DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.6124

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۲۱۵-۱۹۹ (۱۳۹۳)

تأثیر نیتروژن بر رشد، اختصاص زیست‌توده و تولید آلکالوئیدهای ریشه و شاخساره گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) در شرایط تنش کم‌آبی

منصور قربانپور[۱*]، ناصر مجنون‌حسینی[۲]، شمسعلی رضازاده[۳]، منصور امیدی[۲]، کاظم خاوازی[۴]، مهرناز حاتمی[۵] و رضا غفارزادگان[۶]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

پست الکترونیک: m_ghorbanpour@yahoo.com

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، تهران

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، مؤسسه خاک و آب، کرج

۵- استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۶- مربی پژوهشی، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

چکیده

این مطالعه با هدف تأثیر تنش کم‌آبی (تخلیه آب تا ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای به‌ترتیب تنش خفیف، متوسط و شدید) و نیتروژن (براساس ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) بر رشد، محتوی کلروفیل، اختصاص زیست‌توده، محتوی نسبی آب برگ، محتوی و عملکرد تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) انجام شد. استخراج آلکالوئیدها به روش اختصاصی و به‌وسیله حلال‌های مختلفی صورت گرفت و شناسایی آنها براساس مقایسه زمان بازداری دستگاه کروماتوگرافی گازی با داده‌های طیف جرمی و استانداردهای مربوطه هیوسیامین و اسکوپولامین انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین محتوی هیوسیامین (۰/۲۸۱٪ ماده خشک) و اسکوپولامین در ریشه (۰/۲۳۲٪) و همچنین بیشترین محتوی هیوسیامین (۰/۹۳۷٪) و اسکوپولامین در شاخساره (۰/۴۱۶٪) در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در شرایط تنش کم‌آبی شدید مشاهده گردید. همچنین بیشترین آلکالوئید کل (۲۰/۵۲ میلی‌گرم در گیاه) در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در شرایط تنش خفیف کم‌آبی و کمترین آن (۸/۹۵ میلی‌گرم در گیاه) در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در شرایط تنش کم‌آبی شدید حاصل شد. نتایج این تحقیق حکایت از آن داشت که گیاه بذرالبنج در تیمار تنش کم‌آبی متوسط به همراه کود نیتروژن به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار علاوه بر اینکه دارای مقادیر مناسبی از محتوی و عملکرد هر دو آلکالوئید می‌باشد، بلکه بیشترین میزان اسکوپولامین را نیز که نشان از کیفیت آلکالوئید است داراست.

واژه‌های کلیدی: بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.)، تروپان آلکالوئیدها، هیوسیامین، اسکوپولامین، نیتروژن، تنش کم‌آبی.

مقدمه

گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) از تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) با انتشار جغرافیایی نسبتاً وسیعی که دارد یکی از مهمترین گونه‌ها در استخراج آلکالوئید به‌شمار می‌رود. هیوسیامین و اسکوپولامین دو آلکالوئید اصلی تروپان در گیاهان خانواده سیب‌زمینی هستند (Nussbaumer *et al.*, 1998). ریشه‌های ظریف این گیاه و ریشه هایی که فاقد رشد ثانویه هستند مکان بیوسنتزی

تروپان آلکالوئیدها بوده و آنزیم‌های عمده مسیر ساخت آنها در این محل قرار دارند (Oksman-Caldentey & Hiltunen, 1996). مقدار زیادی از این تروپان آلکالوئیدها پس از سنتز به اندام‌های هوایی منتقل و در واکوئل بافت‌های مختلف متمرکز می‌شوند. تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ترکیب‌هایی با خاصیت پاراسمپاتولیتیک می‌باشند و به‌طور گسترده در درمان طیف وسیعی از بیماریها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zayed & Wink, 2004). از این ترکیب‌ها برخی داروهای مهم از قبیل اسکوپولامین هیدروبرمید و هیوسیامین سولفات که داروهایی آنتی‌اسپاسمودیک، آنتی‌کلینرژیک و مسکن هستند تولید شده‌است.

سنتز صنعتی این ترکیب‌ها به‌دلیل ساختمان شیمیایی پیچیده آنها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و این ترکیب‌ها هنوز از برخی گیاهان متعلق به تیره سیب‌زمینی از قبیل شابیزک، داتوره و سایر تیره‌های گیاهی مانند شب‌بو استخراج می‌شوند (Willaman & Li, 1997). امروزه تلاش‌های زیادی در زمینه کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های مویین گیاهان مذکور به‌منظور تولید تروپان آلکالوئیدها انجام می‌شود، ولی متأسفانه تلاش‌های مذکور هنوز به نقطه عطف اقتصادی مطلوب نرسیده‌است. بنابراین هنوز هم تولید این متابولیت‌ها در سطح وسیع و گیاه کامل تنها روش موفق و اقتصادی به نظر می‌رسد. البته تاکنون محرک‌های زیادی از قبیل تنش‌های محیطی و غیره به‌منظور دستیابی سریع به آلکالوئیدها گزارش شده‌است.

اگرچه این تنش‌ها، رشد و نمو گیاهان زراعی را به‌طور معکوس تحت تأثیر قرار می‌دهند، اما محتوی متابولیت‌ها اکثراً از طریق اثرات مثبتی که تنش‌ها روی مسیرهای متابولیکی ساخت ترکیب‌های مؤثره گیاهان دارویی دارند افزایش می‌یابد (Selmar, 2008). همچنین مطالعات محققان نشان می‌دهد که چنانچه کودهای مغذی به مقادیر و در زمان مناسب در اختیار این گیاه قرار بگیرند، نقش عمده‌ای در افزایش عملکرد پیکره رویشی و مقدار آلکالوئیدهای آن خواهند داشت (Baricevic *et al*., 1999). در آزمایشی دیگر اثر سطوح کود نیتروژن (۰، ۵۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) روی محتوی آلکالوئیدهای دو موتانت حاوی آلکالوئید زیاد گیاه پروانش در مقایسه با رقم والدین، به‌منظور تعیین امکان افزایش بیشتر محتوی آلکالوئیدهایشان مطالعه شدند. نتایج نشان داد که کود نیتروژن (۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) به‌طور معنی‌داری محتوی آلکالوئیدها را در برگ‌ها (۴۲٪) و ریشه‌های (۳۲٪) تمام ژنوتیپ‌ها افزایش داد. همچنین این افزایش، در ژنوتیپ‌های با کمترین محتوی آلکالوئیدها بیشترین بود و در موتانت‌های با آلکالوئید زیاد به‌ترتیب افزایش ۸۷ و ۵۶ درصدی در محتوی آلکالوئیدهای برگ‌ها و ریشه‌ها در مقایسه با والدین (بدون کود) مشاهده گردید. کود نیتروژن عملکرد برگ‌ها و ریشه‌ها را به‌ترتیب ۱۷۰٪ و ۹۰٪ افزایش داد و افزایش محتوی آلکالوئیدهای برگ‌ها و ریشه‌ها (به‌دلیل کاربرد نیتروژن) با افزایش عملکرد آنها مطابق بوده‌است (Sreevalli *et al*., 2004). در مطالعه‌ای که با هدف تشریح شرایط بهینه‌ای از فراهمی آب و نیتروژن برای به حداکثر رساندن محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه‌های گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*) انجام شد، رژیم‌های آبیاری (۳۵٪، ۵۵٪، ۶۵٪ و ۹۵٪ تخلیه آب در دسترس خاک) در کنار سطوح مختلف نیتروژن (۰/۳۷-۱/۶۰ گرم نیتروژن در گلدان) اعمال گردید. نتایج نشان داد که حداکثر عملکرد آلکالوئیدهای تروپان (هیوسیامین ۵۴ و اسکوپولامین ۷ میلی‌گرم در گیاه) در تیمار بهینه آبیاری (۳۵٪ تخلیه آب در دسترس خاک) با نیتروژن کل ۰/۳۷ گرم حاصل شد. در مقابل حداکثر محتوی آلکالوئیدها با تخلیه ۹۵٪ آب و نیتروژن ۱/۶۰ بدست آمد (Baricevic *et al*., 1999). تاکنون مطالعه‌ای جامع در خصوص جنبه‌های تغذیه‌ای گیاه بذرالبنج برای افزایش محتوی آلکالوئیدها انجام نشده‌است. نظر به اینکه آلکالوئیدها ترکیب‌هایی نیتروژنی هستند، انتظار می‌رود که فراهمی این عنصر نقش مهمی را در بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها در این گیاه بازی کند، اما اطلاعات کافی در مورد اثر متقابل تنش کم‌آبی و نیتروژن روی محتوی و عملکرد آلکالوئیدهای اندام‌های این گیاه وجود ندارد. هدف این مطالعه بررسی اثر کود نیتروژنه (نیترات آمونیوم) و تنش کم‌آبی روی رشد، اختصاص زیست‌توده و افزایش عملکرد کمّی و کیفی آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذرالبنج می‌باشد.

مواد و روشها

آماده‌سازی و جوانه‌زنی بذر

بذر گیاه بذرالبنج از مزرعه کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شد. بذر این گیاه در شرایط طبیعی، جوانه‌زنی کم و غیریکنواختی دارد، بنابراین به‌منظور شکست خواب بذر، تسریع در جوانه‌زنی و همچنین داشتن درصد سبز یکنواخت، بذرها در دمای اتاق (۰/۵ ± ۲۵) تحت تیمار اسید جیبرلیک (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۴۸ ساعت) قرار داده شدند. سپس بذرها (۲۵۰ عدد) به مدت ۲ دقیقه با اتانول ۷۰٪ و ۱۰ دقیقه با سفیدکننده شیمیایی ۲۵٪ که حاوی ۶٪ هیپوکلریت‌سدیم بود استریل سطحی شدند. سرانجام بذرها درون ظروف آزمایشگاهی پوشیده با دو لایه کاغذ صافی (شماره ۱) و مرطوب کشت گردیدند، بعد از ۳ روز بیش از ۹۰٪ جوانه‌زنی داشتند و زمانی‌که طول ریشه‌چه به ۳ تا ۴ میلی‌متر رسید درون گلدان کشت شدند.

آزمایش گلخانه‌ای

پس از تیمار جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی به قطر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر (حاوی ۸ کیلوگرم خاک) کشت شدند. در هر گلدان پنج گیاهچه کشت گردید و تا قبل از اعمال تیمار کوددهی، یعنی در طول دو هفته و در دو نوبت، دو تا از ضعیف‌ترین گیاهچه‌ها تنک شدند، به‌طوری که هر گلدان در نهایت حاوی سه گیاهچه گردید. با توجه به اینکه رشد اولیه این گیاه بسیار کُند و بطئی است، برای ترغیب گیاهچه ها به رشد سریعتر و بیشتر و همچنین برای دستیابی به حداکثر تولید آلکالوئیدها از تیمار کود نیتروژنی و در زمان های ابتدایی رشد گیاه استفاده گردید. تیمار تنش کم‌آبی، پس از بهاره‌سازی گیاهان و براساس روش وزنی اجرا شد. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش به‌صورت زیر آنالیز شد؛ درصد عصاره اشباع: ۳۱/۶۲، pH خاک: ۷/۶، هدایت‌الکتریکی: ۰/۶۸ دسی‌زیمنس بر متر، رس: ۲۵/۱، سیلت: ۱۲/۸، شن: ۶۲/۱، ماده آلی: ۱/۴۶، کربن آلی: ۰/۸۹، نیتروژن: ۰/۲۵، فسفر: ۱۲/۲، پتاسیم: ۱۲۵ و کربنات‌کلسیم: ۴/۹۱ میلی‌گرم در کیلوگرم.

تیمار نیتروژن و تنش کم‌آبی

در این آزمایش از کود معدنی نیترات‌آمونیوم (۳۳٪ نیتروژن خالص)، به‌صورت محلول و به شیوه تقسیط در سه نوبت و در هر نوبت یک سوم مقدار کل کود، طی سه نوبت (الف: دو هفته بعد از کشت، ب: چهار هفته بعد از کشت، ج: با شروع رشد مجدد و ساقه‌دهی) استفاده گردید. مقادیر کود براساس ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، به ترتیب به میزان ۰، ۰/۱۴، ۰/۲۸ و ۰/۴۰ گرم نیتروژن (معادل ۰، ۰/۴۰۴، ۰/۸۰۸ و ۱/۲۱۲ گرم نیترات‌آمونیوم) در هر گلدان محاسبه و استفاده شد. از مقادیر محاسبه شده فوق، پس از تقسیط در هر نوبت کوددهی، محلول استوک تهیه گردید و به‌وسیله آب مقطر به حجم مورد نیاز رسانده شد. در هر نوبت کوددهی مقدار مشخصی از محلول استوک برای رساندن رطوبت خاک گلدان به رطوبت ظرفیت مزرعه (Field Capacity) استفاده گردید. تمام گلدان‌ها پس از کشت و قبل از اعمال تنش کم‌آبی در حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای تا ۴۵ روز حفظ شدند. گیاهان بعد از ۴۵ روز پس از کشت، به مدت ۴۵ روز نیز در معرض تنش کم‌آبی قرار گرفتند. میزان رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای (FC) با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Pressure Plate Apparatus) تعیین گردید (۱۲/۵٪). برای اعمال تیمارهای تنش کم‌آبی، ابتدا وزن گلدان‌ها در حد رطوبت ظرفیت مزرعه و همچنین سطوح مختلف مصرف آب قابل استفاده خاک محاسبه و بعد تمام گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند تا به حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای رسیدند. پس از این مرحله و با توزین روزانه گلدان‌ها، مقدار آب مصرفی آنها محاسبه و پس از رسیدن رطوبت به حد مجاز تعیین شد. در هر تیمار، آبیاری گلدان برای رسیدن به حد ظرفیت مزرعه انجام شد. برای جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان‌ها توسط یونولیت پلاستیکی سفید رنگ پوشیده شد. پس از ۹۰ روز از کشت، گیاهان برداشت و نمونه‌برداری‌های مربوطه انجام شد.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات مرفولوژیکی گیاه

بوته‌های برداشت شده، به بخش‌های ریشه و شاخساره جدا و ریشه پس از شستشوی کامل به دو قسمت ریشه‌های ظریف (با قطر مساوی و کمتر از ۱ میلی‌متر) و

ضخیم (با قطر بیشتر از ۱ میلی‌متر) تقسیم و وزن تر و خشک آنها اندازه‌گیری گردید. بخش شاخساره به دو قسمت برگ و ساقه جدا شدند. پس از شمارش تعداد برگ‌ها، سطح آنها با دستگاه نوری اندازه‌گیری سطح برگ (LICOR Photoelectric Area Meter) تعیین گردید. برای تعیین میزان کلروفیل برگ (چهارمین برگ کاملاً توسعه یافته از نقطه رویش) از روش لیچتنتالر استفاده شد (Lichtenthaler, 1987). به این ترتیب که در پایان دوره تنش کم‌آبی، ۵۰ میلی‌گرم از برگ تازه تهیه و بعد نمونه برگی درون هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر استون (۸۰٪v/v) کاملاً ساییده شد، به‌طوری که محلول یکنواختی حاصل گردید. میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, Model Shimadzu UV-160A) قرائت شد. به این منظور ابتدا دستگاه با استون کالیبره گردید و بعد میزان جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر (کلروفیل a) و ۶۶۳ نانومتر (کلروفیل b) یادداشت شد و محتوی کلروفیل a و b از روابط زیر بدست آمد (Lichtenthaler, 1987).

= (میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) کلروفیل a

جذب در ۶۴۵ × ۲/۳۵ – جذب در ۶۶۳ × ۱۱/۷۵

= (میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) کلروفیل b

جذب در ۶۶۳ × ۳/۹۶– جذب در ۶۴۵ × ۱۸/۶۱

میزان سبزینگی برگ در طی دوران رشد گیاه توسط دستگاه کلروفیل‌متر دستی (مدل مینولتا، ۵۰۲) انجام شد. به‌منظور بررسی وضعیت آبی گیاه، در روزهای ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ روز پس از کشت (هر دو هفته یک‌بار پس از اعمال تنش) محتوی نسبی آب برگ با استفاده از روش زیر اندازه‌گیری گردید: ابتدا چهارمین برگ کاملاً توسعه یافته از نقطه رویش گیاه به‌صورت تازه وزن شد (بین ساعت ۹ تا ۱۱ صبح) و پس از قطعه قطعه کردن آن، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و در شرایط آزمایشگاه در داخل آب مقطر قرار داده شد تا برگ به اندازه نیاز آب جذب نموده و بعد از ۶ ساعت به حالت آماس درآید. آنگاه برگ‌های آماس شده را برداشته و با کاغذ صافی خشک نموده و وزن آماس شده برگ اندازه‌گیری گردید. پس از توزین، برگ‌ها را در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به مدت ۴۸ ساعت خشک شوند. وزن برگ پس از خشک شدن نیز اندازه‌گیری شد. محتوی نسبی آب برگ (Relative Water Content) از فرمول زیر محاسبه شد (Jeon *et al*., 2003).

$$RWC = \frac{\text{وزن برگ خشک شده} - \text{وزن برگ تازه}}{\text{وزن برگ خشک شده} - \text{وزن برگ آماس شده}} \times ۱۰۰$$

برداشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های ریشه و شاخساره بلافاصله پس از برداشت در سایه در معرض خشک شدن قرار گرفتند. عمل خشک کردن باید تا زمان تسهیل در پودر شدن گیاه ادامه یابد. رطوبت اندام‌ها در این حالت حدود ۲٪ است. پس از پودر کردن مواد گیاهی با آسیاب برقی، برای الک کردن آن از توری (Mesh) آزمایشگاه (اندازه ۳۰ و قطر منافذ ۵۴۵ میکرومتر) استفاده گردید.

استخراج و آنالیز آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئیدها به روش اختصاصی و به‌وسیله حلال‌های مختلفی انجام شد (Kamada *et al*., 1986). در این روش ۲ گرم از ماده خشک گیاهی با ترکیب کلروفرم– متانول– آمونیاک ۲۵٪ به نسبت ۱: ۵: ۱۵ و به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض اولتراسونیک قرار گرفت. سپس نمونه به حمام آب گرم (۴۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱ ساعت انتقال داده شد. عصاره حاصل، از کاغذ صافی عبور داده شد و روی صافی دو بار با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو گردید. فاز کلروفرمی به کمک دستگاه تبخیرکننده دوّار خشک گردید. سپس ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ نرمال به آن اضافه و کاملاً هم زده شد. بعد فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها تا ۱۱–۱۰ =pH با محلول آمونیاک ۲۵٪ تنظیم گردید. آلکالوئیدها یک‌بار با ۲۵ میلی‌لیتر و دو بار با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. محلول حاصل با سدیم‌سولفات انیدر آبگیری و صاف شد. روی صافی با ۲۰– ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو و نمونه حاصل قبل از آنالیز با

دستگاه GC در ۲-۱ میلی‌لیتر متانول HPLC حل گردید. آلکالوئیدهای استخراج شده پس از آماده‌سازی به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC تزریق گردیدند تا نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آنها مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Acme 6000 GC با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع MS HP-5 بود. برنامه دمایی ستون شامل دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. شناسایی آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین براساس مقایسه زمان بازداری (Retention Time) دستگاه GC با داده‌های طیف جرمی (Mass Spectra) و استانداردهای مربوطه آنها انجام شد. عملکرد آلکالوئیدها با توجه به محتوی آنها و تولید زیست‌توده گیاهی از رابطه زیر بدست آمد.

= عملکرد آلکالوئید (میلی‌گرم در گیاه)
(میلی‌گرم) وزن خشک × (٪ ماده خشک) محتوی آلکالوئید

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل دو عاملی با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری حاصل از اندازه‌گیری صفات، تعیین انحراف استاندارد (±SD) و همچنین ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی از نرم‌افزار SAS و MSTAT-C استفاده گردید و همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج

صفات مرفولوژیکی، رشد و زیست‌توده گیاه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل بین تنش کم‌آبی و سطوح مختلف نیتروژن برای بیشتر پارامترهای مرفولوژیک، فیزیولوژیک و متابولیک گیاه بذرالبنج، به غیر از وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه‌های ضخیم و کل ریشه در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. به‌طور کلی، با افزایش سطح تنش کم‌آبی و بدون توجه به تیمار نیتروژن (در نیتروژن ثابت) تعداد برگ، سطح برگ و ارتفاع گیاه کاهش یافتند (جدول ۱). اما با افزایش نیتروژن در سطوح مختلف تنش، ابتدا مقادیر این پارامترها تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار (N2) افزایش و بعد کاهش داشتند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود درصد این کاهش، در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (N3) نسبت به سطوح دیگر نیتروژن کاملاً مشهود است. به‌عنوان مثال درصد کاهش تعداد برگ از تیمار N2W1 به N3W1 در حدود ۳۷٪ بود، اما از تیمار N2W2 به N3W2 حدود ۵۱٪ و همچنین از تیمار N2W3 به N3W3 حدود ۸۶٪ است. بیشترین تعداد برگ در بوته (۲۹/۹)، سطح برگ (۴۰۶/۹ سانتی‌مترمربع) و ارتفاع گیاه (۵۳/۳ سانتی‌متر) در تیمار N2W1 و کمترین آنها در تیمار N3W3 اندازه‌گیری شده‌است (جدول ۱).

محتوی نسبی آب برگ (RWC)، به‌طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۱$) تحت تأثیر تنش کم‌آبی و کود نیتروژن قرار گرفت. این شاخص در ۱۵ روز ابتدایی دوره تنش، در تمام تیمارها در حداکثر مقدار خود بود و در تیمارهای N3W1 و N3W3 به ترتیب بیشترین (۸۸/۹٪) و کمترین (۷۹/۳٪) مقادیر را داشتند (شکل ۱). به‌طور کلی، محتوی نسبی آب برگ در گیاهان تحت تیمار تنش کم‌آبی و نیتروژن از ۳۰ روز پس از تنش شروع به کاهش نمود و در ۴۵ روز کاهش شدیدی داشت و در انتهای دوره تنش (۶۰ روز پس از تنش) در تیمار N3W3 به کمترین مقدار خود تنزل پیدا کرد (۶۲/۱٪). این روند تنزل در بین تیمارها یکسان نبوده و از حالت نزول تدریجی در تیمار تنش کم‌آبی خفیف یا تخلیه ۳۰٪ رطوبت مزرعه‌ای (W1) به نزول شدید در تیمار تنش کم‌آبی شدید (W3) ختم شد. با افزایش نیتروژن در سطوح مختلف تنش، واکنش گیاه در این مورد نسبت به صفات ذکر شده قبلی اندکی متفاوت بود، به طوری که در سطح رطوبتی ایده‌ال (W1) با افزایش نیتروژن تا سطح ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار، RWC نیز افزایش یافت. در

حالی‌که در سطوح دیگر تنش این روند مشاهده نشد و افزایش نیتروژن تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در تیمارهای تنش یکسان سبب افزایش RWC شده است (شکل ۱). به‌طور کلی تنش کم‌آبی، محتوی کلروفیل برگ را مانند RWC کاهش داد و افزایش نیتروژن بجز در سطح اول تنش کم‌آبی (W1)، تا مقدار ۱۵۰ کیلوگرم (N2) سبب افزایش محتوی کلروفیل و بعد از آن یعنی در سطح ۲۲۵ کیلوگرم (N3) باعث کاهش آن شده‌است (جدول ۱). اما در سطح W1 همان‌طور که گفته شد افزایش نیتروژن، افزایش محتوی کلروفیل را در پی داشته‌است. در این آزمایش روند تغییر محتوی کلروفیل a و b در برگ گیاهان مشابه بوده و نسبت بین کلروفیل a و b با افزایش تنش، افزایش یافته است. نتایج نشان داد که کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a به تنش کم‌آبی حساس‌تر است. البته بیشترین محتوی کلروفیل (۰/۰۸۳) a و b (۰/۱۴۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) در گیاهان تحت تیمار N3W1 حاصل شده‌است (جدول ۱). در مطالعه حاضر رابطه مثبت و معنی داری بین محتوی نسبی آب برگ در پایان دوره تنش کم‌آبی و محتوی کلروفیل a (r= ۰/۹۴) و b (r= ۰/۹۱) مشاهده شده‌است. نتایج این آزمایش بیان‌کننده این است که کاربرد مناسب کود نیتروژن (نیترات آمونیوم) در افزایش بیوسنتز رنگدانه‌های کلروفیل می‌تواند به‌عنوان یک راهکار زراعی برای بهبود تحمل تنش در گیاهان در شرایط کم‌آبی در نظر گرفته شود. سبزینگی برگ نیز به‌طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۱$) بین تیمارها متفاوت بوده‌است. به‌طور کلی و صرف‌نظر از تیمار نیتروژن، این صفت در گیاهان تحت تنش کم‌آبی کاهش یافته، در حالی‌که استفاده از نیتروژن تا سطح ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار (N3) در شرایط تنش خفیف (W1) سبب بهبود سبزینگی برگ شده و در سایر سطوح تنش، افزایش نیتروژن تا N2 باعث افزایش سبزینگی برگ و بعد از آن باعث کاهش سبزینگی شده‌است. برگ گیاهان تحت تیمار N3W1 بیشترین مقدار سبزینگی (۶۹/۱۰) را در انتهای دوره آزمایش از خود نشان دادند (جدول ۱). در واقع استفاده از SPAD به نوعی وضعیت نیتروژن گیاه را به‌طور غیرمستقیم برآورد می‌کند. همچنین رابطه نزدیکی بین شاخص سبزینگی (عدد SPAD) و میزان کلروفیل برگ گیاه بذرالبنج (r= ۰/۹۸) در این آزمایش مشاهده شده‌است. در حالت کلی تنش کم‌آبی به‌طور مشخصی زیست‌توده ریشه و شاخساره بذرالبنج را کاهش داده‌است. تیمار نیتروژن تا حدودی توانسته این اثر منفی تنش را تعدیل و زیست‌توده اندام‌ها را افزایش دهد. به‌عنوان مثال در یک تنش مشخص، وزن خشک برگ در سطح ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار (N2) بیشتر از سایر سطوح نیتروژن است. بیشترین وزن خشک برگ (۷/۱۸ گرم) در تیمار N2W1 بدست آمده‌است (جدول ۲). همچنین با افزایش تنش کم‌آبی و سطوح نیتروژن، زیست‌توده برگ کاهش یافت، به‌طوری که کمترین ماده خشک برگ (۲/۷۶ گرم) در تیمار N3W3 مشاهده شده‌است. اما در مورد وزن خشک ساقه همان‌طور که اشاره شد اثر متقابل تیمارها روی این صفت معنی دار نبوده و به این دلیل اثرات ساده آنها بررسی شد. وزن خشک ساقه با افزایش تنش، کاهش و با افزایش نیتروژن ابتدا افزایش و بعد کاهش یافته است. وزن خشک کل شاخساره (برگ + ساقه) نیز مانند وزن خشک برگ روند یکسانی را در تیمارهای مربوطه داشته و در هر سطح تنش افزایش نیتروژن تا حد N2 باعث افزایش وزن خشک شاخساره شده‌است. درصد کاهش زیست‌توده از سطح N2 به N3 با افزایش سطح تنش از W1 به W3 بیشتر و کاملاً مشهود بوده‌است (جدول ۲). نسبت ماده خشک گیاهی در شاخساره و ریشه در تیمار N2W1 بیشتر از بقیه تیمارها بوده‌است. حداکثر (۲۵/۰۴ گرم) و حداقل (۹/۳۸ گرم) وزن خشک کل گیاه به‌ترتیب در تیمارهای N2W1 و N3W3 مشاهده شده‌است (جدول ۲). مقدار وزن خشک ریشه های ظریف نیز با افزایش تنش، در همه سطوح نیتروژن کاهش نشان داده ولی میزان N2 علاوه بر این‌که بیشترین تأثیر را روی این ریشه‌ها در تمام سطوح تنش داشته، با درصد کمتری نیز کاهش پیدا کرده‌است. به‌عنوان مثال، درصد کاهش وزن خشک این ریشه ها در تیمار N2W1 نسبت به N2W3 در حدود ۲۷٪ است، در حالی‌که این میزان در تیمار N3W1 نسبت به N3W3 در حدود ۳۲٪ می‌باشد (جدول ۲). رابطه رگرسیونی بین سطوح مختلف نیتروژن با وزن خشک ریشه های ضخیم، یک رابطه درجه دوم (R^2= ۰/۸۶) است. بیشترین

(۱۱/۰۶ گرم) و کمترین (۳/۹۹ گرم) مقدار وزن خشک ریشه (ریشه‌های ظریف + ریشه‌های ضخیم) به‌ترتیب در تیمارهای N2W1 و N3W3 حاصل شده‌است. تولید زیست‌توده یا ماده خشک اندام‌های گیاهی بذرالبنج (برحسب گرم) و اختصاص آن (درصد از کل زیست‌توده) در بین اندام‌های ریشه و شاخساره تحت تأثیر تنش کم‌آبی و سطوح نیتروژن در جدول ۲ نشان داده شده‌است. البته اختصاص زیست‌توده بیشتر به ریشه و حفظ نسبت بالاتر ریشه به شاخساره ممکن است در بهبود جذب آب مفید باشد.

تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره

نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل بین تنش کم‌آبی و سطوح مختلف نیتروژن برای محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین شاخساره و همچنین عملکرد هیوسیامین ریشه معنی دار نشد، به همین دلیل اثرات ساده آنها مورد بررسی قرار گرفت. اما اثر متقابل سایر صفات مانند محتوی هیوسیامین ریشه، عملکرد هیوسیامین و اسکوپولامین شاخساره و عملکرد کل آلکالوئید در سطح ۱٪ و محتوی و عملکرد اسکوپولامین ریشه در سطح ۵٪ معنی دار شدند. در پایان دوره آزمایش، بیشترین محتوی هیوسیامین (۰/۲۸۱٪ ماده خشک یا DW٪) و اسکوپولامین ریشه (DW٪ ۰/۲۳۲) و همچنین بیشترین محتوی هیوسیامین (DW٪ ۰/۹۳۷) و اسکوپولامین شاخساره (DW٪ ۰/۴۱۶) در تیمار N3W3 مشاهده گردید که البته از این نظر با تیمار N2W3 اختلاف معنی داری ندارد (شکل ۲). به طور کلی با افزایش تنش کم‌آبی و سطوح نیتروژن، محتوی متابولیت‌ها در اندام‌های گیاهی افزایش یافت. ولی روند این افزایش در مورد اسکوپولامین به نحویست که هر چه به سطوح تنش کم‌آبی و نیتروژن اضافه می‌شود، از درصد افزایش اسکوپولامین اندام‌ها کاسته می‌شود. به‌عنوان مثال، درصد افزایش اسکوپولامین ریشه از تیمار N3W1 به تیمار N3W2 در حدود ۲۴٪ است، اما از تیمار N3W2 به تیمار N3W3 در حدود ۹٪ می‌باشد. به عبارت دیگر با افزایش سطح تنش کم‌آبی از W2 به W3 در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (N3) از شیب افزایش محتوی اسکوپولامین ریشه کاسته می‌شود و این در حالیست که در سایر سطوح نیتروژن این روند مشاهده نشده‌است و همواره افزایش تنش کم‌آبی محتوی متابولیت ها را افزایش داده‌است (شکل ۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود عملکرد آلکالوئیدهای (هیوسیامین و اسکوپولامین) ریشه و شاخساره با افزایش تنش کم‌آبی در تیمارهای نیتروژن ابتدا تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم (N2) افزایش و بعد کاهش یافته است. درصد کاهش در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم (N3) بیشتر از سایر سطوح نیتروژن بوده‌است (شکل ۳). همبستگی مثبت و معنی‌داری ($p< ۰/۰۱$) بین عملکرد آلکالوئیدهای ریشه و شاخساره با محتوی کلروفیل ها مشاهده شده‌است. این همبستگی بین عملکرد کل آلکالوئیدها با وزن خشک ریشه های ظریف ($r= ۰/۹۰^{**}$)، با کل ریشه ($r= ۰/۹۳^{**}$) بدست آمده‌است. شکل ۴ به‌طور واضح عملکرد آلکالوئیدهای کل (هیوسیامین + اسکوپولامین) گیاه را تحت تأثیر اثر متقابل تنش کم‌آبی و نیتروژن نشان می‌دهد. با افزایش نیتروژن در همه سطوح تنش، ابتدا تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم عملکرد کل آلکالوئیدها افزایش و بعد کاهش نشان داد و میزان کاهش در سطح ۲۲۵ کیلوگرم با افزایش تنش شدت یافت. بیشترین آلکالوئید کل (۲۰/۵۲ میلی‌گرم در گیاه) در تیمار N2W1 و کمترین (۸/۹۵ میلی‌گرم در گیاه) آن در تیمار N3W3 حاصل شده‌است. دلیل اصلی کاهش عملکرد کل آلکالوئید در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در تمام شرایط رطوبتی می‌تواند به عدم سنتز آنها نسبت داده شود که دلیل آن هم ممکن است تأثیر منفی این تیمار روی ریشه‌های موئین (جایگاه بیوسنتزی آلکالوئیدها) گیاه باشد (Hashimoto *et al.*, 1991). رابطه رگرسیونی بین عملکرد کل آلکالوئید با وزن خشک شاخساره ($R^2= ۰/۹۳$) و نیز با وزن خشک ریشه ($R^2= ۰/۹۱$) گیاه یک رابطه خطی می‌باشد.

گین اثرات متقابل تنش کم‌آبی و نیتروژن بر روی تعداد و سطح برگ، ارتفاع گیاه، محتوی کلروفیل و سبزینگی برگ گیاه بذرالبنج (انحراف معیار ± میانگین)

سبزینگی برگ (SPAD)	کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ)	کلروفیل a (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	ح برگ ی‌مترمربع)
۵۵/۹۷ ± ۲/۴۵	۰/۱۰۹ ± ۰/۰۰۵۵	۰/۰۵۶ ± ۰/۰۰۵۵	۳۶/۷ ± ۲/۵	± ۳۳۸/۸
۶۳/۰۵ ± ۲/۹۲	۰/۱۲۲ ± ۰/۰۰۵۰	۰/۰۶۹ ± ۰/۰۰۴۴	۴۴/۰ ± ۳/۰	± ۳۷۴/۷
۶۷/۰۳ ± ۲/۶۵	۰/۱۳۴ ± ۰/۰۰۴۵	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۲۱	۵۳/۳ ± ۳/۵	± ۴۰۶/۹
۶۹/۱۰ ± ۱/۵۸	۰/۱۴۵ ± ۰/۰۰۶۵	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۰۵۴	۳۴/۰ ± ۳/۰	± ۳۲۴/۳
۵۰/۵۸ ± ۱/۴۲	۰/۰۹۲ ± ۰/۰۰۴۲	۰/۰۴۹ ± ۰/۰۰۳۶	۳۳/۰ ± ۳/۱	± ۲۸۷/۵
۵۸/۲۷ ± ۱/۳۹	۰/۱۱۲ ± ۰/۰۰۳۰	۰/۰۶۴ ± ۰/۰۰۱۵	۳۹/۰ ± ۳/۲	± ۳۳۴/۰
۶۲/۲۳ ± ۲/۳۴	۰/۱۲۴ ± ۰/۰۰۴۵	۰/۰۷۳ ± ۰/۰۰۴۲	۴۸/۷ ± ۲/۵	± ۳۷۸/۳
۵۴/۰۳ ± ۲/۴۴	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۰۵۵	۰/۰۶۰ ± ۰/۰۰۴۰	۲۷/۳ ± ۲/۴	± ۲۵۳/۱
۴۲/۴۲ ± ۲/۸۸	۰/۰۷۱ ± ۰/۰۰۶۰	۰/۰۴۱ ± ۰/۰۰۴۲	۲۸/۳ ± ۲/۵	± ۲۰۲/۷
۵۱/۸۰ ± ۲/۴۲	۰/۰۹۸ ± ۰/۰۰۶۹	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۲۵	۳۴/۲ ± ۳/۰	± ۲۹۹/۵
۵۷/۲۰ ± ۳/۶۶	۰/۱۱۰ ± ۰/۰۰۴۶	۰/۰۶۶ ± ۰/۰۰۲۳	۴۲/۳ ± ۲/۲	± ۳۴۶/۰
۳۸/۷۸ ± ۱/۶۰	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۴۰	۰/۰۳۶ ± ۰/۰۰۲۱	۲۱/۰ ± ۲/۰	± ۱۸۴/۴

۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت مزرعه‌ای

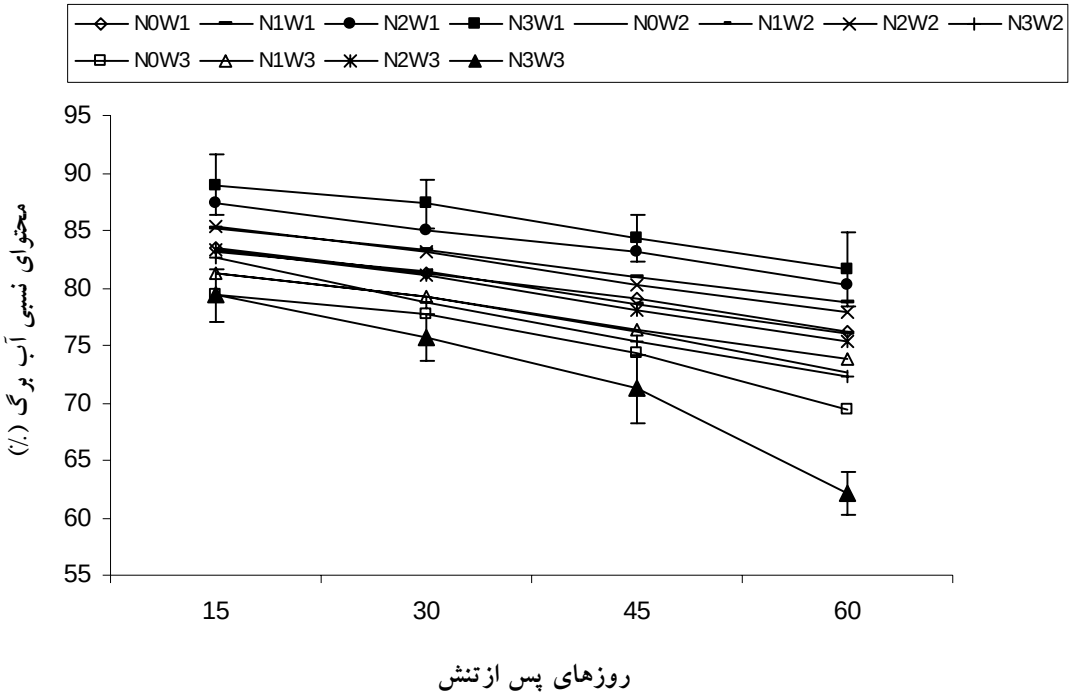
۲ کیلوگرم نیتروژن در هکتار

جدول ۲- میانگین تولید زیست‌توده ریشه و شاخساره (گرم) و اختصاص آن (درصدهای داخل پرانتز) بین اندام‌های گیاه بذرالبنج در تیمار تنش کم‌آبی و سطوح نیتروژن

ساقه		کل شاخساره		ریشه‌های ظریف		ریشه‌های ضخیم		کل ریشه		کل گیاه	
(٪۲۷/۱۸)	۹/۷۶	(٪۵۷/۳۰)	۳/۰۴	(٪۱۷/۸۶)	۴/۲۳	(٪۲۴/۸۴)	۷/۲۷	(٪۴۲/۷۰)	۱۷/۰۳	(٪۱۰۰)	
(٪۲۶/۵۷)	۱۱/۲۸	(٪۵۵/۵۱)	۳/۶۳	(٪۱۷/۸۷)	۵/۴۱	(٪۲۶/۶۲)	۹/۰۳	(٪۴۴/۴۹)	۲۰/۳۲	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۱۶)	۱۳/۹۸	(٪۵۵/۸۲)	۴/۵۲	(٪۱۸/۰۵)	۶/۵۴	(٪۲۶/۱۱)	۱۱/۰۶	(٪۴۴/۱۶)	۲۵/۰۴	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۴۵)	۹/۲۷	(٪۵۹/۶۱)	۲/۷۱	(٪۱۷/۴۳)	۳/۵۷	(٪۲۲/۹۶)	۶/۲۸	(٪۴۰/۳۹)	۱۵/۵۵	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۶۵)	۸/۶۰	(٪۵۷/۰۹)	۲/۷۶	(٪۱۸/۳۰)	۳/۷۱	(٪۲۴/۶۱)	۶/۴۷	(٪۴۲/۹۱)	۱۵/۰۸	(٪۱۰۰)	
(٪۲۶)	۱۰/۲۵	(٪۵۴/۷۸)	۳/۴۱	(٪۱۸/۲۱)	۵/۰۶	(٪۲۷/۰۱)	۸/۴۷	(٪۴۵/۲۲)	۱۸/۷۳	(٪۱۰۰)	
(٪۲۶/۲۷)	۱۲/۸۹	(٪۵۵/۵۳)	۴/۰۳	(٪۱۷/۳۶)	۶/۲۹	(٪۲۷/۱۰)	۱۰/۳۱	(٪۴۴/۴۷)	۲۳/۲۱	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۶۷)	۷/۳۴	(٪۵۸/۵۳)	۲/۱۸	(٪۱۷/۳۸)	۳/۰۳	(٪۲۴/۱۶)	۵/۲۰	(٪۴۱/۵۴)	۱۲/۵۴	(٪۱۰۰)	
(٪۲۸/۷۸)	۷/۳۰	(٪۵۷/۴۰)	۲/۲۶	(٪۱۷/۷۶)	۳/۱۶	(٪۲۴/۸۴)	۵/۴۲	(٪۴۲/۶۰)	۱۲/۷۲	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۷۷)	۹/۰۵	(٪۵۶/۲۲)	۲/۹۱	(٪۱۷/۵۶)	۴/۶۱	(٪۲۷/۸۲)	۷/۵۲	(٪۴۵/۳۸)	۱۶/۵۷	(٪۱۰۰)	
(٪۲۷/۷۶)	۱۱/۲۳	(٪۵۶/۰۳)	۳/۲۶	(٪۱۶/۲۵)	۵/۵۶	(٪۲۷/۷۲)	۸/۸۳	(٪۴۳/۹۷)	۲۰/۰۶	(٪۱۰۰)	
(٪۲۸/۰۳)	۵/۴۰	(٪۵۷/۴۶)	۱/۸۳	(٪۱۹/۵۱)	۲/۱۶	(٪۲۳/۰۳)	۳/۹۹	(٪۴۲/۵۴)	۹/۳۸	(٪۱۰۰)	

۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت مزرعه‌ای

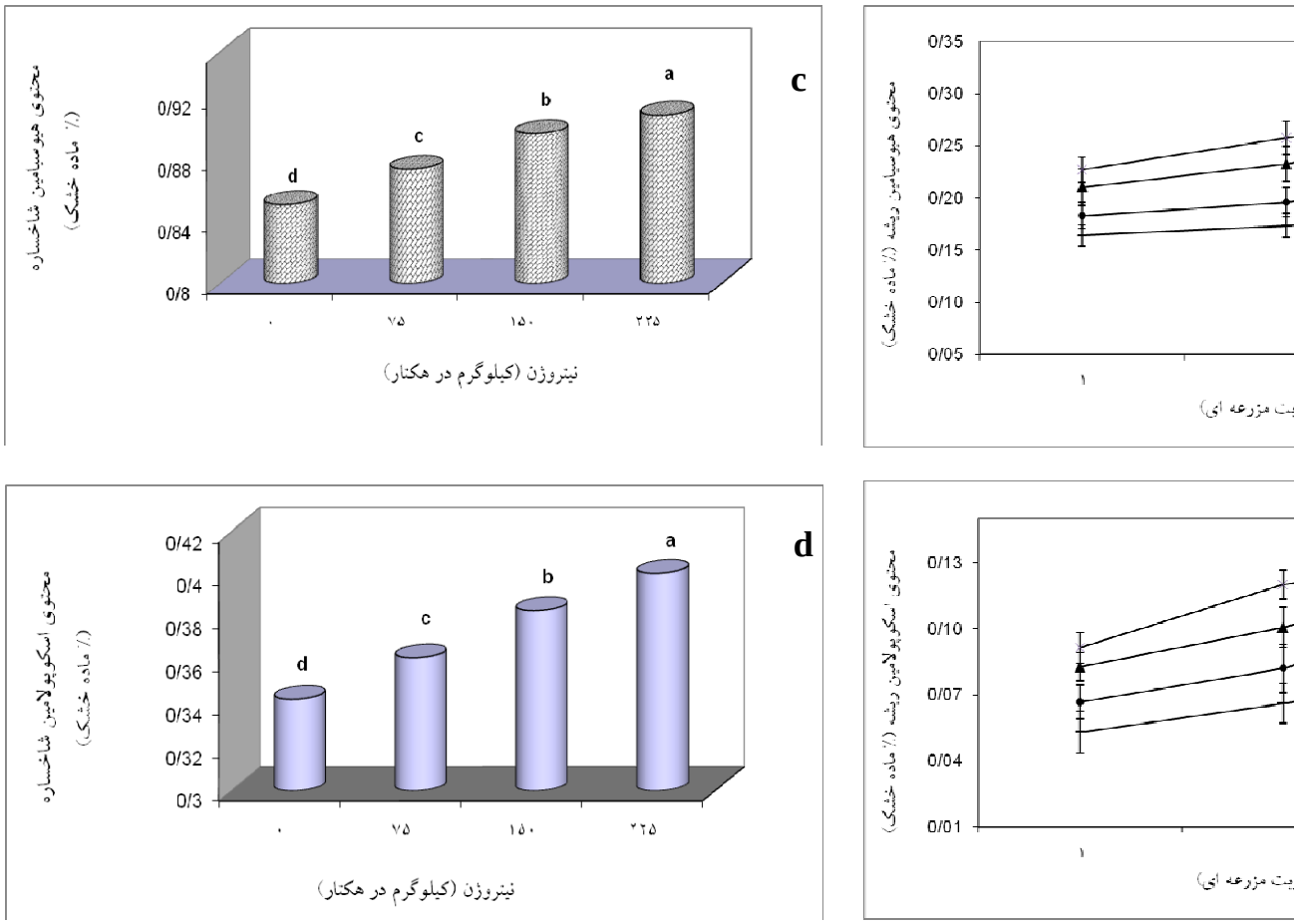
۲۷ کیلوگرم نیتروژن در هکتار



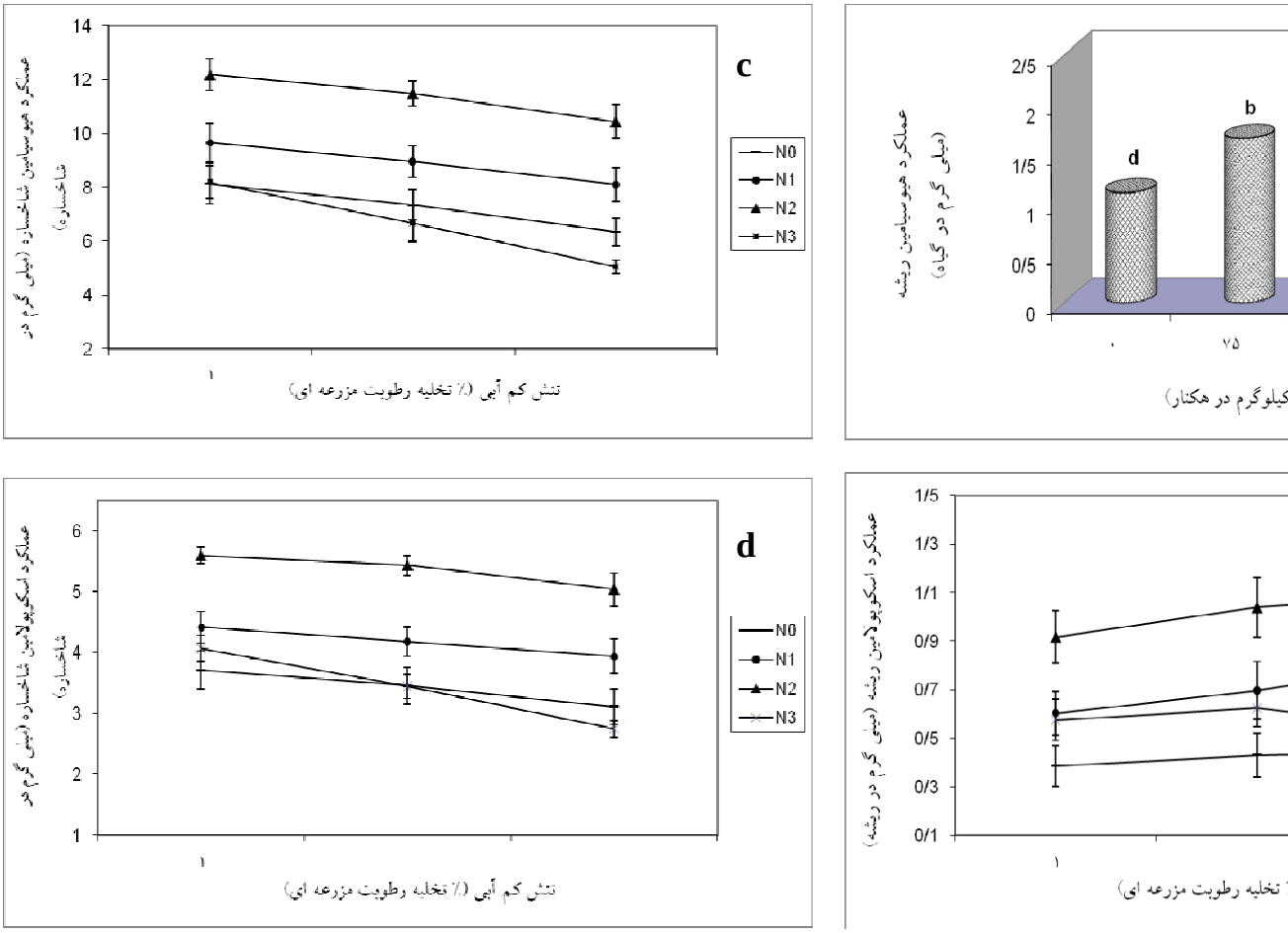
شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف نیتروژن (N0، N1، N2 و N3: به‌ترتیب ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار) و تنش کم‌آبی (W1، W2 و W3: به‌ترتیب تخلیه ۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت مزرعه‌ای) بر محتوی نسبی آب برگ (٪) گیاه بذرالبنج پس از ۱۵ تا ۶۰ روز از اعمال تنش کم‌آبی

بحث

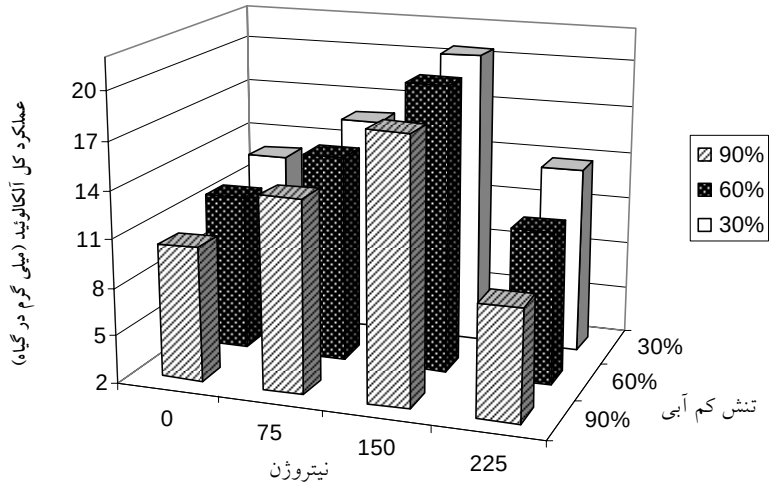
تنش خشکی و نیتروژن به‌عنوان اصلی‌ترین مؤلفه‌های محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان محسوب می‌شوند (Wua *et al*., 2008). در آزمایش حاضر، تنش کم‌آبی صرف‌نظر از تیمار نیتروژن، سبب کاهش شاخص‌های رشد و زیست‌توده گیاه بذرالبنج گردید. اگرچه پارامترهای رشد گیاه مانند تعداد برگ، سطح برگ، ارتفاع گیاه، زیست‌توده اندام‌های گیاه، واکنش‌های مثبتی به نیتروژن تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار (N2) نشان دادند، اما فراهمی نیتروژن به تنهایی نمی‌تواند بر روند کاهشی این صفات در اثر تنش کم‌آبی تأثیر بگذارد. این نتایج نشان‌دهنده این است که تنش کم‌آبی نقش اول محدودکنندگی و نیتروژن نقش دوم را دارا می‌باشد. دلیل اصلی افزایش تعداد و سطح برگ و همچنین ارتفاع گیاه در تیمار نیتروژن می‌تواند به نقش این عنصر در تقسیم سلولی نسبت داده شود. نتایج مطالعات زیاد در این مورد نشان می‌دهد که نیتروژن، ماده غذایی ضروری برای افزایش تقسیم سلولی، افزایش رشد و زیست‌توده کل گیاه از طریق افزایش رشد ساقه، برگ‌ها و ریشه است. کمبود نیتروژن در مراحل اولیه تکامل برگ در زمانی که تقسیم سلولی صورت می‌گیرد، باعث کاهش زیادی (در حدود ۸۰٪) در اندازه نهایی و وزن خشک برگ می‌شود (Cechin & Fumis, 2004). حساسیت زیاد رشد برگ به فراهمی نیتروژن در بسیاری از مطالعات گزارش شده‌است. اندازه برگ به فراهمی نیتروژن که باعث تولید و توسعه سلول است بسیار واکنش‌پذیر می‌باشد (Trapani *et al*., 1999).



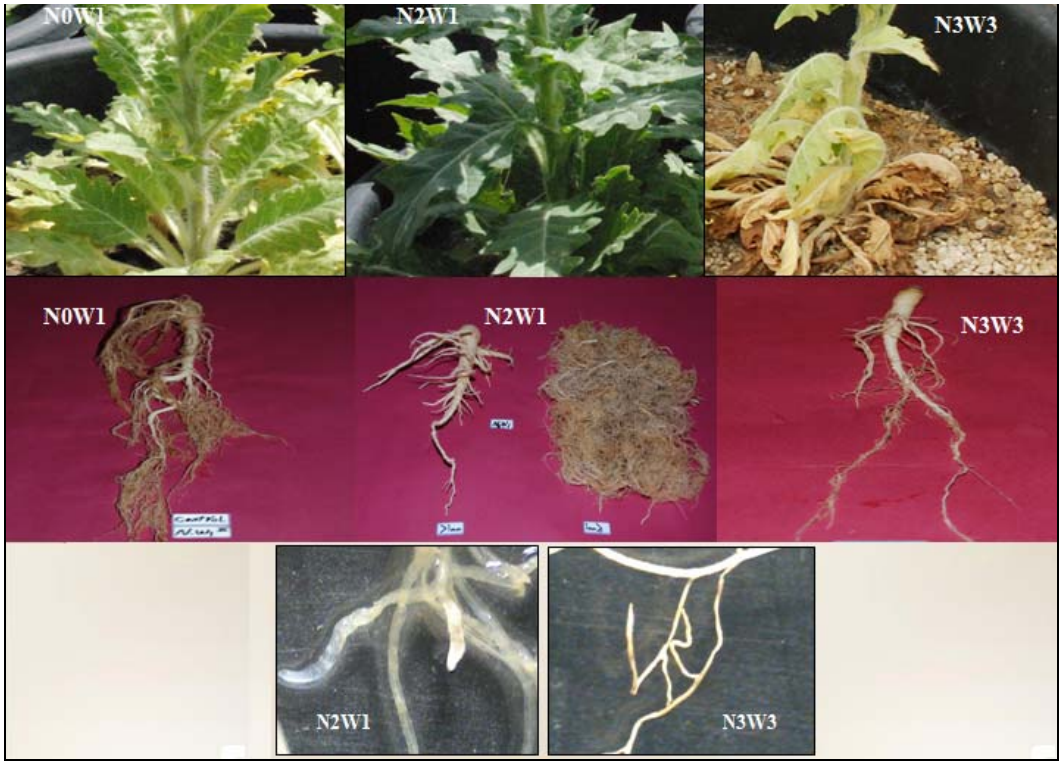
ب نیتروژن (N0، N1، N2 و N3: به‌ترتیب ۰، ۷۵،۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار) و تنش کم‌آبی (W1، W2 و W3: به‌ترتیب تخلیه ۳۰٪، ۶۰٪
رعه‌ای) روی محتوی هیوسیامین ریشه (a)، اسکوپولامین ریشه (b)، هیوسیامین شاخساره (c) و اسکوپولامین شاخساره (d) گیاه بذرالبنج



ن (N0، N1، N2 و N3: به‌ترتیب ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار) و تنش کم‌آبی (W1، W2 و W3: به‌ترتیب تخلیه ۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت
ی عملکرد هیوسیامین ریشه (a)، اسکوپولامین ریشه (b)، هیوسیامین شاخساره (c) و اسکوپولامین شاخساره (d) گیاه بذرالبنج



شکل ۴- اثر متقابل سطوح مختلف نیتروژن (N0، N1، N2 و N3: به‌ترتیب ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار) و تنش کم‌آبی (W1، W2 و W3: به‌ترتیب تخلیه ۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت مزرعه‌ای) روی عملکرد کل آلکالوئید گیاه بذرالبنج



شکل ۵- اثر سطوح مختلف نیتروژن (N0، N1، N2 و N3: به‌ترتیب ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار) و تنش کم‌آبی (W1، W2 و W3: به‌ترتیب تخلیه ۳۰٪، ۶۰٪ و ۹۰٪ رطوبت مزرعه‌ای) روی سبزینگی برگ، میزان ریشه‌های ظریف و ضخیم گیاه بذرالبنج (تصویر میکروسکوپی ریشه‌های ظریف در انتها نشان داده شده‌است)

کاهش محتوی نسبی آب برگ گیاهان بذرالبنج در شرایط تنش کم‌آبی ممکن است به‌دلیل افزایش غلظت ترکیب‌هایی مانند پرولین و یا سایر متابولیت‌ها باشد. چون در ابتدای دوره تنش، محتوی نسبی آب برگ در حد بالایی بوده و با افزایش رشد و تجمع ماده خشک در انتهای دوره تنش کاهش پیدا کرده‌است و دلیل اینکه چرا محتوی نسبی آب برگ گیاهان بذرالبنج در شرایط تنش کم‌آبی شدید (W3) و نیتروژن ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار (N3) نسبت به سایر تیمارها کاهش قابل‌ملاحظه‌ای داشت ممکن است با میزان تعرق آنها مرتبط باشد. چون گزارش شده‌است که در شرایط فراهمی زیاد نیتروژن، مقدار آبی که از طریق تعرق از دست می‌رود خیلی بیشتر از شرایطی است که میزان نیتروژن کم است (Cechin & Fumis, 2004).

افزایش تنش سبب کاهش محتوی کلروفیل و کاهش فتوسنتز می‌شود، چنین واکنشی می‌تواند به تخریب رنگدانه‌های کلروفیل و تولید گونه‌های اکسیژن فعال در تیلاکوئیدها (Reddy *et al*., 2004) نسبت داده شود. حفظ محتوی کلروفیل در شرایط محدودیت آبی که از طریق تیمار نیتروژن حاصل شده‌است به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک می‌کند. تیمار نیتروژن از اثرات مخرب تنش کم‌آبی روی رشد و محتوی کلروفیل کاسته و این ممکن است به‌دلیل نقش کلیدی مولکول نیتروژن در ساختار کلروفیل باشد. مطابق گزارش محققان افزایش تنش خشکی، کاهش در آسمیلاسیون کربن را در پی دارد که این نیز به نوبه خود منجر به کاهش طول ریشه می‌شود (Wua *et al*., 2008). این نتیجه از رابطه معنی‌دار بین سطح برگ و طول ریشه حاصل شده‌است. در مطالعه حاضر نیز رابطه معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۱) بین سطح برگ و پارامترهای ریشه، مانند وزن خشک ریشه‌های ظریف (r= ۰/۹۱) مشاهده شده‌است. به‌منظور کاهش مصرف و افزایش جذب آب، گیاهان در شرایط تنش، اغلب میزان رشد و تولید زیست‌توده بخش هوایی را کاهش داده و زیست‌توده بیشتری را به ریشه اختصاص می‌دهند، به‌طوری‌که نسبت ریشه به شاخساره را در حد بالاتری نگه می‌دارند. نتایج تحقیق حاضر (جدول ۲) نیز با این تئوری مطابقت دارد (Martin & Stephens, 2006). طبق گزارش محققان (Wua *et al*., 2008)، مقادیر اضافی کود سبب مرگ و از بین رفتن تارهای کشنده می‌شود و از این طریق مانع توسعه و افزایش طول سلول‌های ریشه شده و تأثیر منفی روی رشد ریشه دارد. تصویر میکروسکوپی ریشه‌های موئین گیاه بذرالبنج در مطالعه حاضر این واقعیت را نشان می‌دهد (شکل ۵). در مطالعه‌ای دیگر (Mengel & Kirkby, 1982) محققان دریافتند که مقادیر زیاد کود باعث افزایش فشار اسمزی خاک شده و در نتیجه سبب می‌شود آب بشدت توسط گرانوله‌های خاک نگهداری شود و باعث پس‌آبیدگی اندام‌های گیاه و به‌ویژه بخش هوایی به‌دلیل جذب و انتقال کمتر آب به ساقه‌ها، برگ‌ها و سایر قسمت‌ها شود. همچنین کاربرد زیاد کود ممکن است سبب تسهیل تولید اتیلن و اثر منفی آن روی ریشه شود (Tan & Hogan, 1997). بنابراین استفاده از مقادیر مناسب نیتروژن می‌تواند اثر تنش خشکی را از طریق تغییر راهکارهای سازگاری گیاه به شرایط خشک تعدیل کند و از این نظر به نیتروژن اصطلاحاً تعدیل‌کننده گفته می‌شود. افزایش زیست‌توده ریشه و شاخساره در برخی از تیمارهای آزمایش ممکن است به علت اختصاص بیشتر مواد فتوسنتزی به قسمت‌های فوق‌الذکر باشد. به‌عنوان مثال تیمار N3W1 بیشترین درصد زیست‌توده شاخساره (۵۹/۶۱٪) و نیز کمترین درصد زیست‌توده ریشه (۴۰/۳۹٪) را داشته است (جدول ۲). وجود بیشترین (۰/۸۳) و کمترین (۰/۶۸) نسبت ریشه به شاخساره به‌ترتیب در تیمارهای N1W3 و N3W1 می‌تواند دلیلی بر صحت این نظریات باشد. نکته‌ای که در این مورد باید به آن توجه شود این است که نسبت ریشه به شاخساره در تیمارها مهم می‌باشد. به‌عنوان مثال این نسبت (ریشه به شاخساره) در تیمار N3W3 در حدود ۰/۷۳ بوده اما در تیمار N1W3 در حدود ۰/۸۳ یعنی تیمار اخیر ماده خشک بیشتری را به ریشه‌ها اختصاص داده‌است (جدول ۲). گیاهان تحت تیمار N2W1 از نظر تعداد و سطح برگ، وزن خشک برگ و شاخساره، برتری قابل‌توجهی نسبت به سایر تیمارها دارند که این می‌تواند به تولید بیشتر ریشه‌های ظریف در این تیمار نسبت داده شود. چون گیاهانی که

دارای ریشه‌های خیلی ظریف هستند به‌دلیل مساحت بیشتر سطح ویژه ریشه، در جذب آب و مواد غذایی کارآمدتر می‌باشند (Smucker, 1993). دلیل توسعه بیشتر ریشه‌ها در این شرایط، ممکن است وجود رطوبت و نیتروژن کافی باشد که متعاقباً باعث افزایش کارایی نیتروژن می‌شود. به‌طور کلی واکنش‌های مرفولوژیک گیاه بذرالبنج به سطوح مختلف نیتروژن در شرایط مختلف تنش خشکی ثابت نبوده و در مقادیر کم (N1) تا متوسط (N2) باعث افزایش در بیشتر صفات مورد بررسی شده‌است، اما در نیتروژن زیاد (N3) یا باعث کاهش این صفات شده و یا تأثیر اندکی روی آنها داشته‌است. چنین واکنش‌هایی در استفاده از نیتروژن به تعادل بین جذب و استفاده از آب و نیتروژن نسبت داده می‌شود و اشاره به این دارد که گیاهان رشدشان را برای جذب و توزیع منابع محدودکننده رشد تنظیم می‌کنند (Monclus *et al*., 2006). همچنین گزارش شده‌است (Broadley *et al*., 2000) که گیاهان اغلب از نیتروژن در ابتدا برای تولید و نگهداری برگ‌ها به‌منظور تثبیت حداکثری کربن استفاده می‌کنند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که منابع مناسبی از آب و نیتروژن ممکن است به‌دلیل کمک به آسمیلاسیون بیشتر کربن، سبب رشد بهینه‌ای شده باشد که گیاه به‌وسیله تعداد و سطح برگ و زیست‌توده اندام‌های هوایی و زمینی آن را نشان داده‌است. کود نیتروژن می‌تواند مقاومت به تنش را در گیاهان افزایش دهد، همچنین سبب افزایش ماده خشک در شرایط تنش شود که دلیل اصلی آن افزایش شاخص سطح برگ و دوام سطح برگ گزارش شده‌است (Latiri-Souki *et al*., 1998). بنابراین به وضوح مشخص است که مقادیر اضافی نیتروژن همیشه نقش مثبت در تخفیف اثر منفی تنش خشکی روی رشد گیاه ندارد.

عملکرد آلکالوئیدهای ریشه و شاخساره با افزایش تنش کم‌آبی تحت تیمارهای نیتروژن ابتدا تا سطح ۱۵۰ کیلوگرم (N2) افزایش و بعد کاهش یافته‌است. درصد کاهش در تیمار ۲۲۵ کیلوگرم بیشتر از سایر سطوح نیتروژن بوده‌است که این می‌تواند به‌دلیل تغییرات پارامترهای رشد (ریشه و شاخساره) در تیمارهای مربوطه باشد. محتوی آلکالوئیدها در گیاهان می‌تواند از طریق دست‌ورزی‌های ژنتیکی و یا شرایط محیطی افزایش یابد و از آنجایی‌که آلکالوئیدها ترکیب‌هایی نیتروژنی هستند، انتظار می‌رود که فراهمی نیتروژن نقش بسیار مهمی در بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها در گیاهان بازی کند. گزارش شده‌است که نیتروژن باعث افزایش محتوی آلکالوئیدها در برخی از گیاهان دارویی و غیر دارویی مثل توتون، لوپین، جو، داتوره، شابیزک و خشخاش می‌شود (Waller & Nowacki, 1979)، ولی اطلاعات دقیقی روی اثر کود نیتروژن و تنش کم‌آبی روی محتوی و عملکرد آلکالوئیدهای ریشه و شاخساره گیاه دارویی بذرالبنج وجود ندارد. فراهم نمودن نیتروژن از ابتدای رشد برای گیاه، جهت دستیابی به تشکیل بهینه آلکالوئید ضروریست. زیرا در دسترس بودن نیتروژن علاوه بر تولید زیست‌توده، سنتز آلکالوئید را نیز تنظیم می‌کند. زمان بحرانی کاربرد نیتروژن ۴۰ روز پس از جوانه‌زنی گزارش شده‌است (Panda, 2002). مطابق فرضیه CNB یا (Carbon Nitrogen Balance)، کاهش فراهمی مواد غذایی منجر به سرمایه‌گذاری کمتر گیاه برای متابولیت‌های ثانویه حاوی N می‌شود (Wua *et al*., 2008). محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه با افزایش تنش کم‌آبی و نیتروژن افزایش می‌یابد که بخشی می‌تواند مرتبط با کاهش زیست‌توده اندام‌ها تحت این شرایط و بخشی دیگر نیز به‌دلیل تأثیر مستقیم تنش و نیتروژن روی ساخت این متابولیت‌ها باشد. بنابراین می‌توان نیتروژن را مانند تنش خشکی یک الیسیتور یا محرک تولید متابولیت‌های ثانویه نامید.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که با توجه به اینکه هدف از تولید تجاری گیاهان دارویی، بدست آوردن مقادیر بیشتری زیست‌توده در واحد سطح است که محتوی بالاتری از مواد مؤثره نیز داشته باشند تا هزینه استخراج مواد مؤثره و تولید صنعتی دارو را مقرون به صرفه نماید؛ بنابراین نتایج مطالعه این تحقیق نیز حکایت از آن دارد که گیاه بذرالبنج در تیمار تنش کم‌آبی متوسط (W2) به همراه کود نیتروژن (نیترات‌آمونیوم) به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار علاوه بر اینکه دارای مقادیر مناسبی از محتوی و عملکرد هر دو

آلکالوئید می‌باشد، بلکه بیشترین میزان اسکوپولامین را نیز که نشان از کیفیت آلکالوئید است داراست.

سپاسگزاری

از تمامی اعضای هیئت علمی و کارمندان محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی و مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Broadley, M.R., Escobar-Gutierrez, A.J., Burns, A. and Burns, I.G., 2000. What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? New Phytologist, 147(3): 519-526.
- Baricevic, D., Umek, A., Kreft, S., Maticic, B. and Zupancic, A., 1999. Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). Environmental and Experimental Botany, 42: 17-24.
- Cechin, I. and Fumis, T.D.F., 2004. Effect of nitrogen supply on growth and photosynthesis of sunflower plants grown in the greenhouse. Plant Science, 166(5): 1379-1385.
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amono, Y., Kohno, J., Iwanari, H., Usuda, S. and Yamada, Y., 1991. Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. Journal of Biological Chemistry, 266(7): 4648-4653.
- Jeon, J.S., Lee, S.S., Kim, H.Y., Ahn, T.S. and Song, H.G., 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. The Journal of Microbiology, 41(4): 271-276.
- 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(4): 239-242.
- Latiri-Souki, K., Nortcliff, S. and Lawlor, D.W., 1998. Nitrogen fertilizer can increase dry matter, grain production and radiation and water use efficiencies for durum wheat under semi-arid conditions. European Journal of Agronomy, 9: 21-34.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes Methods in enzymology, 148: 350-382.
- Martin, P.J. and Stephens, W., 2006. Willow growth in response to nutrients and moisture on a clay landfill cap soil. I. Growth and biomass production. Bioresource Technology, 97(3): 437-448.
- Mengel, K. and Kirkby, E.A. 1982. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern, Switzerland, 849p.
- Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F.M., Delay, D., Petit, J.M., Barbaroux, C., Thiec, D.L., Brechet, C. and Brignolas, F., 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides*, *Populus nigra*. New Phytologist, 169(4): 765-777.
- Nussbaumer, P., Kapetanidis, I. and Christen, P.H., 1998. Hairy roots of *Datura candida* × *D. Aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. Plant cell reports, 17(5): 405-409.
- Oksman-Caldentey, K.M. and Hiltunen, R., 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field Crops Research, 45(1-3): 57-69.
- Panda, H., 2002. Medicinal Plants Cultivation and their Uses. National Institute of Industrial Research, 598p.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M., 2004. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161(11): 1189-1202.
- Selmar, D., 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. Landbauforschung=VTI Agriculture and Forestry Research, 58: 139-144.
- Smucker, A.J.M., 1993. Soil environmental modifications of root dynamics and measurement. Annual Review of Phytopathology, 31: 191-216.
- Sreevalli,Y., Kulkarni, R.N., Baskaran, K. and Chandrashekara, R.S., 2004. Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. Industrial Crops and Products, 19(2): 191-195.
- Tan, W. and Hogan, G.D., 1997. Physiological and morphological responses to nitrogen limitation in jack pine seedlings: potential implications for drought tolerance. New Forests, 14: 19-31.
- Trapani, N., Hall, A.J. and Weber, M., 1999. Effects of constant and variable nitrogen supply on sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaf cell number and size. Annals of Botany, 84(5): 599-606.
- Waller, G.R. and Nowacki, E.K., 1979. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press, New York, 294p.
- Willaman, J.J. and Li, H.L., 1997. Alkaloid Bearing Plants and Their Contained Alkaloids. Lloyd Library and Museum and the American Society of Pharmacognosy, 286p.
- Wua, F., Bao, W., Lia, F. and Wu, N., 2008. Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. Environmental and Experimental Botany, 63(1-3): 248-255.
- Zayed, R. and Wink, M., 2004. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Zeitschrift für Naturforschung, 59(11-12): 863-867.

Nitrogen effects on growth, biomass allocation, root and shoot alkaloids production of black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under water decici stress

M. Ghorbanpour[1*], N. Majnon Hossieni[2], Sh. Rezazadeh[3], M. Omidi[2], K. Khavazi[4], M. Hatami[5] and R. Ghafarzadegan[6]

1*- Corresponding author, Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran, E-mail: m_ghorbanpour@yahoo.com
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faulty of Agricultural Science, Tehran University, Karaj, Iran
3- Institute of Medicinal Plants (IMP), Karaj, Iran
4- Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran
5- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran
6- Pharmaceutical Engineering Group, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: January 2012 Revised: May 2012 Accepted: May 2012

Abstract

In order to indicate the water deficit stress and nitrogen fertilization effects on alkaloids yield and content of *Hyoscyamus niger* L. plant parts (root and shoot), this experiment was conducted at the full flowering growth stage in greenhouse conditions. Plants were treated with different nitrogen application (0, 75, 150 and 225 kg/ha N as ammonium nitrate in the form of solution, N0-N3) before the commencement of water deficit stress treatment (30, 60 and 90% depletion of water from field capacity, W1-W3). Extracted alkaloids were analyzed by Gas chromatography /mass spectrometery (GC/MS) analysis using a Younglin Acme 6000 GC system equipped with a flame ionization detector (FID) and HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). The identification of alkaloids was based on the comparison of their GC retention time and mass spectra data with their standards substances. Results showed that the highest alkaloid content values in root (HYO: 0.281 %DW; SCO: 0.232 % DW) and shoot (HYO: 0.937%DW; SCO: 0.416%DW) were achieved in plants grown under sever water deficit stress (W3) accompanied with nitrogen supply of 225kg/h (N3). The maximum and minimum (20.52 and 8.95mg.plant^{-1}) total alkaloids yield in whole plant were obtained in N2W1 and N3W3 treatments, respectively. The survey results indicated that *H. niger* in the treatment of moderate water deficit stress (W2) along with 150kg N.h^{-1} (N2) in addition to having a good amount of content and performance of both alkaloids, it also contained the highest level of SCO, indicating alkaloid quality.

Key words: *Hyoscyamus niger* L., tropane alkaloids, hyoscyamine, scopolamine, nitrogen, water deficit stress.