بررسی قدرت سنتز نیکوتین در یافتهای ساقه‌توتون باسما

دکتر حسن ابراهیم زاده و غلامحسین طریقی
گروه زیست شناسی ـ دانشکده علوم ـ دانشگاه تهـــــران

خلاصـــــه

امکان سنتز نیکوتین بوسیله بافتهای‌ساقه‌توتون ، با کشت قطعات محور گل آذین‌توتون باسما بر روی محیط های مناسب برای تشکیل ریشه ، جوانه های رویشی و غنچه های نوپدید تحقق یافت . نتایج حاصله نشان داد که نوع اندام نوپدید به مقدار اسیداندولیل استیک (A) و کینتین (K) در محیط کشت‌بستگی داشته ، غنچه های گل در محیط فاقد این ترکیبات تشکیل می‌شوند در حالیکه جوانه‌های رویشی درشرایطی که نسبت A/K برابر با 0.1 وریشه ها درشرایطی که این نسبت برابر با10 می‌باشد تشکیل می‌گردند .

بررسی مقدار نیکوتین‌در قطعات جداکشت (Explantat) در طول‌اندام‌زائی نشان داد که در بیستمین‌روز کشت مقدار این‌ماده در قطعات کاهش پیدا کرده‌و وجود اسیداندولیل استیک،وکینتین‌در محیط‌کشت‌این کاهش‌را تشدید می‌نماید . پس از ظهور اندام برروی قطعات جداکشت ، مقدار نیکوتین مجددا " افزایش پیدا کرده و قطعات حامل ریشه مقدار بیشتری نیکوتین بوجود می‌آورند . بنابر این قدرت سنتز نیکوتین در بافتهای ساقه نیز وجود داشته و این قدرت باتشکیل بافت کال از سلولهای‌زیر اپیدرمی‌وهمچنین‌تشکیل‌ریشه ازبافتهای‌عمیق‌ساقه‌آشکارمی‌شود . بعلاوه مقدارنیکوتین در قطعات جداکشت به مقدار اسید اندولیل استیک و کینتین موجود در محیط مستقیما " بستگی نداشته تابع نوع‌اندام نوپدید می‌باشد .

در قطعاتی که حامل ریشه و جوانه های‌رویشی با هم می‌باشند ، بافت کال بیش از سایر بخش ها تشکیل‌دهنده قطعات جداکشت محتوی نیکوتین بوده جوانه‌های رویشی که از تمایز بعضی از سلولهای کال بوجود می‌آیند نسبت‌به این سلولها و ریشه نیکوتین کمتری در بر دارند .

مقدمـــــه

امروزه بااطمینان کامل‌می‌توان‌گفت که در تمام گونه‌های‌توتون و تنباکو بیوسنتزنیکوتین‌اساسا "درریشه ها انجام می‌گیرد (۱۳)وقطعات این‌اندام می‌توانند در شرایط‌کشت‌سترون مخصوصا "این آلکالوئیدرا بوجودآورند (۳ و۴ و۱۲ و۱۳) . بعلاوه مشاهده نیکوتین‌در کال‌حاصل از کشت قطعات‌ریشه ، ساقه وبرگ‌توتون‌این فکررا بوجود آورده‌است‌که‌بین‌اندامهای

تشکیل دهنده این گیاه از نظر قدرت سنتز نیکوتین تفاوتی وجود ندارد (۵) . باوجوداین مقدار نیکوتین در کال کمتراز بافتهای‌تشکیل‌دهنده قطعات‌جداکشت‌اولیه بوده (۱۳) کال‌حاصل ازساقه بعضی از واریته‌های توتون‌کاملا " فاقد نیکوتین می‌باشـــد (۱۳) .

مطالعه اثر ترکیبات تنظیم کننده رشد در تشکیل نیکوتین‌نشان‌داده است که کال توتون در محیط‌کشت محتوی اسید ۲ و ۴ ــ دی کلروفنوکسی‌استیک قادر به سنتز نیکوتین نبوده‌ولی درحضور اسید اندولیل استیک این قدرت درکال آشکار می‌گردد (۶ و ۱۴) . درحقیقت‌این‌دو ترکیب اکسینی دارای اثرمشابهی در تشکیل نیکوتین بوده (۱۲)ولی باتراکم مساوی هورمون اول نسبت به هورمون دوم دارای‌اثر بازدارندگی بیشتری می‌باشد (۱۴) . بعـلاوه مشاهده گردیده است‌که کینتین تشکیل نیکوتین را درغیاب ترکیبات اکسینی تحریک کرده هریک از دو ترکیب‌اکسینی فوق‌الذکر (اسید اندولیل استیک یا اسید دی کلروفنوکسی استیک) حتی در حضور کینتین بشدت مانع تشکیل نیکوتین می‌گردند (۱۳) .

درکلیـه این تجربیات محققان‌از تشکیل جوانه و یا ریشه های نوپدیدبرروی بافتها و یا قطعات جداکشت سخنی بمیان نیاورده اند (۱۴) . بهمین‌علت بنظر ما جالب آمد که ببینیم آیابین بیوسنتز نیکوتین و نوع اندام‌های نوپدیدی که تحت اثر ترکیبات تنظیم کننده رشد بوجود می‌آیند رابطه ای وجود دارد یا خیر .

روش کـــــار

گیاهان مادر در گلخانه ، در نور طبیعی و در درجه حرارت‌نسبتا " ثابت (تقریبا " ۲۲ درجه سانتی‌گراد)کشت داده شدند و پس از تشکیل گل برروی آنها محورهای گل‌آذین جهت کشت در محیط مصنوعی مورد استفاده قرارگرفتند . باین منظور ابتدا برگها از روی محورهای گل آذین کنده شدند و ساقه های حاصله با استفاده از محلول ۷ % هیپوکلریت کلسیم و قرارگرفتن بمدت ۸ دقیقه درداخل آن استریل گردیدند . سپس ساقه های استریل شده در بین دو برگ کاغـذ استریل خشک شدند و قطعات نیم سانتیمتری میان گره های آن در روی محیط‌کشت ژلوز دار که بطور استریل در داخل لوله های کشت تهیه گردیده‌بودند منتقل گردیدند . این‌محیط‌کشت درکلیه تجربیات‌محتوی‌ماکروالمانهای‌محلول‌غذائی دوبار رقیق شده کنوپ ، اولیگوالمانهای‌برتلو ، گلوکز (۳۰ گرم درلیتر) ، آگار (۱۳ گرم در لیتر)و ویتامین ها (تیامین ۱ میلی گرم در لیتر ، پیریدوکسین ۰/۵میلی‌گرم در لیتر ، اسیدنیکوتینیک ۱ میلی گرم‌در لیتر)بوده و درتجربیات‌مختلف به نسبتهای متفاوت اسید اندولیل استیک و کینتین به آنها اضافه شده است .

ظهور قدرت تشکیل اندامهای نوپدید در قطعات‌جداکشت در حرارت آزمایشگاه تحقق‌پیدا کرده و برش‌هائی‌که در مراحل مختلف رشد و نمو از قطعات جداکشت تهیه گردیده مطابق روش کلاسیک با مخلوطی از کارمن و سبز متیل رنگ آمیزی گردیده است .

استخراج الکالوئیدها از نمونه‌های‌مورد‌مطالعه‌یا بکمک آب‌ویابوسیله‌دی کلرومتان‌انجام گرفته‌روش کروماتوگرافی دو بعدی برروی پلاک‌های سیلیکاژل جهت تشخیص این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳) . سنجش نیکوتین در عصاره های حاصله یا بااستفاده‌از یک روش حجمی (۱۴)و یابوسیله یک روش اسپکتروفتومتری‌که در سال۱۹۶۶ بوسیله کورستا پذیرفته شده صورت گرفته است .

نتایج حاصلـــــه

۱ ــ تشکیل ریشه و جوانه های نوپدید

مطالعه قدرت تشکیل اندامهای نوپدید برروی قطعات میان گره محورگل آذین توتون باسما نشان داده است که

بـــر روی یک محیط کشت مناسب ، قطعات جداکشت می توانند برحسب مقدار اسید اندولیل استیک (A) و کینتین (K) موجود در محیط خوامریشه‌وخواه‌جوانه‌های رویشی‌ویا زایشی‌بوجود آورند (شکل ۱) . نتایج‌حاصله که در جدول شمارهٔ ۱ معرفی شده نشان می‌دهد که :

ـ غنچه ها در غیاب ترکیبات محرک رشد ، برروی قطعات جداکشت تشکیل می‌شوند .

ـ جوانه‌های رویشی موقعی برروی‌قطعات جداکشت‌تشکیل‌می‌گردند که‌نسبت A/K در محیط کشت‌برابر با 1.0 می‌باشد در حالیکه اگر این نسبت برابر با 10 باشد قدرت تشکیل ریشه در قطعات آشکار می‌گردد .

جدول شمارهٔ ۱ ـ اثر اسید اندولیل استیک (A) و کینتین (K) در تشکیل ریشه ، جوانه های رویشی و غنچه های نوپدید برروی قطعات محورگل‌آذین توتون باسما

تراکم A , K	تعداد قطعات مطالعه شده	تعداد قطعات حامل ریشه	تعداد ریشه‌هائی که‌درروی هرقطعه ظاهرشده است	تعداد‌قطعات حامل جوانه های رویشی	تعداد جوانه‌هائی که‌درروی‌هر قطعه ظاهر شده‌است	تعداد‌قطعات حامل غنچه‌های گل	تعداد غنچه‌هائی که درروی هرقطعه ظاهرشده است
A=0 K=0	۴۵	۳	–	–	–	۱۷	۱
A=0.5 ppm K=5 "	۴۷	–	–	۴۷	۶	–	–
A=5 " K=0.5	۴۲	۴۰	۳	۳	–	۲	–

در شرایط مناسب برای تشکیل ریشه ،اندام‌زائی با جوان شدن بعضی ازسلولهای‌پارانشیمی درنزدیکی‌آوندهای چوب آبکش آغازمی‌شود درحالیکه در شرایط مناسب‌برای‌تشکیل‌جوانه‌های‌رویشی‌وزایشی سلولهائی‌که درمنطقه زیرا پیدرمی قرار گرفته اند تقسیم شده و بافتی بنام کال بوجودمی‌آورند و سپس از جوان ترشدن بعضی‌از سلولهادر داخل این‌بافت وتمایز مجدد این سلولها است که اندامهای مذکور تشکیل می‌گردند (شکل ۲) .

۲ ـ تغییرات مقدار نیکوتین در طول تشکیل اندامهای نوپدید

مطالعه تغییرات مقدار نیکوتین‌در قطعات جداکشت‌در طول تشکیل اندامهای‌مختلف نشان می‌دهد (جدول ۲) که در بیستمین روز کشت‌مقدار نیکوتین در قطعات جداکشت کمتر از نخستین روز کشت بوده وجود اسید اندولیل‌استیک (A) و کینتین (K) در محیط‌کشت این کاهش را تشدید می‌نماید .

جدول شمارهٔ ۲ ــ تغییرات مقدار نیکوتین در قطعات محور گل آذین توتون در طول تشکیل جوانه‌های رویشی ، غنچه‌های گل و ریشه‌های نوپدید .

مدت کشت	تراکم K.A در محیط کشت	صفات مشخصه قطعه جدا کشت	مقدار نیکوتین برحسب میلی‌گرم در هرگرم از ماده تر	مقدار نیکوتین برحسب میلی‌گرم در هرگرم از ماده خشک
صفر روز	—	—	۰/۴	۱/۶
۲۰ روز	A = 0 K = 0	—	۰/۱	۰/۴
	A = 0/5ppm K = 0/5ppm	—	۰	۰
	A = 5ppm K = 0/5ppm	—	۰/۰۳	۰/۳
۳۰ روز	A = 0 K = 0	—	۰/۵	۲/۷
	A = 0/5ppm K = 5ppm	—	۰/۱	۰/۴
	A = 5ppm K = 0/5ppm	قطعات فاقد ریشه بوده اند	۰/۱	۰/۶
	A = 5ppm K = 0/5ppm	قطعات حامل ریشه بوده‌اند	۰/۶	۳/۳

در سی‌امین روز کشت ، اندامها برروی قطعات جداکشت ظاهر می‌شوند و مقدار نیکوتین مجددا "افزایش پیدا می‌کند . در چهل و پنجمین روز کشت (جدول ۳) قطعاتی که برروی محیط محتوی A=5ppm و K = ۰/۵ ppm کشت داده شده و حامل جوانه و ریشه هر دو می‌باشند مقدار زیادتری نیکوتین سنتز کرده در این قطعات بافت کال زیادتر از بخش‌های دیگر تشکیل دهنده قطعات جداکشت محتوی نیکوتین می‌باشد . این مقدار قابل مقایسه با مقادیری است که در اندامهای هوائی گیاه کامل توتون وجود دارد .

جدول شماره ۳ ـ مقدار نیکوتین در بخش‌های مختلف تشکیل دهنده قطعات جدا کشت پس از ۴۵ روزرشدونمودربخش‌های جوان و مسن ساقه و برگ یکگیاه کامل

اندام مورد مطالعه	مقدار نیکوتین برحسب میلی‌گرم درهرگرم ازماده‌تر	اندام مورد مطالعه	مقدار نیکوتین برحسب میلی‌گرم ـ رهرگرم از ماده تر
کال	۱/۰۳	محور گل آذین	۰/۴۰
ریشه های نوپدید	۰/۸۸	بخش میانی ساقه	۰/۲۰
جوانه های نوپدید	۰/۴۲	بخش تحتانی ساقه	۰/۱۰
قطعات اولیه	۰/۲۴	برگهای جوان	۲/۴۰
		برگهای مسن	۳/۲۰

بحث در نتایج

شرایط لازم برای تشکیل ریشه ، جوانه های رویشی وغنچه‌های نوپدید در روی قطعات محور گل‌آذین توتون باسما مشخص گردید و معلوم شد که نوع اندام نوپدید به تعادل بین اسید اندولیل استیک و کینتین (نسبت A/K) در محیط کشت بستگی دارد . این نتیجه با آنچه‌که تاکنون بامطالعه‌گیاهان دیگر بدست‌آمده‌مطابقت می‌نماید (۱ و ۲ و ۹و ۱۰ و ۱۱) تعادل مذکور در روی مقدار نیکوتین‌موجود در قطعات جداکشت نیزتاثیر داشته درشرایطی که نسبت A/K مناسب برای تشکیل ریشه برروی قطعات جدا کشت می‌باشد مقدار نیکوتین در قطعات قبل از تشکیل این اندام کاهش و پس از تشکیل آن بتدریج افزایش پیدامی‌نماید درحالیکه‌با نسبتی ازA/K که مناسب برای‌تشکیل‌جوانه می‌باشد مقدار نیکوتین‌درقطعات قبل از تشکیل اندام‌کاهش بیشتری‌پیدا کرده و بعد از ظهوراین اندام افزایش کمتری حاصل‌می‌نماید . این افزایش‌خفیف هم احتمالا " از ظهور ریشه هائی ناشی می‌شود که به تعداد کم در شرایط مناسب برای‌تشکیل جوانه بر روی قطعات ظاهر می‌گردند .

نتایج اخیر نشان می‌دهد که توانائی سنتز نیکوتین در ساقه توتون نیز وجود داشته (۵) اثر تحریک‌کنندگی ، سازمان دهندگی‌ویا بازدارندگی ترکیبات‌تنظیم‌کننده رشد به تراکم‌آنهادر داخل محیط کشت‌بستگی‌دارد (۶ و ۱۲ و ۱۴) .

BIBLIOGRAPHIE

1. AGHION-PRAT D., 1965. Néoformation de fleurs in vitro chez Nicotiana tabacum L. Physiol. Vég.,3(3), 229-303.

2. BIGOT K., 1974. Obtention de plantes entiéres à partir de pedoncules floraux de Gloxinia hybrida cultivés in vitro. Z.Pflanzen-physiol. Bd. 73, S., 178-183.

3. DAWSON R.F., 1960. Biosynthesis of the Nicotiana alkaloids.Am.Scientist., 48, 321-340.

4. DAWSON R.F., D.R. CHRISTMAN, A.D'ADAMO,M.L. SOLT and A.P. WOLF 1960. The biosynthesis of nicotine from isotopically labelled nicotinic acid. J.Am. Chem. Soc., 82, 2628-2633.

5. FURUYA T H. KOJIMA and K. SYONO, 1966. Nicotine and anabasine in tobacco callus. Chem. Pharm. Bull., 14 (10), 1189-1190.

6. FURUYA T., H. KOJIMA and K. SYONO, 1967. Regulation of nicotine synthesis in tobacco callus tissue. Chem. Pharm. Bull. 15 (6), 901-903.

7. GATTERMANN L., 1947. Manuel pratique de chimie organique. Payot, Paris.

8. LEDERER E., 1959. Chromatographie en chimie organique et biologique. Volume I, généralités et applications en chimie organique. Masson et Cie editeurs. Paris.

9. MICHNIEWICS M. and A. KAMIENSKA, 1964. Flower formation induced by Kinetin and Vitamin E treatment in cold-requiring plant (Cichorium intybus) grown under no-inductive conditions. Naturwiss,51, 295-296.

10. ROSSINI L.M. H. et J.P.NITSCH, 1966. Induction de la floraison in vitro chez une plante de jours courts, Streptocarpus nobilis. C.R. Acad. Sc. Paris. 263, 1379-1382.

11. SKOOG F. and C.O. MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro in the biological action of growth substances. Symp. Soc.Exp. Biol., 11, 118-131.

12. SOLT M.L.,1957. Nicotine production and growth of excised tobacco root culture. Plant physiol., 32, 480-484.

13. TABATA M.,H. YAMAMOTO, N.HIRAOKA, Y. MARUMOTO and M.KONOSHIMA, 1971. Phytochem. 10, 723-729.

14. TAKAHASHI, M. and Y. YAMADA, 1973. Regulation of nicotine production by auxins in tobacco cultured cells in vitro. Agr. Biol. Chem., 37 (7), 1755-1757.