترکیبات ناشی از تیمار ۵۰ میلی مولار محرک کیتوزان در بازه زمانی صفر تا ۷۲ ساعت

R.T.	material	Area %			
		Sample 0 24	Sample 50 24	Sample 50 48	Sample 50 72
2	Benzaldehyde Phenylmeth	11.41	-	-	-
6	Phenol, 2,4-dichloro	-	5.55	8.83	-
8	Phenol, 4-chloro-2-methyl	-	7.38	10.31	-
9	Acetic acid, (4-chloro-2-methylp	18.67	12.18	11.64	6.98
15	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis	5.74	5.47	-	-
19	Chlorpyrifos \$\$ Dursban	-	35.89	-	64.55
21	Hexadecanoic acid, ethyl ester	5.69	-	-	-
24	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	-	-	-	6.40
27	1H-Benzimidazole, 2-(4-thiazolyl	8.87	-	-	-
28	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	8.90	9.84	11.61	-

جدول ۳) مقایسه تغییرات ترکیبات ناشی از تیمار ۱۰۰ میلی مولار محرک کیتوزان در بازه زمانی صفر تا ۷۲ ساعت

R.T.	material	Area %			
		Sample 0 48	Sample 100 24	Sample 100 48	Sample 100 72
1	Methoxy(n-pentyloxy)methylsilane	-	9.54	5.00	-
7	Phenol, 2,4-dichloro	-	7.35	6.90	11.58
9	Phenol, 2,4-dichloro	-	6.45	8.49	-
10	5-Hydroxymethylfurfural	-	7.59	7.29	-
12	Phenol, 4-chloro-2-methyl	6.46	11.33	12.16	-
15	Acetic acid, (4-chloro-2-methylp	20.99	11.42	11.13	15.90
22	Hexadecanoic acid, ethyl ester	5.28	5.83	-	-
33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	-	8.52	-	15.20

جدول ۴) مقایسه تغییرات ترکیبات ناشی از تیمار ۱۵۰ میلی مولار محرک کیتوزان در بازه زمانی صفر تا ۷۲ ساعت

R.T.	material	Area %			
		Sample 0 72	Sample 150 24	Sample 150 48	Sample 150 72
1	4,5-Dihydrooxazole-5-one, 4-chloro	-	21.12	-	-
7	Phenol, 4-chloro-2-methyl	-	8.89	14.14	14.43
9	Acetic acid, (4-chloro-2-methyl	26.34	13.33	23.38	-
14	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis	10.49	5.64	-	6.44
17	Chlorpyrifos \$\$ Dursban	-	11.70	-	-
27	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	18.08	13.30	15.82	20.36
16	Hexadecanoic acid, ethyl ester	7.22	-	6.36	5.37
3	Carbonic acid, allyl isobutyl ester	-	-	5.48	-

منابع

- امیدیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات آستان قدس رضوی. چاپ چهارم. ۷۸۳ صفحه
- اسمعیل زاده بهابادی، ص.، شریفی، م. ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت های ثانوی گیاهی با استفاده از محرکهای زیستی. مجله سلول و بافت، جلد۴. شماره ۲: ۱۲۸-۱۱۹
- Abdel Rahman, R., Gomma, S. E., Abdelsalam, N. R., El-Wakil, H. M. F., Khaled, A. S. And Hassan, H. M. (2013) Effect of sodium chloride on tropane alkaloids accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 1:197-210
- Kumar, J. and Gupta, P. K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2(2): 93.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Popp M.P., Lesney M.S., Davis J.M., 1997. Defense responses elicited in pine cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47(3):199-205.
- Putalun W, Luealon W, De-Eknankul W, Tanaka H, et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., Biotechnol Let. 2007; 29: 1143-1146.
- Vasconsuelo, A. Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172: 861-875
- Kim S.J., Lee S.Y., Park S., 2004. Agrobacterium mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports. 23: 386-390.

چکیده

گیاه بذرالبنج یکی از گیاهان دارویی مهم می باشد که به علت دارا بودن الکالوئیدهای ارزشمند در اندام هایش در صنعت داروسازی نقش بسیار مهمی پیدا کرده است. افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت بافت اغلب با وجود ترکیبات خاصی به نام الیستور یا محرک صورت می گیرد. کیتوزان از جمله محرک هایی است که از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو در تولید متابولیت های ثانویه نقش دارد. بدین منظور این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل کیتوزان در چهار سطح (۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میکرومولار) و زمان در سه بازه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با سه تکرار انجام گرفت. ابتدا با استفاده از کشت ریز نمونه های برگ حاصل از گیاهچه های درون شیشه ای در محیط کشت حاوی هورمون های مناسب کالوس زایی، کالوس های کافی تولید شد. کالوس ها در محیط مایع حاوی کیتوزان با غلظت ها و بازه های زمانی فوق قرار گرفتند. کالوسها پس از برداشت عصاره گیری شد. عصاره ها توسط دستگاه کروماتوگرافی طیف سنج جرمی آنالیز گردید و روند تغییرات ترکیبات در جداولی با غلظت های ثابت و بازه های زمانی مختلف با هم مقایسه شد. طبق نتایج، ترکیبات حاصل از تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ کیتوزان در بازه های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت از پایداری بیشتری برخوردار بود و تغییرات کمتری در آن ها مشاهده شد. با توجه به اینکه اغلب ترکیبات به صورت تجزیه شده توسط دستگاه GC/MS شناسایی شد. تحقیق بیشتر جهت شناسایی منشأ این ترکیبات مورد نیاز است.

مقدمه

بنگدانه سیاه گیاهی (*Hyoscyamus Niger L.*) از تیره سیب زمینی و حاوی الکالوئیدهای ارزشمند است. از ترکیبات مختلف این گیاه جهت از بین بردن و تسکین دردها مانند میگرن، درد اعصاب، درد دندان، درد روماتیسم و درد گوش استفاده می شود (امید بیگی، ۱۳۸۸). با توجه به اهمیت الکالوئیدهای گیاه بنگدانه در پزشکی و کم بودن مقدار تولید آنها در این گیاه، پژوهش های فراوانی جهت افزایش میزان این الکالوئیدها در داخل و خارج از کشور انجام شده است. فناوری زیستی با کمک روش هایی مانند کشت سوسپانسیون سلول، تولید کالوس و مطالعه مسیرهای موثر در تولید مواد موثره قادر به افزایش کارایی گیاهان در جهت تولید ترکیبات دارویی می باشد. استفاده از کشت درون شیشه ای گیاه، سبب تولید ترکیبات دارویی در شرایط کنترلی و مستقل از محیط می شود ذخیره متابولیت های ثانویه در گیاه، پاسخی از گیاه به تنش های محیطی است، در نتیجه می توان مقدار این ترکیبات را از طریق محرک های زیستی و غیر زیستی تحریک کرد (اسمین تانسکا، ۲۰۰۸). تاکنون محرک ها ی زیادی از قبیل تنش های محیطی، محرک های زیستی و غیر زیستی و غیره به منظور دستیابی سریع به الکالوئیدها گزارش شده است. محققان نشان دادند استفاده از کیتوزان به عنوان محرک، باعث افزایش تولید آنتراکینون در گیاه *Rubia tinctorum* می شود (واسکونسولو و همکاران، ۲۰۰۴). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن دار، به ویژه اسید زمارینیک و اوژنول می شود (کیوم و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین استفاده از محرک کیتوزان سبب افزایش تجمع لیمون و لینالول در کشت سلول گیاه *Citrus Grandis* شده است (عبدل رحمان و همکاران، ۲۰۰۳). در آزمایشی، کیتوزان باعث افزایش تولید آرتیمیزین در گیاه *Artemisia annua* شد (پانتولون و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش تولید لیگنان و فنیل پروپانویید در کشت سوسپانسیون سلولی *Linum album* تیمار شده با کیتوزان و کیتین گزارش شد (اسماعیل زاده و همکاران، ۲۰۱۲). از کیتوزان در کشت بافت *H. muticus* استفاده شد که منجر به افزایش ۵ برابری غلظت هیوسیمین در شرایط کشت بافت شد (سوون و همکاران، ۲۰۰۲). کیتوزان به عنوان عامل تراوش پذیر کننده در تولید الکالوئیدها استفاده شده است (کومار و گوپتا، ۲۰۰۸).

مواد و روش ها

جهت بررسی اثر محرک کیتوزان بر میزان ترکیبات کالوس گیاه بنگدانه سیاه، اقدام به کالوس گیری از اندام برگ حاصل از گیاهچه های استریل کشت شده در محیط (Ms موراشیگ و اسکوگ) درون شیشه ای شد. جهت تهیه تیمارها از کیتوزان با وزن مولکولی متوسط ۱۹۰ کیلودالتون استفاده شد. برای تهیه محلول پایه کیتوزان) ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر) از روش Popp و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. در این پژوهش از غلظت های ۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان استفاده شد. کالوس ها در محیط $\frac{1}{2}$ Ms مایع قرار گرفت و در فضای استریل اتاق کشت و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کالوس ها پس از گذراندن تیمارهای زمانی مورد نظر از محیط کشت خارج و بلافاصله عصاره گیری شدند.

شکل ۱: اعمال محرک کیتوزان: ۱) تهیه غلظت های مختلف کیتوزان، ۲) قرار دادن کالوس ها در محیط حاوی

غلظت های کیتوزان، ۳) نگهداری در اتاق کشت و اعمال تیمارهای زمان



جهت عصاره گیری نیم گرم کالوس، پس از توزین در هاون چینی با ازت مایع پودر شد. ۱ میلی لیتر متانول خالص در پودر کالوس افزوده و ترکیب را به اپندروف ۱۵ میلی لیتری منتقل کردیم. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک نگهداری شد. سپس مخلوط عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دور rpm10000 سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را با سمپلر برداشته و در فریزر جهت سنجش ترکیبات نگهداری شد.