



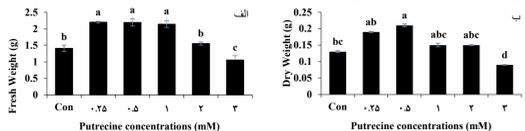
# اثر وابسته به غلظت پوتریسین بر شاخص‌های رشدی، وضعیت اکسیداتیو و تولید آلکالوئید در *Hyoscyamus niger* L. در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

سارا مرادی<sup>۱</sup>، مرضیه تقی زاده<sup>۲\*</sup>

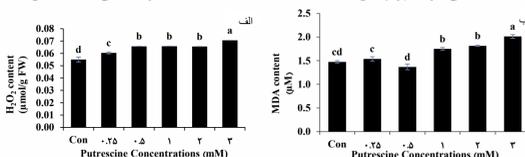
<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
<sup>۲\*</sup> گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

## نتایج و بحث

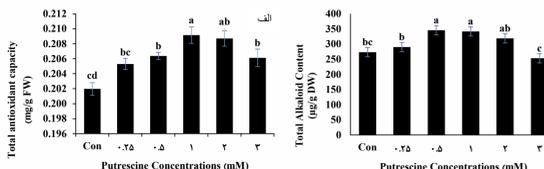
غلظت‌های پایین پوتریسین (۱-۲۵/۰) وزن تر گیاهچه‌ها را تحریک کرده و تجمع زیست‌توده را بهبود بخشید (شکل ۱ الف). تیمار با غلظت‌های ۰.۲۵/۰، ۰.۵/۰، ۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ میلی‌مولار پوتریسین سبب افزایش وزن خشک نسبت به شاهد شد. بیشترین افزایش وزن خشک مربوط به گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰.۵/۰ و ۱/۰ میلی‌مولار پوتریسین بود. در مقابل، غلظت بالاتر پوتریسین یعنی ۳ میلی‌مولار موجب کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک در مقایسه با شاهد شد، به طوری که کمترین مقدار وزن تر و خشک در این تیمار مشاهده شد (شکل ۱ ب).



بر اساس نتایج، بیشترین مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاهچه‌های تیمار با غلظت ۳ میلی‌مولار پوتریسین مشاهده شد. همچنین، در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰.۲۵/۰، ۰.۵/۰ و ۱/۰ میلی‌مولار پوتریسین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲ الف). بررسی تغییرات MDA نشان داد که در غلظت‌های ۰.۲۵/۰ و ۱/۰ میلی‌مولار پوتریسین، مقدار MDA به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها افزایش یافت. بیشترین مقدار MDA در گیاهچه‌های تیمار شده با تیمار ۳ میلی‌مولار پوتریسین مشاهده شد. در حالی که کمترین مقدار MDA در تیمار ۰.۵/۰ میلی‌مولار پوتریسین مشاهده شد که نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲ ب).



بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای ۱ و ۲ میلی‌مولار پوتریسین مشاهده شد که نسبت به شاهد معنی‌دار بود. همچنین کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۳ الف). غلظت‌های ۰.۲۵/۰ و ۱/۰ میلی‌مولار پوتریسین سبب افزایش معنی‌دار محتوای آلکالوئید کل در مقایسه با شاهد شد. غلظت ۳ میلی‌مولار پوتریسین سبب کاهش محتوای آلکالوئید نسبت به شاهد شد اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۳ ب).



پوتریسین به‌عنوان یکی از پلی‌آمین‌های اصلی، با تثبیت غشا، تنظیم چرخه سلولی و افزایش سنتز پترتین، در بهبود رشد گیاه نقش مهمی دارد (González-Hernández et al., 2022). در این مطالعه، غلظت ۰.۵ میلی‌مولار موجب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک شد که احتمالاً ناشی از تحریک تقسیم سلولی، فعال شدن مسیرهای آنابولیک و بهبود کارایی فتوسنتزی است. اما در غلظت ۳ میلی‌مولار کاهش رشد مشاهده شد. این کاهش می‌تواند به دلیل ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید ROS باشد، زیرا افزایش H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و MDA در این تیمار نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب غشایی است. مطالعات پیشین نیز گزارش کرده‌اند که پوتریسین در غلظت‌های پایین محرک رشد و در دوزهای بالاتر بازدارنده است (González-Hernández et al., 2022). پراکسیداسیون لیپیدی و مالون‌دی‌آلدئید شاخص‌های اصلی ارزیابی تنش اکسیداتیو در گیاهان هستند. افزایش H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به‌عنوان یکی از ROS های مهم، هم می‌تواند نقش پیام‌رسان در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی داشته باشد و هم در صورت تجمع بیش‌ازحد موجب آسیب اکسیداتیو شود. از سوی دیگر، افزایش MDA بیانگر شدت پراکسیداسیون لیپیدی و تخریب غشاهای زیستی است (Del Río et al., 2005). نتایج این پژوهش نشان داد پوتریسین موجب افزایش تدریجی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاهچه‌های *H. niger* شد و بیشترین مقدار آن در غلظت ۳ میلی‌مولار مشاهده گردید. این افزایش می‌تواند حاصل تنش اکسیداتیو یا محصول فرعی کاتابولیسم پوتریسین توسط دی‌آمین اکسیداز باشد (González-Hernández et al., 2022). در غلظت‌های پایین‌تر (۰.۲۵ و ۰.۵ میلی‌مولار)، اگرچه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> افزایش داشت، اما MDA تغییر معنی‌داری نکرد. این موضوع احتمالاً نشان می‌دهد که H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در این سطح بیشتر نقش سیگنالی‌نگ داشته و سیستم آنتی‌اکسیدانی و اثر حفاظتی پوتریسین بر غشا توانسته از تخریب لیپیدی جلوگیری کند. در غلظت‌های بالا این تعادل به‌هم خورد و با افزایش تولید ROS، میزان MDA نیز افزایش یافته که نشان‌دهنده وقوع آسیب اکسیداتیو و تخریب غشا است.

نتایج این پژوهش نشان داد که پوتریسین در تمامی غلظت‌ها موجب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) شد و بیشترین مقدار مربوط به غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار بود. این افزایش احتمالاً ناشی از تحریک مسیرهای سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها، پروئین، آلکالوئیدها و همچنین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط پوتریسین است. با این حال، در غلظت ۳ میلی‌مولار، به دلیل افزایش بیش از حد ROS و پراکسیداسیون لیپیدی، تعادل اکسیداتیو مختل شد و TAC نسبت به غلظت‌های پهنه کاهش یافت. مطالعات متعدد نیز تأیید کرده‌اند که کاربرد بیرونی پوتریسین موجب افزایش ترکیبات فنلی و TAC می‌شود. از طرف دیگر، نتایج پژوهش نشان داد پوتریسین اثر معنی‌داری بر محتوای آلکالوئید کل *H. niger* ندارد؛ به طوری که غلظت‌های ۰.۲۵/۰، ۰.۵/۰ و ۱/۰ میلی‌مولار بیشترین مقدار آلکالوئید را ایجاد کردند و غلظت ۳ میلی‌مولار موجب کاهش آن شد. این الگوی وابسته‌به‌دوز با نقش

دوگانه پوتریسین در مسیر بیوسنتز تروپان‌آلکالوئیدها قابل تفسیر است. پوتریسین به‌عنوان پیش‌ساز اصلی این مسیر، توسط آنزیم Putrescine N-methyltransferase (PMT) متیله شده و وارد نخستین گام اختصاصی تولید آلکالوئیدها می‌شود؛ بنابراین افزایش ملایم پوتریسین می‌تواند جریان سوپرسترا و فعالیت مسیر را افزایش دهد و تولید آلکالوئید را بالا ببرد (Kim et al., 2016). در غلظت‌های بالا، پوتریسین می‌تواند موجب برهم خوردن تعادل پلی‌آمین‌ها و ایجاد بازخورد منفی روی آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی شود. افزون بر این، کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها توسط آمین‌آکسیدازها سبب تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و سایر ROS ها می‌شود که می‌تواند به آسیب اکسیداتیو، سرکوب بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئید و کاهش فعالیت آنزیم‌ها منجر گردد (González-Hernández et al., 2022). این پدیده احتمالاً دلیل کاهش آلکالوئید در غلظت ۳ میلی‌مولار است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاربرد پوتریسین در غلظت‌های پایین تا متوسط اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشدی و محتوای آلکالوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه *H. niger* داشت. این نتایج بیانگر نقش تنظیمی و حفاظتی پوتریسین در تقویت سیستم دفاعی و تعادل اکسیداسیون-احیا در سلول‌های گیاهی است. در مقابل، غلظت بالاتر (۳ میلی‌مولار) سبب کاهش رشد، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی شد. بنابراین، این پلی‌آمین می‌تواند به‌عنوان یک محرک مؤثر برای ارتقای تولید ترکیبات دارویی در سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

## چکیده

*Hyoscyamus niger* L. از گیاهان دارویی ارزشمند خانواده Solanaceae است که به‌دلیل تولید آلکالوئیدهای تروپان از اهمیت دارویی بالایی برخوردار است. این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف پوتریسین (۰، ۰.۲۵/۰، ۰.۵/۰، ۱/۰، ۲/۰ و ۳ میلی‌مولار) بر شاخص‌های رشدی (وزن تر و خشک)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، میزان پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و آلکالوئید کل در گیاهچه‌های *H. niger* در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد تیمارهای پایین تا متوسط پوتریسین (۰.۲۵/۰-۲ میلی‌مولار) موجب افزایش معنی‌دار رشد، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی، کاهش شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی، و افزایش انباشت آلکالوئید کل شدند؛ در حالی که غلظت‌های بالا (۳ میلی‌مولار) سبب افزایش ROS و کاهش شاخص‌های رشدی شد. همچنین با اندازه‌گیری این پارامترها مشخص شد پوتریسین در غلظت‌های بالا به تنهایی می‌تواند منجر به اعمال تنش در گیاه شود ولی در غلظت پهنه می‌تواند محرکی مؤثر برای افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه *H. niger* در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای باشد.

## مقدمه

گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال بیولوژیک، جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی و دارویی دارند. *Hyoscyamus niger* L. (بذرالبنج) یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده Solanaceae است که به دلیل داشتن آلکالوئیدهای تروپان مانند هیوسيامین و اسکپولامین، ارزش دارویی بسیار بالایی دارد (Roshan et al., 2020). با توجه به محدودیت تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط طبیعی، استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای به‌عنوان روشی مناسب برای تولید پایدار متابولیت‌های ثانویه اهمیت یافته است. یکی از روش‌های مؤثر در افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده از محرک‌ها است. محرک‌ها مولکول‌های سیگنال با منبع زیستی و غیر زیستی هستند که سبب فعال شدن سیستم دفاعی در سلول شده و منجر به افزایش سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌شوند. یکی از این محرک‌ها پلی‌آمین‌ها هستند. پلی‌آمین‌ها، از جمله پوتریسین، از مهم‌ترین ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاه محسوب می‌شوند و در فرآیندهایی همچون تقسیم سلولی، تنظیم تنش، پایداری غشا و تعدیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش دارند (Blázquez, 2024). پوتریسین علاوه بر اثرات حفاظتی، قادر است مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه را فعال کرده و سبب افزایش آلکالوئیدهای کل در گیاه شود. از سوی دیگر، بهبود وضعیت رشد و افزایش وزن تر و خشک گیاهچه‌ها از پیامدهای مهم استفاده از پلی‌آمین‌هاست (Yousefi et al., 2021). با توجه به نقش‌های چندگانه پوتریسین، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف آن بر شاخص‌های رشدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، محتوای هیدروژن پراکسید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، مالون دی‌آلدئید MDA، تولید آلکالوئید کل در گیاهچه‌های *H. niger* در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انجام شد.

## مواد و روش‌ها

بذرهای *H. niger* پس از ضدعفونی سطحی با اتانول و آب اکسیژنه، در محیط ½MS کشت شدند و در اتاق کشت با شرایط نوری ۱۶ ساعت نور / ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳±۲ قرار گرفتند. پس از ظهور گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های یکنواخت به محیط‌های MS حاوی پوتریسین در غلظت‌های ۰، ۰.۲۵، ۰.۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار منتقل شدند و سه هفته در شرایط رشد کنترل‌شده نگهداری شدند. پس از برداشت، وزن تر اندازه‌گیری و سپس نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه خشک و وزن خشک تعیین شد. میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با روش پتاسیم دیدید (Velikova et al., 2000) و MDA با آزمون TBARS اندازه‌گیری شد (Heath & Packer, 1968). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز به روش فسفومولیدات تعیین شد (Prieto et al., 1999). آلکالوئیدها با استخراج متانولی و استفاده از معرف برموکروزول گرین (BCG) بر اساس پروتکل Shamsa و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شدند. تمامی آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. معنی‌دار بودن آماری داده‌ها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و در سطح احتمال P ≤ ۰/۰۵ مشخص شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

## منابع

- Roshan, R., Ahmed, S., & Khan, T. (2020). Tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger*: Biosynthesis and medicinal importance. *Medicinal Plants Research, 10*(4), 123–130.
- Blázquez, M. A. (2024). Polyamines and plant growth regulation. *Plant Physiology, 196*(1), 45–61.
- Yousefi, A., Rezaei, M., & Khosravi, A. (2021). Polyamines and plant biomass accumulation. *Plant Growth Regulation, 94*(3), 365–374.
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science, 151*(1), 59–66.