

اثر برخی مشخصات خاک بر محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی گیاه علف کبکی

حدیث روشندل* و رشید جامعی

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹ / پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۱

دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*مسئول مکاتبات: Rhadis64@yahoo.com

چکیده. علف کبکی گیاهی است متعلق به تیره شیرینجه که غدد زیرزمینی غنی از آلکالوئید دارد. در پژوهش حاضر، محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی علف کبکی مناطق نقده، زنجان و بوکان به روش اسپکتروفتومتری بررسی شد. اثر برخی مشخصات خاک منطقه رویش مانند نیتروژن کل، پتاسیم، اسیدیته خاک، نوع بافت خاک و محتوای نترات غدد زیرزمینی، بر روی محتوای آلکالوئید تام گیاه سنجیده شد. نتایج تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری میان محتوای آلکالوئید تام گیاه علف کبکی نقده، زنجان و بوکان نشان داد. نتایج همچنین تفاوت معنی‌داری را میان محتوای نترات علف کبکی در سه منطقه نشان داد. بیشترین و کمترین محتوای نترات به ترتیب مربوط به نقده و بوکان بود. بررسی نمونه‌های خاک مناطق مختلف نشان داد که بافت خاک نقده رسی-لومی، زنجان سیلتی-رسی-لومی و بوکان لومی-شنی است. همچنین مشخص شد که با افزایش درصد شن خاک، مقدار آلکالوئید تام گیاه افزایش می‌یابد. اثر اسیدیته خاک بر محتوای آلکالوئید تام معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی. نترات، آلکالوئید تام، بافت خاک، نیتروژن، پتاسیم

The effect of some soil parameters on the total alkaloid levels of tubers of *Bongardia chrysogonum* in three regions of Iran

Hadis Roshandel* and Rashid Jamei

Received 08.02.2014/ Accepted 11.05.2015

Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

*Correspondent author: Rhadis64@yahoo.com

Abstract. The tubers of *Bongardia chrysogonum*, belonging to to Podophyllaceae, are rich in alkaloids. In this study, total alkaloid content of the tubers of this plant in Naghadeh, Zanzan and Boukan were determined by spectrophotometric method. In addition, the effects of soil characteristics such as total nitrogen, potassium, pH, soil texture and tubers nitrate levels on the plant total alkaloid content were measured. The results of the analyses indicated significant differences between the total alkaloid content of *B. chrysogonum* in these three regions. Moreover, the results showed significant differences among nitrates amounts of this plant in these habitats. The highest and lowest nitrate contents belong to Naghadeh and Boukan plants, respectively. The evaluation of soil samples of these three regions indicated that the texture of soil in Naghadeh is clay-loamy, in Zanzan it is silty- clay- loamy and in Boukan it is loamy-sandy. It was also discovered that increase in plant total alkaloid content depends on the increase of sand percentag in soil to some extent. The effect of soil pH on total alkaloid content turned out to be nonsignificant.

Keywords. nitrate, total alkaloid, soil texture, nitrogen, potassium

مقدمه

زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه شناسایی شدند. نمونه‌ها (غدد زیرزمینی) با آب مقطر شست‌وشو داده و در دمای اتاق، دور از نور خورشید و رطوبت خشک و آسیاب شدند. همچنین خاک هر سه منطقه برای انجام بررسی‌های خاک‌شناسی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

آماده‌سازی محلول‌ها برای اندازه‌گیری محتوای آکالوئید تام

جهت تهیه بروموکروزول سبز با غلظت 1×10^{-4} مولار، ۶۹/۸ میلی‌گرم از آن در ۳ میلی‌لیتر سود ۲ نرمال و ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. محلول حاصل تا انحلال کامل حرارت داده شد و با آب دوبار تقطیر به حجم یک لیتر رسانده شد. برای تهیه بافر فسفات، اسیدیته فسفات سدیم ۲ مولار (۷۱/۶ گرم از Na_2HPO_4 در یک لیتر آب دوبار تقطیر) در ۴/۷ تنظیم شد. برای تهیه محلول استاندارد مورفین، ۱۰۰ میلی‌گرم مورفین (تهیه‌شده از معاونت غذا و داروی تهران) در ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد (Shamsa et al., 2008).

آماده‌سازی منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری آکالوئید تام

مقادیر متفاوت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد مورفین در قیف‌های جداکننده جداگانه قرار گرفت. در مرحله بعد ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۵ میلی‌لیتر محلول بروموکروزول سبز به هر کدام اضافه و با ۵، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم عصاره‌گیری شد. فاز کلروفرمی به بالن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد و به حجم رسید. سپس جذب کمپلکس در ۴۱۵ نانومتر در مقابل محلول بدون مورفین، اندازه‌گیری شد (Shamsa et al., 2008).

تهیه عصاره تام آکالوئیدی و سنجش میزان آن

آکالوئیدهای غدد زیرزمینی نمونه‌ها با تلفیقی از روش‌های کرن و شمس عصاره‌گیری شد (Krenn et al., 1998; Shamsa et al., 2008). ابتدا یک گرم از نمونه‌های خشک و آسیاب-

علف کبکی گیاهی علفی، پایا، چندساله با غدد زیرزمینی عمیق، متعلق به تیره شیربنجه است. علف کبکی در ارتفاعات و در اراضی زراعی حاصل‌خیز شخم‌خورده (به‌منزله علف هرز) می‌روید (معروفی، ۱۳۸۶). غده‌های زیرزمینی این گیاه منبع غنی آکالوئید است. این آکالوئیدها از خانواده آکالوئیدهای کینولیزیدین، ایزوکینولیزیدین و پیریدین هستند. آکالوئیدهای گیاهی از بزرگ‌ترین گروه‌های تولید طبیعی به شمار می‌روند که از نظر داروشناسی ترکیبات فعال بسیاری را فراهم می‌کنند. این ترکیبات مهم‌ترین گروه دگرگوهره‌های ثانویه می‌باشند که یا مشتق از آمینواسیدها یا حاصل فرایند ترانس‌آمیناسیون هستند (Aniszewski, 2007). یکی از مهم‌ترین نقش‌های آن‌ها حفاظت گیاه در مقابل رادیکال‌های تولیدشده در بافت‌های گیاهی در حضور نور است (Tadeusz, 2007). آکالوئیدها دارای محدوده وسیعی از فعالیت زیستی و فارماکولوژیک هستند. وجود این دگرگوهره‌های ثانویه در غدد زیرزمینی علف کبکی باعث شده از این گیاه در طب سنتی کشور ترکیه برای درمان بیماری‌هایی مانند هموروئید، بزرگ‌شدگی پروستات و عفونت‌های مجاری ادراری شده است (Rahman et al., 1999). ارتباط میان مواد غذایی در خاک و تغییرات در مقدار آکالوئیدهای گیاهی یکی از موضوعات بسیار مهم در زیست‌شناسی، فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهی است. در این تحقیق با توجه به اهمیت دارویی آکالوئیدهای گیاه علف کبکی، محتوای آکالوئید تام موجود در غدد زیرزمینی این گیاه و همچنین اثر برخی عوامل محیطی بر مقدار آکالوئید تام در فصل گل‌دهی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاه علف کبکی از سه منطقه سلطان‌یعقوب واقع در شهرستان نقده از استان آذربایجان غربی، روستای زواج واقع در شهرستان زنجان از استان زنجان و منطقه زران دول واقع در شهرستان بوکان از استان آذربایجان غربی در اردیبهشت‌ماه (فصل گل‌دهی) سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شدند. گیاهان در هرباریوم گروه

اتاق نگه‌داری شد. در این مرحله ۱۹ میلی لیتر سود ۲ نرمال به آن اضافه شد تا pH بیش از ۱۲ شود. در انتها نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شدند و میزان جذب محلول لیمویی رنگ حاصل در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد (Cataldo et al., 1975).

تحلیل خاک

نمونه‌های خاک پس از خشک شدن در هوا از الک ۲ میلی متری عبور داده شد. pH عصاره اشباع بافت خاک به روش هیدرومتری، پتاسیم قابل جذب با استفاده از استات آمونیوم نرمال و خشی و میزان نیتروژن خاک به روش کج‌دال اندازه‌گیری شد (خوش گفتار، ۱۳۸۶).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج آزمایش در سه تکرار به صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) بیان شد. اختلاف میان نمونه‌های مناطق مختلف با استفاده از تحلیل واریانس یک‌سویه (آنوا) در سطح احتمال ۵ درصد ($p < 0.05$) بررسی شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS.16 و اکسل ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

سنجش کمی آلکالوئید تام و میزان نیترات

میانگین محتوای آلکالوئید تام و محتوای نیترات غدد زیرزمینی علف کبکی از سه منطقه مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. بین محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی علف کبکی منطقه نقده با منطقه زنجان و منطقه بوکان اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. محتوای آلکالوئیدی علف کبکی منطقه بوکان به طور معنی‌داری بیشتر از محتوای آلکالوئیدی مناطق نقده و زنجان بود و کمترین آن مربوط به منطقه نقده بود. بین محتوای نیترات علف کبکی منطقه نقده، منطقه زنجان و منطقه بوکان اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین و کمترین مقدار نیترات به ترتیب در علف کبکی منطقه نقده و منطقه بوکان مشاهده شد.

شده در ۸۰ میلی لیتر اسیداستیک ۰/۰۵ درصد (v/v) هجده ساعت خیسانده شد. ده میلی لیتر از عصاره صاف شده چندین بار با کلروفرم (هر بار ۱۰ میلی لیتر) شست‌وشو داده شد، تا این که همه مواد رنگی حذف شود و کلروفرم حاصل از شست‌وشو رنگی نباشد. در انتها، اسیدیته محلول باقی‌مانده با آمونیاک به ۷ رسانده شد و به آن ۵ میلی لیتر معرف بروموکرزول سبز و ۵ میلی لیتر بافر استات اضافه شد و سه بار با سه حجم از کلروفرم (۵، ۸ و ۱۰ میلی لیتر) عصاره‌گیری شد. بعد از جداسدن دو فاز، به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. در این مرحله وجود رنگ زرد در فاز پائینی نشان‌دهنده حضور آلکالوئید است. فاز آلکالوئیدی جدا و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری آن در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت محتوای آلکالوئید تام نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد مورفین تعیین شد.

آماده‌سازی منحنی استاندارد نیترات

نیم میلی لیتر از غلظت‌های مختلف (۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر) محلول استاندارد نیترات سدیم (NaNO_3) به ۰/۸ میلی لیتر اسیدسالیسیلیک ۵ درصد اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۱۹ میلی لیتر سود ۲ نرمال به آن اضافه شد تا pH بیشتر از ۱۲ شود. نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شدند و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای نیترات نمونه‌ها با استفاده از معادله منحنی استاندارد ($Y = 0.037X - 0.00275$, $R^2 = 0.998$) تعیین شد (Cataldo et al., 1975).

اندازه‌گیری میزان نیترات موجود در نمونه‌های گیاهی

به ۱ گرم از نمونه‌های گیاهی خشک و آسیاب شده ۱۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها پس از سرد شدن، در ۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. نیم میلی لیتر از محلول رویی به درون لوله آزمایش منتقل و به آن ۰/۸ میلی لیتر اسید سالیسیلیک ۵ درصد اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای

جدول ۱- محتوای آلکالوئید تام (میلی گرم بر گرم وزن خشک) و محتوای نیترات (میکروگرم بر گرم) غدد زیرزمینی گیاه کبکی از سه منطقه مختلف. (داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE نشان داده شده و حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).

Table 1. The total alkaloid (mg/g dw) and nitrate contents (μ g/g) of *Bongardia chrysogonum* tubers in three different regions (Data are shown as mean $\pm$ SE and dissimilar letters in each column indicate significant difference at the 5% level).

منطقه	میانگین آلکالوئید تام (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	محتوای نیترات (میکروگرم بر گرم)
نقده	11.67 $\pm$ 0.2a	151.79 $\pm$ 1.1a
زنجان	13.32 $\pm$ 0.4b	94.64 $\pm$ 0.4b
بوکان	18.26 $\pm$ 0.6c	82.37 $\pm$ 0.39c

تحلیل خاک

نتایج تحلیل خاک نشان داد که بافت خاک در منطقه نقده رسی-لومی، در منطقه زنجان سیلتی-رسی لومی و در منطقه بوکان لومی-شنی می‌باشد.

خاک هر سه منطقه دارای pH قلیایی ضعیفی بود. منطقه بوکان بیشترین مقدار نیتروژن کل و پتاسیم را داشت (جدول ۲).

جدول ۲- برخی ویژگی‌های خاک مناطق نمونه‌برداری.

Table 2. Some characteristics of soil sample locations.

منطقه	اسیدیته	نیتروژن کل (درصد)	پتاسیم قابل جذب (میلی گرم/کیلوگرم)	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	بافت
نقده	۷/۲	۰/۲۳	۶۶۲	۲۱	۴۶	۳۳	رسی-لومی
زنجان	۷/۱	۰/۱۷	۶۵۳	۱۸	۴۵	۳۷	سیلتی-رسی-لومی
بوکان	۷/۱	۰/۱۳	۶۴۷	۴۹	۲۸	۲۳	لومی-شنی

همبستگی بین مشخصات خاک منطقه رویش و محتوای آلکالوئید تام

همبستگی بین محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی گیاه علف کبکی و محتوای نترات غدد زیرزمینی، pH خاک، نیتروژن کل، پتاسیم خاک و بافت خاک با نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ محاسبه شد. نتایج نشان داد بین محتوای آلکالوئید تام با نیتروژن کل، پتاسیم خاک، محتوای سیلت و رس بافت خاک و از سوی

دیگر با محتوای نترات غدد زیرزمینی رابطه معکوس و معنی داری وجود دارد.

همچنین بین محتوای آلکالوئید تام و مقدار شن بافت خاک رابطه مستقیم و معنی داری وجود دارد، اما محتوای آلکالوئید تام و اسیدیته خاک ضریب همبستگی بسیار ضعیفی نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- ضریب همبستگی بین محتوای آلکالوئید تام با محتوای نترات غدد زیرزمینی گیاه علف کبکی، اسیدیته خاک، نیتروژن کل، پتاسیم خاک و بافت خاک.

Table 3. The correlation coefficient between the total alkaloid content and tubers nitrate content of *Bongardia chrysogonum*, pH, total nitrogen, potassium and soil texture.

همبستگی	معادله خط همبستگی	ضریب همبستگی
نترات و آلکالوئید تام	$Y = -8.7971X + 236.91$	-0.667 *
اسیدیته و آلکالوئید تام	$Y = -1.966X + 31.38$	0.002
نیتروژن و آلکالوئید تام	$Y = -0.0136X + 0.3733$	-0.857*
پتاسیم و آلکالوئید تام	$Y = -2.0431X + 683.49$	-0.857*
شن و آلکالوئید تام	$Y = 4.7132X - 38.694$	0.889*

بحث

گیاهان دارویی به عنوان مخازن غنی از دگرگهره‌های ثانویه، اساساً تحت هدایت فرایندهای ژنتیکی هستند. اما ساخت این دگرگهره‌ها به طور بارز تحت تأثیر عوامل محیطی و تغییرات آن نیز قرار دارد. به طوری که عوامل محیطی باعث تغییراتی در رشد گیاه، مقدار و کیفیت این دگرگهره‌ها می شود (دوازده امامی و مجنون حسینی، ۱۳۸۶). Kitamura و همکاران نشان داده اند که تأثیر عوامل آب و هوایی در تفاوت های مشاهده شده میان مقادیر آلکالوئیدها در گیاهان مناطق مختلف ناچیز است و این تفاوت ها اساساً به ارتفاع و عوامل خاکی بستگی دارد. مناطق مختلف از نظر ارتفاع و میزان عناصر غذایی خاک از جمله

نیتروژن، پتاسیم و فسفر تفاوت های معنی داری دارند (Kitamura et al., 1992).

یکی از عناصر بسیار اساسی در گیاهان، فرم های نیتروژن خاک و سطوحی از نیتروژن است که بر رشد، تکامل و مسیرهای متابولیکی ویژه در گیاهان مؤثر است (Fabre & Planchon, 2000). استخراج و اندازه گیری محتوای آلکالوئید تام گیاه علف کبکی و بررسی تأثیر عوامل محیطی بر آن ها برای اولین بار در این پژوهش صورت گرفت. نتایج تحلیل ضریب همبستگی در این تحقیق نشان داد که بین نترات و محتوای آلکالوئید تام رابطه معکوس و معنی داری وجود دارد (جدول ۳). نترات یکی از منابع تغذیه نیتروژن گیاه است. اولین مرحله احیای نترات با نترات ردوکتاز انجام می شود. نیتريت حاصل از این فرایند با

نیتريت ردوكتاز به آمونوم تبديل می شود و آمونوم برای سنتز اسیدهای آمینه (دگر گوهره های اولیه) مصرف می شود.

دگر گوهره های اولیه مستقیماً در رشد و سوخت و ساز درگیر هستند (Taiz & Zeiger, 2002). افزایش غلظت نیتريت باعث افزایش تولید زی توده می شود ولی بیوسنتز آکالوئیدها را مهار می کند. آکالوئیدها دارای نیتروژن هستند و در تغذیه گیاه نیتروژن به طور اساسی به شکل نیتريت استفاده می شوند. در گیاهان آنزیم نیتريت ردوكتاز اولین آنزیم درگیر در جذب نیتريت است. علت افزایش زی توده هم زمان با افزایش غلظت نیتريت احتمالاً به این دلیل است که پیش سازهای اسید آمینه برای متابولیسم اولیه به کار می روند و پیش سازهای مشترک در مسیرهای متابولیسمی اولیه و ثانویه، برای تولید زی توده و پی گیری فرایند رشد استفاده می شوند و عوامل محرک تولید زی توده از جمله افزایش نیتريت غلظت آکالوئیدها را کاهش می دهند (Demeyer & Dejaegere, 1989). این نتیجه با نتایج چلیپان همخوان است. چلیپان با کار درباره دو گونه بنگدانه مشاهده کرد که محیط کشت دارای نیتريت سبب افزایش رشد و سرعت تمایز ریشه می شود که با کاهش تولید آکالوئید همراه است اما کاهش نیتريت تولید آکالوئید را افزایش می دهد (چلیپان، ۱۳۷۸). نتایج بررسی تأثیر غلظت های متفاوت نیتريت پتاسیم بر بیوسنتز آکالوئیدهای تروپانی نشان داد که افزایش غلظت نیتريت موجب کاهش بیوسنتز آکالوئیدها می شود و مقدار پائین نیتريت اثر تحریکی بر تولید آکالوئیدهای تروپانی دارد (ایرانبخش، ۱۳۸۳). نتایج تحقیق حاضر با نتایج محققان مذکور هم سو است. افزایش غلظت نیتروژن باعث افزایش رشد ریشه و اندام های دیگر گیاهی می شود. فاکتورهای تغذیه ای مانند نیتروژن به عنوان پارامترهای مهمی استفاده می شوند که بر تولید آکالوئیدها مؤثر می باشند. غلظت نیتروژن محیط کشت اغلب بر سنتز آکالوئیدها مؤثر است. همه آکالوئیدها حاوی نیتروژن هستند. ممکن است این ترکیبات حاصل از اسیدهای متغیر باشد به این معنی که بعضی پیش سازها از لحاظ مقدار نیتروژن نسبت به آکالوئیدها غنی تر هستند. به همین دلیل بعضی آکالوئیدها در مورد در دسترس بودن نیتروژن نسبت به دیگر

آکالوئیدها حساسیت بیشتری دارند. از طرفی تعادل عناصر تغذیه ای خاک بسیار اهمیت دارند. به نظر می رسد غلظت های کم یا زیاد نیتروژن در خاک باوجود طبیعت بیوسنتتیک آکالوئیدها بر محتوای آکالوئیدها در گیاهان تأثیر می گذارد. تنش مواد غذایی ممکن است دلیلی برای این موضوع باشد (Tadeusz, 2007). نتایج بررسی برخی عوامل محیطی بر میزان آکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین نشان داد که میزان این آکالوئیدها تحت تأثیر غلظت نیتروژن است (دیلماقانی و همکاران، ۱۳۸۵). در تحقیق حاضر محتوای آکالوئید تام و مقدار نیتروژن کل خاک رابطه معکوس و معنی داری را نشان دادند. این موضوع را می توان به سنتز آکالوئید از محصولات حاصل از شکست پروتئین نسبت داد، زیرا اعتقاد بر این است که آکالوئیدها از تولیدات پروتئینی تجزیه شده و حد واسطه های کربوهیدراتی تولید می شوند. ساختار و متابولیسم پروتئین ها به طور گسترده با سنتز تولیدات گیاهی نیتروژن دار ثانویه مرتبط است. کربوهیدرات ها یا مشتقات دیگر آن ها یا در ساختمان مولکول آکالوئید وارد می شوند یا اینکه صرفاً به منظور تأمین انرژی برای واکنش های سنتزی که منجر به تشکیل آکالوئید می شوند، لازم اند (Cromwell, 1937).

مطالعات در باب گیاه تنباکو نشان داده است که سنتز آکالوئید نیکوتین در گیاهان تنباکویی که در معرض نیتروژن معدنی فراوان بوده اند مهار می شود. همچنین مشاهده شد که وضعیت نامساعد محیطی در زمان رشد گیاه تنباکو باعث تولید مداوم نیکوتین می شود (Mothes et al., 1928). احتمالاً افزایش یا کاهش زیاد مقدار نیتروژن عامل نامساعد محیطی برای گیاه تلقی می شود و راه کار گیاه برای مقابله با این عامل نامساعد کاهش یا افزایش مقدار آکالوئید است. این نتیجه هم سو با نتایجی است که بعضی محققین به دست آورده اند. اوکی و همکاران با تغییر ترکیب محیط کشت میزان رشد و تروپان آکالوئیدها را در تارکشنده ریشه گیاه شاهبیزک بررسی کرده اند. آن ها مشاهده کردند که افزودن غلظت محیط کشت باعث کاهش رشد و میزان تروپان آکالوئیدها می شود. همچنین رقت محیط کشت و کاهش غلظت نیتروژن میزان رشد و تولید

مواد غذایی خاک است. پتاسیم یکی از عناصر غذایی بسیار متحرک است. پتاسیم به صورت طبیعی و کودهای حاوی پتاسیم به آسانی از سطح خاک شسته شده (به ویژه خاک‌های ماسه ای در مناطق پر باران یا با باران معمولی) و باعث می‌شود که پتاسیم کمتری در اختیار گیاهان قرار بگیرد. در این شرایط غلظت آلکالوئیدها ممکن است نوسان کمتری داشته باشد (Waller & Nowacki, 1978). گیاهانی که در خاک‌هایی با کمبود پتاسیم رشد می‌کنند، بیشتر مستعد تنش‌های محیطی هستند و ممکن است گیاه با افزایش تولید آلکالوئید به این موضوع پاسخ دهد (Marschner et al., 1995). باتوجه به اینکه پتاسیم باعث مقاومت گیاه در مقابل کم‌آبی، خطرات سرمازدگی، آفات و بیماری‌ها می‌شود، کمبود پتاسیم برای گیاه تنش تلقی می‌شود و این موضوع باعث تولید آلکالوئید در گیاه می‌گردد، زیرا آلکالوئیدها باعث محافظت گیاه در مقابل حمله پاتوژن‌ها، بیماری‌ها و وضعیت سخت محیطی می‌شود (Cox, 1978). دیلمقانی و همکاران با مقایسه میزان آلکالوئید تروپان دو گونه بذربالنج در مراحل مختلف رشد به این نتیجه رسیده‌اند که کاهش پتاسیم خاک باعث افزایش میزان هیوسامین و اسکوپولامین می‌شود. آن‌ها دریافته‌اند که افزایش آلکالوئید تولید شده در گیاه به هنگام کمبود پتاسیم نشان می‌دهد که کمبود یون پتاسیم عرضه پیش‌ساز آلکالوئید را با افزایش فعالیت آرزین دکربوکسیلاز که مسئول تولید پوترسین هستند، افزایش می‌دهد. یون پتاسیم به طور مستقیم فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز آلکالوئیدها را با تأثیر بر کنتورماسیون پروتئین تنظیم می‌کند (دیلمقانی، ۱۳۸۶). چون آنزیم لیزین دکربوکسیلاز آنزیم کلیدی در بیوسنتز آلکالوئیدهای کوئینولیزیدین است، احتمالاً کمبود یون پتاسیم عرضه پیش‌ساز آلکالوئیدهای کوئینولیزیدین را با افزایش فعالیت آنزیم لیزین دکربوکسیلاز که مسئول بیوسنتز آلکالوئیدهای کوئینولیزیدین است افزایش می‌دهد.

کمبود پتاسیم سنتز آلکالوئیدها را در گیاه شاهبیزک افزایش می‌دهد، درحالی‌که کاهش آن به افزایش درصد آلکالوئیدها منجر می‌شود (Bashir Khan & Harbone, 1991). از-

آلکالوئید را افزایش می‌دهد (Aoki et al., 1997). Dupraz و همکاران نشان داده‌اند که رشد گیاه داتورا و محتوای آلکالوئیدهای آن با افزایش غلظت نیتروژن کاهش می‌یابد (Dupraz et al., 1993). Payne و همکاران دریافته‌اند که رقیق‌شدن محیط کشت و کاهش غلظت نیتروژن باعث افزایش رشد و محتوای آلکالوئید در گیاهان تیره سولاناسه می‌شود (Payne et al., 1987). Sugimoto و همکاران نشان داده‌اند که غلظت نیتروژن و نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت اغلب بر سنتز آلکالوئیدها مؤثرند (Sugimoto et al., 1988). نتایج بررسی حاضر با نتایج بعضی از محققان مغایرت دارد. با افزایش مقدار ازت، میزان آلکالوئید فیزالین در گیاه عروسک پشت پرده افزایش می‌یابد (Khoshlahjeh et al., 2013).

Dejaegere و Demeyer با بررسی میزان آلکالوئیدهای گیاه داتورا، گزارش کرده‌اند که با افزایش میزان نیتروژن میزان آلکالوئیدها نیز افزایش می‌یابد (Demeyer & Dejaegere, 1992). همچنین آن‌ها گزارش کرده‌اند که تیمار نیتروژنی باعث افزایش میزان هیوسامین در کشت ریشه داتورا می‌شود (Demeyer & Dejaegere, 1989). Franz نیز با بررسی تعدادی از گیاهان دارویی به این نتیجه رسید که نیتروژن به عنوان یک عنصر غذایی به طور مستقیم بر بیوسنتز دگرگروه‌های ثانویه مانند آلکالوئید مؤثر می‌باشد (Franz, 1983). البته اختلاف در سطوح آلکالوئید ناشی از فاکتورهای داخلی مانند سن گیاه و غیره هم هست که این فاکتورهای داخلی نسبت به فاکتورهای محیطی از اهمیت بیشتری برخوردارند (Hoft et al., 1998).

در تحقیق حاضر، رابطه معکوس و معنی‌داری میان مقدار پتاسیم خاک و مقدار آلکالوئید تام گیاه مشاهده شد. پتاسیم بیشتر محرک بیوسنتز پروتئین است. پتاسیم یکی از عناصر غذایی اصلی برای گیاهان است که در بسیاری از فرایندهای گیاهی مانند فتوسنتز، انتقال قند، فعال‌سازی آنزیم، نگهداری فشار تورگر گیاهی و تنظیم روزنه نقش دارد. یکی از فاکتورهایی که ممکن است بر غلظت آلکالوئید تأثیرگذار باشد، کمبود

طرفی، کمبود پتاسیم باعث انباشتگی نشاسته، کم شدن محتوای آب سلول و ممانعت از فعالیت‌های هیدرولیتیک می‌شود، که در نتیجه آن غلظت کربوهیدرات‌های سلول کاهش می‌یابد. همان‌طور که قبلاً گفته شد حدواسط‌های کربوهیدراتی نقش اساسی در بیوسنتز آلکالوئیدها دارند. کربوهیدرات‌ها یا در ساختمان مولکول آلکالوئید داخل می‌شوند یا این که برای تأمین انرژی در واکنش‌های سنتزی که منجر به تشکیل آلکالوئیدها می‌شوند، لازم می‌باشند. در نتیجه، کمبود پتاسیم با کاهش غلظت کربوهیدرات‌ها باعث کاهش غلظت آلکالوئیدهای گیاه می‌شود (Cromwell, 1937). نتیجه این تحقیق با نتایج مطالعات دیگر سازگاری دارد. Gremigni دریافت که غلظت آلکالوئیدهای دانه باقلای مصری (آبی) تحت کمبود پتاسیم افزایش می‌یابد (Gremigni et al., 2001) و همچنین Scibor و Marchocka مشاهده کرده‌اند که کمبود پتاسیم موجب افزایش غلظت آلکالوئیدها در دانه باقلای مصری (سفید) می‌شود (Scibor-Marchocka, 1970).

Gremigni و همکاران دریافته‌اند که کمبود پتاسیم القاکننده افزایش غلظت آلکالوئیدها در گیاه باقلای مصری است (Gremigni et al., 1997; Gremigni et al., 1998). نتایج کار Waller و Nowacki نیز با نتایج او همسو است. Waller و Nowacki دریافته‌اند که باقلای مصری که محتوای پتاسیم کمتری نسبت به گیاهانی که به مقدار کافی پتاسیم داشته‌اند، محتوای آلکالوئیدی بالاتری دارند (Waller & Nowacki, 1978).

اندازه ذرات خاک از بسیار درشت تا بسیار ریز متغیر است. بافت خاک نه تنها بر قدرت نفوذ ریشه‌ها، هوادهی و شست‌و-شوی خاک، بلکه بر مقدار عناصر غذایی و درجه حرارت خاک نیز تأثیر می‌گذارد (باقریه، ۱۳۸۷)، اسیدیته خاک و تنش خشکی موقتی نیتریفیکاسیون را بلوکه می‌کند (Arechavaleta et al., 1992). تنش خشکی باعث افزایش میزان آلکالوئید نیز می‌شود (Hoft et al., 1998). از آنجائی-که نیتریفیکاسیون بخش مهمی از چرخه نیتروژن در طبیعت است که طی آن عمل اکسیداسیون آمونیاک به واسطه باکتری‌ها

انجام می‌شود، در مرحله اول نیتریفیکاسیون، میکروارگانیسم‌های شیمولیتوتروف آمونیاک را اکسید و به نیتريت تبدیل می‌کند و در مرحله دوم نیتريت از طریق باکتری‌های اکسیدکننده نیتريت به نترات تبدیل می‌شود (بینا و همکاران، ۱۳۸۴). پس با بلوکه-شدن نیتریفیکاسیون غلظت نترات در گیاه کاهش یافته و همان-طور که در بحث نترات بیان شد، کاهش غلظت نترات باعث افزایش تولید آلکالوئید در گیاهان می‌شود. پس تنش خشکی موقتی باعث کاهش غلظت نترات گیاه و افزایش تولید آلکالوئید در گیاه می‌شود. Demyer و همکاران گزارش کرده‌اند که افزایش غلظت نترات در کشت ریشه‌ای دگرریخت داتوره باعث افزایش زی‌توده می‌شود، ولی بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی را مهار می‌کند (Demeyer & Dejaegere, 1992). احتمالاً علت افزایش زی‌توده به این دلیل است که زی‌توده در پیش‌سازهای اسیدآمین برای متابولیسم اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد و پیش‌سازهای مشترک مسیرهای متابولیسمی اولیه و ثانویه، برای تولید زی‌توده و پی‌گیری فرایند رشد استفاده می‌شوند و عوامل محرک تولید زی‌توده از جمله افزایش نترات غلظت آلکالوئید را کاهش می‌دهد. Flores و Galston دریافته‌اند که تنش اسموتیک در سلول‌های گیاهی می‌تواند سنتز پوترسین را، که پیش‌ساز آلکالوئیدهای تروپان است، فعال کند و باعث افزایش میزان آلکالوئید گیاه شود. Szabo و همکاران ثابت کرده‌اند که شقایق تحت تأثیر تنش خشکی سطوح بالاتری از آلکالوئید تولید می‌کند (Flores & Galston, 1982; Arechavaleta et al., 1992; Szabo et al., 2005). نتایج تحقیق حاضر حاکی از رابطه مستقیم میان درصد شن خاک و مقدار آلکالوئید تام و رابطه منفی میان درصد سیلت و رس خاک با مقدار آلکالوئید تام بوده است. چنان‌که در بخش نتایج ذکر شد، بیشترین مقدار آلکالوئید مربوط به خاک منطقه‌ای بود که بیشترین درصد شن را داشت و همبستگی میان درصد شن خاک و مقدار آلکالوئید تام ۰/۸۸ بود. باتوجه به اینکه در خاک‌های شنی تخلخل خاک زیاد و ظرفیت نگهداری آب کم است، خاک‌های شنی بیشتر مستعد تنش خشکی هستند. احتمالاً یکی از دلایلی که باعث بیشتر شدن تولید آلکالوئید در منطقه بوکان شده است، وجود درصد بیشتر

کیفی بسیار متفاوت هستند (Barclay & Perdue, 1976; Ayres & Loike, 1990).

Zunnunzhanov و همکاران با جست‌وجو در آلکالوئیدهای اندام هوایی گیاه لئونیتس داروآسیا نشان دادند که ترکیبات آلکالوئیدی از لحاظ کمی و کیفی براساس محل رویش گیاه تغییر می‌کند (Zunnunzhanov *et al.*, 1974). بررسی‌های انجام‌شده به کوشش محقق‌زاده و همکاران درباره ترکیبات میوه زنیان نشان داد که اختلافات شیمیایی ترکیبات موجود در این گیاه در مناطق مختلف تحت تأثیر کم‌دیوم‌ها قرار دارد (Mohagheghzadeh *et al.*, 2007). Van و Verdoon با مطالعه بر روی آلکالوئیدهای گیاه ترب‌شیر اختلافاتی را در میان آلکالوئیدهای برگ، غده‌های زیرزمینی و دانه‌های مناطق مختلف مشاهده کرده‌اند. آن‌ها دریافته‌اند که علت این اختلاف‌ها ممکن است به دلیل وجود چندین ترکیب کم‌دیوم در این گیاه باشد. آن‌ها با مطالعات بعدی بر روی جنس *Pearsonia* از تیره پروانه‌آسا متوجه شده‌اند که ترکیبات آلکالوئیدی حتی در میان جمعیت‌های متعلق به یک گونه از مناطق مختلف نیز اختلاف دارند (Van & Verdoon, 1991). کم‌دیوم‌ها مولکول‌هایی هستند که هر گیاه آن‌ها را با ژن‌ها و آنزیم‌ها تعیین می‌کند. مشخصات شیمیایی کم‌دیوم‌ها وراثتی است. این ترکیبات تحت تأثیر خاک، ارتفاع از سطح دریا، بارندگی، دما، تابش نور خورشید و طول موج‌های تابشی قرار دارند. گیاهان متعلق به یک گونه ممکن است از لحاظ مورفولوژیکی و تاکسونومیکی باهم اختلاف نداشته باشند، اما اختلافات شیمیایی ایجادشده به وسیله پروفایل‌های شیمیایی باعث تفاوت ژنتیکی این گیاهان می‌شود. بنابراین ترکیبات شیمیایی تولیدشده در گیاه از لحاظ کمی و کیفی می‌توانند با هم متفاوت باشند که این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از وضعیت محیطی گیاه باشد (Lavrieux *et al.*, 2011). اختلافات ایجاد شده در میان اعضای یک گونه برای استفاده دارویی و غذایی مهم است (Mohagheghzadeh *et al.*, 2007).

شن و احتمال بیشتر ایجاد تنش خشکی است که در نتیجه آن غلظت نیترات گیاه کاهش می‌یابد و طبق نتایج تولید آلکالوئید در گیاهان این منطقه افزایش می‌یابد. Abdul-Jaleel و همکاران با تحقیق درباره پروانش بیان کرده‌اند که تنش خشکی القا کننده تنش اسموتیک، متابولیسم پروتئین، فعالیت‌های آنزیم‌های پاداکساینده و انباشته‌کننده آلکالوئید ایندول است. یافته‌های آن‌ها نشان داد که تحت تنش خشکی محتوای اسیدهای آمینه در این گیاه به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. احتمالاً انباشتگی اسید آمینه ناشی از هیدرولیز پروتئین می‌باشد که این مسئله نیز ممکن است در پاسخ به تغییر در تنظیم اسموتیک محتوای سلول ایجاد شود. تنظیم اسموتیک سازوکاری مهم است که بعضی آثار تنش آبی را کم می‌کند (Abdul-Jaleel *et al.*, 2007). از این جهت بررسی اسیدهای آمینه آزاد انباشته‌شده برای مشاهده اثر آن‌ها در تغییرات مقادیر آلکالوئیدها اهمیت بسزایی دارد (Demeyer & Dejaegere, 1988). پتاسیم عنصر غذایی بسیار متحرکی است و به آسانی در خاک‌های ماسه‌ای از طریق باران شسته‌شده و از دسترس گیاه خارج می‌شود (Gremigni *et al.*, 2001). بیشترین مقدار آلکالوئید در منطقه بوکان دیده شد که خاک آن بیشترین درصد شن را نسبت به مناطق دیگر دارد. احتمالاً یکی از دلایل بیشتر بودن مقدار آلکالوئید در این منطقه شست‌وشوی بیشتر پتاسیم از خاک آن باشد. اثر غلظت پتاسیم خاک بر مقدار آلکالوئیدها در بحث پتاسیم بررسی شد. از آنجایی که خاک هر سه منطقه pH قلیایی ضعیفی داشت، نتیجه گرفته شد اسیدیته خاک تأثیری بر مقدار آلکالوئیدهای گیاه تحت مطالعه ندارد. اما عملکرد آلکالوئیدها اساساً در ارتباط با ژن‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های درون ارگانیزم می‌باشد. آلکالوئیدها یک عملکرد و پس زمینه ژنتیکی-فیزیولوژیکی قوی در ارگانیزم‌های تولید کننده آن‌ها دارند. بر این اساس محتوای آلکالوئیدها در درون گونه‌ها و بین گونه‌ها متنوع است (Waller & Nowacki, 1978). Ayres و همکاران و نیز Barclay و Perdue دریافته‌اند که دگرگوه‌های ثانویه در میان گونه‌های نزدیک، در یک گونه یا در میان اعضای یک جمعیت از لحاظ کمی و

نتیجه گیری

تغییرات غلظت عناصر مختلف، عوامل آب و هوایی و غیره را بر محتوای آکالوئیدی گیاه علف کبکی در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی به صورت دقیق تر بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری آقایان مهندس مهدی گلابی منش و دکتر احمد پورستار صمیمانه قدردانی می شود.

در این تحقیق با توجه به همبستگی های مشاهده شده و نیز تفاوت معنی دار محتوای آکالوئید تام گیاه علف کبکی از مناطق مختلف بایکدیگر می توان نتیجه گرفت که محتوای آکالوئید تام علاوه بر وراثت تحت تأثیر عوامل محیطی و تغییرات آن ها نیز قرار دارد. در مطالعات بعدی می توان نقش

منابع/References

خوش گفتار منش، ا.ح. ۱۳۸۶. ارزیابی وضعیت تغذیه ای گیاه و مدیریت بهینه کودی. - انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. ۹۷۸-۹۶۴.

دوازده امامی، س. و مجنون حسینی، ن. ۱۳۸۶. زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه ای. - انتشارات دانشگاه تهران.

دیلقمانی، ک.، خاوری نژاد، ر.ع.، فهیمی، ح. و حکمت شعار، ح. ۱۳۸۵. استخراج و اندازه گیری آکالوئیدهای تروپانی هیوسامین و اسکوپولامین از اندام های مختلف *Hyoscyamus* *pustillus* L. در مراحل مختلف رشد. - فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۲: ۲۰-۱.

دیلقمانی، ک.، فهیمی، ح.، خاوری نژاد، ر.ع. و حکمت شعار، ح. ۱۳۸۶. مقایسه میزان آکالوئید تروپان گونه های *Hyoscyamus* *reticulatus* L. و *Hyoscyamus* *arachnoideus* Pojark در مراحل مختلف رشد. - مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی ۶۶: ۶۱-۵۲.

معروفی، ح. ۱۳۸۶. فلور ایران. - انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور. ۷-۱۳.

ایران بخش، ع. ۱۳۸۳. بهینه سازی رشد و تولید آکالوئیدهای تروپانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تاتوره *Datura stramonium* - مجله پژوهش و سازندگی ۶۲: ۳۳-۲۵.

باقریه نجار، م. ب. ۱۳۸۷. مقدمه ای بر اکولوژی. - انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. فصل ششم: ۱۸۵-۱۸۲.

بینا، ب.، موحدیان، ح. و پورزمانی، ح. ۱۳۸۴. رساله دکتری. بررسی تأثیر نسبت COD/N ورودی بر سرعت نیتریفیکاسیون در تصفیه فاضلاب با استفاده از یک راکتور پیلوت در مقیاس آزمایشگاهی. - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

تایز، ل. و زایگر، ا. ۲۰۰۲. فیزیولوژی گیاهی. گروه مترجمین انجمن زیست شناسی ایران. - انتشارات خانه زیست شناسی. ۳۴۳-۳۲۹.

چلیپان، ف. ۱۳۷۸. رساله دکتری. بررسی جایگاه، زمان بیوسنتز و خواص ضد میکروبی آکالوئیدهای تروپان در گیاهان طبیعی و نمونه های حاصل از کشت در شیشه دو گونه از سرده بنگدانه (*Hyoscyamus*) و برخی عوامل مؤثر در افزایش میزان آکالوئیدها. - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

Abdul-Jaleel, C., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundram, R. and Panneerselva, R. 2007. Alternation in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. – *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59: 150-157.

Aniszewski, T. 2007. Alkaloids-secret of life alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological roles. 1st Ed. – Elsevier, 140-190.

Aoki, T., Matsumoto, H., Asako, Y., Matsunaga, Y. and Shimomura, K. 1997. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. – *Plant Cell Reports* 16: 282-286.

Arechavaleta, M., Bacon, C.W., Plattner, R.D., Hoveland, C.S. and Radcliffe, D.E. 1992. Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil-water and nitrogen-fertilizer. – *Applied and Environmental Microbiology* 58: 857-861.

Ayres, D.C. and Loike, J.D. 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties. – *Chemistry and Pharmacology of Natural Products* 49: 1009-1017.

Barclay, A.S. and Perdue, R.E. 1976. Distribution of anti cancer activity in higher plants. – *Cancer Treatment Reports* 60: 1018-1113

Bashir Khan, M. and Harborne, J.B. 1991. Potassium deficiency increases tropan alkaloid synthesis in *Atropa acuminata* via arginine and ornithine decarboxylase levels. – *Phytochemistry* 30: 3559-3561.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. and Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid, common in soil. – *Science and Plant Analysis* 6: 71-80.

Cox, W.J. 1978. Potassium deficiency in lupins, identification, rates, times and method of

application. – *Journal of Agriculture Western Australia* 19: 27-31.

Cromwell, B.T. 1937. Experiments on the synthesis of hyoscyamine in *Atropa belladonna*. – *Biochemistry* 31: 551-559.

Demeyer, K. and Dejaegere, R. 1988. Influence of the mineral nutrition on yield and alkaloid content in *Datura stramonium*. – *Medelingen van de Faculteit* 53: 1723-1725.

Demeyer, K. and Dejaegere, R. 1989. Influence of the ion balance in the growth medium in the yield and alkaloid content of *Datura stramonium*. – *Plant and Soil* 114: 289-294.

Demeyer, K. and Dejaegere, R. 1992. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO^{-3} , NH^{+4}) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. – *Plant and Soil* 147: 79-86.

Dupraz, J.M., Christen P. and Kapetanidis, I. 1993. Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. – *Planta Media* 60: 158-162.

Fabre F. and Planchon, C. 2000. Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. – *Plant Science* 152: 51-58.

Flores, H.E. and Galston, A.W. 1982. Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. – *Science* 217: 1259-1261.

Franz, C. 1983. Nutrient and water management for medicinal and aromatic plants. – *Acta Horticulture* 132: 215-203.

Gremigni, P., Gazey, C., Hamblin, J. and Harris, D. 1998. Soil nutritional status affects alkaloid levels in Australian sweet lupin. – *Proceedings of the 3rd European Conference on Grain Legumes*. Paris, 179-181.

Gremigni, P., Hamblin, J. and Harris, D. 1997. Alkaloid level in lupin seed is affected by nutritional stresses. – *Proceedings of the International Food Legume Research Conference III*. Adelaide, 143-148.

Gremigni, P., Wong, M.T.F., Edwards, N.K., Harris, D. and Hamblin, J. 2001. Potassium nutrition effects on seed alkaloid concentrations, yield and mineral content of lupins. (*Lupinus angustifolius*). – *Plant Soil* 234: 131-142.

Hoft, M., Verpoorte, R. and Beck, E. 1998. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. – *Planta Medica* 64: 148-152.

Khoshlahjeh, A., Eradatm and Asli, D., Lotfi, Z., Fakharian Kashani, Z. and Shirmard, M. 2013. Effects of pyridoxine and different levels of nitrogen on qualitative and quantitative yield of *Physalis alkekengi*. – *International Journal of Biosciences* 3: 204-211.

Kitamura, Y., Sato, M. and Miura, H. 1992. Differences of total alkaloid, atropine and scopolamine contents in leaves of *Atropa belladonna* in relation to some environmental and phonological factors. – *Phytochemistry* 31: 1191-1194.

Krenn, L., Glantschig, S. and Sorgner, U. 1998. Determination of five major opium alkaloids by Reversed-phase high-Performance liquid chromatography on a base-deactivated stationary phase. – *Chromatographia* 47: 21-24.

Lavrieux, M., Jacob, J., Lemilbeau, C., Zocatelli, R., Masuda, K., Breheret, J. and Disnar, J. 2011. Occurrence of triterpenyl actates in soil and their potential as chemotaxonomical markers of Asteraceae. – *Organic Geochemistry* 42: 1315-1323.

Marschner, H. 1995. Functions of Mineral Nutrients: macronutrients. In *Mineral Nutrition of Higher Plants*. – Academic Press. 299-312.

Mohagheghzadeh, A., Faridi, P. and Ghasemi, Y. 2007. *Carum copticum* Benth. & Hook., essential oil chemotypes. – *Food Chemistry* 100: 1217-1219.

Payne, J., Hamill, J.D., Robins, R.J. and Rhodes, J.C. 1987. Production of hyoscyamine

by hairy root cultures' of *Datura stramonium*. – *Planta Medica* 53: 474-478.

Rahman, A.U., Shahwar, D., Choudhary, M.I., Sener, B., Toker, G. and Baser, K.H. 1999. Alkaloids of *Bongardia chrysogonum*. – *Phytochemistry* 50: 333-336.

Scibor-Marchocka, A. 1970. Comparative studies on the homologous types of bitter and fodder white lupine. – *Acta Agrobot* 23: 23-38.

Shamsa, F., Monsef, H., Ghamoshi, R. and Verdian-rizi, M. 2008. Spectrophotometer determinati- on total alkaloid in some Iranian medicinal plants. – *Pharmaceutical Science* 32: 17-20.

Sugimoto, Y., Sugimura, Y. and Yamada, Y. 1988. Effects of culture conditions on bisben- zyloquinoline alkaloid production in cultured roots of *Stephania cepharantha*. – *Agrictural and Biological Chemistry* 52: 1495-1498.

Szabo, B., Tyihok, E., Szabo, G.Y. and Botz, L. 2005. Mycotoxine and drought stress induce change of alkaloid content of *Papaver somniferum* plantlets. – *Acta Botanica Hungarica* 45: 409-417.

Tadeusz, A. 2007. Alkaloids, secrets of life. – Elsevier Publications, Chapter 1-4.

Van, W. and Verdoorn, G.H. 1991. Alkaloid variation in the genus *Pearsonia*. – *Biochemical Systematics and Ecology* 19: 685-695.

Waller, G.R. and Nowacki, E.K. 1978. Alkaloid biology and metabolism in plants. – Plenum Press, New York. 22: 294-297.

Zunnunzhanov, A., Iskandarov S. and Yunusov, S. 1974. Alkaloids of *Leontice darvasica*. – Translated from *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 373-377.

Roshandel, H. and Jamei, R. 2015. The effect of some soil parameters on the total alkaloid levels of tubers of *Bongardia chrysogonum* in three regions of Iran. – *Nova Biologica Reperta* 2: 36-47.

روشندل، ح. و جامعی، ر. ۱۳۹۴. اثر برخی مشخصات خاک بر محتوای آلکالوئید تام غدد زیرزمینی گیاه علف کبکی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۳۶-۴۷.

