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

پیمان رجایی ،[1] ندا محمدی[2]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۴
تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

بنگدانه(Hyoscyamus pusillus L.) یکی از گیاهان دارویی است که غنی از آلکالوئید های تروپان می باشد. در این تحقیق تأثیر نیترات و آمونیوم بر متابولیت ثانویه وسایر پارامترهای فیزیولوژیک، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد در شرایطی که هر دو یون نیترات وآمونیوم 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 می شود.اما با افزایش غلظت آمونیوم از رشد گیاه و پارامترهای ذکر شده کاسته می شود. نسبت ریشه به بخش هوایی و مقدار کربوهیدراتهای محلول در بخش هوایی و ریشه با بالا رفتن غلظت آمونیوم به طور معنی داری کاهش می یابد. 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 غلظت های پایین به همراه نیترات فعالیت آنزیم را افزایش می دهد اما با بالا رفتن غلظت آمونیوم فعالیت آنزیم کاهش می یابد. بیشترین مقدار آلکالوئیدهای تروپان در شرایطی حاصل شد که هر دو یون در محلول غذایی وجود داشت و غلظت آمونیوم کمتر از نیترات بود.

واژه های کلیدی: *آمونیوم ، نیترات، بنگدانه، آلکالوئید*

---

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

۲. دانشجوی دکترای علوم گیاهی-عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان
neda_mohammadi2001@yahoo.ca

مقدمه

نیتروژن یکی از مهم ترین فاکتورهای محدود کننده برای رشد گیاه محسوب می شود و گیاهان سازوکارهای متعددی برای افزایش کارایی نیتروژن داراهستند(Fernandes and Rossiello, 1995).گونه های گیاهی از نظر حساسیت به نوع تغذیه نیتروژنی متنوع اند. به طور کلی نیترات به عنوان منبع اصلی برای تغذیه گیاهان در نظر گرفته می شود. (Barker, 1980). با در نظرگرفتن احتمال تجمع بالای نیترات در برگ ها وسمیت نیترات برای سلامت انسان و سایر جانداران، کودهای آمونیومی می توانند در شرایط خاصی به عنوان منبع تغذیه نیتروژنی 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 Jagendrof, 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 Jagendrof, 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 نیتروژنی، آنزیم نیترات ردوکتاز می باشدکه 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 نیتروژنی استفاده شود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می‌یابد. در مورد آمونیوم، محققان معتقد به دخالت یک مرحله تنظیمی در رابطه با فعالیت آنزیم می‌باشند. ثابت شده است که آمونیوم در تره، *lemnaceae* و جلبکهای هـای *Chlorella* و *Neurospora* باعث بازدارندگی فعالیت نیترات ردوکتاز می‌شود. اما در بیشتر گیاهان عالی این ترکیب یا تأثیری در فعالیت آنزیم ندارد یا باعث افزایش آن می‌گردد (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 آلکالوئید ها در ریشه بنگدانه سنتز و به اندام هوایی منتقل می شوند (Ulrich, 1992). اسکوپولامین یا هیوسین اولین بار در سال ۱۸۸۱ از

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 کندیک سری مکانیزم های دفاعی القا میشوند.کورتیس و دانولوپ نشان دادند که solavetivone تولید شده در تارکشنده *Hyoscyamus muticus* به شکل سینرژیسم 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 ودر 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 ازطرفی 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 وپارامترهای 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.

مواد و روش ها

بذرهای گیاه بنگدانه(*Hyoscyamus pusillus* L) از بخش راین 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 رستهای 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 ۲±۲۸ 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 میلی‌مول نیتروژن به صورت نیترات پتاسیم (KNO_3) تغذیه شدند. در سایر تیمارها به ترتیب ۱۰میلی مول نیترات توام با ۵ میلی مول آمونیوم (بصورت $(NH_4)_2SO_4$) (تیمار ۱)، ۷/۵میلی مول نیترات توام با ۷/۵ میلی مول آمونیوم(تیمار ۲)، ۵ میلی مول نیترات توام با۱۰ میلی مول آمونیوم(تیمار ۳) و۱۵ 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 .

pH محلول غذایی در حدود ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. مجموعا ۵ تیمار غذایی با ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

-آنالیزرشد: 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(W۱). ۲۱ روز پس از اعمال تیمارها از هر تیمار ۴گیاه به عنوان ۴ تکرار مجدداً وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی (W۲) 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 باpH=۸ اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ، 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 (آلبومین گاوی) استفاده شد(Lowry et al., 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 برگی 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 اسپکتروفوتومتر مدل UV-۰۲،۱۲۰Shimazu,Kyoto خوانده شد(Arnon, 1949). نتایج به دست آمده بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه ارائه شد.

غلظت کلروفیل a (Chl. a) $=0.0127A_{663} -0.00269A_{645}$

غلظت کلروفیل b (Chl. b) $=0.0229A_{645} -0.00468A_{663}$

غلظت کلروفیل کل سنجش (Chl. Tot) = $0.0202A_{645} +0/00802A_{663}$

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز: سنجش آنزیم با روش Sym(۱۹۸۴) صورت گرفت(۳۱). ۰/۲ درصد گرم ماده تربخش هوایی وزن شد. نمونه های گیاهی در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محلولی که غلظت نیترات پتانسیم درآن ۱۵۰میلی مولار، پروپانول ۰/۳درصد و تامپون فسفات ۱۰۰میلی مولار باشد، قرار داده شد. لوله ها در آون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند سپس محلول صاف گردید. ۲میلی لیتر از محلول بالا برداشته، ۱میلی لیتر گریس I (۰/۵ گرم اسید سولفانیلیک در ۵۰میلی لیتر اسید استیک حل و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) و گریسII (۰/۲گرم آلفا نفتیل آمین در ۵۰درصد میلی لیتر اسید

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

سنجش کمی آکالوئیدها: این اندازه گیری با استفاده از روش Torssell & 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 آلکالوئید است). محلول اسیدی را داخل آب و یخ گذاشته وتوسط آمونیاک ۲۵ درصد قلیایی شد.سپس به آن ۲۰ میلی لیتر اتانول افزوده شد. محلول قلیایی به قیف جداکننده منتقل و ۴-۳ بار با هم حجم خود توسط کلروفرم شستشو داده شد. سپس با سدیم سولفات‌انهیدرید آبگیری و از صافی گذرانده شد. پس از تبخیر عصاره کلروفرمی ماده به‌جا مانده در بشر در سه میلی‌لیتر اتانول مطلق حل شد و با دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید. ماکزیمم طول‌موج محلول استاندارد اسکوپولامین در اتانول ۲۱۸ نانومتر و برای محلول استاندارد آتروپین در اتانول ۲۱۰ نانومتر بود.

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 داری۰/۰۵، ۰/۰۱و P<۰/۰۰۱ انجام شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCLL صورت گرفت.

نتایج

وزن تر و خشک بخش‌هوایی و ریشه تحت تاثیر غلظت‌های بالای آمونیوم کاهش یافت، که این کاهش در تیمارهای۳ و۴ در سطح P<۰/۰۱ معنی-داربود. در غلظت‌های پایین آمونیوم در گیاهان در تیمار۱ پارامترهای فوق افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود.نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی (R/S) در غلظت‌های بالای آمونیوم کاهش یافت که این کاهش در تیمار ۳،۲ و۴ در سطح ۰/۰۱ معنی دار بود(نمودارهای ۳،۲،۱).

با بالا رفتن نسبت آمونیوم به نیترات غلظت قند در برگ گیاه کاهش یافت که این کاهش در تیمارهای۳،۲ و۴ در سطح ۰/۰۱ معنی دار بود.اما قند ریشه در مقایسه با برگ به میزان کمتری در کلیه تیمارها کاهش یافت(نمودار۴).

مقایسه پروتئین در برگ گیاه بنگدانه نشان داد که مقدار پروتئین در غلظت‌های بالاتر آمونیوم افزایش یافت و این افزایش در کلیه تیمارها در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود. محتوای پروتئین ریشه نیز الگوی افزایشی مشابهی با پروتئین برگ نشان داد(نمودار۵).

.غلظت‌های بالاتر آمونیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل a و b نسبت به تیمار شاهد شد که این افزایش در تیمارهای۳ و۴ معنی‌دار بوده است. نتایج مربوط به کلروفیل کل بیانگر آن‌است که با افزایش غلظت آمونیوم میزان کلروفیل کل بالا رفته و این افزایش در کلیه تیمارها معنی‌دار بود(نمودار۶).

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمار ۱افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نسبت به شاهد نشان می-دهد. در حالی‌که در سایر تیمارها با کاهش فعالیت آنزیم مواجه هستیم که این کاهش در تیمار ۳ و۴ در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود(نمودار۷).

غلظت آلکالوئید هیوسیامین در تیمار۱ نسبت به شاهد افزایش معنی داری در سطح۰/۰۱ نشان می‌دهد اما در سایر تیمارها مقدارهیوسیامین کاهش می‌یابد و این کاهش در تیمارهای ۳ و ۴ در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود(نمودار۸).

نتایج و بحث

نتایج اثر غلظت های مختلف نیترات 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 دراثرجذب آمونیوم ایجاد می‌شود (Alan, 1989). بررسی های مختلف نشان داده است که اغلب گیاهان قادر به همانندسازی کل آمونیوم جذب شده نیستند و این امرمنجر به تجمع یون مزبور در بافت-های گیاه می‌شود. استناد اکثر دانشمندان بر این‌است که سمیت ناشی از تجمع این یون می‌تواند تأثیر باز دارنده ای روی مراحل فتوسنتز وبه تبع آن رشد وتولید بیوماس داشته باشد(Crawford, 1995). نتایج این تحقیق در راستای مطالعه Lasa و همکاران در سال ۲۰۰۱ روی سه گیاه اسفناج، آفتابگردان ونخود می باشد در تحقیق اخیر تولید ماده خشک گیاه بطور معنی‌دار در تغذیه آمونیومی نسبت به تغذیه نیتراتی کاهش می یابد واین کاهش به ترتیب در اسفناج، آفتابگردان و نخود ۸۶ درصد ۴۵ درصدو۱۳درصد بوده است (۲۱).

از آنجا که در تیمار نیتراتی قندها ی موجود در بخش هوایی جهت تثبیت نیترات بکار رفته و قندهای ریشه صرف رشد ریشه می‌شوند در نتیجه نسبت وزن بخش هوایی به ریشه کاهش می یابد ولی در تغذیه با آمونیاک کربوهیدرات‌های موجود در ریشه جهت تثبیت آمونیاک به‌کارمی‌روند ودر نتیجه رشد ریشه نسبت به بخش هوایی کاهش می یابد (Aslam, 1996).

Cramer در سال ۱۹۹۳ با آزمایش روی گیاه گندم وذرت مشاهده کرد که تغذیه آمونیاکی در گیاه ذرت تفاوت معنی داری در نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی (R/S) ایجاد نمی کند که در تقابل با نتایج به دست آمده از این تحقیق است علت آن به این دلیل است که ذرت یک گیاه C_4 است و با فراهم کردن اسکلت کربنی درریشه، اثر آمونیوم را بر رشد به حداقل می رساند (Crame and Lewis, 1993). اما در گندم که یک گیاه C_3 می باشد، نسبت R/S درتغذیه آمونیاکی بالاتر از تغذیه

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

از آنجا که درگیاهان ازت نیتراتی نسبت به ازت آمونیاکی با سرعت کمتری جذب و تثبیت می‌شود و در نتیجه کربوهیدرات کمتری در گیاه کاهش می-یابد (۳۲). غلظت‌های بالای آمونیوم در بخش هوایی باعث کاهش کربوهیدرات ها می‌شود (Crame and Lewis, 1993) وبه همین دلیل در دسترس بودن اسکلت کربنی برای جلوگیری از سمیت آمونیوم ضروری است انتقال نیتروژن آمینی ازگلوتامین به کتواسیدها نیازمند وجود انرژی واسکلت 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، اسیدهای‌آمینه و آمیدها در ریشه (از آمونیوم)تولید شده وسپس به برگها انتقال می یابند (Baranein et al.,1996). آمونیوم جذب شده به سرعت به وسیله گلوتامین سنتتاز و گلوتامات سنتاز 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 پروتئین‌های محلول در تیمار آمونیاکی، در اسفناج ۵۰ درصد و در نخود و آفتابگردان ۲۰درصد بیش از تیمار نیتراتی بوده است(Lasa et al., 2001).

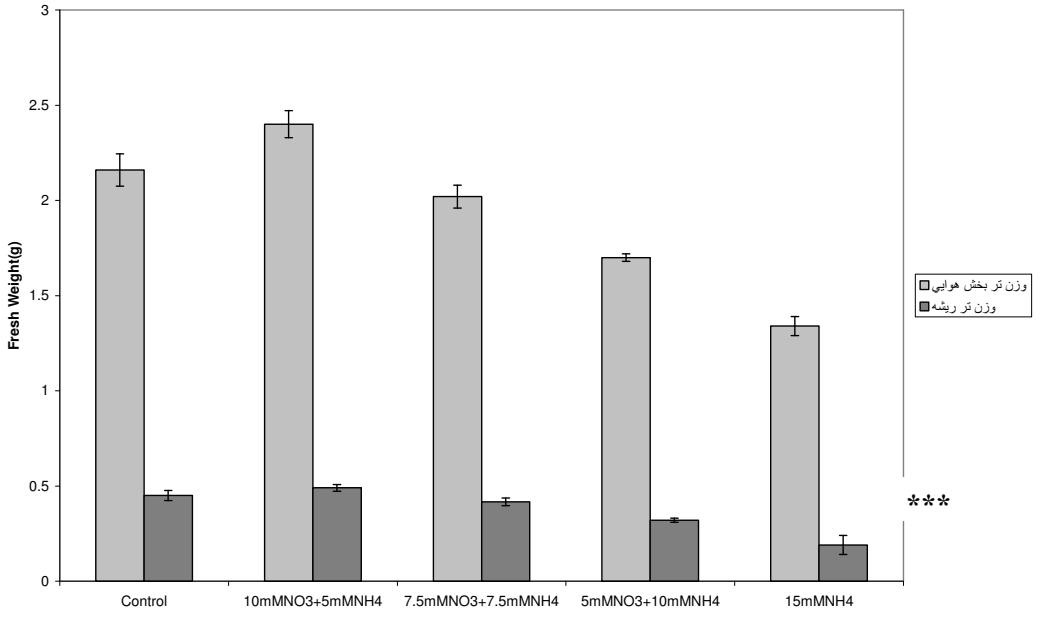
جذب و تثبیت آمونیاک نسبت به نیترات با سرعت بیشتر و صرف انرژی کمتر انجام می شود. آمونیاک با ورود به چرخه فعالیت گلوتامین سنتتاز وگلوتامات سنتاز وتولید گلوتامات که پیش ساز آمینولولینیک اسید می‌باشد خیلی سریع میزان کلروفیل را بالا می-برد (Harborne and Dey, 1997). این نتیجه در برگ گیاه کلزا هم ثابت شده است (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 تائید 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 درغلظت‌های 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 Poonnachit و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. این محققین با بررسی فعالیت نیترات ردوکتاز دربافت ریشه گیاه *Vaccinum* نشان دادند در شرایطی که از نیترات به عنوان منبع تغذیه نیتروژنی استفاده شود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می‌یابد (Poonacchita, Darnell and 2004). نتایج Botella وهمکاران

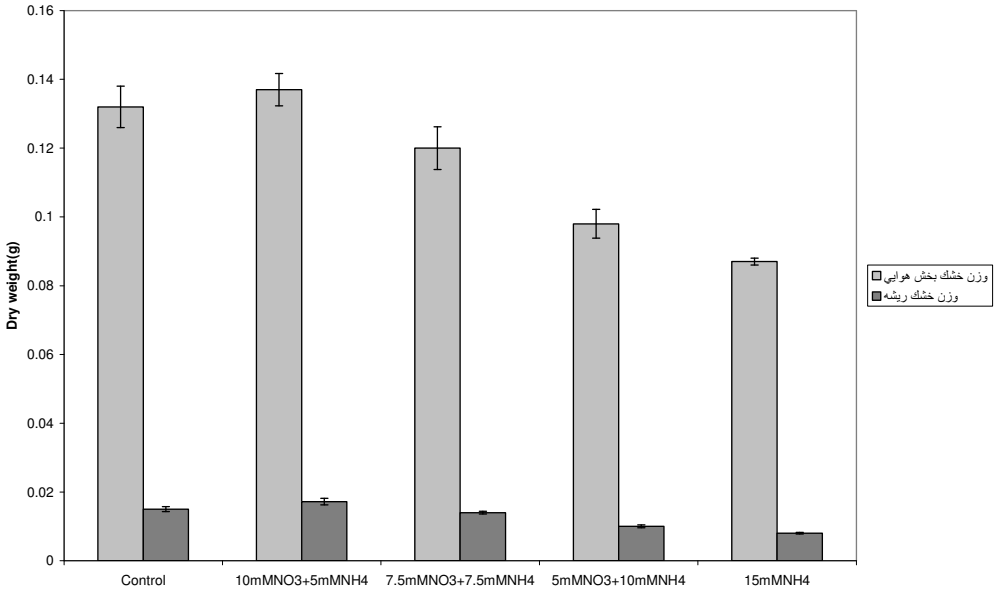
در سال ۱۹۹۳ روی گیاه گندم دال بر این بود که بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به شرایطی است که محلول غذایی واجد نیترات به تنهایی و نه آمونیوم باشد. این تحقیق نشان می‌دهد که آمونیوم تأثیر بازدارنده برفعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز دارد (Botella et al., 1993) که در تقابل با نتایج تحقیق حاضر است. در آزمایش Lewis 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 بیشتراز 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 برروی خود آنزیم (Lowry et al., 1951). شایان ذکر است که مکانیزم توجیه سنتز آنزیم نیترات ردوکتاز توسط آمونیوم مختص گیاهان عالی می‌باشد و در مورد قارچ‌ها و جلبک‌ها صدق نمی‌کند. در آزمایش دیگری که روی تأثیر آمونیوم بر القاء پروتئین نیترات ردوکتاز (NRP) انجام گرفت معلوم شد که در حضور ۵ میلی‌مول 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 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 ونسبت 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 واین 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 عاملی‌است برای تولید بیشتر تروپان آلکالوئید ها 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 تارکشنده 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

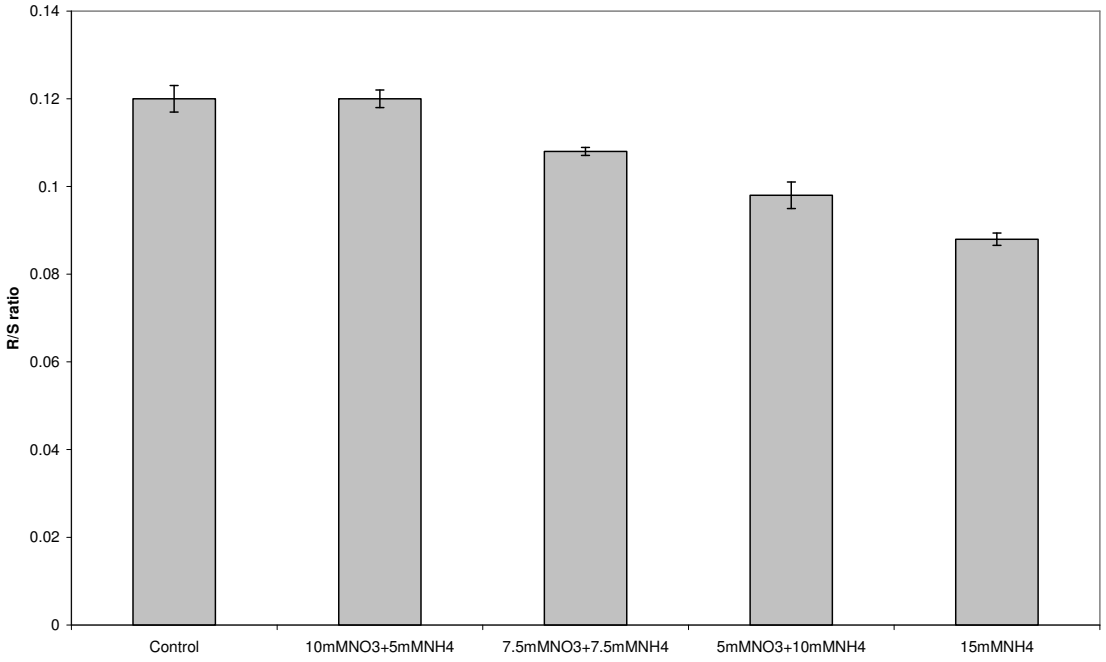
سال۱۹۹۴ بر روی *Hyoscyamus muticus* انجام شد مشخص شد، در شرایطی که غلظت نهایی نیتروژن بیش از ۱۰ mM شود، رشد گیاه و تولید هیوسیامین زیاد خواهد شد اما به تدریج با افزایش غلظت نیتروژن تا ۷۵ mM، رشد همچنان افزایش اما تولید هیوسیامین کاهش نشان خواهد داد(Oksman-Caldentey, 1994). در این آزمایش مشابه آنچه در 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 نامناسب بودن آمونیوم تنها تغییر pH محیط کشت تا کمتر از ۵ توضیح داده شده ست 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 *Holarrthena antidysenterica* برای تجمع conessine به ۶۰mM نیتروژن نیاز دارد(Oksman-Caldentey, 1994).



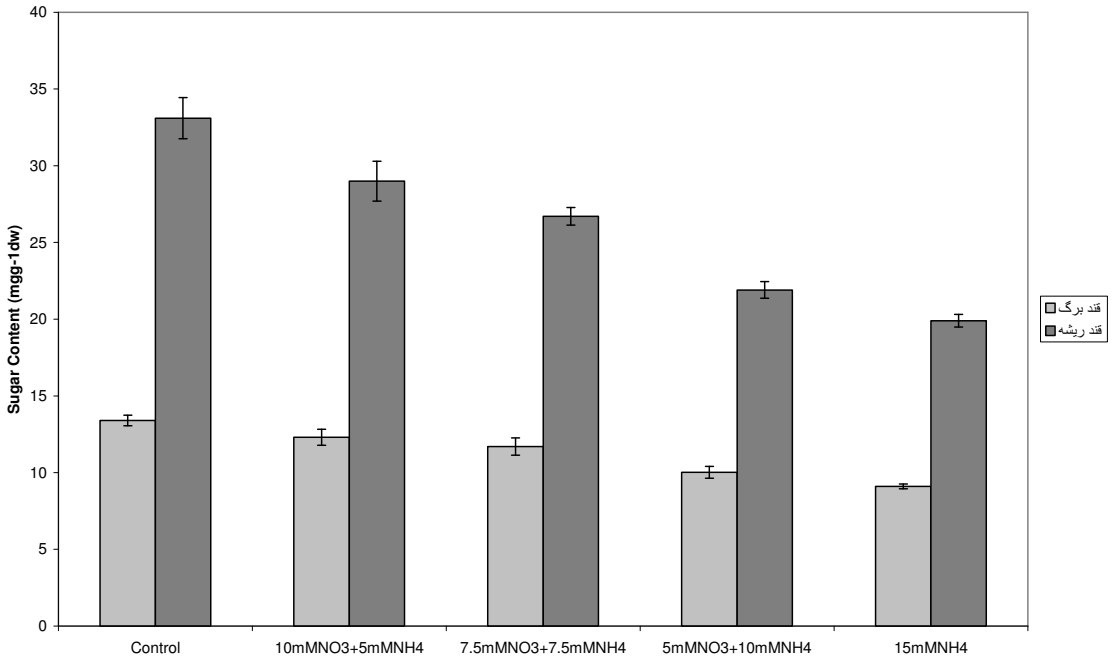
شکل۱. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن تر بخش هوایی و ریشه(g)



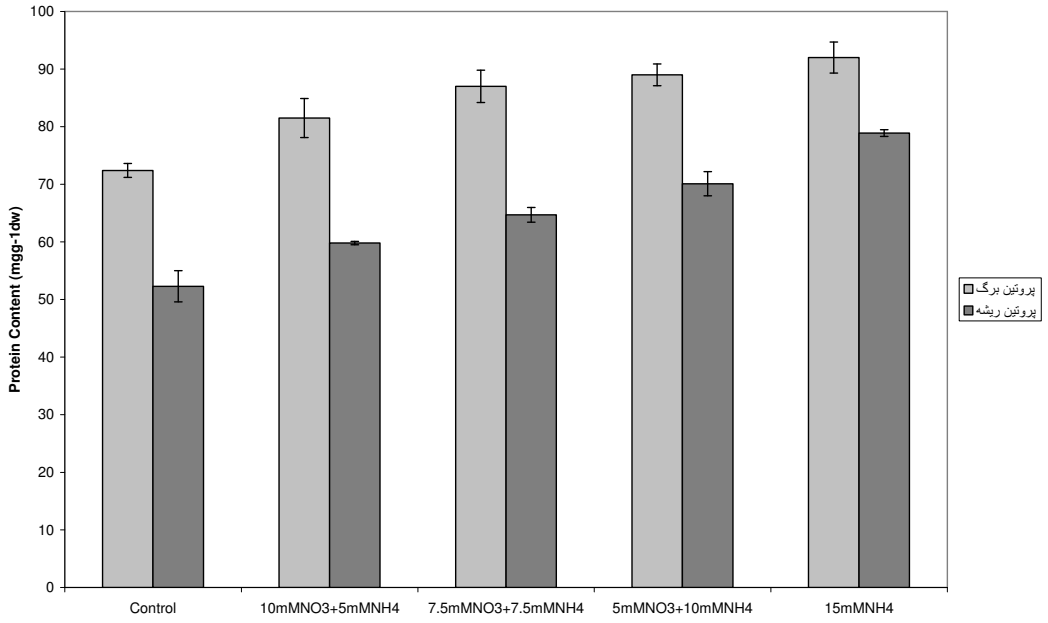
شکل۲. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه(g)



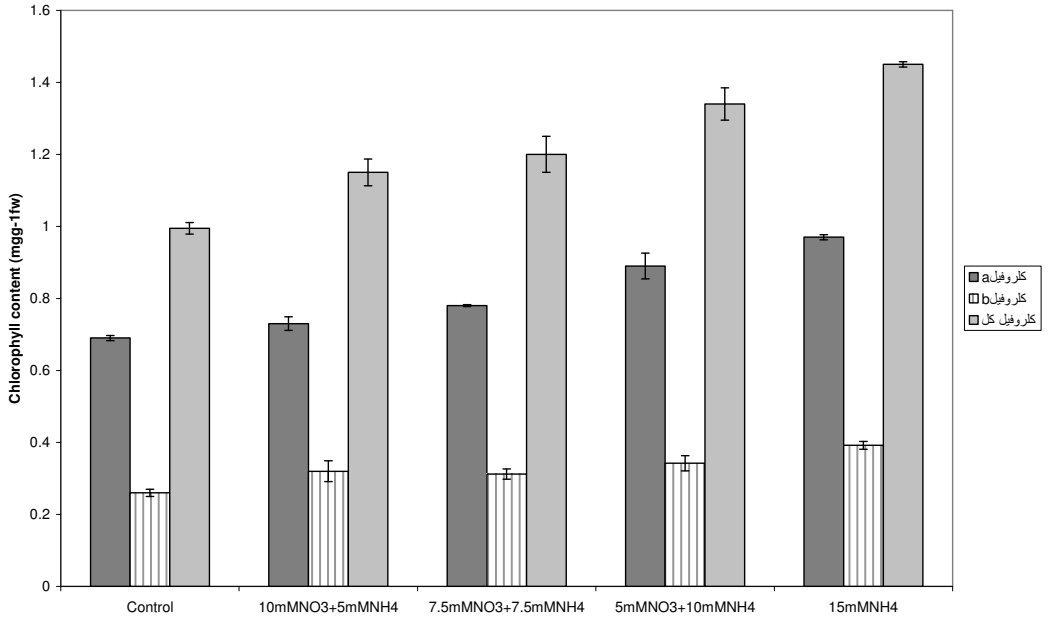
شکل ۳. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر نسبت ریشه به بخش هوایی



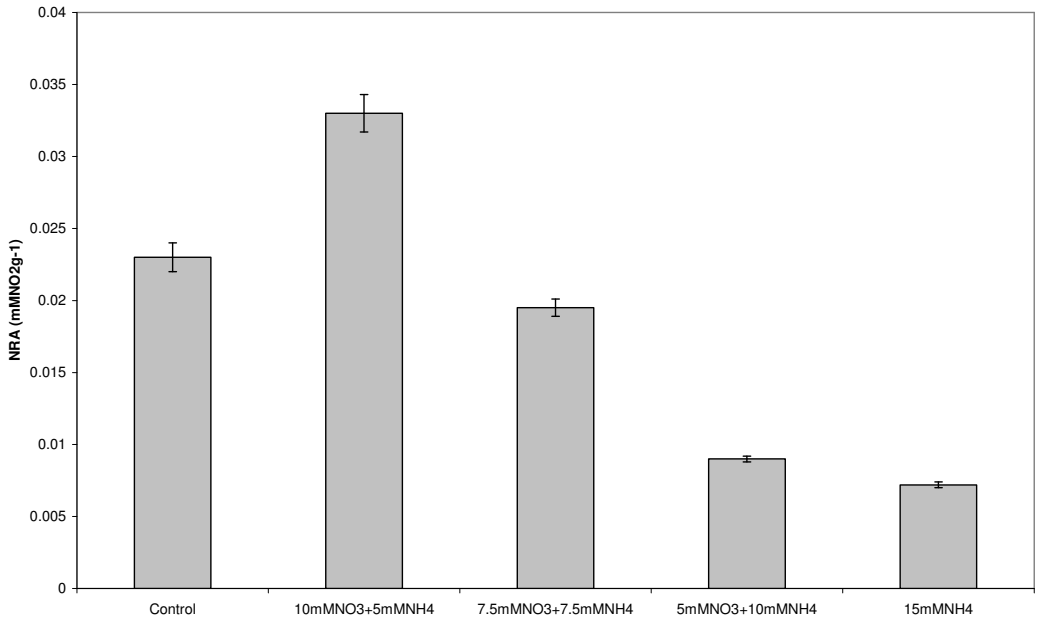
شکل۴. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر مقدار قند($mgg^{-1}dw$)



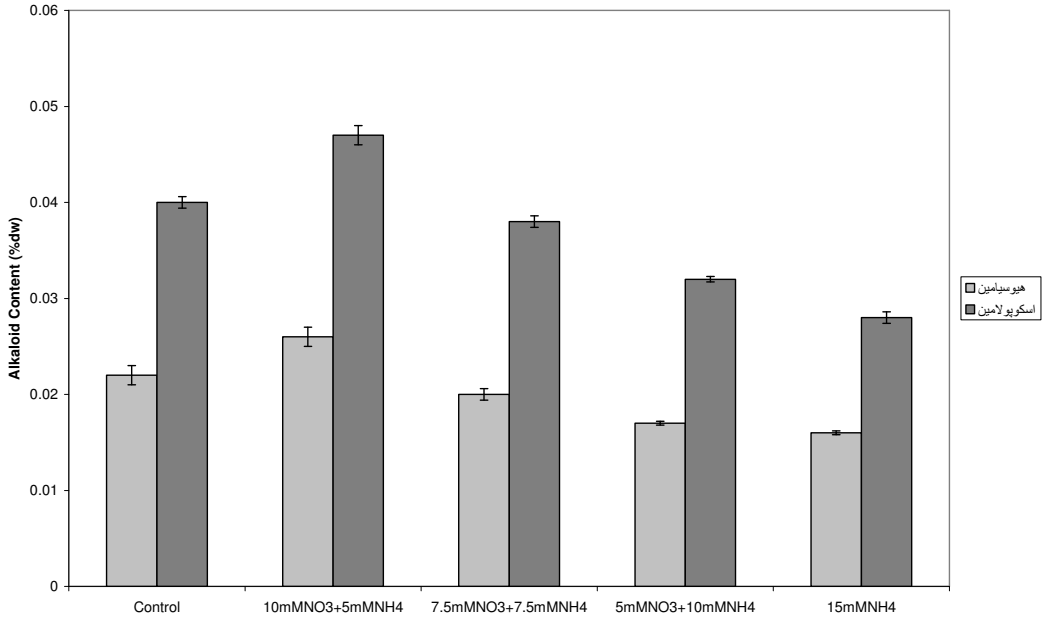
شکل۵. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر مقدار پروتیئن($mgg^{-1}dw$)



شکل۶. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر محتوای کلروفیل($mgg^{-1}fw$)



شکل۷. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان فعالیت نیترات ردوکتاز($mMNO_2g^{-1}$)



شکل۸. تاثیر غلظت های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان آلکالوئیدهای برگ(٪dw)

* P<۰/۰۵

** P<۰/۰۱

***P<۰/۰۰۱

منابع

آئینه چی، یعقوب، (۱۳۵۸). "روشهای نوین تجزیه شیمیایی گیاهان".انتشارات دانشگاه تهران ۲۴۵-۲۳۵.

زرگری، علی، (۱۳۶۶). گیاهان دارویی. جلدسوم. انتشارات دانشگاه تهران ۵۸۰-۵۴۶

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 production: Modelization of the in vitro biochemical response. Plant sci 177:81-87

Arnon D.I.(1949)copper enzymes in isolated chloroplasts. pollyphenol 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.

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. Phytochemistery. 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; Jagendrof A. T. (1959) Uncouples of spinach chloroplast photosynthetic phosphorilation. Plant Physiol. 34:272-277.

Lasa B; Frechilla S; Lamsfus C; Aparcio-Tego P. M. (2001) The sensivity 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 stramnium*. 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.