

تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر رشد و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و مقدار تروپان آکالوئیدها در گیاه بنگدانه^۱

رمضانعلی خاوری نژاد، ندا محمدی: دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

بنگدانه^۱ یکی از گیاهان دارویی غنی از آکالوئیدهای تروپان است. در این تحقیق تأثیر نیترات و آمونیوم بر متابولیت ثانویه و سایر پارامترهای فیزیولوژیک، بررسی شد. 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 کمتر 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 با بالا رفتن غلظت آمونیوم به طور معنی‌داری کاهش یافت. با وجود آمونیوم در غلظت‌های کم به همراه نیترات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش یافت اما با افزایش غلظت آمونیوم فعالیت آنزیم کاهش یافت. بیش‌ترین مقدار آکالوئیدهای تروپان در شرایطی حاصل شد که هر دو یون در محلول غذایی وجود داشت و غلظت آمونیوم کمتر از نیترات بود.

مقدمه

بنگدانه گیاهی علفی، یک‌ساله و متعلق به خانواده سیب زمینی است [۲]. این گیاه به دلیل وجود تروپان آکالوئیدها دارای خواص دارویی است. از خواص دارویی گیاه می‌توان به اثر ضد تشنج، آرام‌کنندگی درد، تخدیر، بازکننده مردمک چشم و خواب آور بودن اشاره کرد و در مواردی که نتوان تریاک تجویز کرد، همچنین در بیماری‌هایی با منشأ عصبی و اختلالات دماغی استفاده می‌شود. این گیاه در بیماری‌های دستگاه تنفسی مانند سرفه‌های تشنجی، سل، برونشیت مزمن، صرع، هیستری و به علت دارا بودن هیوسین زیاد در بیماری پارکینسون استفاده می‌شود [۳].

بررسی کشت بافت گیاه نشان داده است که تروپان آکالوئیدها در ریشه بنگدانه سنتز می‌شوند [۴]. هیوسیامین، آتروپین، اسکوپولامین (هیوسین) سه آکالوئید موجود در خانواده سیب زمینی محسوب می‌شوند. هیوسیامین اولین بار در سال ۱۸۳۳ از گیاه تاجریزی جدا شد و در همان سال از بذربنج هم به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: آمونیوم، بنگدانه، نیترات، نیترات ردوکتاز

دریافت ۸۵/۱/۹

پذیرش ۸۷/۱/۳۱

۱-Hyoscyamus Pusillus L.

اسکوپولامین یا هیوسین با فرمول ($C_{17}H_{21}N_{54}$) اولین بار در سال ۱۸۸۱ از گیاه *Hyoscyamus muticus* و *Scopolia atropides*) جدا شد. هیوسین به صورت نمک کلرید و برومید دیده شده است که هر دو حالت متبلور دارند و به خوبی در آب حل می‌شوند [۵].

از آنجا که بسیاری از آلكالوئیدها فرآورده‌های فرعی و بی‌اهمیت متابولیسم نیتروژن گونه‌هایی هستند که در آن‌ها یافت می‌شوند و از طرفی در مسیر بیوسنتزی آلكالوئیدهای تروپان یک پیش‌ساز پلی‌آمینی به نام پوترسین دخالت دارد، غلظت و نوع نیتروژن مصرفی و همچنین نسبت کربن/ نیتروژن در محیط تغذیه گیاه تأثیر عمده‌ای در سنتز آلكالوئید خواهد داشت [۶].

Akao و همکارانش در سال ۱۹۹۷ با تغییر ترکیب محیط کشت میزان رشد و تولید تروپان آلكالوئیدها را در تار کشنده ریشه گیاه *Atropa belladonna* بررسی کردند. افزودن غلظت محیط کشت باعث کاهش میزان رشد و تولید تروپان آلكالوئیدها شد. رقت محیط کشت و کاهش غلظت نیتروژن میزان رشد و تولید آلكالوئید را افزایش داد [۷].

از نظر کمی، نیتروژن دومین ماده کمی سازنده بافت گیاهی است که ۱/۵٪ ماده خشک را بعد از کربن تشکیل می‌دهد. نیتروژن یکی از مولکول‌هایی است که در متابولیسم گیاه نقش اصلی را دارد؛ مثلاً در جوانه‌زنی بذور و در ساختار بافت‌ها (دیواره و غشا)، مولکول‌های پروتئین، اسید نوکلئیک و رنگیزه‌ها دخالت مستقیم دارد [۸]. گیاه از طریق سیستم ریشه‌ای نیترات و یا آمونیوم محلول در خاک را جذب می‌کند. همانندسازی نیترات شامل یک مرحله احیاست که قبل از همانندسازی واقعی صورت می‌گیرد. بنابراین از نظر تئوری آمونیوم باید از نظر انرژی بسیار اقتصادی‌تر از نیترات باشد زیرا مستقیماً قابل هضم است. ولی نیترات بهترین بازده رشد و تولید را می‌دهد در حالی که آمونیوم غالباً نشانه‌های سمیت را ظاهر می‌سازد. بین عوامل مختلفی که تغذیه نیتراتی و آمونیاکی را متمایز می‌سازد نحوه جذب دو یون و تغییرات pH فضای درون سلولی به هنگام همانندسازی آن‌ها بیش‌تر قابل توجه است [۸].

بعد از جذب نیترات به درون سلول باید احیای آن به نیتريت توسط آنزیم نیترات ردوکتاز صورت گیرد. این آنزیم در سیتوزول سلول‌های اپیدرمی، پوست ریشه و سلول‌های مزوفیل واقع شده است [۹]. بخش‌بندی آنزیم نیترات ردوکتاز بین ریشه و اندام هوایی بسته به گونه گیاه، سن و فاکتورهای محیطی متغیر است. در بیش‌تر گیاهان علفی احیای نیترات در برگ‌ها صورت می‌گیرد؛ در حالی که در گونه‌های چوبی احیای نیترات غالباً در ریشه‌ها صورت می‌گیرد. سهم ریشه و اندام هوایی در احیای 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 [۱۰]. در شرایطی که از نیترات به عنوان منبع تغذیه نیتروژنی استفاده شود؛ فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می‌یابد. در مورد آمونیوم محققان

معتقد به نقش تنظیمی برای آنزیم یاد شده‌اند. ثابت شده است که آمونیوم در تیره عدسک آبی و گونه‌های *Neurospora* و *Chlorella* فعالیت نیترات ردوکتاز را مهار می‌کند. اما در بیش‌تر گیاهان عالی یا تأثیری بر فعالیت نیترات ردوکتاز نداشته یا باعث افزایش آن شده است [۱۱].

در این پژوهش تأثیر تغذیه با نسبت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر تغییرات رشد، میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و مقدار کمی آلکالوئیدها بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus pusillus* L) از مرکز جهاد کشاورزی استان کرمان تهیه شد. بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد به مدت ۴ دقیقه ضد عفونی گردیدند و به منظور جوانه‌زنی درون ظروف پتری محتوای کاغذ صافی مرطوب و ضد عفونی شده قرار داده شدند. دانه رست‌های یک‌نواخت انتخاب شده و به گلدان‌های حاوی ماسه منتقل شد. در هر گلدان ۴ گیاهچه قرار داده شد. گلدان‌ها تحت شرایط نوری (۸:۱۶) (تاریکی/ نور) و متوسط دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهان بنگدانه به مدت ۲۱ روز از مرحله ۵ برگی تحت تیمار نیترات و آمونیوم قرار گرفتند. گیاهان شاهد در محلول غذایی هوگلند [۱۹] که حاوی ۱۵ میلی‌مول نیتروژن به صورت نیترات است، تغذیه شدند. در سایر تیمارها به ترتیب ۱۰ میلی‌مول نیترات توام با ۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۱)، ۷/۵ میلی‌مول نیترات توام با ۷/۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۲)، ۵ میلی‌مول نیترات توام با ۱۰ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۴) به کار برده شد. pH محلول غذایی در حدود ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. تجزیه و تحلیل آماری طبق کاملاً تصادفی با ۴ تکرار صورت گرفت. بررسی‌های آماری طبق آنالیز واریانس یک طرفه آزمون LSD با نرم افزار SPSS 11.5 در سطوح معنی‌داری ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ انجام شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL صورت گرفت.

آنالیز رشد: هنگام شروع تیمارها ۴ گیاه انتخاب و ریشه آن‌ها با آب مقطر شستشو داده شد. پس از خشک کردن آب سطحی ریشه‌ها وزن تر ریشه و بخش هوایی اندازه‌گیری شد و در آون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک گردیدند (W۱). ۲۱ روز پس از اعمال تیمارها مجدداً وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی (W۲) و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی (R/S) اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز: سنجش آنزیم با روش سیم (۱۹۸۴) صورت گرفت (۲۹). ۰/۲ درصد گرم ماده تر بخش هوایی وزن شد. نمونه‌های گیاهی در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محلولی که غلظت نیترات پتانسیم در آن ۱۵۰ میلی‌مولار، پروپانول ۰/۳ درصد و تامپون فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار باشد، قرار داده شد. لوله‌ها در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند، سپس محلول صاف گردید. ۲ میلی‌لیتر از

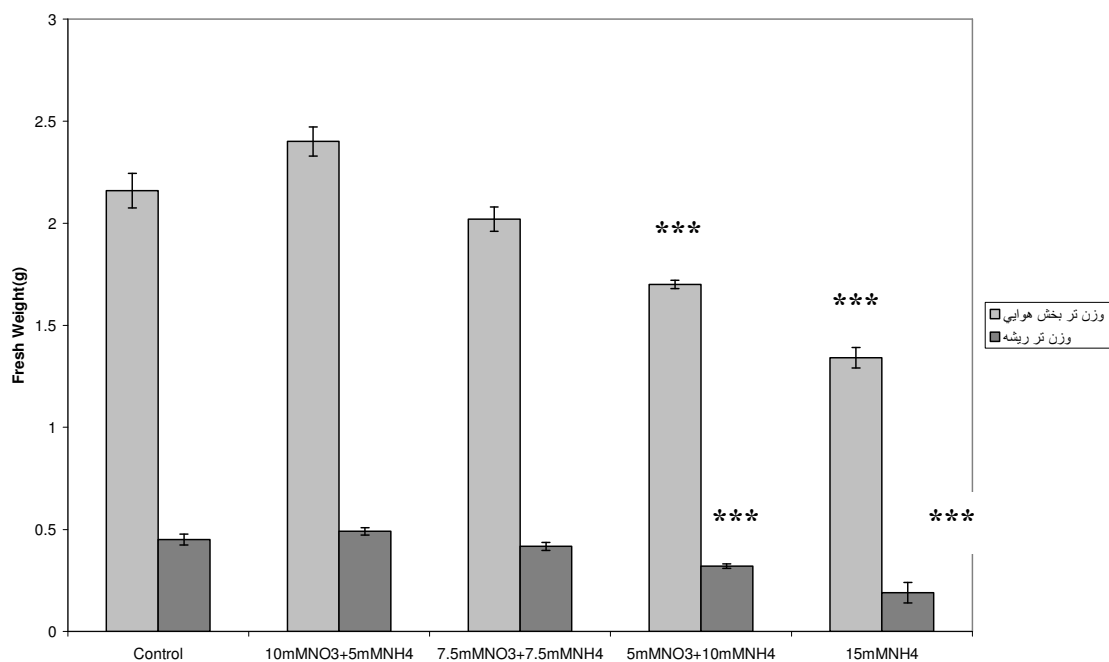
محلول مذکور برداشته، ۱ میلی‌لیتر گریس I (۰/۵) گرم سولفانیلیدک اسید در ۵۰ میلی‌لیتر استیک اسید حل و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) و گریس II (۰/۲) گرم آلفا نفتیل آمین در ۵۰ درصد میلی‌لیتر استیک اسید حل و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) به آن اضافه و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای یافتن غلظت نیتريت حاصل از احیای نیترات تحت تأثیر آنزیم نیترات ردوکتاز (C) از غلظت‌های متفاوت نیتريت سدیم برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش کمی آلكالوئیدها: این اندازه‌گیری به روش Torssel-mulrin نقل از یعقوب آئینه‌چی (۱۳۵۸) انجام شد (۱). ۳ گرم پودر گیاهی را در ظرف در بسته‌ای حاوی ۵ ml آمونیاک ۲۵ درصد خیسانده و به آن ۲۰ میلی‌لیتر 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 آلكالوئید است). محلول اسیدی را داخل آب و یخ گذاشته و با آمونیاک ۲۵ درصد قلیایی شد. سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر اتانول افزوده شد. محلول قلیایی به قیف جداکننده منتقل و ۳ تا ۴ بار با هم حجم خود با کلروفرم شستشو داده شد. سپس با سدیم سولفات بی‌آب 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 (فرم racemized از هیوسیامین) در اتانول ۲۱۰ نانومتر بود.

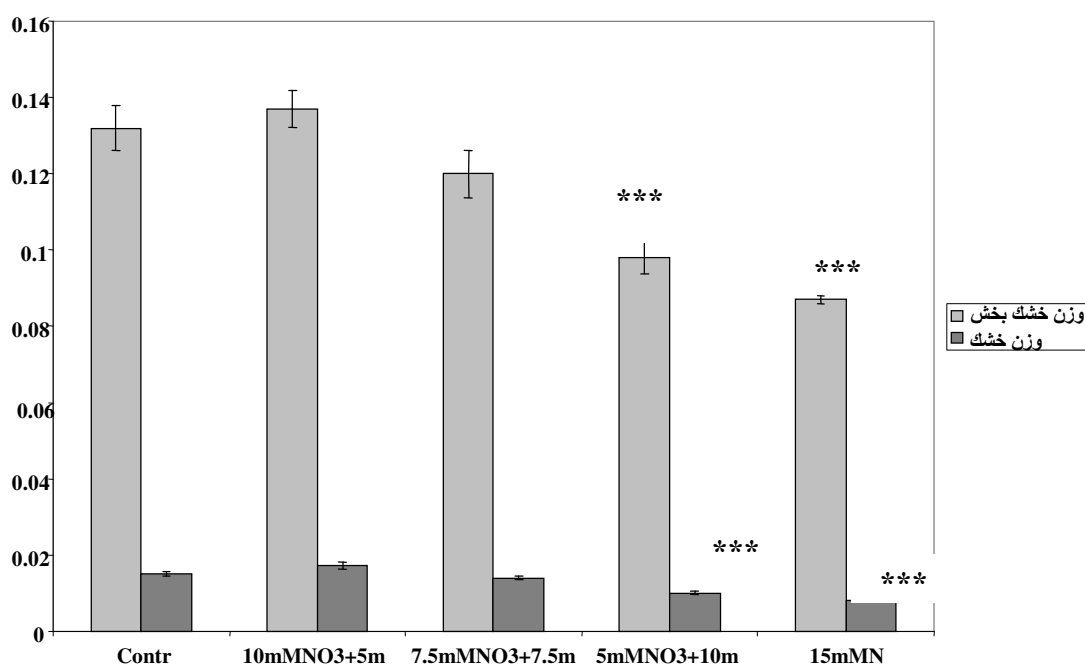
نتایج

وزن‌تر و خشک‌بخش‌هوایی و ریشه تحت تأثیر غلظت‌های فراوان آمونیوم کاهش یافت، که این کاهش در تیمارهای ۵ میلی‌مول نیترات توام با ۱۰ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۴) در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود. در غلظت‌های اندک آمونیوم در گیاهان در تیمار ۱۰ میلی‌مول نیترات توام با ۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۱) پارامترهای فوق افزایش یافت؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود. نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی (R/S) در غلظت‌های فراوان آمونیوم کاهش یافت که این کاهش در ۷/۵ میلی‌مول نیترات توام با ۷/۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۲)، ۵ میلی‌مول نیترات توام با ۱۰ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۴) در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (شکل‌های ۱، ۲، ۳).

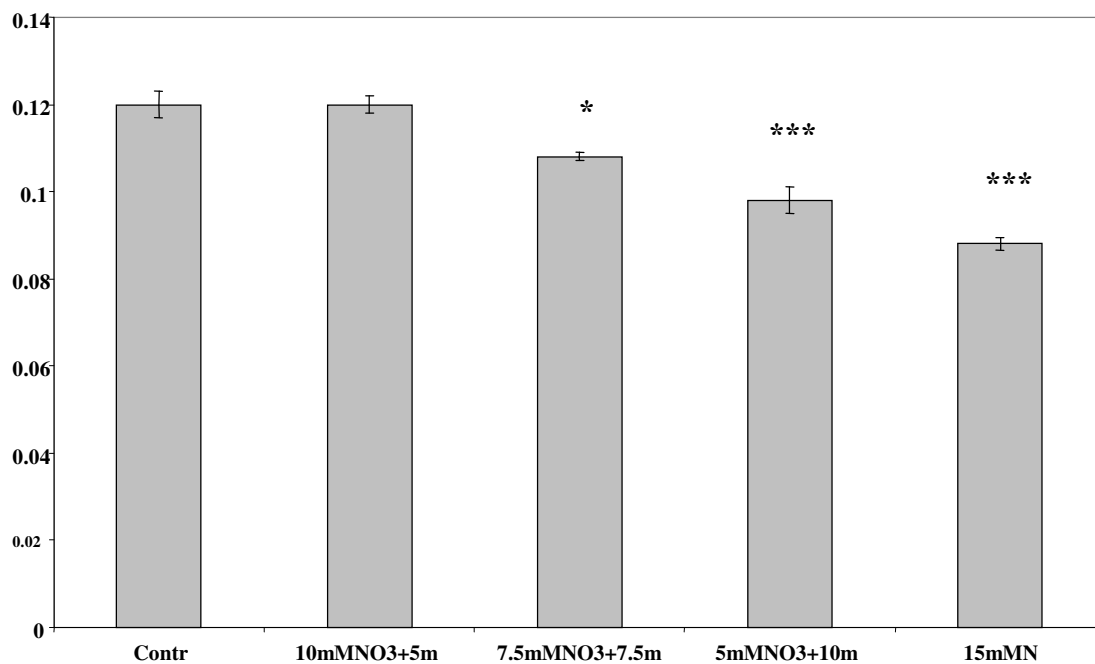
فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ۱۰ میلی‌مول نیترات توام با ۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۱)، افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ نسبت به شاهد نشان داد. در حالی که در سایر تیمارها فعالیت آنزیم کاهش یافت و این کاهش در ۵ میلی‌مول نیترات توام با ۱۰ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۴) در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (شکل ۴).



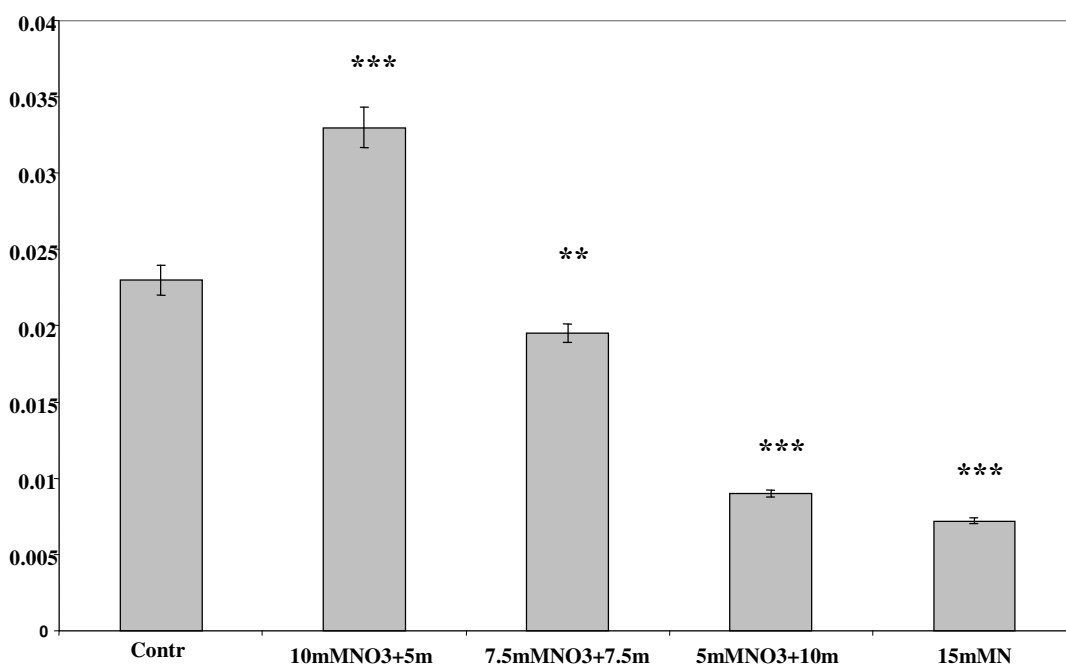
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن تر بخش هوایی و ریشه (g)



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه (g)



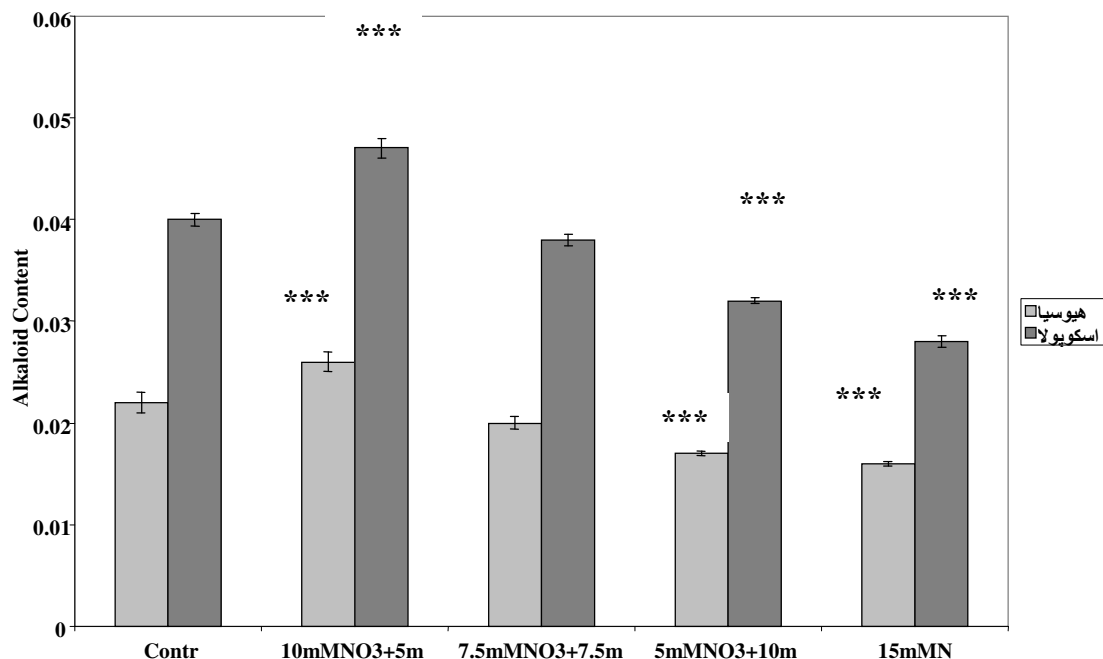
شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر نسبت ریشه به بخش هوایی



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان فعالیت نیترات ردوکتاز ($\text{mMNO}_2\text{g}^{-1}\text{fw}$)

غلظت آلکالونید هیوسیامین در ۱۰ میلی‌مول نیترات توام با ۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۱) نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نشان داد؛ اما در سایر تیمارها مقدار هیوسیامین کاهش یافت و این کاهش در ۵ میلی‌مول

نیترات توام با ۱۰ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۳) و ۱۵ میلی‌مول آمونیوم (تیمار ۴) در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (نمودار ۵).



شکل ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر میزان آکالوئیدهای برگ (dw%)

ستاره‌ها معرف سطوح معنی‌داری $p < 0/05$ (یک ستاره)، $p < 0/01$ (دو ستاره)، $p < 0/001$ (سه ستاره) برای آزمون LSD است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج اثر غلظت‌های مختلف نیترات و آمونیوم بر پارامترهای رشد نشان داد 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 تغذیه‌ای 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 [۱۳]. 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 بافت‌های گیاه می‌شود. جذب یون آمونیوم باعث شارش یون‌های هیدروژن از ریشه‌ها شده که اسیدیته ریزوسفر را می‌افزاید و همچنین آمونیوم قطع‌کننده مسیر فسفریلاسیون نوری محسوب می‌شود و تجمع آن می‌تواند از طریق کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گردد [۱۴]. بررسی سه گیاه اسفناج، آفتابگردان و نخود این نتیجه را تأیید کرد که تولید ماده خشک گیاه به‌طور 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 [۱۵].

از آنجا که در تیمار نیتراتی قندهای موجود در بخش هوایی برای تثبیت نیترات به‌کار رفته و قندهای ریشه صرف رشد ریشه می‌شوند، نسبت وزن بخش هوایی به ریشه کاهش می‌یابد؛ ولی در تغذیه با آمونیاک کربوهیدرات‌های موجود در ریشه برای تثبیت آمونیاک به‌کار می‌روند و در نتیجه رشد ریشه نسبت به بخش هوایی کاهش می‌یابد [۱۶]. 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. زیرا ذرت یک گیاه C_4 است و با فراهم کردن اسکلنت کربنی در ریشه، اثر آمونیوم را بر رشد به حداقل می‌رساند [۱۷] اما در گندم که گیاهی C_3 است، نسبت R/S در تغذیه آمونیاکی بیش از تغذیه نیتراتی بوده است و این نشان دهنده آن است که آمونیوم تأثیر سمی بیش‌تری بر ریشه اعمال کرده است [۱۸]. یکی از مراحل فیزیولوژیک که تحت تأثیر تغذیه نیتروژنی قرار می‌گیرد، مراحل جذب آب است. حضور آمونیوم در محیط تغذیه گیاه به‌عنوان تنها منبع نیتروژنی از جذب آب ممانعت می‌کند و باعث برهم زدن موازنه ارتباطات آبی گیاه می‌شود که به طور مستقیم یا غیرمستقیم روی بقیه مراحل تأثیر می‌گذارد [۱۹].

Poonnachat و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با بررسی فعالیت نیترات ردوکتاز در بافت ریشه گیاه Vaccinium نشان دادند در شرایطی که از نیترات به عنوان منبع تغذیه نیتروژنی استفاده شود، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز افزایش می‌یابد [۱۰]. نتایج Botella و همکاران 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 بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز دارد [۲۰]. 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. در این بررسی نتیجه‌ای 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 سنتر آن است تا اثر بر روی خود آنزیم [۱۸]. شایان ذکر است که مکانیسم توجیه سنتر آنزیم نیترات ردوکتاز توسط آمونیوم مختص گیاهان عالی است و در مورد قارچ‌ها و جلبک‌ها صدق نمی‌کند. در آزمایش دیگری که روی تأثیر آمونیوم بر القای پروتئین نیترات ردوکتاز (NRP) انجام گرفت معلوم شد که در حضور ۵ میلی‌مول آمونیوم، یک باند پروتئینی ظاهر شد، اما هیچ تغییری در آنزیم نیترات ردوکتاز دیده نشد. هنگامی که به محیط غذایی KNO_3 اضافه شد، پروتئین نیترات ردوکتاز فعال شد [۱۹]. نتایج حاصل از آزمایش مذکور نشان داد که اضافه کردن آمونیوم در القای و سنتر پروتئین نیترات ردوکتاز تأثیر دارد.

غلظت نیتروژن و نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت روی سنتز آلکالوئیدها تأثیر می‌گذارد [۲۲]. نتایج Bensaddek و همکارانش در سال ۲۰۰۱ روی گیاه *Atropa belladonna* نشان داد که در تیمار نیتراتی ریشه و تار کشنده (محل بیوسنتز آلکالوئید) رشد بیش‌تری دارند و این مسئله روی محتوای آلکالوئید هم تأثیرگذار است [۲۳]. افزایش نیتروژن به صورت نیترات در خاک منجر به افزایش این یون در گیاه می‌شود که عامل تولید بیش‌تر تروپان آلکالوئیدها در گیاه سالم است [۲۳]. در این آزمایش افزایش غلظت آمونیوم در مقایسه با کنترل بدون این‌که روی نسبت اسکوپولامین به هیوسامین 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.

آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژنی محیطی تأثیر متفاوتی روی رشد، آنزیم نیترات ردوکتاز به عنوان یکی از عوامل کلیدی در تغذیه نیتروژنی و یک عامل محدود کننده رشد، نمو و تولید پروتئین در گیاهان و سنتز آلکالوئیدها داشت و بهترین تأثیر مربوط به شرایطی بود که نیترات به عنوان منبع اصلی برای تغذیه گیاهان به همراه آمونیوم در غلظت اندک در نظر گرفته شود.

منابع

- ۱- آئینه چی یعقوب، "روش‌های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان". انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۵۸) ۲۳۵-۲۴۵
- ۲- خاتم ساز محبوبه فلور ایران شماره ۲۴ تیره سیب زمینی. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، (۱۳۷۲)
- ۳- زرگری علی، گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۶۶) ۵۴۶-۵۸۰
4. A. Strauss, *Hyoscyamus spp*: In vitro culture and the production of tropane alkaloids, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 7(1989) 289-314.
5. T. Hashimoto, D. Youn, Production of tropane alkaloid in genetically engineered root culture, *Phytochemistry* 32 (1993) 713-718.
6. W. Evans, J. Lampard, Alkaloids of *Datura suaveolens*, *Phytochemistry* 11(1972) 3293-3298.
7. T. Aoki, H. Matsumoto, Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Rep* 16 (1997) 282-286.
8. W.G. Hopkins, P.A. Norman, Introduction to plant physiology, Third edition chapter 8 (2004), The university of Western Ontario, John Wiley
9. E. Fedorova, J.S. Greenwood, A. Oaks, In-situ localization of nitrate reductase in maize roots, *Planta* 194(1994) 279-286.

10. M.L.C. Carelli, J.I. Fahl, Partitioning of nitrate reductase activity and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes, *Environ. Exp. Bot.* 120(2005) 65-72.
11. U. Poonacchita, R. Darnell, Effect of ammonium and nitrate of chelate reductase and nitrate reductase in *Vaccinium* species, *Annals of Botany* 93(2004) 399-405.
12. G.D. Sym, Optimisation of the in vivo assay condition for nitrate reductase in barley (*Hordeum vulgare* L.), *J.Sci Food Agric* 35(1984) 725-730.
13. R. Alan, 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 (1989) 467-474.
14. N.M. Crawford, Nitrate:nutrient and signal for plant growth, *.Plant cell* 7 (1995) 859-868.
15. B. Lasa, S. Frechilla, C. Lamsfus, P.M. Aparcio-Tego The sensivity of ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation, *Scientia Horticulturae* 91(2001) 143-152.
16. M. Aslam, Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport system in roots of intact barley seedlings, *Planta* 200 (1996) 58-63.
17. M.D. Cramer, O.A.M. Lewis, Influence of nitrate and ammonium nutrition on growth of wheat and maise plant, *Annal of Botany* 72(1993) 359-365.
18. O.A.M. Lewis, E.O. Leidi, S.H. Lips, Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maise and wheat, *New Phytologist* 11(1989) 115-160.
19. F.M. Thomas, C. Hilker, Nitrate reduction in leaves and roots of young pedunculate oakes growing on different nitrate concentrations, *Environ Exp Bot* 43(2000)19-32.
20. M. Botella, C. cruze, M. Martins, A. Cerda, Nitrate reductase activity in wheat seedlings of affected by NO_3/NH_4 ratio and salinity, *. J plant phys* 142(1993) 531-536.
21. A Oak, M Valerie, The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maise leaves, *Plant Physiol* 88(1982) 1067-1072.
22. J. Payne, J.D. Hamill, J.C. Rodes, Production of hyoscyamin by hairy root culture of *Datura stramonium*, *Planta Medica* 53(1984) 474-478.
23. L. Beshaddac, F. Gillet, J. Saucedo, M. Fliniaux, The effect of nitrate and ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots, *. Journal of Biotechnology* 85 (2001) 35-40.