مطالعه متابولیت‌های 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، ایران

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[*]نویسنده مسئول: razibiglari65@gmail.com

چکیده

گیاه بذرالبنج یکی از گیاهان دارویی مهم می‌باشد که به علت دارا بودن آلکالوئیدهای ارزشمند در اندام‌هایش در صنعت داروسازی نقش بسیار مهمی پیدا کرده است. افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت اغلب با وجود ترکیبات خاصی به نام الیسیتور یا محرک صورت می‌گیرد. کیتوزان از جمله محرک‌هایی است که از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارد. بدین منظور این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل کیتوزان در چهار سطح (۰،۵۰،۱۰۰،۱۵۰ میکرومولار) و زمان در سه بازه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با سه تکرار انجام گرفت. ابتدا با استفاده از کشت ریز نمونه‌های برگی حاصل از گیاهچه‌های درون شیشه ای در محیط کشت حاوی هورمون‌های مناسب کالوس‌زایی، کالوس‌های کافی تولید شد. کالوس‌ها در محیط مایع حاوی کیتوزان با غلظت‌ها و بازه‌های زمانی فوق قرار گرفتند. کالوس‌ها پس از برداشت عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی طیف سنج جرمی آنالیز گردید و روند تغییرات ترکیبات در جداولی با غلظت‌های ثابت و بازه‌های زمانی مختلف با هم مقایسه شد. طبق نتایج، ترکیبات حاصل از تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ کیتوزان در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت از پایداری بیش‌تری برخوردار بود و تغییرات کم‌تری در آن‌ها مشاهده شد. با توجه به این‌که اغلب ترکیبات به‌صورت تجزیه شده توسط دستگاه GC/MS شناسایی شد. تحقیق بیش‌تر جهت شناسایی منشا این ترکیبات مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، متابولیت‌های ثانویه، بنگدانه سیاه.

مقدمه

بنگدانه سیاه گیاهی (*Hyoscyamus Niger* L.) از تیره سیب زمینی و حاوی آلکالوئیدهای 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 می‌شود (امید بیگی، ۱۳۸۸). با توجه به اهمیت آلکالوئیدهای گیاه بنگدانه در پزشکی و کم بودن مقدار تولید آن‌ها در این گیاه ، پژوهش‌های فراوانی جهت افزایش میزان این آلکالوئیدها در داخل و خارج از کشور انجام شده است. فناوری زیستی با کمک روش‌هایی مانند کشت سوسپانسیون سلول، تولید کالوس و مطالعه مسیرهای موثر در تولید مواد موثره قادر به افزایش کارایی گیاهان در جهت تولید ترکیبات دارویی می‌باشد. استفاده از کشت درون شیشه ای گیاه، سبب تولید ترکیبات دارویی در شرایط کنترلی و مستقل از محیط می‌شود ذخیره متابولیت‌های ثانویه در گیاه، پاسخی از گیاه به تنش‌های محیطی است، در نتیجه می‌توان مقدار این ترکیبات را از طریق محرک‌های زیستی و غیر زیستی تحریک کرد (اسمین تانسکا، ۲۰۰۸). تاکنون محرک‌ها ی زیادی از قبیل تنش‌های محیطی، محرک‌های زیستی و غیر زیستی وغیره به‌منظور دستیابی سریع به آلکالوئیدها گزارش شده است. محققان نشان دادند استفاده از کیتوزان به عنوان محرک، باعث افزایش تولید آنتراکوئینون در گیاه (*Rubia tinctorum*) می‌شود (واسکونسوئلو و همکاران، ۲۰۰۴). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن‌دار، به ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول می شود (کیم و همکاران، ۲۰۰۴). استفاده ازمحرک کیتوزان سبب افزایش تجمع لیمونن و لینالول در کشت سلول گیاه (*Citrus Grandis*) شده است (عبدل رحمان و همکاران،۲۰۰۳). در آزمایشی، کیتوزان باعث افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه (*Artemisia annua*) شد (پاتولون و

همکـاران،۲۰۰۷). افزایش تولید لیگنان و فنیل پروپانوییـد در کشت سوسپانسـیون سـلولی (*Linum album*) تیمـار شـده بـا کیتوزان و کیتین گزارش شد (اسـماعیل زاده و همکاران، ۲۰۱۲). از کیتوزان در کشت بافت (*Muticus*) .*H* استفاده شد که منجر به افزایش ۵ برابری غلظت هیوسیامین در شرایط کشت بافت شد (سوون و همکاران، ۲۰۰۲). کیتوزان به عنوان عامل تراوش پذیر کننده در تولید آلکالوئیدها استفاده شده است (کومار و گوپتا، ۲۰۰۸).

مواد و روش‌ها

جهت بررسی اثر محرک کیتوزان بر میزان ترکیبات کالوس گیاه بنگدانه سیاه، اقدام به کالوس گیری از اندام برگ حاصل از گیاه‌چه‌های 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 (۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) از روش Popp و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. در این پژوهش از غلظت‌های ۰ و ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان استفاده شد. هم‌چنین کالوس‌ها در محیط Ms ½ مایع قرار گرفت و در فضای استریل اتاق کشت و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کالوس‌ها پس از گذراندن تیمارهای زمانی مورد نظر از محیط کشت خارج و بلافاصله عصاره‌گیری شدند.

شکل۱- اعمال محرک کیتوزان:۱) تهیه غلظت‌های مختلف کیتوزان، ۲) قرار دادن کالوس‌ها در محیط حاوی غلظت‌های کیتوزان، ۳) نگهداری در اتاق کشت و اعمال تیمارهای زمان.

جهت عصاره‌گیری 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. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک نگهداری شد. سپس مخلوط عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دورrpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را با سمپلر برداشته و در فریزر جهت سنجش ترکیبات نگهداری شد.

جدول ۱- مشخصات دستگاه (GC/MS).

دستگاه GC	مدلHP-6890 شرکت HEWLETT PACKAR آمریکا
نوع ستون	HP-5MS (5% Phenyl di methyl siloxan)
ابعاد ستون	طول۳۰ متر، قطر۰,۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰,۳۲ میکرون
برنامه ریزی دمایی ستون	دمای اولیه ۶۰درجه سانتی‌گراد(۳ دقیقه)، گرادیان دمایی۵، دمای نهایی ۲۲۰درجه
محل تزریق	Split/split less
دمای محل تزریق	۲۵۰ درجه سانتی‌گراد
گاز حامل	هلیوم با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه
دستگاه Mass	مدلHP-5973 شرکت HEWLETT PACKAR آمریکا
انرژی یونش(EI)	۷۰ الکترون ولت
دمای محفظه یونش	۲۳۰ درجه سانتی‌گراد
تجزیه‌گر جرمی	کوادروپل
دمای تجزیه‌گر جرمی	۱۵۰درجه سانتی‌گراد

نتایج

جدول ۲- ترکیبات مربوط به پیک‌های بارز حاصل از GC/MS عصاره ی کالوس‌های تیمار شده با کیتوزان.

ردیف	نام ترکیب	نوع ترکیب	ویژگی	کاربرد
۱	۴کلرو۲ متیل فنوکسی استیک اسید	اسید	مایع شفاف و بی رنگ با بوی تند و سوزاننده	علف کش انتخابی علف‌های هرز
۲	بنزالدهید	آلدئید 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
۳	۴ کلرو ۲ متیل فنول	فنل	کریستال سفید رنگ	حشره کش، علف کش، رنگ، دارو
۴	هگزا دکانوئیک اسید (پالمیتیک اسید)	استر اسید چرب	مایع روغنی	از ترکیبات روغن و اسانس
۵	متوکسی تری متیل سیلان	سیلان	مایع بی رنگ	آبگریز نمودن سطوح و مواد
۶	هیدروکسی متیل فورفورال	آلدهید حلقوی	جامدی بی رنگ و حلالیت زیاد در آب	به عنوان شاخص واکنش میلارد

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

جدول ۳- 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 ٤- 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 ٥- 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

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات آستان قدس رضوی. چاپ چهارم. ۷۸۳ صفحه.

اسمعیل زاده بهابادی، ص.، شریفی، م. ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت‌های 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., 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., Gupta, P.K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2: 93.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 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-Eknamkul, W., Tanaka, H. 2007. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of Artemisia annua L., Biotechnol Let 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.

Study of callus metabolites of Black henban (*Hyoscyamus Niger L.*) under chitosan By mass spectrometry chromatography treatment

Ruhollah Nikfekr[1], Razieh Bigleri Farash[2]*
[1] (Faculty of Payame Noor University, Yasouj Branch, Yasouj, Iran)
M.Sc. Student (Sari University of Agricultural Sciences Responsible, Sari, Iran)
Corresponding Author: razibiglari65@gmail.com

Abstract

Black henban plant is one of the important medicinal plants that has played a very important role in the pharmaceutical industry due to the presence of valuable alkaloids in its organs. Increased production of secondary metabolites in tissue culture often occurs despite the presence of certain compounds called excitators. Chitosan is one of the stimulants involved in the production of secondary metabolites by causing oxidative stress. For this purpose, this experiment was performed as a factorial experiment in a completely randomized design with two factors including chitosan at four levels (150,100,50,0 µM) and in three time intervals (24, 48 and 72 hours) with three replications. First, sufficient calluses were produced by culturing leaf specimens obtained from seedlings in vitro in culture medium containing suitable callus-producing hormones. The calli were placed in a liquid medium containing chitosan at the above concentrations and intervals. Calluses were extracted after harvest. Extracts were analyzed by mass spectrometry chromatography and the trends of treatments were compared. According to the results, changes in the compositions caused by treatments 50 and 100 of chitosan in 24 and 48 hours were more stable and less changes were observed. Given that most of the compounds were detected by decomposition by GC / MS. Further research is needed to identify the origin of these compounds.

***Keywords*:** Chitosan, Secondary metabolites, Black henban.