

بررسی اثر برخی مشخصات خاک منطقه رویش بر روی محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی دو گونه تربشیر (غدد زیرزمینی تربشیر و تربشیر صغیر) از چهار منطقه مختلف ایران

سمیرا شوکت‌یاری، رضا حیدری، رشید جامعی*، سیاوش حسینی سرقین؛
دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه

چکیده

آلکالوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات هستند که فعالیت‌های شیمیایی، زیستی و فیزیولوژیکی دارند. تربشیر^۱ گیاهی است متعلق به تیره شیربنجه^۲ که منبعی غنی از آلکالوئید است. در پژوهش حاضر، محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی تربشیر^۳ از مریوان و سنندج و تربشیر صغیر^۴ از سنندج و نقده به روش اسپکتروفتومتری، براساس واکنش آلکالوئید با محلول بروموکرزول سبز، بررسی شد. همچنین اثر برخی مشخصات خاک منطقه رویش مانند pH خاک، نیترژن کل، پتاسیم و نوع بافت خاک، ارتفاع منطقه و نیز محتوای نیترات غدد زیرزمینی، بر روی محتوای آلکالوئید تام سنجیده شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین محتوای آلکالوئید تام تربشیر جمعیت مریوان (۲۷/۱۲±۱/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و سنندج (۱۷/۴۲±۰/۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و نیز محتوای آلکالوئید تام تربشیر صغیر جمعیت سنندج (۱۵/۳۸±۰/۶۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و نقده (۷/۴±۰/۲۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) وجود دارد. همچنین بین گونه‌های مناطق مختلف به‌غیر از تربشیر جمعیت سنندج (۱۷/۴۲±۰/۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و تربشیر صغیر جمعیت سنندج (۱۵/۳۸±۰/۶۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. نتایج نشان داد که محتوای نیترات در گونه تربشیر صغیر بیش‌تر از میزان آن در تربشیر است. بررسی نمونه‌های خاک مناطق نشان داد که بافت خاک در منطقه سنندج (تربشیر صغیر) شنی- لومی و در سایر مناطق لومی- رسی بود. خاک همه مناطق از نظر pH، قلبایی ضعیف تشخیص داده شد. نتایج حاصل از بررسی اثر مشخصات خاک منطقه رویش بر روی محتوای آلکالوئید تام نشان داد که برخی عوامل بر روی محتوای آلکالوئید تام در جنس تربشیر تأثیر می‌گذارند. به این صورت که، با افزایش مقدار نیترژن کل، پتاسیم خاک و محتوای نیترات گیاه، مقدار آلکالوئید تام کاهش می‌یابد. در حالی‌که تأثیر اسیدیته، بافت خاک و ارتفاع منطقه بر محتوای آلکالوئید تام در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی: تربشیر، نیترژن، پتاسیم، بافت خاک، آلکالوئید تام

پذیرش ۹۲/۸/۴

دریافت ۹۱/۷/۲۹

*نویسنده مسنول r.jamei@urmia.ac.ir

۱. *Leontice*

۲. *Podophyllaceae*

۳. *L. leontopetalum L.*

۴. *L. armeniaca L.*

مقدمه

جنس تربشیر گیاهی است علفی، چندساله، با غده‌های زیرزمینی که متعلق به تیره شیرپنجه است. این جنس دو گونه تربشیر و تربشیر صغیر در ایران دارد. دو گونه از نظر ارتفاع ساقه، شکل برگچه‌ها و رویش‌گاه متفاوت هستند. تربشیر صغیر در ارتفاعات و اراضی سنگلاخی و فقیر، و گونه تربشیر در اراضی زراعی حاصلخیز (به‌عنوان علف هرز) یا به‌ندرت در اراضی مرتعی با خاک حاصلخیز یافت می‌شود. هر دو گونه متعلق به مناطق ایرانی تورانی و زاگرسی‌اند [۱]. از غدد زیرزمینی این جنس برای درمان رماتیسم، درد مفاصل و التهاب [۱۰] استفاده می‌شود. گیاهان جنس تربشیر منبعی غنی از آلکالوئیدهای کینولیزیدین و ایزوکینولین هستند [۱۱]. آلکالوئیدها گروهی از دگرگوره‌های^۱ ثانویه هستند که اثرات فیزیولوژیکی قوی بر روی انسان و سایر حیوانات دارند. این ترکیبات خاصیت ضد میکروبی و ضدانگلی دارند. بعضی از آن‌ها هنوز در داروهای مدرن به‌عنوان ترکیبات طبیعی یا تغییر یافته کاربرد دارند. این امر مربوط به فعالیت بیولوژیک آن‌ها در انسان یا حیوانات است. همچنین آلکالوئیدها نقش مهمی در دگرگور^۲ و عمل‌کرد گیاهان دارند [۱۲]. امروزه تحقیقات انجام شده روی بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان می‌دهد که دگرگوره‌های ثانویه گیاهی از جمله آلکالوئیدها به‌علت قدرت پاک‌کنندگی یا مهار واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌ها می‌توانند در آینده به‌عنوان پاداکساینده‌های^۳ مؤثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شوند [۱۳]. تحقیقات انجام شده مقدار آلکالوئید تام اندام‌های هوایی لئونتیس داروازیکا^۴ را ۱/۱ درصد تشخیص داده است [۱۴]. در این تحقیق با توجه به اهمیت دارویی آلکالوئیدهای جنس تربشیر محتوای آلکالوئید تام موجود در غدد زیرزمینی دو گونه این جنس و همچنین اثر برخی عوامل محیطی بر روی مقدار آلکالوئید تام در مرحله گل‌دهی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گونه تربشیر از دو منطقه شهرستان مریوان حد فاصل روستای رشنش به نگل، در طول ۳۴' و ۴۶° شرقی و عرض ۱۸' و ۳۵° شمالی، ارتفاعات ۱۵۰۰ متری و سنندج، اطراف سد قشلاق در طول ۵۷' و ۴۶° شرقی و عرض ۲۶' و ۳۵° شمالی، ارتفاعات ۱۶۰۰ متری جمع‌آوری گردید. گونه تربشیر صغیر نیز از ارتفاعات ۲۰۰۰ متری جاده قدیم ماموخ در طول ۵۹' و ۴۶° شرقی و عرض ۳۰' و ۳۵° شمالی در شهرستان سنندج و ارتفاعات ۱۵۰۰ متری سلطان یعقوب در طول ۲۲' و ۴۵° شرقی و عرض ۵۵' و ۳۵° شمالی در شهرستان نقده در اردیبهشت سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد. شناسایی گونه‌ها در هر بار یوم گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه انجام شد. نمونه‌ها (غدد زیر زمینی) پس از شستشو و خشک شدن در سایه و دمای اتاق آسیاب شدند. همچنین خاک هر چهار منطقه برای انجام بررسی‌های خاک‌شناسی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

۱. metabolites

۲. metabolism

۳. antioxidants

۴. *L.darvasica* Rgl

مشخصات مناطق نمونه برداری

شهرستان مریوان در ۱۳۵ کیلومتری شمال غربی سنندج، سد قشلاق در ۱۰ کیلومتری شمال سنندج و جاده قدیم ماموخ در ۱۵ کیلومتری سنندج واقع شده است. در تقسیمات اقلیمی و بیوکلیماتیک ایران، طبق روش آمبرژه سنندج و مریوان جزو اقلیم نیمه مرطوب سرد هستند [۲]. دره سرسبز سلطان یعقوب در ۴ کیلومتری جنوب نرده قرار دارد. بر اساس طبقه‌بندی اقلیمی دومارتن گسترش یافته، نرده دارای اقلیم خیلی مرطوب سرد است [۳].

آماده‌سازی محلول‌ها برای اندازه‌گیری محتوای آلکالوئید تام

برای تهیه محلول بروموکرزول سبز^۱ با غلظت $10^{-4} \times 1$ مولار، $69/8$ میلی‌گرم از آن در ۳ میلی‌لیتر سود ۲ نرمال و ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. محلول حاصل تا انحلال کامل حرارت داده شد و با آب دوبار تقطیر به حجم یک لیتر رسانده شد. برای تهیه بافر فسفات ($\text{pH}=4/7$)، اسیدیته فسفات سدیم ۲ مولار ($71/6$ گرم از Na_2HPO_4 در یک لیتر آب دوبار تقطیر) در $4/7$ تنظیم شد. برای تهیه محلول ۱۰۰ میلی‌گرم مورفین (تهیه شده از معاونت مواد غذایی و داروی تهران) در ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد [۱۵].

آماده‌سازی منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری آلکالوئید تام

مقادیر متفاوت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد مورفین در قیف‌های جداکننده جداگانه قرار گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ($\text{pH}=4/7$) و ۵ میلی‌لیتر محلول بروموکرزول سبز به هر کدام اضافه شد و با ۵ و ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم عصاره‌گیری شد. فاز کلروفرمی به بالن ۲۵ میلی‌لیتر منتقل شد و به حجم رسید. سپس جذب کمپلکس در ۴۱۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد که همان محلول بدون مورفین است، $R^2=0/9776$ ، $Y=0/0165X+0/0335$ است اندازه‌گیری شد [۱۵].

تهیه عصاره تام آلکالوئیدی و سنجش میزان آن

آلکالوئیدها در برگ و غدد زیرزمینی گیاهان نمونه با تلفیقی از روش‌های کرن^۱ [۱۶] و شمسآ^۲ [۱۵]، عصاره‌گیری گردید. در ابتدا یک گرم از نمونه‌های خشک و آسیاب شده در ۸۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۰/۰۵ درصد (v/v) ۱۸ ساعت خیسانده شد. ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده چندین بار با کلروفرم (هر بار ۱۰ میلی‌لیتر) شستشو داده شد، تا آن‌جاکه همه مواد رنگی حذف شده و کلروفرم حاصل از شستشو رنگی نباشد. در نهایت، اسیدیته محلول باقی‌مانده با آمونیاک به ۷ رسانده شد و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف بروموکرزول سبز ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$) و ۵ میلی‌لیتر بافر استات اضافه شد و سه بار با کلروفرم (۵، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر) عصاره‌گیری گردید و اجازه داده شد تا دوفاز از هم جدا شوند و سپس به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در این حالت وجود رنگ زرد در فاز پایینی نشان‌دهنده حضور آلکالوئید است. این فاز جدا گردید و با اسپکتروفتومتر^۴

۱. bromocresol green

۲. Kreen

۳. Shamsa

۴. (WPA, S2100, UK) UV/VIS

میزان جذب نوری آن در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای آلکالوئید تمام نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد مورفین تعیین شد.

آماده‌سازی منحنی استاندارد نیترات

۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف (۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میکروگرم بر لیتر) محلول استاندارد نیترات نیترژن (NaNO_3) به ۰/۸ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک ۵ درصد اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۱۹ میلی‌لیتر سود ۲ نرمال به آن اضافه شد تا pH بیش‌تر از ۱۲ شود. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شده و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای نیترات نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد $Y = 0.037X - 0.0275$, $R^2 = 0.9985$ تعیین شد [۱۷].

اندازه‌گیری میزان نیترات موجود در نمونه‌های گیاهی

در ابتدا به مقدار ۱ گرم از نمونه‌های گیاهی خشک و خردشده ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. سپس نیم‌ساعت در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. در مرحله بعد نمونه‌ها پس از سرد شدن در ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به داخل لوله آزمایش منتقل و به آن ۰/۸ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک ۵ درصد اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۱۹ میلی‌لیتر سود ۲ نرمال به آن اضافه شد تا pH بیش‌تر از ۱۲ شود. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شده و میزان جذب محلول لیمویی رنگ حاصل در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد [۱۷].

آنالیز خاک

نمونه‌های خاک پس از خشک شدن در هوا از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. pH در عصاره اشباع، بافت خاک به روش هیدرومتری، پتاسیم قابل جذب با استفاده از اسنات آمونیوم نرمال و خنثی و میزان نیترژن خاک به روش کجدال اندازه‌گیری شد [۴].

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌ها در سه تکرار به صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) بیان شد. اختلاف بین نمونه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک سویه (آنوا^۱) در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شد. برای رسم نمودارها از نرم افزارهای SPSS ۱۶/۰ و اکسل^۲ ۲۰۰۷ استفاده شد.

۱. ANOVA

۲. EXCEL

نتایج

سنجش کمی آکالوئید تام و میزان نیترات

میانگین محتوای آکالوئید تام و محتوای نیترات غدد زیر زمینی دو گونه ترب شیر در جدول ۱، نشان داده شده است.

جدول ۱. محتوای آکالوئید تام (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و محتوای نیترات (میکروگرم بر گرم) غدد زیرزمینی

گونه	جمعیت	بینگین آکالوئید تام (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	محتوای نیترات (میکروگرم بر گرم)
ترب‌شیر	مربوان	$27/12 \pm 1/18^a$	$42/46 \pm 2/39^a$
ترب‌شیر	سنندج	$17/42 \pm 0/77^bc$	$63/13 \pm 3/26^bc$
ترب‌شیر صغیر	سنندج	$15/38 \pm 0/65^bc$	$80/39 \pm 1/19^bc$
ترب‌شیر صغیر	نقده	$7/4 \pm 0/32^d$	$86/46 \pm 2/49^d$

داداها به صورت بینگین $\pm SE$ نشان داده شده‌اند و حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است

بین محتوای آکالوئید تام غدد زیرزمینی ترب‌شیر جمعیت مربوان ($27/12 \pm 1/18$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) با ترب‌شیر جمعیت سنندج ($17/42 \pm 0/77$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و بین ترب‌شیر صغیر جمعیت سنندج ($15/38 \pm 0/65$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ترب‌شیر صغیر جمعیت نقده ($7/4 \pm 0/32$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. بین محتوای آکالوئید تام ترب‌شیر جمعیت مربوان ($27/12 \pm 1/18$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ترب‌شیر صغیر جمعیت‌های سنندج ($15/38 \pm 0/65$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و نقده ($7/4 \pm 0/32$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و نیز بین محتوای آکالوئید تام ترب‌شیر جمعیت سنندج ($17/42 \pm 0/77$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ترب‌شیر صغیر جمعیت نقده ($7/4 \pm 0/32$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد لیکن بین ترب‌شیر جمعیت سنندج ($17/42 \pm 0/77$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) با ترب‌شیر صغیر سنندج ($15/38 \pm 0/65$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین محتوای آکالوئیدی در ترب‌شیر جمعیت مربوان و کم‌ترین آن در ترب‌شیر صغیر جمعیت نقده ارزیابی شد (جدول ۱). محتوای آکالوئیدی ترب‌شیر جمعیت مربوان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از جمعیت سنندج و محتوای آکالوئیدی ترب‌شیر صغیر جمعیت سنندج بیش‌تر از جمعیت نقده بود. بیش‌ترین مقدار نیترات مربوط به ترب‌شیر صغیر جمعیت نقده ($86/46 \pm 2/49$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و کم‌ترین آن مربوط به ترب‌شیر جمعیت مربوان ($42/46 \pm 2/39$ میکروگرم بر گرم وزن خشک) است.

آنالیز خاک

نتایج حاصل از آنالیز خاک نشان داد که بافت خاک در مناطق مریوان، سنندج (تربشیر) و نقده، لومی-رسی و در منطقه سنندج (تربشیر صغیر) شنی-لومی است. خاک هر چهار منطقه دارای pH قلیایی ضعیف است. بیشترین مقدار نیتروژن کل و پتاسیم مربوط به نقده و کمترین مقدار مربوط به مریوان است (جدول ۲).

جدول ۲. برخی ویژگی‌های خاک مناطق نمونه برداری

منطقه	گونه	اسیدیته	نیتروژن کل (درصد)	پتاسیم قابل جذب (میلی‌گرم/کیلوگرم)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	شن (درصد)	بافت خاک
مریوان	تربشیر	۷/۵	۰/۱۱	۱۸۰	۴۲	۳۵	۲۳	لومی-رسی
سنندج	تربشیر	۷/۱	۰/۱۵	۴۱۱	۳۶	۳۹	۲۵	لومی-رسی
سنندج	تربشیر صغیر	۷/۵	۰/۱۳	۳۱۲	۶	۱۲	۸۲	شنی-لومی
نقده	تربشیر صغیر	۷/۵	۰/۲۳	۶۴۷	۴۶	۳۳	۲۱	لومی-رسی

همبستگی بین مشخصات خاک منطقه رویش و محتوای آلکالوئید تام

همبستگی بین محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی گیاه تربشیر و محتوای نیترات غدد زیرزمینی، ارتفاع محل رویش، pH خاک، نیتروژن کل، پتاسیم و بافت خاک با نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ محاسبه شد. نتایج نشان داد بین محتوای آلکالوئید تام از سویی با نیتروژن کل و پتاسیم خاک و از سوی دیگر با محتوای نیترات غدد زیرزمینی رابطه معکوس و معنی‌داری وجود دارد. در سایر موارد ضریب همبستگی بسیار ضعیف به دست آمد (جدول ۳). جدول ۳. ضریب همبستگی بین محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی تربشیر و تربشیر صغیر و محتوای نیترات غدد

زیرزمینی، ارتفاع محل رویش، اسیدیته، ازت، پتاسیم و بافت خاک

ضریب همبستگی	معادله خط همبستگی	همبستگی بین
۰/۹۰۷ *	$Y = -0.391x + 43.47$	نیترات و آلکالوئید تام
۰/۰۱۸	$Y = -0.003x + 23.24$	ارتفاع و آلکالوئید تام
۰/۰۰۲	$Y = -1.966x + 31.38$	اسیدیته و آلکالوئید تام
۰/۷۸۹ *	$Y = -1.36/9x + 38/0.6$	نیتروژن و آلکالوئید تام
۰/۸۶۷ *	$Y = -0.38x + 31/64$	پتاسیم و آلکالوئید تام
۰/۰۰۹	$Y = -0.20x + 17/77$	شن و آلکالوئید تام
۰/۰۳۴	$Y = 0.276x + 25/0.9$	رس و آلکالوئید تام
۰/۰/۰۰	$Y = 0.11x + 16/47$	سیلت و آلکالوئید تام

* تفاوت در سطح ۵ درصد معنی‌دار است

بحث

اگرچه سنتز آلکالوئیدها در اصل تحت کنترل عوامل ژنتیکی است، اما آشکارا تحت تأثیر عوامل محیطی و تغییرات آنها نیز قرار می‌گیرد [۵]. نیترات به‌عنوان منبعی نیتروژنی در محیط بر روی رشد، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به‌عنوان یکی از عوامل کلیدی در تغذیه نیتروژنی محدودکننده رشد، نمو و تولید پروتئین در گیاهان و سنتز آلکالوئیدها مؤثر است [۶]. نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز ضریب همبستگی نشان داد که بین نیترات با

محتوای آلکالوئید تام رابطه معکوس و معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). با افزایش میزان نیترات، محتوای آلکالوئید تام گیاه کاهش می‌یابد. نیترات یکی از منابع تغذیه نیتروژنی گیاه است. اولین مرحله احیای نیترات با آنزیم نیترات ردوکتاز انجام می‌شود. نیتريت حاصل از این فرایند با نیتريت ردوکتاز به آمونیوم تبدیل می‌شود و آمونیوم نیز برای سنتز اسیدهای آمینه (دگرگوهره‌های اولیه) مصرف می‌شود. دگرگوهره‌های اولیه مستقیماً در رشد و سوخت و ساز درگیر هستند [۷]. همه آلکالوئیدها (دگرگوهره‌های ثانویه) حاوی نیتروژن هستند. این ترکیبات از اسیدهای آمینه و واکنش‌های ترانس آمیناسیون به‌وجود می‌آیند [۱۲]. با افزایش نیترات پیش‌سازهای اسیدآمینه برای دگرگوهرش اولیه و پیش‌سازهای مشترک در مسیرهای دگرگوهره اولیه و ثانویه، برای تولید زی‌توده و تداوم رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند و در نتیجه عوامل محرک زی‌توده از جمله افزایش نیترات، محتوای آلکالوئید تام را کاهش می‌دهند [۱۸]. اسکلت کربنی دگرگوهره‌های ثانویه از کربوهیدرات‌ها تأمین شده و طی فرآیند فتوسنتز ایجاد می‌شود. دگرگوهره‌های اولیه دیگری که در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، اسیدهای آمینه هستند [۱۲]. زیرا احیای نیترات نیاز به احیاکننده، انرژی و اسکلت کربنی دارد، این فرآیند در ارتباط تنگاتنگ با فتوسنتز و متابولیسم کربن است. تجمع نیترات منجر به کاهش سنتز و تجمع کربوهیدرات می‌شود و بخش بزرگی از کربن از طریق گلیکولیز و چرخه اسیدسیتریک به اسیدهای آلی تبدیل می‌شوند. در حضور مقادیر زیاد نیتروژن، مالات، سترات و سوکسینات افزایش می‌یابند. این اسیدهای آلی می‌توانند به‌عنوان پیش‌سازهای کربنی برای اسیدهای آمینه عمل کنند و همچنین از قلیایی شدن^۱ جلوگیری می‌کنند [۱۹]. تا کنون روی استخراج و اندازه‌گیری محتوای آلکالوئید تام این گونه‌ها و بررسی اثر عوامل محیطی روی آن پژوهشی صورت نگرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات زیرمطابقت می‌کند. ایران‌بخش (۱۳۸۳) با تحقیق روی داتورا^۲ نشان داده است که افزایش غلظت نیترات موجب کاهش بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان می‌گردد [۸]. دمیر^۳ و دژاگرا^۴ (۱۹۸۸) گزارش کردند که افزایش غلظت نیترات در ریشه‌های تراریخت داتورا استرامونیوم باعث افزایش زی‌توده می‌گردد ولی بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی را مهار می‌کند [۱۸].

رویز^۵ و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند افزایش غلظت نیترات در تنباکو باعث افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و احیای بیش‌تر نیترات و در نتیجه افزایش زی‌توده و همچنین افزایش تولید آلکالوئید می‌گردد [۲۰]، که این نتیجه با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی ندارد.

نتایج حاصل از بررسی همبستگی‌ها نشان داد بین محتوای آلکالوئید تام نمونه‌های گیاهی و اسیدیته، بافت خاک و ارتفاع محل رویش ضریب همبستگی بسیار ضعیف است (جدول ۳). بنا بر این شاید بتوان نتیجه گرفت که تأثیر این عوامل در تفاوت مشاهده شده بین محتوای آلکالوئیدی گیاهان ناچیز است و این تفاوت‌ها به‌طور عمده به سایر عوامل خاکی منطقه یعنی نیتروژن کل و پتاسیم خاک بستگی دارد. گونه تریبشیر از دو منطقه مریوان و سنندج جمع‌آوری شد. این دو منطقه از نظر نیتروژن کل و پتاسیم خاک تفاوت دارند. نیتروژن کل و

۱. alkalization

۲. *Datura stramonium*

۳. Demeyer

۴. Dejaegere

۵. Ruize

پتاسیم خاک منطقه مریوان به ترتیب ۰/۱۱ درصد و ۱۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، در حالی که در منطقه سنندج ۰/۱۵ درصد و ۴۱۱ میلی‌گرم در کیلوگرم است. گونه تربشیر صغیر از دو منطقه سنندج و نقده جمع‌آوری شد. نیتروژن کل و پتاسیم خاک در منطقه سنندج به ترتیب ۰/۱۳ درصد و ۳۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم و در منطقه نقده ۰/۲۳ درصد و ۶۴۷ میلی‌گرم در کیلوگرم است. با توجه به این که گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه مریوان نسبت به سنندج دارای محتوای آکالوئیدی بیش‌تری هستند و از طرفی گونه گیاهان جمع‌آوری شده نیز یکسان است و همچنین محتوای آکالوئیدی گونه تربشیر صغیر جمعیت سنندج نسبت به نقده بیش‌تر است، به نظر می‌رسد که شرایط خاص منطقه مریوان برای گونه تربشیر و منطقه سنندج برای تربشیر صغیر مانند نیتروژن کل و پتاسیم خاک موجب افزایش محتوای آکالوئیدی این جمعیت‌ها نسبت به جمعیت‌های مریوان و نقده می‌شود.

محتوای آکالوئید گیاه معمولاً به سطح نیتروژن قابل دسترس بستگی دارد. در طی مسیر بیوسنتز آکالوئیدها نیتروژن موجود در پیش‌ساز می‌تواند آزاد شود و یا نیتروژن اضافه به مولکول پیوند شود. بعضی پیش‌سازهای آکالوئیدی از نظر نیتروژن نسبت به خود آکالوئید غنی‌تر هستند و در بعضی موارد آکالوئیدها غنی‌تر از پیش‌سازهایشان هستند. این می‌تواند دلیلی بر این موضوع باشد که بعضی آکالوئیدها نسبت به مقدار نیتروژن قابل دسترس برای گیاه حساس‌تر از بقیه هستند [۱۲]. غلظت آکالوئیدها باید با افزایش سطح نیتروژن قابل دسترس افزایش یابد به دلیل این که این ترکیبات برای بیوسنتز نیاز به نیتروژن دارند [۱۸]. در این تحقیق بین محتوای آکالوئید تام و مقدار نیتروژن کل خاک رابطه معکوس معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳) و با افزایش میزان نیتروژن محتوای آکالوئید تام کاهش می‌یابد. این نشان می‌دهد که بیوسنتز آکالوئیدهای این گیاه احتمالاً به‌قدرت نسبت به نیتروژن محدود هستند و غلظت آن‌ها ممکن است بیش‌تر به میزان کربن قابل دسترس وابسته باشند [۱۸].

نتایج حاصل از این تحقیق با برخی پژوهش‌ها سازگار نیست که از جمله این موارد عبارتند از:

دیلمقانی و همکاران (۱۳۸۶) اعلام کردند که با افزایش مقدار ازت خاک میزان هیوسیامین و اسکوپولامین در دو گونه از جنس بذربنج^۱ افزایش می‌یابد [۵]. خوش لهجه و ارادتمند (۲۰۱۳) گزارش کردند که با افزایش مقدار ازت، میزان آکالوئید فیزالین^۲ در گیاه عروسک پشت پرده^۳ افزایش می‌یابد [۲۱].

آنالیزهای آماری مشخص کرد که بین محتوای آکالوئید تام نمونه‌های گیاهی و مقدار پتاسیم موجود در خاک رابطه معکوس و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). این یون به‌طور مستقیم فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز آکالوئیدها را با تأثیر بر روی پیکربندی پروتئین تنظیم می‌کند [۵]. با توجه به این که آکالوئیدهای جنس تربشیر از آمینواسیدهای تیروزین و لیزین سنتز می‌شوند و از طرفی لیزین تحت تأثیر لیزین دکربوکسیلاز به پیش‌ساز آکالوئیدی کاداورین (آمین) تبدیل می‌شود و نیز تیروزین تحت تأثیر تیروزین دکربوکسیلاز به تیرامین تبدیل می‌شود [۱۲]. این احتمال وجود دارد که کاهش پتاسیم عرضه این پیش‌سازهای آکالوئیدی رابا افزایش فعالیت آنزیم‌های لیزین دکربوکسیلاز و تیروزین دکربوکسیلاز افزایش دهد.

۱. *Hyosyamus L.*۲. *physaline*۳. *Physalis alkekeng L.*

دیلمانی و همکاران (۱۳۸۶) با کار بر روی دو گونه بذربنج بیان کردند که تراز پایین‌تر پتاسیم به افزایش میزان تروپان آکالوئیدها منجر می‌شود. این مسئله نشان می‌دهد که کاهش یون پتاسیم عرضه پیش‌ساز آکالوئید را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آرژنین‌دکربوکسیلاز و اورنیتین‌دکربوکسیلاز که مسئول سنتز پیش‌ساز پلی‌آمینی پوترسین هستند، افزایش می‌دهد. اگرچه این امر به بررسی‌های بیشتر نیاز دارد، زیرا اطلاعات محدودی در باره تأثیر مواد معدنی بر بیوسنتز دگرگورده‌های ثانویه وجود دارد [۵].

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که بین محتوای آکالوئید تام گونه تربشیر جمعیت‌های مریوان و سنندج و همچنین بین محتوای آکالوئیدی گونه تربشیر صغیر جمعیت‌های سنندج و نقده اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). علاوه بر اثر مشخصات خاک منطقه که در بالا ذکر شد، این تفاوت می‌تواند مطابق با سایر مشخصات گونه‌ها باشد: حضور چندین کم‌دیوم^۱ در داخل هر دو گونه کم‌دیوم‌ها به یک گروه از گیاهان درون یک گونه مربوط می‌شود که خصوصیات مورفولوژیکی یکسان دارند ولی از نظر شیمیایی متفاوتند. حضور این ترکیبات می‌تواند منجر به ایجاد تنوع در نوع و محتوای ترکیبات معینی از جمله دگرگورده‌های ثانویه شود. این ترکیبات می‌توانند نیمرخ‌های شیمیایی بسیار متفاوت تولید کنند. جمعیت‌های مختلف در خیلی از گونه‌های گیاهی از نظر شیمیایی تنوع زیادی از خود نشان می‌دهند [۲۲].

گابریل^۲ و همکاران (۱۹۹۳) با کار بر روی گونه تربشیر جمع‌آوری شده از دو منطقه فلسطین اشغالی گزارش کردند که تفاوت‌های کمی بین محتوای آکالوئیدی نمونه‌های دو منطقه به‌علت حضور چندین کم‌دیوم در داخل تربشیر وجود دارد [۱۱].

در پژوهش کامالیدینو^۳ و همکاران (۱۹۶۹)، مقایسه‌ای بر روی اندام‌های هوایی لئونتیس آلبرتی^۴ از مناطق مختلف محتوای آکالوئید تفاوت کمی نشان داد [۲۳].

بین محتوای آکالوئید تام تربشیر جمعیت مریوان و تربشیر صغیر جمعیت‌های سنندج و نقده و محتوای آکالوئید تربشیر جمعیت سنندج و تربشیر صغیر جمعیت نقده تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، ولی بین تربشیر جمعیت سنندج و تربشیر صغیر سنندج، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). از آنجا که سنتز ترکیبات آکالوئیدی تحت کنترل فرایندهای ژنتیکی است، این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و نیز تفاوت در محل انتشار گونه‌ها است. عدد کروموزومی تربشیر $2n=16$ (B+8=n) و تربشیر صغیر $2n=14$ است [۲۴]. تربشیر به‌صورت علف هرز در اراضی زراعی و به‌ندرت در مراتع با خاک عمیق می‌روید و تربشیر صغیر در ارتفاعات و اراضی سنگلاخی و فقیر می‌روید [۱]. در این زمینه تحقیقات زیادی صورت گرفته است از آن جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد:

گابریل و همکاران (۱۹۹۳) نیمرخ آکالوئیدی اندام‌های مختلف تربشیر و لئونتیس اورسمانی^۵ بررسی و بیان کردند که تفاوت چشمگیر بین نیمرخ آکالوئیدی دو تاکسون با سایر ویژگی‌های آن‌ها مانند انتشار (جغرافیای زیستی)

۱. Chemodemes ۲. Gabriele ۳. Kamalidtinov ۴. *L. albertii* Rgl ۵. *L. ewersmannii* Bge

و سطح پلوئیدی مطابقت دارد [۱۱]. دیلمقانی و همکاران (۱۳۸۶) در بررسی میزان آکالوئیدهای تروپان هیوسيامین و اسکوپولامین در دو گونه بذرالبنج اعلام کردند که گونه آراکونئیدس^۱ از نظر تراز آکالوئیدی غنی‌تر از گونه رتیکولاتوس^۲ است و از نظر ژنتیکی توان بیوسنتزی بالاتری دارند. تأیید تفاوت‌های کمی مشخص درون یک جنس به روشنی می‌تواند نشان دهد که خزانه اختلافات ژنتیکی بزرگی در بین گونه‌های جنس هیوسياموس^۳ وجود دارد که در تولید تروپان آکالوئیدها به‌کار گرفته می‌شود. عوامل اکولوژیکی تولید این آکالوئیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵]. عواملی که رشد و نمو و بیوسنتز ترکیبات ثانویه را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند، عوامل اکولوژیکی، ژنتیکی، محل انتشار و میزان مواد مغذی خاک هستند [۹].

نتیجه‌گیری

اگرچه سنتز آکالوئیدها تحت کنترل ژنتیک است، ولی با توجه به همبستگی‌های حاصل و نیز تفاوت معنی‌دار محتوای آکالوئید تام گونه‌های یک‌سان از مناطق مختلف با یکدیگر می‌توان نتیجه گرفت که محتوای آکالوئید تام تحت اثر عوامل محیطی و تغییرات آن‌ها قرار می‌گیرد. در تحقیق‌های بعدی می‌توان گونه‌های مناطق بیش‌تری را بررسی کرد و نقش تغییرات غلظت عناصر بر محتوای آکالوئیدی این گیاه نیز در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی به‌صورت دقیق‌تر بررسی کرد.

قدردانی

از همکاری خانم‌ها فضا محمدی، مهندس ندا فرناد و جناب آقای دکتر احمد پورستار سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

۱. حسین معروفی، فلور ایران، شماره ۵۶، تیره شیرینجه، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (۱۳۸۶).
۲. پدانه نجفی، جغرافیای عمومی استان کردستان، انتشارات امیرکبیر (۱۳۶۹).
۳. خلاصه سیمای آب و هوا، اقلیم و منابع آب استان آذربایجان غربی، اداره کل مطالعات و بررسی‌های اقتصادی، (۱۳۸۸) ۳-۶.
۴. امیرحسین خوش‌گفتار منش، ارزیابی وضعیت تغذیه ای گیاه و مدیریت بهینه کودی (تالیف)، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان (۱۳۸۶۳).
۵. کمال الدین دیلمقانی، حمید فهیمی، رمضانعلی خاوری‌نژاد، حسن حکمت‌شعار، مقایسه میزان آکالوئیدهای تروپان گونه‌های *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark و *Hyoscyamus reticulates* L. در مراحل مختلف رشد، مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی (۱۳۸۶) ۵۰، ۶۶-۶۱.

۱. *H. arachnoideus* Pojark

۲. *H. reticulates* L.

۳. *Hyoscyamus*

۶. رمضانعلی خاوری نژاد، ندا محمدی، تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیم بر رشد و فعالیت آنزیم نیترات‌ردوکتاز و مقدار تروپان آکالوئیدها در گیاه بنگدانه، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم (۱۳۸۶) جلد ۷، شماره ۴، ۹۶۳-۹۷۲.
۷. لینکولن تاپز، ادواردو زایگر، فیزیولوژی گیاهی، ویرایش سوم، انتشارات خانه زیست شناسی (۲۰۰۲)، ۳۲۹-۳۴۳.
۸. علیرضا ایران‌بخش، بهینه‌سازی رشد و تولید آکالوئیدهای تروپانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تاتوره، پژوهش و سازندگی (۱۳۸۳) شماره ۶۲.
۹. محمدجمال سحرخیز، تأثیر زمان برداشت میوه گیاه دارویی آنیسون بر اسانس و مواد متشکله آن، پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (۱۳۸۱).
10. S. Sahranavard, F. Naghibi, M. Mosaddegh, S. Esmaili, P. Sarkhail and S. Ghafari, "Cytotoxic activities of selected medicinal plants from Iran and phytochemical evaluation of the most potent extract", *Research in Pharmaceutical Sciences*, 4 (2009) 133-137.
11. G. Gabriele, P. Bachman, L. Wittet and E. C. Czygan, "Distribution and taxonomic significance of Quinolizidine alkaloids in *L. leontopetalum* and *L. ewersmannii* (Berberidaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 21 (1993) 679-685.
12. T. Aniszewski, "Alkaloids-secret of life alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological roles", 1nd Ed, Elsevier, (2007) 140-190.
13. B. Nickavar, A. Alinaghi, M. Kamalinegad, "Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species", *Phytochemistry*, 7 (2006) 203-209.
14. S. Iskandarov, S. Y. U. Yunusov, "Alkaloids of *darvasica*", 5 (1969) 132.
15. F. Shamsa, H. Monsef, R. Ghamoshi, M. Verdian-rizi, "Spectrophotometer determination total alkaloid in some Iranian medicinal plant", *Pharmaceutical Science*, 32 (2008) 17-20.
16. L. Krenn, S. Glantschig and U. Sorgner, "Determination of five major opium alkaloids by Reversed-phase high-Performance liquid chromatography on a base-Deactivated Stationary Phase", *Chromatographia*, 47 (1998) 21-24
17. D. A. Cataldo, M. Haroon, L. E. Schrader, V. L. Youngs, "Rapid colorimetric determination nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid", *Common in Soil Science and Plant Analysis*, 6 (1975) 71-80.
18. K. Demeyer, R. Dejaegere, "Influence of the mineral nutrition on yield and alkaloid content in *Darura stramonium*", *Medelingen Van de Faculteit*, 53 (1988) 1723-1725.

19. S. Rasmussen, A. J. Parsons, K. Fraser, H. Xue, J. A. Newman, "Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply", carbohydrate content, and fungal endophyte Infection, *Plant Physiology*, 146 (2008) 1440-1453.
20. J. M. Ruiz, L. R. Lopez-Lefebvre, E. Sanchez, R. M. Rivero Pablo, C. Garcia, L. Romero, "Preliminary studies on the influence of boron on the foliar biomass and quality of tobacco leaves subjected to NO⁻³ fertilization", *Science of Food and Agriculture*, 81(2001) 739-744.
21. A. Khoshlahjeh, D. Eradatmand Asli, Z. Lotfi, Z. Fakharian Kashani, M. Shirmard, "Effects of pyridoxine and different levels of nitrogen on qualitative and quantitative yield of *Physalis alkekengi*", 3, 6 (2013) 204-211.
22. M. Lavrieux, J. Jacob, C. Lemilbeau, R. Zocatelli, K. Masuda, J. Breheret, J. Disnar, "Occurrence of triterpenyl actates in soil and their potential as chemotaxonomical markers of Asteraceae", *Organic Geochemistry*, 42 (2011) 1315-1323.
23. D. D. Kamalitdinov, S. Iskandarov, S. Y. Yunusov, "A study of the alkaloids of *albertii*", *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5 (1969) 409-412.
24. J. W. Nowicke, J. J. Skvarla, "Pollen Morphology and Phylogenetic Relationships of the Berberidaceae", *Smithsonian Institution Press*, 50 (1981).