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

حلیمه حسن پور[1]* و وحید نیکنام[2]

[1]پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران صندوق پستی ۸۳۴-۱٤٦٦٥، ایران

[2]دانشکده زیست شناسی، و قطب تبارزائی موجودات زنده ایران، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰۲/۳۱)

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، آنتی‌کلرژنیک و ضد درد می‌باشد. ارتعاشات مکانیکی یکی از تنش های غیر زیستی است که می‌تواند روی رشد و نمو سلول های گیاهی تاثیر داشته باشد. در این پژوهش اثر ارتعاشات مکانیکی بر شاخص‌های رشد، محتوای فنلی، الکالوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد با روش ۲و 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 زمان های ۱۵، ۳۰ و ٤۵ دقیقه روی بافت کالوس اعمال شد. نتایج نشان داد که پاسخ بافت کالوس در زمان های مختلف ارتعاش مکانیکی از نظر رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدان، محتوای فنلی و الکالوئیدی متفاوت بود و بهینه زمان اعمال ارتعاش مکانیکی در ۳۰ دقیقه مشاهده گردید. ارتعاشات مکانیکی در فرکانس های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی‌دار پارامترهای رشد، محتوای پروتئین، پرولین، محتوای ترکیبات فنلی و الکالوئیدی شد و بیشترین مقدار این پارامترها در فرکانس ۵۰ هرتز برای زمان ۳۰ دقیقه مشاهده گردید. محتوای کربوهیدرات تحت ارتعاشات مکانیکی کاهش معنی دار یافت و کمترین مقدار این پارامتر در فرکانس ۱۰۰ هرتز برای زمان ٤۵ دقیقه مشاهده شد. همچنین ارتعاشات مکانیکی منجر به کاهش معنی دار پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد از طریق کاهش مقدار IC_{50} شد و بیشترین کاهش نیز در فرکانس ۵۰ هرتز برای زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد. بنظر می‌رسد ارتعاشات مکانیکی در فرکانس و زمان مناسب می-تواند به عنوان ابزاری برای افزایش رشد و محتوای متابولیت های ثانویه در سلول‌های گیاهی باشد.

واژه های کلیدی: ارتعاشات مکانیکی، الکالوئید، بافت کالوس، بذرالبنج مشبک، پرولین، ترکیبات فنلی

مقدمه

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) گیاهی داروئی، یک ساله و متعلق به تیره سیب زمینی است (Al-Quran, 2008). بخش های مختلف گیاه حاوی مواد موثره آلکالوئیدی است که در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارد. از این گیاه برای تهیه داروهای ضد رماتیسم، بیماری‌های عصبی و تنفسی استفاده می شود که به دلیل حضور تروپان الکالوئیدهایی نظیر هیوسیامین، اسکوپلامین و آتروپین می باشد. این گیاه در استان‌های

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: hassanpour@ari.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

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 می توانند اثرات قابل توجهی روی رشد گیاهان داشته باشند (Bochu *et al.*, 2012). تنش‌های غیرزیستی در گیاهان می توانند باعث افزایش تجمع رادیکال های آزاد و در پی آن آسیب‌های بافتی شوند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا که به وسیله رادیکال‌های آزاد ایجاد می شود، 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 سلول های گیاهی گزارش شده است و بیشتر مطالعات در فرکانس های پائین ارتعاشات می باشد. ارتعاشات مکانیکی در سطوح ۰ تا ۵ هرتز می تواند پاسخ دوگانه‌ای از نظر رشد روی سلول های 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 acuminate*، 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 (۲۰۱٤) نشان دادند که محتوای فنلی برگ‌های گیاه *H. niger* و *H. reticulates* به ترتیب ۷/۵ و ۹/٤ میلی‌گرم بر گرم بافت و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) به ترتیب ۲۷۰/۲ و ۲۲٤/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می باشد. Guler و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه دارای محتوای فنلی بیشتری نسبت به عصاره متانولی و استنی می‌باشد. Yucel و Yilmaz (۲۰۱٤) نشان دادند که محتوای الکالوئیدی 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٪ می باشد. تاثیر ارتعاشات مکانیکی در فرکانس های بالا بر سلول-های گیاهی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، بنابراین در پژوهش حاضر اثر ارتعاشات مکانیکی بر تعدادی از شاخص-های رشد و محتوای متابولیت‌های داروئی بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت بافت کالوس و اعمال ارتعاش مکانیکی: بذرهای گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus reticulatus*) از جاده الموت قزوین در اواخر تابستان ۹٤ 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 MS ½ قرار گرفتند. برای از بین بردن خواب بذر، پتری دیش ها برای ٤۸ 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 mg L^{-1}, BA=1 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 زمان های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه اعمال شد. بعد از گذشت ۳ هفته از اعمال ارتعاش، کالوس‌ها جهت انجام سنجش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جمع آوری شدند. مقداری از آن‌ها برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک مورد استفاده قرار گرفتند و بخشی دیگر به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

پرولین و کربوهیدرات: سطح پرولین آزاد سلولی با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد. کالوس های تازه در ۱۰ میلی لیتر محلول آبی سولفوسالیسیلیک اسید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

(۳٪) هموژن 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 نین‌هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه گردید. لوله‌ها 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 ـ 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 عصاره‌گیری گردید. عصاره‌ها 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 سریعا به آن اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب محلول حاصل در طول موج ٤٨٥ 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 ٦/٨ در دمای ٤ درجه سانتیگراد هموژن گردید. سپس همگنای حاصل در یک سانتریفوژ یخچالدار ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و از محلول روشناور برای سنجش پروتئین کل استفاده کرد. غلظت پروتئین موجود در هر نمونه با روش Bradford (۱۹۷٦) و سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید.

پراکسیداسیون لیپیدها: سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها محتوای مالون دی آلدهید بر اساس روشHeath و Packer (۱۹٦۸) انجام شد. یک گرم از بافت کالوس با ۲ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد عصاره گیری شد. عصاره بدست آمده برای ۳۰ دقیقه در دمای محیط و با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رو شناور حاصل از سانتریفوژ ۲ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید۲۰ ٪ که حاوی ۰/۵٪ تیوباربیوتیک 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 لوله‌های آزمایش به سرعت در یخ سرد شده و بعد از این مراحل ۱/۵ میلی‌لیتر 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 مد Photometric و طول موج‌های ۵۳۲ و ٦۰۰ 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 (۵۰، ۷۵، ۱۰۰؛ ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره و نیز آنتی اکسیدان سنتزیBHT (Butylated hydroxytoluene) در حلال متانول آماده شدند. یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت یک میلی مولار معادل با ۰/۳۹٤ میلی‌گرم) 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 مهارادیکالهای DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار رادیکال آزاد= (Ac-As)/Ac × 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 اندازه‌گیری محتوای فنل کل به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره کالوس، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪)،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

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 میلی لیتر 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 میلی لیتر محلول متان تری کلرید شستشو گردید. محلول صاف شده تبخیر و خشک شد. به باقیمانده ۵ میلی لیتر متان تری کلرید و ۲ میلی لیتر 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 میلی لیتر و بار دوم با یک میلی لیتر متان تری کلرید عصاره گیری شد. عصاره ها مخلوط شده و سولفات سدیم آنهیدراز اضافه گردید و فیلتر شد. باقیمانده در ۱ میلی لیتر متان تری کلرید حل شد و میزان الکالوئید کل بر حسب میلی گرم بر گرم بافت محاسبه گردید.

آنالیز آماری: این پژوهش بر اساس طرح های کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام گرفت. پردازش اطلاعات به وسیله نرم افزار آماری *SPSS 18.0* و آنالیز واریانس یکطرفه در سطح معنی داری $P \leq ۰/۰۵$ صورت گرفت. مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آنالیز LSD انجام شد.

نتایج

کالوس ها در نمونه شاهد به رنگ قهوه ای روشن بوده و در ۵۰ و ۱۰۰ هرتز به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد و سبز در آمدند. در فرکانس ۱۵۰ هرتز کالوس ها قهوه‌ای شده و کاهش رشد را نشان دادند (شکل ۱و جدول ۱).

پاسخ وزن تر و خشک بافت کالوس در زمان‌های مختلف ارتعاشات مکانیکی متفاوت بود و با افزایش زمان تا ۳۰ دقیقه رشد بافت ها افزایش یافت و در ٤۵ دقیقه رشد کاهش یافت (جدول ۱). بهینه رشد در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده گردید و فرکانس های 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 ($P \leq ۰/۰۵$). بهینه رشد بافت کالوس در فرکانس ۵۰ هرتز و زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد که به ترتیب منجر به افزایش ۲٤/٤٦ و ۳٦/٦٦٪ وزن تر و خشک بافت کالوس گیاه بذرالبنج مشبک شد (جدول ۱).

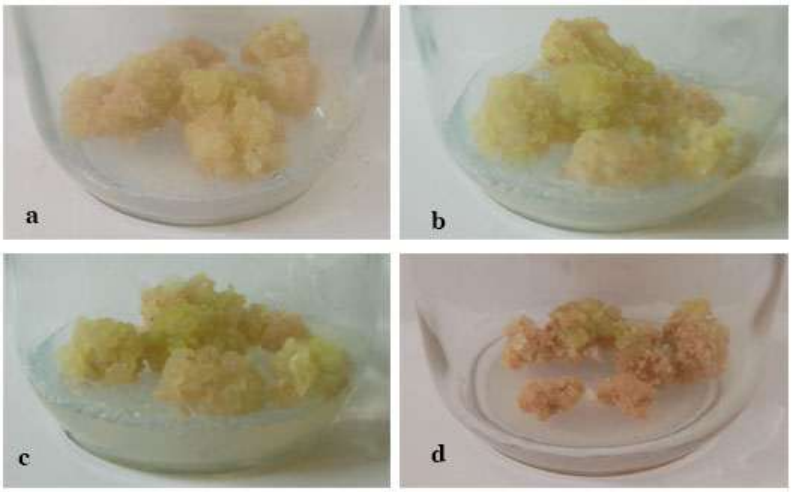
محتوای پروتئین تحت ارتعاشات مکانیکی افزایش معنی-داری یافت ($P \leq ۰/۰۵$) و بیشترین محتوای پروتئین در فرکانس ۵۰ هرتز در زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مشاهده شد (جدول ۱). فرکانس ۵۰ هرتز به ترتیب منجر به افزایش ۲۰/٦، ٤۵/۸ و ۳٤/۵٪ مقدار پروتئین در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ٤۵ دقیقه نسبت به شاهد شد.

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 ٤۵ دقیقه مشاهده گردید که نسبت به شاهد یک افزایش ٦٦/۹٪ 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 ٤۵ دقیقه مشاهده گردید (شکل ۲ b). محتوای کربوهیدرات در زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مکانیکی بیشتر از زمان‌های ۱۵ و ٤۵ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]



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- تاثیر فرکانس های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان های ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه بر وزن تر، وزن خشک و محتوای پروتئین بافت کالوس بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)

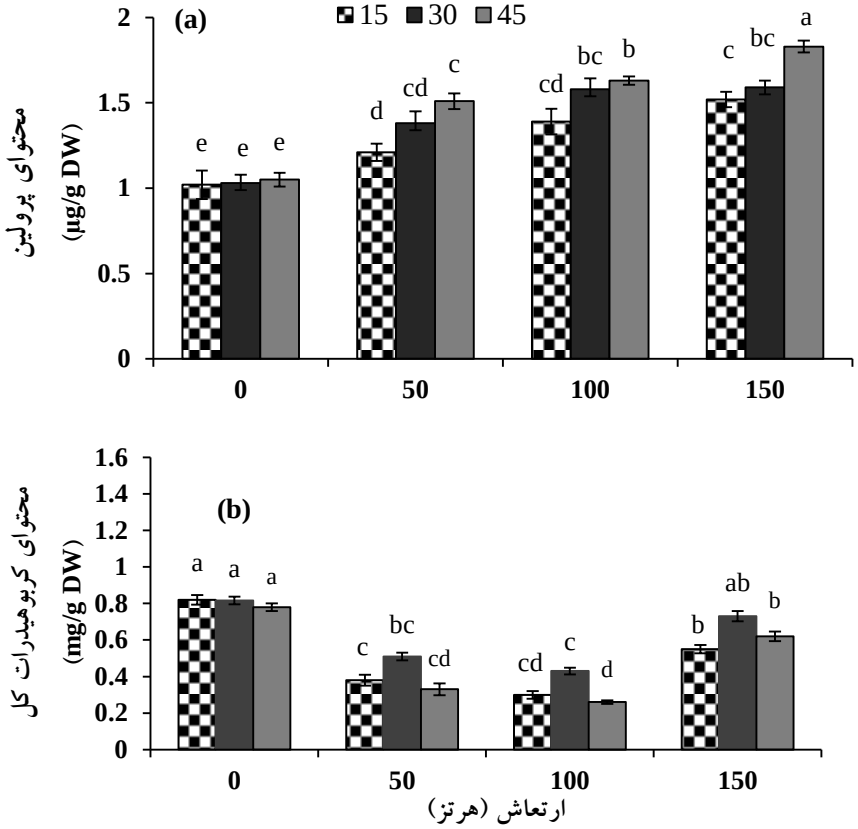
منابع تغییرات	زمان	ارتعاش (هرتز)			
		۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
وزن تر	۱۵	٦/۰۱ ± ۰/٤۲٦ a	٦/۳٤ ± ۰/۵۸۵ a	۵/۸۲ ± ۰/٤۹۲ b	۵/۲۱ ± ۰/۲۹۵ b
(گرم)	۳۰	۷/۰۷ ± ۰/۵۳٦ b	۸/۰۸ ± ۰/٤۳۱ a	۸/۱۲ ± ۰/۲۹۳ a	۵/۷٤ ± ۰/٤۲۱ c
	٤٥	٦/۱۲ ± ۰/۲۱٤ ab	٦/۵۱ ± ۰/٤۰۵ a	۵/٦۹ ± ۰/۳۷۲ b	٤/۲۷ ± ۰/۲٦۳ c
وزن خشک	۱۵	۰/۵۷ ± ۰/۰۲۲ a	۰/۵٤ ± ۰/۰۵۸ b	۰/٤۸ ± ۰/۰۷۲ c	۰/٤۲ ± ۰/۰۳۳ d
(گرم)	۳۰	۰/٦۰ ± ۰/۰۲۱ b	۰/۸۲ ± ۰/۰٤۸ a	۰/۷٤ ± ۰/۰۳۲ a	۰/۵۰ ± ۰/۰۳۳ b
	٤٥	۰/٦۰ ± ۰/۰۱۸ b	۰/٦۹ ± ۰/۰٤۳ a	۰/۵۰ ± ۰/۰۵۲ a	۰/٤٦ ± ۰/۰۳۹ b
پروتئین	۱۵	۲۳/۳٦ ± ۱/۵٤ ab	۲۸/۱۷ ± ۲/۰۹ a	۲۹/۲۸ ± ۲/۵۳ a	۲٤/۳۱ ± ۱/۸۹ ab
(میلی گرم/گرم)	۳۰	۲۳/٤۸ ± ۲/۷٦ b	۳٤/۲٤ ± ۳/۰۹ a	۳۰/۲۸ ± ۲/۵۳ a	۲۷/۵٤ ± ۳/٦۱ c
	٤٥	۲۳/۱٤ ± ۱/۳۲ b	۳۱/۱۲ ± ۲/۱٤ a	۲۹/۹۵ ± ۲/۷٦ a	۲۳/۵٤ ± ۱/۹۸ b

مقادیر میانگین ٤ تکرار ± انحراف معیار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می‌باشد.

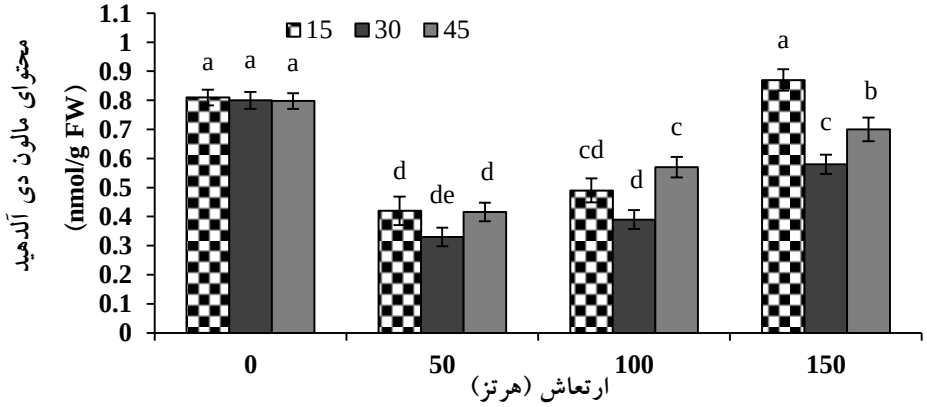
دقیقه منجر به کاهش بیشتر محتوای پراکسیداسیون لیپیدها نسبت به زمان‌های ۱۵ و ٤٥ دقیقه شد. کمترین محتوای پراکسیداسیون لیپیدها در ۵۰ هرتز مشاهده شد و یک کاهش ٤٦/۳٪ محتوای پراکسیداسیون لیپید را نسبت به شاهد نشان داد.

ارتعاشات مکانیکی در فرکانس‌های مختلف منجر به کاهش معنی‌دار مقدار IC_{50} نسبت به نمونه شاهد شد($P \leq ۰/۰۵$). 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 پاسخ های متفاوتی را از نظر محتوای IC_{50} نشان دادند و کمترین محتوای IC_{50} در زمان ۳۰ دقیقه نسبت به زمان‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]



شکل ۲- تاثیر فرکانس های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان های ۱۵، ۳۰ و ٤٥ 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 می‌باشد.



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 می‌باشد.

دیگر مشاهده شد. فرکانس ۵۰ هرتز در زمان‌های ۱۵, ۳۰ و ٤٥ دقیقه به ترتیب منجر به کاهش ۱۵/۱، ٤۲/٤ و ۲۱/۵٪ محتوای IC_{50} نسبت به نمونه شاهد شد.

محتوای فنل و الکالوئید کل تحت ارتعاش مکانیکی افزایش معنی‌داری یافت($P \leq$ ۰/۰۵). فرکانس‌های ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی‌دار محتوای فنل و الکالوئید در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

جدول ۲- تاثیر فرکانس های مختلف ارتعاشات مکانیکی در زمان های ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه بر مهار رادیکال‌های آزاد، محتوای فنل و الکالوئید کل بافت کالوس بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)

منابع تغییرات	زمان	ارتعاش (هرتز)			
		۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
IC_{50}	۱۵	٦٢٧/٣ ± ١٢/٢٦ ab	٥٣٢/٤ ± ١٥/٨٥ c	٥٧٣/٤ ± ١٩/٤٩ b	٥٩٨/٢ ± ٢٣/٩٥ a
(میکرو گرم/میلی لیتر)	۳۰	٦٢٨/٧ ± ١١/٣٦ a	٣٨٩/٨ ± ١٤/٥٣ d	٤٢٣/١ ± ١٧/٣٤ c	٤٩٥/٧ ± ٢١/٦٤ ab
	٤٥	٦٢٠/٩ ± ١٦/٢٤ a	١.٤٨٧ ± ٢٢/٤٠ c	٥١٠/٩ ± ٢٩/٨٤ c	٥٧٩/٢ ± ٣٣/٢٦ b
فنل کل	۱۵	١٢/٤ ± ١/٩٩ c	١٥/٧ ± ٢/٧٤ ab	١٦/٢ ± ١/٨٦ a	١٢/٩ ± ١/٦٥ c
(میلی گرم/گرم)	۳۰	١٢/٨ ± ٢/٧٦ e	١٨/٧ ± ٣/٥٩ a	١٨/١ ± ٢/٦٧ b	١٧/٧ ± ٢/٥٩ cd
	٤٥	١٢/٧ ± ٢/٤٧ d	١٦/١ ± ٢/٥٩ a	١٥/٨ ± ٣/٧٦ b	١٤/٦ ± ٢/٩٨ c
الکالوئید کل	۱۵	٥/١ ± ٠/٩٩ c	٦/٧ ± ٠/٧٤ a	٦/٢ ±٠/٨٦ a	٥/٩ ± ٠/٦٥ b
(میلی گرم/گرم)	۳۰	٥/٤ ± ٠/٧٦ c	٧/٩ ± ٠/٥٩ a	٧/٤ ±٠/٦٧ a	٦/٧ ± ٠/٥٩ b
	٤٥	٥/٥ ± ٠/٤٧ c	٧/١ ± ٠/٥٩ a	٦/٨ ± ٠/٧٦ a	٦/٢ ± ٠/٩٨ b

مقادیر میانگین ٤ تکرار ± انحراف معیار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه می‌باشد.

مقایسه با نمونه شاهد شدند. بیشترین محتوای فنل و الکالوئید مشابه نتایج IC_{50} در فرکانس ۵۰ هرتز و زمان ۳۰ دقیقه ارتعاش مشاهده شد و یک افزایش ٤٦/١ و ٥٩/٣٪ محتوای فنل و الکالوئید 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 معنی‌دار بوده، ولی الکالوئید معنی‌داری نبود.

بحث

تغییرات رشد به عنوان اولین پاسخ آشکار گیاهان تحت تنش-های غیرزیستی است. هنگامیکه گیاهان تحت تنش‌های مکانیکی قرار می‌گیرند، سیگنال‌ها به سلول ها 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 معنی‌داری یافت و بهینه رشد در فرکانس ۵۰ هرتز مشاهده شد (جدول ۱). افزایش رشد بافت کالوس تحت ارتعاشات مکانیکی قبلا در بافت کالوس *Gerbera jamesonii* نیز مشاهده شده است (Bochu *et al.*, 2002). افزایش رشد تحت ارتعاشات مکانیکی می‌تواند در ارتباط با افزایش سیالیت غشا باشد (Xiongbiao *et al.*, 1993). سیالیت غشا می‌تواند منجر به حرکت رسپتورها ، 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 پروتئین‌های محلول در بافت می‌باشد. با افزایش پروتئین‌های محلول، تقسیم سلولی و مقدار آنزیم‌ها افزایش می‌یابد(Yiyao *et al.*, 2002) . بنظر می‌رسد افزایش رشد تحت تاثیر ارتعاشات مکانیکی در ارتباط با افزایش محتوای پروتئین‌های محلول و تیادلات یونی سلول‌ها باشد.

پرولین آمینواسیدی است که می‌تواند در تعادل اسمزی، تمامیت غشاهای زیستی، حفاظت از ساختار پروتئین‌ها و جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد در طی تنش‌های غیر زیستی نقش داشته باشد (Szabados and Savoure, 2010; Lehmann *et al.*, 2010) در این پژوهش ارتعاشات مکانیکی منجر به افزایش معنی‌دار 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

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 می دهد.

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 پایداری است که با ماکزیمم جذب در ۵۱۷ نانومتر می‌توانند منجر به جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد شود (Lu and Yeap Foo, 2001). مقادیر پائین‌تر 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 آنتی کسیدانی و جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد شود.

الکالوئیدها ترکیبات نیتروژن‌داری هستند که میزان آن‌ها می‌تواند تحت تنش های محیطی تغییر یابد. در این پژوهش، ارتعاشات مکانیکی در ۵۰ و ۱۰۰ هرتز منجر به افزایش معنی-دار 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 محیط، درجه حرارت و رطوبت محیط می‌تواند در محتوای الکالوئید بافت تاثیر داشته باشد (Waller, 1978). تاثیر نیتروژن در گیاه پریوش 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 معنی داری 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 acuminate* شد. بنظر می‌رسد ارتعاشات مکانیکی می‌توانند با تحریک رشد و محتوای پروتئین‌های آنزیمی مربوط به مسیر بیوسنتز الکالوئیدها، محتوای الکالوئید ها 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

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 الکالوئید 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 می‌توانند به عنوان عامل تحریک کننده رشد محسوب گردند و از آن می 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 در اختیار قرار دادن دستگاه شیکر الکترومکانیکی و کمک در اجرای تست ارتعاشات تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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., Attarroshan, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]

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) Enviromental 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.26.11.0]