

تأثیر ارتعاشات مکانیکی بر محتوای فنل، الکلونید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulates L.*)

حلیمه حسن پور^{۱*} و وحید نیکنام^۲

^۱پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران صندوق پستی ۸۳۴-۱۴۶۶۵، ایران

^۲دانشکده زیست شناسی، و قطب تبارزائی موجودات زنده ایران، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۲/۳۱)

چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulates L.*) از گیاه دارویی متعلق به تیره سیب زمینی (Solanaceae) است. این گیاه حاوی آلکالوئیدهای تروپانی از جمله هیوسیامین و اسکوپولامین بوده و دارای خواص ضد اسپاسم، آنٹی کلرژنیک و ضد درد می‌باشد. ارتعاشات مکانیکی یکی از تنش‌های غیر زیستی است که می‌تواند روی رشد و نمو سلول‌های گیاهی تأثیر داشته باشد. در این پژوهش اثر ارتعاشات مکانیکی بر شاخص‌های رشد، محتوای فنلی، الکلونیدی و مهار رادیکال‌های آزاد با روش ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکرازیل (DPPH) در بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک مورد بررسی قرار گرفت. ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ هرتز) برای زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه روی بافت کالوس اعمال شد. نتایج نشان داد که پاسخ بافت کالوس در زمان‌های مختلف ارتعاش مکانیکی از نظر رشد، فعالیت آنٹی اکسیدان، محتوای فنلی و الکلونیدی متفاوت بود و بهینه‌ترین زمان اعمال ارتعاش مکانیکی در ۳۰ دقیقه مشاهده گردید. ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی‌دار پارامترهای رشد، محتوای پروتئین، پرولین، محتوای ترکیبات فنلی و الکلونیدی شد و بیشترین مقدار این پارامترها در فرکانس ۵۰ هرتز برای زمان ۳۰ دقیقه مشاهده گردید. محتوای کربوهیدرات تحت ارتعاشات مکانیکی کاهش معنی‌دار یافت و کمترین مقدار این پارامتر در فرکانس ۱۰۰ هرتز برای زمان ۴۵ دقیقه مشاهده شد. همچنین ارتعاشات مکانیکی منجر به کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد از طریق کاهش مقدار IC₅₀ شد و بیشترین کاهش نیز در فرکانس ۵۰ هرتز برای زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد. بنظر می‌رسد ارتعاشات مکانیکی در فرکانس و زمان مناسب می‌تواند به عنوان ابزاری برای افزایش رشد و محتوای متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی باشد.

واژه‌های کلیدی: ارتعاشات مکانیکی، الکلونید، بافت کالوس، بذرالبنج مشبک، پرولین، ترکیبات فنلی

مقدمه

در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارد. از این گیاه برای تهیه داروهای ضد رماتیسم، بیماری‌های عصبی و تنفسی استفاده می‌شود که به دلیل حضور تروپان الکلونیدهایی نظیر هیوسیامین، اسکوپلامین و آتروپین می‌باشد. این گیاه در استان‌های

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) گیاهی دارویی، یک ساله و متعلق به تیره سیب زمینی است (Al-Quran, 2008). بخش‌های مختلف گیاه حاوی مواد موثره آلکالوئیدی است که

محتوای الکلونیدی گیاه *H. niger* در مناطق جغرافیایی متفاوت بوده و در برگ و بذر گیاهان جمع‌آوری شده از شهر ادرمیت (Edremit) ترکیه به ترتیب ۰/۰۸۷ و ۰/۰۵۸٪ می‌باشد. تاثیر ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌های بالا بر سلول‌های گیاهی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، بنابراین در پژوهش حاضر اثر ارتعاشات مکانیکی بر تعدادی از شاخص‌های رشد و محتوای متابولیت‌های دارویی بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت بافت کالوس و اعمال ارتعاش مکانیکی: بذره‌های گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus reticulatus*) از جاده الموت قزوین در اواخر تابستان ۹۴ جمع‌آوری شد. بذرها در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ برای ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس ۳ با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از ضدعفونی جهت جوانه زنی در محیط کشت $1/2$ MS قرار گرفتند. برای از بین بردن خواب بذر، پتری دیش‌ها برای ۴۸ ساعت در یخچال قرار گرفته و سپس به اتاق کشت منتقل گردیدند. پس از جوانه زنی و رشد، قطعات جداکشت ریشه گیاهچه‌ها به محیط کشت دارای هورمون ($2,4-D=1 \text{ mg L}^{-1}$, $BA=1 \text{ mg L}^{-1}$) جهت القای کالوس منتقل شدند. کالوس‌های یک ماهه در معرض ارتعاشات مکانیکی از نوع سینوسی در چهار سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ هرتز قرار گرفتند. ارتعاشات مکانیکی با دستگاه شیکر الکترومکانیکی با مولد ارتعاش مدل DC-3200 از کشور چین ایجاد گردید. ارتعاشات مکانیکی در راستای محور Y برای زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه اعمال شد. بعد از گذشت ۳ هفته از اعمال ارتعاش، کالوس‌ها جهت انجام سنجش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جمع‌آوری شدند. مقداری از آنها برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک مورد استفاده قرار گرفتند و بخشی دیگر به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

پرویلین و کربوهیدرات: سطح پرویلین آزاد سلولی با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد. کالوس‌های تازه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی سولفوسالیسیلیک اسید

آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی انتشار دارد و به خصوص در مزارع شهرستان نقده به وفور یافت می‌شود (Guler, 2012).

ارتعاشات مکانیکی جزو تنش‌های غیرزیستی بوده و می‌توانند اثرات قابل توجهی روی رشد گیاهان داشته باشند (Bochu *et al.*, 2012). تنش‌های غیرزیستی در گیاهان می‌توانند باعث افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد و در پی آن آسیب‌های بافتی شوند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا که به وسیله رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود، می‌تواند منجر به از بین رفتن یکپارچگی غشا و عملکرد سلول شود (Alhdad *et al.*, 2013). تاکنون مطالعات کمی در ارتباط با تاثیر ارتعاشات روی سلول‌های گیاهی گزارش شده است و بیشتر مطالعات در فرکانس‌های پائین ارتعاشات می‌باشد. ارتعاشات مکانیکی در سطوح ۰ تا ۵ هرتز می‌تواند پاسخ دوگانه‌ای از نظر رشد روی سلول‌های گیاهی داشته باشد (Yang *et al.*, 2002). ارتعاشات مکانیکی در ۳ هرتز سبب افزایش رشد بافت کالوس و تجمع فیبر در دیواره سلولی بافت کالوس گیاه *Gerbera jamesonii* شد و ارتعاش بالاتر از ۳ هرتز رشد را کاهش داد (Bochu *et al.*, 2002). در سلول‌های گیاه *Camptotheca acuminata* ارتعاشات مکانیکی در ۲ هرتز سبب افزایش رشد، محتوای پروتئین‌های محلول و متابولیت‌های ثانویه شد (Kang *et al.*, 2012). در بافت کالوس گیاه *Hyoscyamus kurdicus* نشان دادند که فرکانس‌های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش رشد، محتوای نسبی آب و پروتئین شد (Hassanpour *et al.*, 2016). در ارتباط با محتوای فنلی و فلاونوئیدی گیاه بذرالبنج نیز چندین مطالعه صورت گرفته است. Jassbi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که محتوای فنلی برگ‌های گیاه *H. niger* و *H. reticulatus* به ترتیب ۷/۵ و ۹/۴ میلی‌گرم بر گرم بافت و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) به ترتیب ۲۷۰/۲ و ۲۲۴/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. Guler و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه دارای محتوای فنلی بیشتری نسبت به عصاره متانولی و استنی می‌باشد. Yilmaz و Yucel (۲۰۱۴) نشان دادند که

لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد عصاره گیری شد. عصاره بدست آمده برای ۳۰ دقیقه در دمای محیط و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به ۱ میلی لیتر از محلول رو شناور حاصل از سانتریفوژ ۲ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ که حاوی ۰/۵٪ تیوباریبوتیک اسید (TBA) بود اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. بعد از این مدت لوله های آزمایش به سرعت در یخ سرد شده و بعد از این مراحل ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط حاصل برای بار دیگر و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. جذب محلول رویی حاصل از سانتریفوژ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 و Photometric طول موج های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد.

مهار رادیکال های آزاد با DPPH: ارزیابی فعالیت مهار

رادیکال آزاد با ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) صورت گرفت. برای این منظور، محلولهایی با غلظتهای مختلف (۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۰۰، ۲/۵۰ و ۵/۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره و نیز آنتی اکسیدان سنتزی (Butylated BHT) (hydroxytoluene) در حلال متانول آماده شدند. یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت یک میلی مولار معادل با ۰/۳۹۴ میلی گرم) به ۳ میلی لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت همزده شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. در نهایت درصد مهاررادیکالهای DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac-As)/Ac \times 100$$

در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند (Shimada et al., 1992). میزان IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) به عنوان ۵۰٪ بازدارندگی محلول DPPH با استفاده از روش Von Sontag و همکاران (۱۹۸۰) تعیین شد (Von Sontag et al, 1980).

فنل کل: برای اندازه گیری محتوای فنل کل به ۱۰۰

میکرولیتر از عصاره کالوس، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم (۰/۲)،

(۳٪) هموزن شدند. ۱ میلی لیتر از محلول روشناور به همراه ۱ میلی لیتر آب مقطر در لوله آزمایش ریخته، سپس به هر کدام ۲ میلی لیتر محلول نین هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه گردید. لوله ها به مدت ۱ ساعت در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شده، پس از طی این زمان بلافاصله در حمام یخ سرد شده و پس از رسیدن به دمای محیط به هر لوله ۲ میلی لیتر تولوئن اضافه شده و ۲۰ - ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. محلول رنگی وارد فاز فوقانی تولوئن شد. فاز فوقانی جدا شده و جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 در مد Quantitative و طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای تعیین مقدار کربوهیدرات، ۰/۵ گرم از پودر خشک حاصل از بافت کالوس با استفاده از ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ در هاون سائیده شد و عصاره گیری گردید. عصاره ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد و با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور به همراه ۰/۵ میلی لیتر فنل ۵ درصد در لوله آزمایش ریخته شد و پس از ورتکس، ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۷ درصد سریعاً به آن اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب محلول حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و غلظت قند کل با استفاده از نمودار استاندارد گلوکز بدست آمد (Dubois et al., 1956).

پروتئین کل: جهت استخراج پروتئین، یک گرم بافت برگ

در حضور ۲ میلی لیتر بافر استخراج (محلول Tris-HCl یک مولار با pH ۶/۸ در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموزن گردید. سپس همگنای حاصل در یک سانتریفوژ یخچالدار ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و از محلول روشناور برای سنجش پروتئین کل استفاده کرد. غلظت پروتئین موجود در هر نمونه با روش Bradford (۱۹۷۶) و سرم آلومین گاو به عنوان استاندارد بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید.

پراکسیداسیون لیپیدها: سنجش میزان پراکسیداسیون

لیپیدها محتوای مالون دی آلدئید بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. یک گرم از بافت کالوس با ۲ میلی

۵۰ و ۱۰۰ هرتز به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد و سبز در آمدند. در فرکانس ۱۵۰ هرتز کالوس‌ها قهوه‌ای شده و کاهش رشد را نشان دادند (شکل ۱ و جدول ۱).

پاسخ وزن تر و خشک بافت کالوس در زمان‌های مختلف ارتعاشات مکانیکی متفاوت بود و با افزایش زمان تا ۳۰ دقیقه رشد بافت‌ها افزایش یافت و در ۴۵ دقیقه رشد کاهش یافت (جدول ۱). بهینه رشد در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده گردید و فرکانس‌های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی‌داری وزن تر و خشک بافت‌های کالوس نسبت به شاهد شد. فرکانس ۱۵۰ هرتز منجر به کاهش معنی‌دار رشد بافت کالوس شد ($P \leq 0/05$). بهینه رشد بافت کالوس در فرکانس ۵۰ هرتز و زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد که به ترتیب منجر به افزایش ۲۴/۴۶ و ۳۶/۶۶٪ وزن تر و خشک بافت کالوس گیاه بذراالبنج مشبک شد (جدول ۱).

محتوای پروتئین تحت ارتعاشات مکانیکی افزایش معنی‌داری یافت ($P \leq 0/05$) و بیشترین محتوای پروتئین در فرکانس ۵۰ هرتز در زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مشاهده شد (جدول ۱). فرکانس ۵۰ هرتز به ترتیب منجر به افزایش ۲۰/۶، ۴۵/۸ و ۳۴/۵٪ مقدار پروتئین در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه نسبت به شاهد شد.

محتوای پرولین با افزایش سطح فرکانس ارتعاشات مکانیکی افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲ a). بیشترین تجمع پرولین در فرکانس ۱۵۰ هرتز و زمان ۴۵ دقیقه مشاهده گردید که نسبت به شاهد یک افزایش ۶۶/۹٪ را نشان داد. برخلاف پرولین، محتوای کربوهیدرات کل تحت ارتعاشات مکانیکی بویژه در ۵۰ و ۱۰۰ هرتز کاهش معنی‌داری یافت و بیشترین کاهش در فرکانس ۱۰۰ هرتز و زمان ۴۵ دقیقه مشاهده گردید (شکل ۲ b). محتوای کربوهیدرات در زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مکانیکی بیشتر از زمان‌های ۱۵ و ۴۵ دقیقه بود.

ارتعاشات مکانیکی در ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به کاهش معنی‌دار محتوای پراکسیداسیون لیپیدها و در ۱۵۰ هرتز محتوای آن را افزایش داد (شکل ۳). ارتعاش مکانیکی در ۳۰

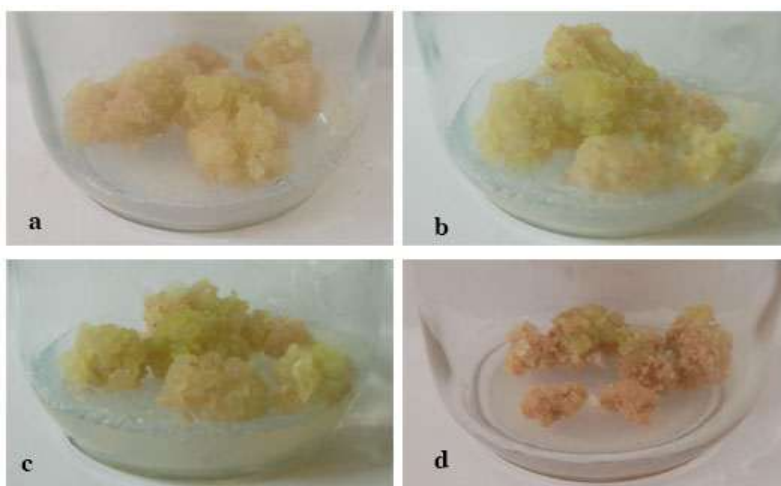
۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالچو (Folin-Ciocalteu's) (۵۰٪) اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت جذب آنها در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد ثبت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد بکار رفت. محتوای فنل کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Meda et al., 2005).

الکالوئید کل: برای سنجش محتوای آلکالوئیدها از روش Kamada و همکاران (۱۹۶۸) استفاده شد. ۲ گرم از بافت خشک کالوس پودر شده از هر نمونه، به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تری کلرید متان: متانول: آمونیاک ۲۵٪ با نسبت حجمی (۱۵: ۵: ۱) اضافه شد و برای ۲۰ دقیقه با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز با دستگاه مولد امواج فراصوت مدل AMMM، Switzerland سونیکیت شد. سپس در حمام آب ۴۰ درجه برای ۱ ساعت قرار گرفت. بعد از فیلتر شدن، رسوبات دو بار با ۱ میلی‌لیتر محلول متان تری کلرید شستشو گردید. محلول صاف شده تبخیر و خشک شد. به باقیمانده ۵ میلی‌لیتر متان تری کلرید و ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ نرمال اضافه شده و سپس به خوبی مخلوط گردید. فاز متان تری کلرید خارج شد و فاز سولفوریک اسید در حمام یخ با آمونیاک ۲۸٪ به pH 10 رسانده شد. الکالوئیدها یک بار با ۲ میلی‌لیتر و بار دوم با یک میلی‌لیتر متان تری کلرید عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها مخلوط شده و سولفات سدیم آنهیدراز اضافه گردید و فیلتر شد. باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر متان تری کلرید حل شد و میزان الکالوئید کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت محاسبه گردید.

آنالیز آماری: این پژوهش بر اساس طرح‌های کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. پردازش اطلاعات به وسیله نرم افزار آماری SPSS 18.0 و آنالیز واریانس یکطرفه در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آنالیز LSD انجام شد.

نتایج

کالوس‌ها در نمونه شاهد به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و در



شکل ۱. تصویری از بافت‌های کالوس گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) تحت ارتعاشات مختلف مکانیکی a (۰ هرتز)، b (۵۰ هرتز)، c (۱۰۰ هرتز) و d (۱۵۰ هرتز).

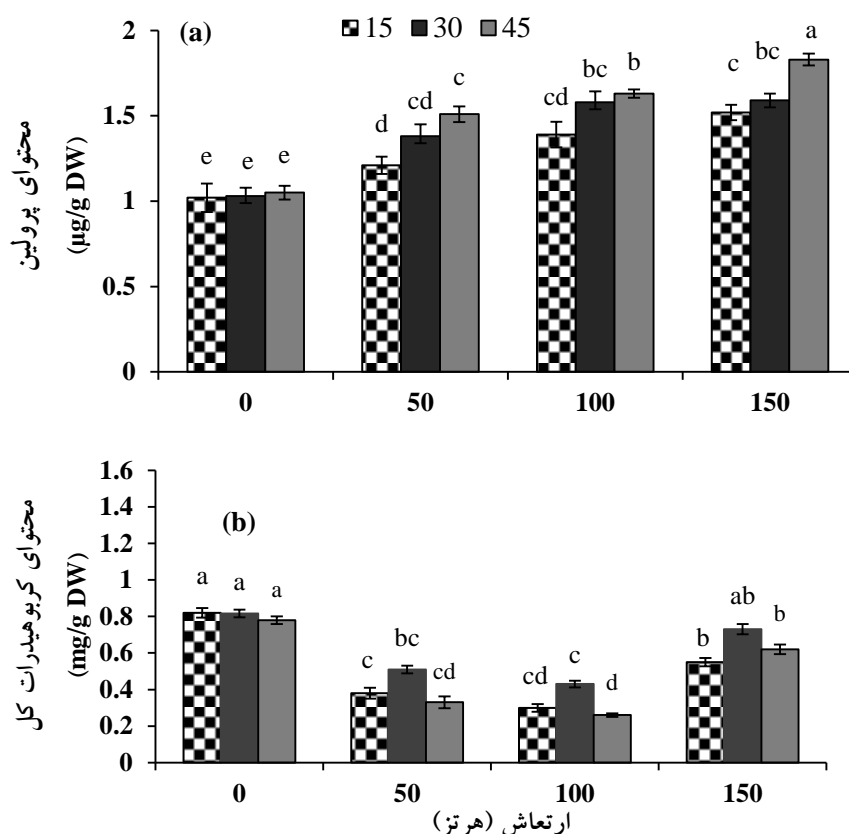
جدول ۱- تأثیر فرکانس‌های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه بر وزن تر، وزن خشک و محتوای پروتئین بافت کالوس بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)

ارتعاش (هرتز)				زمان	منابع تغییرات
۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۰		
۵/۲۱ ± ۰/۲۹۵ ^b	۵/۸۲ ± ۰/۴۹۲ ^b	۶/۳۴ ± ۰/۵۸۵ ^a	۶/۰۱ ± ۰/۴۲۶ ^a	۱۵	وزن تر
۵/۷۴ ± ۰/۴۲۱ ^c	۸/۱۲ ± ۰/۲۹۳ ^a	۸/۰۸ ± ۰/۴۳۱ ^a	۷/۰۷ ± ۰/۵۳۶ ^b	۳۰	(گرم)
۴/۲۷ ± ۰/۲۶۳ ^c	۵/۶۹ ± ۰/۳۷۲ ^b	۶/۵۱ ± ۰/۴۰۵ ^a	۶/۱۲ ± ۰/۲۱۴ ^{ab}	۴۵	
۰/۴۲ ± ۰/۰۳۳ ^d	۰/۴۸ ± ۰/۰۷۲ ^c	۰/۵۴ ± ۰/۰۵۸ ^b	۰/۵۷ ± ۰/۰۲۲ ^a	۱۵	وزن خشک
۰/۵۰ ± ۰/۰۳۳ ^b	۰/۷۴ ± ۰/۰۳۲ ^a	۰/۸۲ ± ۰/۰۴۸ ^a	۰/۶۰ ± ۰/۰۲۱ ^b	۳۰	(گرم)
۰/۴۶ ± ۰/۰۳۹ ^b	۰/۵۰ ± ۰/۰۵۲ ^a	۰/۶۹ ± ۰/۰۴۳ ^a	۰/۶۰ ± ۰/۰۱۸ ^b	۴۵	
۲۴/۳۱ ± ۱/۸۹ ^{ab}	۲۹/۲۸ ± ۲/۵۳ ^a	۲۸/۱۷ ± ۲/۰۹ ^a	۲۳/۳۶ ± ۱/۵۴ ^{ab}	۱۵	پروتئین
۲۷/۵۴ ± ۳/۶۱ ^c	۳۰/۲۸ ± ۲/۵۳ ^a	۳۴/۲۴ ± ۳/۰۹ ^a	۲۳/۴۸ ± ۲/۷۶ ^b	۳۰	(میلی گرم/گرم)
۲۳/۵۴ ± ۱/۹۸ ^b	۲۹/۹۵ ± ۲/۷۶ ^a	۳۱/۱۲ ± ۲/۱۴ ^a	۲۳/۱۴ ± ۱/۳۲ ^b	۴۵	

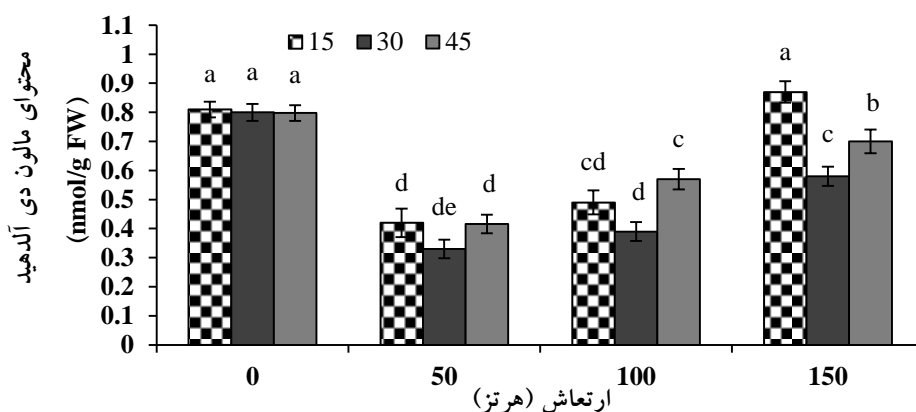
مقادیر میانگین ± تکرار ± انحراف معیار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می‌باشد.

معنی دار مقدار IC_{50} نسبت به نمونه شاهد شد ($P \leq 0.05$). کمترین محتوای IC_{50} در فرکانس ۵۰ هرتز مشاهده شد و با افزایش سطح فرکانس ارتعاش تا ۱۵۰ هرتز محتوای IC_{50} نیز افزایش یافت (جدول ۲). ارتعاشات مکانیکی در زمان‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی را از نظر محتوای IC_{50} نشان دادند و کمترین محتوای IC_{50} در زمان ۳۰ دقیقه نسبت به زمان‌های

دقیقه منجر به کاهش بیشتر محتوای پراکسیداسیون لیپیدها نسبت به زمان‌های ۱۵ و ۴۵ دقیقه شد. کمترین محتوای پراکسیداسیون لیپیدها در ۵۰ هرتز مشاهده شد و یک کاهش ۴۶٪ محتوای پراکسیداسیون لیپید را نسبت به شاهد نشان داد. ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌های مختلف منجر به کاهش



شکل ۲- تاثیر فرکانس های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه بر محتوای پرولین (a) و کربوهیدرات (b) در بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*). حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می باشد.



شکل ۳- تاثیر ارتعاشات مکانیکی بر پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*). حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می باشد.

دیگر مشاهده شد. فرکانس ۵۰ هرتز در زمان های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه به ترتیب منجر به کاهش ۱/۱۵، ۴/۲۶ و ۵/۲۱٪ محتوای IC₅₀ نسبت به نمونه شاهد شد. محتوای فنل و الکلوئید کل تحت ارتعاش مکانیکی افزایش معنی داری یافت (P ≤ ۰/۰۵). فرکانس های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی دار محتوای فنل و الکلوئید در

جدول ۲- تاثیر فرکانس های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه بر مهار رادیکالهای آزاد، محتوای فنل و الكالوئید کل بافت کالوس بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)

منابع تغییرات	زمان	ارتعاش (هرتز)			
		۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۰
IC ₅₀ (میکرو گرم/میلی لیتر)	۱۵	۵۹۸/۲ ± ۲۳/۹۵ ^a	۵۷۳/۴ ± ۱۹/۴۹ ^b	۵۳۲/۴ ± ۱۵/۸۵ ^c	۶۲۷/۳ ± ۱۲/۲۶ ^{ab}
	۳۰	۴۹۵/۷ ± ۲۱/۶۴ ^{ab}	۴۲۳/۱ ± ۱۷/۳۴ ^c	۳۸۹/۸ ± ۱۴/۵۳ ^d	۶۲۸/۷ ± ۱۱/۳۶ ^a
	۴۵	۵۷۹/۲ ± ۳۳/۲۶ ^b	۵۱۰/۹ ± ۲۹/۸۴ ^c	۱.۴۸۷ ± ۲۲/۴۰ ^c	۶۲۰/۹ ± ۱۶/۲۴ ^a
فنل کل (میلی گرم/گرم)	۱۵	۱۲/۹ ± ۱/۶۵ ^c	۱۶/۲ ± ۱/۸۶ ^a	۱۵/۷ ± ۲/۷۴ ^{ab}	۱۲/۴ ± ۱/۹۹ ^c
	۳۰	۱۷/۷ ± ۲/۵۹ ^{cd}	۱۸/۱ ± ۲/۶۷ ^b	۱۸/۷ ± ۳/۵۹ ^a	۱۲/۸ ± ۲/۷۶ ^e
	۴۵	۱۴/۶ ± ۲/۹۸ ^c	۱۵/۸ ± ۳/۷۶ ^b	۱۶/۱ ± ۲/۵۹ ^a	۱۲/۷ ± ۲/۴۷ ^d
الكالوئید کل (میلی گرم/گرم)	۱۵	۵/۹ ± ۰/۶۵ ^b	۶/۲ ± ۰/۸۶ ^a	۶/۷ ± ۰/۷۴ ^a	۵/۱ ± ۰/۹۹ ^c
	۳۰	۶/۷ ± ۰/۵۹ ^b	۷/۴ ± ۰/۶۷ ^a	۷/۹ ± ۰/۵۹ ^a	۵/۴ ± ۰/۷۶ ^c
	۴۵	۶/۲ ± ۰/۹۸ ^b	۶/۸ ± ۰/۷۶ ^a	۷/۱ ± ۰/۵۹ ^a	۵/۵ ± ۰/۴۷ ^c

مقادیر میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می باشد.

(2002). افزایش رشد تحت ارتعاشات مکانیکی می تواند در ارتباط با افزایش سیالیت غشا باشد (Xiongbiao *et al.*, 1993). سیالیت غشا می تواند منجر به حرکت رستپورها، انتقال ملکول های سیگنال، باز و بسته شدن کانالها بویژه کانالهای کلسیمی شود (Mizoguchi *et al.*, 1996). از طرفی تقسیم سلولی و رشد بافت گیاهی تحت تاثیر پروتئین های محلول در بافت می باشد. با افزایش پروتئین های محلول، تقسیم سلولی و مقدار آنزیمها افزایش می یابد (Yiyao *et al.*, 2002). بنظر می رسد افزایش رشد تحت تاثیر ارتعاشات مکانیکی در ارتباط با افزایش محتوای پروتئین های محلول و تیادلالات یونی سلولها باشد.

پرولین آمینواسیدی است که می تواند در تعادل اسمزی، تمامیت غشاهای زیستی، حفاظت از ساختار پروتئینها و جاروب کنندگی رادیکالهای آزاد در طی تنش های غیر زیستی نقش داشته باشد (Szabados and Savoure, 2010; Lehmann *et al.*, 2010). در این پژوهش ارتعاشات مکانیکی منجر به افزایش معنی دار محتوای پرولین و کاهش کربوهیدرات کل شد (شکل ۲). افزایش پرولین تحت تنش ارتعاشات مکانیکی می تواند در ارتباط با القای بیان ژنهای پرولین-۵-کربوکسیلاز

مقایسه با نمونه شاهد شدند. بیشترین محتوای فنل و الكالوئید مشابه نتایج IC₅₀ در فرکانس ۵۰ هرتز و زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مشاهده شد و یک افزایش ۶/۱ و ۵۹/۳٪ محتوای فنل و الكالوئید به ترتیب را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. لازم به ذکر است که بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ هرتز در ۳۰ دقیقه از نظر محتوای فنل اختلاف معنی دار بوده، ولی الكالوئید معنی داری نبود.

بحث

تغییرات رشد به عنوان اولین پاسخ آشکار گیاهان تحت تنش های غیرزیستی است. هنگامیکه گیاهان تحت تنش های مکانیکی قرار می گیرند، سیگنالها به سلولها منتقل شده و می تواند سبب یک پاسخ دوگانه (افزایش و کاهش) در سلولهای گیاهی شود. در این پژوهش رشد و محتوای پروتئین تحت ارتعاشات مکانیکی افزایش معنی داری یافت و بهینه رشد در فرکانس ۵۰ هرتز مشاهده شد (جدول ۱). افزایش رشد بافت کالوس تحت ارتعاشات مکانیکی قبلا در بافت کالوس (*Bochu et al.*, *Gerbera jamesonii* نیز مشاهده شده است

پائین تر IC_{50} بیانگر فعالیت بیشتر جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط DPPH می‌باشد. در این پژوهش ارتعاش مکانیکی منجر به افزایش محتوای ترکیبات فنلیک و کاهش IC_{50} شد و بالاترین محتوای فنل کل در فرکانس ۵۰ هرتز برای زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش بدست آمد. بنظر می‌رسد ارتعاش مکانیکی در زمان و فرکانس مناسب می‌تواند منجر به افزایش ترکیبات آنتی‌کسیدانی و جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد شود.

الکالوئیدها ترکیبات نیتروژن‌داری هستند که میزان آن‌ها می‌تواند تحت تنش‌های محیطی تغییر یابد. در این پژوهش، ارتعاشات مکانیکی در ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی‌دار محتوای الکالوئید در بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک در مقایسه با نمونه شاهد شد (جدول ۲). بسیاری از الکالوئیدها در بافت‌های در حال رشد تشکیل شده و عوامل موثر بر رشد این بافت‌ها نظیر نور، نیتروژن، عناصر محیطی، درجه حرارت و رطوبت محیط می‌تواند در محتوای الکالوئید بافت تاثیر داشته باشد (Waller, 1978). تاثیر نیتروژن در گیاه پرپوش نشان داد که محتوای وین بلاستین، وین کریستین، وین دولین و کاتارانتین به طور معنی‌داری افزایش یافت (Srivastava and Srivastava, 2010). در طی تنش خشکی محتوای الکالوئید در بافت‌های در حال رشد گیاه *Catharantus roseous* افزایش معنی‌داری یافت (Peter et al, 1987). در ارتباط با تاثیر ارتعاشات مکانیکی بر محتوای الکالوئید مطالعات کمی صورت گرفته است. Kang و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که ارتعاشات مکانیکی در ۲ هرتز برای ۶۰ دقیقه منجر به افزایش محتوای Camptothecin در بافت کالوس گیاه *Camptotheca acuminata* شد. بنظر می‌رسد ارتعاشات مکانیکی می‌تواند با تحریک رشد و محتوای پروتئین‌های آنزیمی مربوط به مسیر بیوسنتز الکالوئیدها، محتوای الکالوئیدها را در بافت کالوس تحریک نمایند.

نتیجه‌گیری

بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک تحت ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌ها و زمان‌های مختلف، پاسخ متفاوتی را از نظر رشد و

سنتاز در مسیر بیوسنتز پرولین باشد (Li and Gong 2013). Hassanpour و همکاران نشان دادند که محتوای پرولین تحت ارتعاشات مکانیکی در گیاه *H. kurdicus* به ترتیب افزایش معنی‌داری یافت. افزایش پرولین تحت تاثیر ارتعاشات مکانیکی می‌تواند در ارتباط با حفظ ساختار پروتئین‌ها و جاروب کنندگی ترکیبات ROS (Reactive oxygen species) در این پژوهش باشد.

محتوای کربوهیدرات تحت تنش ارتعاشات مکانیکی کاهش یافت، اگرچه مقدار آن در ۱۵۰ هرتز کمی افزایش یافت ولی نسبت به شاهد کمتر بود. کاهش کربوهیدرات می‌تواند بیانگر عدم ایفای نقش کربوهیدرات‌ها در تنش ارتعاشات مکانیکی باشد.

تنش‌های غیر زیستی می‌توانند با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب اکسیداتیو غشای سلولی و پروتئین‌ها شوند (Yadav, 2010). در این پژوهش ارتعاشات مکانیکی سبب افزایش محتوای پروتئین‌های محلول و پرولین و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک شد. پراکسیداسیون لیپید به عنوان یک نشانگر آسیب اکسیداتیو بافت‌های گیاهی محسوب می‌شود (Demirel and Turkan, 2005). کاهش محتوای پراکسیداسیون لیپید تحت ارتعاشات مکانیکی می‌تواند بیانگر این باشد که فعالیت رادیکال‌های آزاد به خوبی مهار شده است و می‌تواند در ارتباط با افزایش محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدان و پرولین در گیاه باشد. لازم به ذکر است که محتوای پراکسیداسیون لیپید در فرکانس ۱۵۰ هرتز کمی افزایش یافت که این می‌تواند بیانگر این باشد که فرکانس ۱۵۰ هرتز با افزایش محتوای ROS بر ساختار غشاء تاثیر گذاشته و محتوای پراکسیداسیون لیپید را افزایش می‌دهد. ترکیبات فنلی به عنوان ترکیبات جاروب کننده رادیکال‌های آزاد، عوامل احیاء کننده و دهنده‌های هیدروژن عمل نموده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Proestos et al., 2006). DPPH نیز به عنوان یک رادیکال پایدار است که با ماکزیمم جذب در ۵۱۷ نانومتر می‌تواند منجر به جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد شود (Lu and Yeap Foo, 2001). مقادیر

توان به عنوان ابزاری برای افزایش تحمل تنش‌های محیط استفاده نمود.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس موسوی از پژوهشگاه فضایی ایران به خاطر در اختیار قرار دادن دستگاه شیکر الکترومکانیکی و کمک در اجرای تست ارتعاشات تشکر و قدردانی می‌نمایند.

فرآیندهای بیوشیمیایی نشان دادند. ارتعاشات مکانیکی در فرکانس ۵۰ هرتز برای ۳۰ دقیقه منجر به افزایش رشد، محتوای پروتئین، پرولین، خواص آنتی‌اکسیدان، محتوای فنلی و الكالونید کل شد. میزان پراکسیداسیون لیپید و کربوهیدرات نیز تحت ارتعاشات مکانیکی کاهش یافت. با توجه به افزایش رشد، پایداری غشا و خواص آنتی‌اکسیدانی بافت کالوس، ارتعاشات مکانیکی در فرکانس و زمان مناسب می‌تواند به عنوان عامل تحریک کننده رشد محسوب گردند و از آن می

منابع

- Alhdad, G. M., Seal Charlotte, E. and Al Azzawi Mohammed, J. (2013) The effect of combined salinity and waterlogging on the halophyte *Suaeda maritima*: The role of antioxidants 87:120–125.
- Al-Qura'n, S. (2008) Pollen morphology of *Hyoscyamus* L. (Solanaceae) attracts hymenoptera species as Pollen visitors in Jordan. *Pakistan Journal of Entomology* 1 (30): 83-92.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205–207.
- Bochu, W., Xuefeng, L., Yiyao, L., Chuanren, D. and Sakanishi, A. (2002) The effects of mechanical vibration on the microstructure of *Gerbera jamesonii acrocarpous* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23(1): 1-5.
- Demirel, T. and Turkan, I. (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350–356.
- Guler, G. O. (2012) Studies on antioxidant properties of the different solvent extracts and fatty acid composition of *Hyoscyamus reticulatus* L. *Journal of Food Biochemistry* 36: 532-538.
- Hassanpour, H., Niknam, V. and Haddadi, B. S. (2016) High-frequency vibration improve callus growth via antioxidant enzymes induction in *Hyoscyamus kurdicus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* doi: 10.1007/s11240-016-1103-5.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198.
- Jassbi, A. R., Miri, R., Masroorbabanari, M., Asadollahi, M., Attaroshan, M. and Ian, T. B. (2014) HPLC-DAD-ESIMS analyses of *Hyoscyamus niger* and *H. reticulatus* for their antioxidant constituents. *Austin Chromatography* 1(5): 1022.
- Kang, D., Zhang, H., Zeng, Q., Mo, X., Wang, Y. and Yang, D. (2011) Response of *Camptotheca acuminata* calli stimulated by mechanical vibration. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(3): 711-716.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* 5: 239 - 42.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. and Rentsch, D. (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids* 39(4): 949-962.
- Li, Z. G. and Gong, M. (2013) Mechanical stimulation-induced chilling tolerance in tobacco suspension cultured cells and its relation to proline. *Russian journal of plant physiology* 60(1): 149-154.
- Lu, Y. R. and Yeap Foo, L. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 75: 197–202.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O. G. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chemistry* 91: 571-577.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 765–769.
- Peter, M., Frischknecht, M. and Thomas, W. (1987) Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. *Plant Biology* 26(3):707-710.

- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E. and Komaitis, M. (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95: 664-67.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945-8.
- Srivastava, N. K. and Srivastava, A. K. (2010) Influence of some heavy metals on growth, alkaloid content and composition in *Catharanthus roseus* L. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 72(6): 775-778.
- Szabados, L. and Savoure, A. (2010) Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Science* 15:89-97.
- Von Sontag, C. (1980) Free radical reactions of carbohydrates as studied by radiation techniques. *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 37: 7-77.
- Waller, G. R. (1978) Environmental influences on alkaloid production. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plant*. New York.
- Yadav, S. K. (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 515-527.
- Yang, X. C., Wang, B. C., Liu, Y. Y., Duan, C. R. and Dai, C. Y. (2002) Biological effects of *Actinidia chinensis* callus on mechanical vibration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 25(3): 197-203.
- Yiyao, L., Wang, B., Xuefeng, L., Chuanren, D. and Sakanishi, A. (2002) Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 24: 321-326.
- Yucel, U. M. and Yilmaz, O. (2014) Total alkaloid amount of two *Hyoscyamus* species (Henbane) grown in Van region. *Veteriner Fakultesi Dergisi* 25(3): 77-80.
- Xiongbiao, L. (1993) *Plant cell wall*, Peiking University Press, Beijing.