Plant Prod., 2023, 45(3), 549-559
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2023.41987.2060
Received: 2 October 2022
Accepted: 31 January 2023

Plant Productions
Research Article

Investigating the effectiveness of environmental and ecological factors on the amount of alkaloid compounds of the medicinal plant henbane (*Hyoscyamus spp.*)

Alireza Asghari Mirk[1]*, Seyed Siamak Alavi Kia[2], Seyed Abolghasem Mohammadi[3]

1- Faculty member of Payam Noor University, Agro-plant biotechnology, Meshkinshahr, Iran
2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Plant breeding – genetics, University of Tabriz, Iran
3- Professor, Faculty of Agriculture, Biotechnology and molecular biology, University of Tabriz, Iran

Citation: Asghari Mirk, A., Alavi Kia, S.S., & Mohammadi, S.A. (2023). Investigating the effectiveness of environmental and ecological factors on the amount of alkaloid compounds of the medicinal plant henbane (*Hyoscyamus* spp.). *Plant Productions,* 45(4), 549-559.

Abstract

Introduction

Hyoscyamine and scopolamine alkaloids are valuable secondary metabolites that are mainly produced by plants of the Solanaceae family, especially the henbane genus. The production of these alkaloids in henbane is influenced by genetic processes, but environmental factors play a more prominent role in the economic synthesis of these alkaloids.

Materials and Methods

This research was carried out in 2020 to investigate the effect of environmental factors on the quantity and quality of hyoscyamine and scopolamine alkaloids on 10 henbane populations in northwest of Iran. The seeds of *H.niger*, *H.reticulatus* and *H.pusillus* species were collected from Ardabil and East Azarbaijan provinces and dried in shade. After extracting alkaloids from the populations, the amount of these alkaloids was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). To study the physical and chemical properties of the soil, soil sampling was done from the root development depth of each plant (30 cm) in the studied habitats.

Results and Discussion

The results of variance analysis showed that the effect of above mean sea level factor on the amount of hyoscyamine and scopolamine alkaloids is significant at the 1% probability level. The results of variance

* **Corresponding Author:** Alireza Asghari Mirk
E-mail: Alirezapnugen@pnu.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

analysis showed that soil nitrogen and phosphorus have a significant effect on the increase of hyoscyamine and nitrogen on the increase of scopolamine at the probability level of 1%. While the effect of potassium on the amount of hyoscyamine and the effect of phosphorus and potassium on the amount of scopolamine is not significant. The research results showed significant phytochemical diversity in terms of hyoscyamine and scopolamine among species, populations, and genotypes of henbane. Based on this, *H.pusillus* species in terms of scopolamine content and *H.reticulatus* species in terms of hyoscyamine content were at the top of the studied species, and Meshkinshahr population was at the top in terms of scopolamine and hyoscyamine, while Tabriz and Givi populations were at the bottom in this respect. The high amount of alkaloid in some of the studied ecotypes is affected by the high amount of nitrogen, phosphorus, organic carbon in the soil and due to the low potassium in the studied habitats.

Conclusion

Maximum similarity was observed between the populations of Ahar with Herris, Shabester with Azarshahr, Givi with Tabriz, and Shabester with Khalkhal in terms of the amount of hyoscyamine and scopolamine. In this case, in addition to genetic factors, the similarity of the ecological characteristics of the studied habitats can also be involved.

Keywords: Alkaloid, Environmental factors, Hyoscyamine, Phytochemical diversity, Scopolamine

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۱، ۴۵(۴۲)، ۵۴۹-۵۵۹
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2023.41987.2060
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

مطالعه اثربخشی عوامل محیطی و اکولوژیک بر میزان ترکیبات آلکالوئیدی گیاه دارویی بنگ‌دانه (*Hyoscyamus spp.*)

علیرضا اصغری میرک[۱]*، سیدسیامک علوی‌کیا[۲]، سیدابوالقاسم محمدی[۳]

۱- عضو هیات علمی دانشگاه پیام نور، رشته بیوتکنولوژی کشاورزی– گیاهی، مشکین‌شهر ، ایران
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، رشته اصلاح نباتات- ژنتیک، دانشگاه تبریز، ایران
۳- استاد دانشکده کشاورزی، رشته بیوتکنولوژی و بیولوژی مولکولی، دانشگاه تبریز، ایران

چکیده

آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین از متابولیت‌های ثانویه باارزشی هستند که به‌طور عمده توسط گیاهان تیره سیب‌زمینی بویژه جنس بنگ‌دانه تولید می‌شوند. تولید این آلکالوئیدها در بنگ‌دانه تحت تأثیر فرایندهای ژنتیکی می‌باشد ولی عوامل محیطی در سنتز اقتصادی این آلکالوئیدها نقش بارزتری ایفاء می‌کنند. لذا این پژوهش در سال ۱۳۹۹به منظور بررسی اثر عوامل محیطی بر کمیت و کیفیت آلکالوییدهای هیوسیامین و اسکوپولامین روی ۱۰ جمعیت بنگ‌دانه در شمال‌غرب ایران اجرا شد. بذور گونه‌های *H.niger*، *H.reticulatus* و *H.pusillus* از استان‌های اردبیل و آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری و در شرایط سایه خشک شدند. پس از استخراج آلکالوئید از جمعیت‌ها، میزان این آلکالوئیدها با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت. برای بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک، از عمق توسعه ریشه هر گیاه (۳۰ سانتی‌متر) در رویشگاه‌های مورد مطالعه نمونه‌برداری خاک انجام گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر عامل محیطی ارتفاع از سطح دریا بر میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است و اکوتیپ مشکین‌شهر با ارتفاع از سطح دریای پایین‌تر نسبت به سایر مناطق مورد مطالعه، میزان هیوسیامین و اسکوپولامین بالاتری دارد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نیتروژن و فسفر خاک بر افزایش میزان هیوسیامین و نیتروژن بر افزایش میزان اسکوپولامین در سطح احتمال ۱٪ تاثیر معنی‌دار دارند. در حالی‌که تاثیر پتاسیم بر میزان هیوسیامین و اثر فسفر و پتاسیم بر میزان اسکوپولامین معنی‌دار نیست. نتایج، تنوع بسیار معنی‌داری را از لحاظ هیوسیامین و اسکوپولامین در بین گونه‌ها، جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های بنگ‌دانه نشان داد. بر این اساس گونه *H.pusillus* از نظر میزان اسکوپولامین و گونه *H.reticulatus* از نظر میزان هیوسیامین در صدر گونه‌های مورد مطالعه جای گرفتند و جمعیت مشکین‌شهر از لحاظ میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در صدر و جمعیت‌های تبریز و گیوی از این لحاظ در رتبه‌های آخر جای گرفتند. میزان بالای آلکالوئید در برخی از اکوتیپ‌های مورد مطالعه متاثر از بالا بودن مقادیر نیتروژن، فسفر، کربن آلی خاک و ناشی از پتاسیم پایین خاک در رویشگاه‌های مورد مطالعه می‌باشد. بین جمعیت‌های اهر با هریس، شبستر با آذرشهر، گیوی با تبریز و شبستر با خلخال از حیث میزان هیوسیامین و اسکوپولامین حداکثر تشابه مشاهده شد در این امر علاوه بر عوامل ژنتیکی، شباهت ویژگی‌های اکولوژیک رویشگاه های مورد مطالعه هم می‌تواند دخیل باشد.

کلیدواژه‌ها: اسکوپولامین، آلکالوئید، تنوع فیتوشیمیایی، عوامل محیطی، هیوسیامین

* **نویسنده مسئول:** علیرضا اصغری میرک
رایانامه: Alirezapnugen@pnu.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

آلکالوئیدها ترکیبات فیتوشیمیایی طبیعی هستند که در خانواده سیب‌زمینی (solanaceae) و در جنس بنگ‌دانه به وفور یافت می‌شوند. بنگ‌دانه در بسیاری از نقاط ایران به‌صورت خودرو می‌روید. از ۱۳ گونه به ثبت رسیده در دنیا، ۷ گونه آن منحصراً در ایران می‌روید بنابراین فلور ایران از لحاظ ژرم‌پلاسم بنگ‌دانه غنی است (Ghorbanpour et al., 2018). تاثیر بالای آلکالوئیدهای این گیاه در درمان بیماری‌های مختلف انسانی، گرایش جوامع پزشکی را به استفاده از این گیاه دارویی افزایش داده است. تولید مصنوعی آلکالوئیدها به دلیل ساختمان شیمیایی ناشناخته و چرخه‌های تولید بسیار پیچیده، مشکل و مستلزم هزینه زیاد است. لذا استخراج این آلکالوئیدها بیشتر به صورت طبیعی از خود گیاه صورت می‌پذیرد. مطالعه عوامل دخیل در افزایش میزان آلکالوئیدهای بنگ‌دانه برای جوامع پزشکی بسیار حیاتی است (Kohnen-Johannsen and Kayser, 2019).

هیوسیامین در درمان بیماری‌های اعصاب و روان، تهیه داروهای ضد تهوع، درمان دریازدگی، درمان بیماری‌های مسافرتی، انبساط مردمک چشم، درمان عفونت چشم و برطرف کردن حالت‌های اسپاسم کاربرد دارد. اسکوپولامین دارای اثر بسیار قوی در آرام کردن سلسله عصبی، دارای خواص خواب‌آوری و تقویت کننده اثر مورفین است و از آن برای تسکین ناراحتی‌های عصبی، پارکینسون، لرزش‌های زمان کهولت، تسکین دردهای میگرن، درد دندان و افزایش قوای جنسی استفاده می‌شود (Yadav et al., 2018).

مطابق نتایج تحقیقات، محتوای آلکالوئیدهای بنگ‌دانه به فاکتورهای ژنتیکی، عوامل فیزیولوژیک (گونه، اکوتیپ، نوع بافت و مرحله رشد گیاه)، شرایط محیطی و اکولوژیک، تنش‌های محیطی و روش استخراج آن‌ها بستگی دارد (Torki-Harchegani et al., 2018). در این‌جا نقش عوامل محیطی و اکولوژیک در تغییر محتوای آلکالوئیدهای بنگ‌دانه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

عوامل محیطی و اکولوژیک

۱) مکان رویش: محل رشد و نمو بنگ‌دانه، از لحاظ ارتفاع از سطح دریا، شیب و عرض جغرافیایی و تأثیری که این عوامل بر نور و رطوبت نسبی می‌گذارند، می‌تواند در میزان آلکالوئیدهای بنگ‌دانه تاثیرگذار باشد. طبق گزارش محققان میزان اسکوپولامین با افزایش ارتفاع از سطح دریا کاهش می‌یابد (Jan et al., 2016). پژوهشگران ضمن اثبات ارتباط بین میزان آلکالوئیدهای بنگ‌دانه و عوامل جغرافیایی گزارش کرده‌اند که با افزایش ارتفاع، میزان آلکالوئیدها افزایش می‌یابند (Sadeghi et al., 2014).

۲) خاک و عناصر غذایی: حاصل‌خیزی خاک در تأمین عناصر لازم جهت سنتز آلکالوئیدهای بیشتر در بنگ‌دانه بسیار موثر است. با افزایش نیتروژن و فسفر و با کاهش پتاسیم در خاک، سنتز آلکالوئید در گیاه بنگ‌دانه بیشتر می‌شود. اسیدیته مناسب خاک برای بنگ‌دانه حدود ۴/۶ تا ۹/۷ می‌باشد (Izadi et al., 2022; Khademi et al., 2021; Shujaei et al., 2021).

۳) شرایط اقلیمی: بنگ‌دانه در نواحی گرمسیری بیشتر اسکوپولامین و در مناطق غیرگرمسیری بیشتر هیوسیامین تولید می‌نماید. تغییر اقلیم بیشتر تولید هیوسیامین را افزایش می‌دهد تا اسکوپولامین (Jan et al., 2016).

۴) رطوبت و آبیاری: کمبود آب بیشتر از سایر نهاده‌ها بر رشد و نمو، کیفیت وکمیت مواد مؤثره در گیاهان دارویی اثر می‌گذارد. گزارش شده که تنش خشکی توسعه سلول، سنتز پروتئین و دیواره سلولی را دچار مختل نموده و باعث کاهش رشد گیاه و افزایش ۵۰۰-۵ درصدی محتوی آلکالوئیدها در انواعی از گیاهان مثل توتون، داتوره و گوجه‌فرنگی شده است. میزان آلکالوئید در گیاهان نواحی مرطوب به دلیل درصد ازت بالا، بیشتر از نواحی خشک است (Moghaddam et al., 2018).

۵) درجه حرارت: درجه حرارت بهینه برای کشت و افزایش مقدار آلکالوئید در بنگ‌دانه به ترتیب ۱۶ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد است. بنگ‌دانه نیاز حرارتی بالاتری برای جوانه‌زنی دارد و در مناطقی با میانگین دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد که در اواسط تابستان دارند درصد جوانه‌زنی بالایی دارد. در نتیجه بنگ‌دانه آلکالوئید بیشتری در این رویشگاه‌ها تولید می‌کند (Taherabadi et al., 2015).

این پژوهش به منظور نیل به اهداف زیر انجام پذیرفت:
۱- بررسی کمی و کیفی آلکالوئیدهای تروپان از جمله هیوسیامین و اسکوپولامین در بذور گونه‌ها و جمعیت‌های بنگدانه در رویشگاه‌های طبیعی، ۲- شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های مطلوب‌تر جهت آغاز فرآیند زراعی‌سازی و ۳- تجزیه و تحلیل سهم احتمالی عوامل محیطی و اکولوژیک در افزایش میزان آلکالوئیدهای بنگدانه در شمال‌غرب کشور.

مواد و روش‌ها

از گونه‌های جمع‌آوری شده *H.niger*، *H.reticulatus* و *H.pusillus*، نمونه‌های هرباریومی با کد MP-1005، MP-1006 و MP-1007 توسط گیاه‌شناسان هرباریوم دانشگاه شاهد تهران تهیه شد. بذور گونه‌ها از منطقه شمال‌غرب جمع‌آوری و در

شرایط سایه خشک شدند. پس از پودر کردن بذور گونه‌ها با آسیاب برقی، پودر حاصل از الک‌هایی با مش ۱۰ و ۳۰ و قطر دهانه روزنه ۵۴۵ میکرومتر عبور داده شد و پودرهایی با اندازه ذره‌ای مشخص تشکیل شد.

استخراج تروپان‌آلکالوئیدها: برای اطمینان از وجود آلکالوئید در بذرها از آزمون ویتالی- مورین استفاده شد (Cinelli and Jones, 2021). به‌این ترتیب که ۱ گرم از پودر بذر خشک با ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال مخلوط و به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. بعد از صاف کردن آن را با آمونیاک قلیایی کرده و با کلروفرم (دو بار، هر بار با ۱۰ میلی‌لیتر)، دکانته شد. بعد از آبگیری با سولفات‌سدیم انیدرید، جداسازی دو فاز انجام شد. محلول استخراج شده در یک کروزه چینی ریخته و تا حد خشک شدن در حمام آب‌گرم تغلیظ شد و بعد از سرد شدن به محتویات داخل کروزه ۱۰ قطره اسید نیتریک غلیظ اضافه گردید. با تولید رنگ زرد، دو مرتبه کاملاً تغلیظ صورت گرفت. پس از سرد شدن کروزه، ۱۰ میلی‌لیتر استن به آن اضافه و قطره قطره پتاس ۳٪ در اتانول به محتویات کروزه اضافه شد. ظهور رنگ بنفش- آبی وجود تروپان آلکالویید در بذرها را تأیید نمود. افزودن آمونیاک به محلول باعث قلیایی‌شدن محیط شد و آلکالوییدها به شکل باز آزاد درآمدند. این محلول قلیایی شده به داخل دکانتور ریخته شد. آلکالوییدها یک بار با ۲۵ میلی‌لیتر و دوبار با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شدند. سپس تمام فازهای کلروفرمی به‌دست آمده با هم مخلوط و به این مخلوط مقدار ۵ گرم سدیم‌سولفات انیدرید اضافه شد تا آب موجود در مخلوط گرفته شود. سپس این مخلوط صاف شده و روی کاغذ صافی با ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستسو داده شد. کلروفرم بدست آمده توسط دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر شد. جامد بدست آمده در ۲-۱ میلی‌لیتر متانول پیش از آنالیز HPLC حل شد. آلکالوئیدهای استخراج شده پس از آماده سازی به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شدند تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شود. برای بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک در رویشگاه‌های مورد مطالعه، از عمق توسعه ریشه هر گیاه (۳۰ سانتی‌متر) نمونه‌برداری خاک انجام شد. نتایج تجزیه نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

سنجش کمی آلکالوئیدها: برای اندازه‌گیری و تشخیص کمی آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین از دستگاه HPLC به مدل Well Chrom 2000 از شرکت Knauer ساخت آلمان، ستون Eurospher-100C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴ میلی‌متر، UV Detector K-2600 در طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده گردید. سرعت جریان حلال ml/min ۱ و از فاز متحرک شامل متانول، اسید استیک، تری‌اتیل‌آمین و آب به نسبت‌های ۱۵: ۱/۵: ۰/۵: ۸۳ و حجم هر تزریق ۲۰ میکرولیتر استفاده گردید. سنجش عصاره‌های آلکالوئیدی بذور در طول موج ۲۱۰ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد هیوسیامین و اسکوپولامین برای تکرارهای مختلف نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر جمعیت صورت گرفت که این کار با استفاده از اسپکتروفتومتر Visible مدل ۶۳۰۰، ساخت شرکت Jenway انگلستان صورت گرفت. بر این اساس میانگین مقادیر حاصل در جدول ۲ نشان داده شده است.

سنجش کیفی آلکالوئیدها: تجزیه HPLC به‌منظور سنجش کیفی آلکالوئیدها در عصاره اکوتیپ‌های بنگ‌دانه با سه تکرار صورت گرفت. به این منظور، ابتدا محلول‌های استاندارد متانولی از هیوسیامین و اسکوپولامین با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۱۵ ، ۰/۱ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و طیف آن‌ها توسط دستگاه ترسیم شد (شکل ۱). با استفاده از سطح زیر منحنی به‌دست آمده برای غلظت‌های ذکر شده منحنی استاندارد سطح/غلظت توسط نرم‌افزار اکسل رسم شد. منحنی‌های به دست آمده خطی بود و از این فرمول خطی غلظت هیوسیامین و اسکوپولامین با استفاده از عصاره‌های آلکالوئیدی تزریق شده به دستگاه محاسبه شد.

تجزیه‌های آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری: پس از جمع‌آوری اطلاعات، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها انجام شد و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. برای بررسی صفات فیتوشیمیایی، از رویشگاه‌های شمال- غرب، سه ارتفاع از سطح دریا انتخاب و میزان آلکالوییدهای ۱۰ جمعیت در هر ارتفاع از سطح دریا تعیین شد. ضریب همبستگی بین عوامل محیطی و آلکالوئیدها با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه شد.

Table 1. Soil characteristics of the sampled areas

Region	Azarshahr	Ardebil	Khalkhal	Ahar	Tabriz	Sarab	Meshkinshahr	Shabestar	Givi	Heris
above mean sea level	1468	1350	1843	1341	1348	1650	1400	1660	1700	1800
Percentage of saturated extract	45	55	34	51	45	30	42	45	34	33
(EC) ds/m	1.18	2.13	0.66	1.25	1.19	0.64	.086	1.17	0.66	1.80
pH	7.6	7.6	7.5	7.7	7.8	6.5	7.1	7.7	7.4	7.6
C (%)	0.81	1.21	0.97	0.72	0.21	1.80	2.12	0.31	0.52	0.67
N (%)	0.122	0.228	0.131	0.102	0.087	0.242	0.352	0.121	0.091	0.098
C/N	6.64	5.31	7.40	7.06	2.41	7.44	6.02	2.56	5.71	6.84
P (ppm)	5.1	4.9	4.5	5.3	2.8	5.6	6.5	4.3	3.7	4.1
K (ppm)	130	125	120	212	84	215	350	90	88	64
Sand (%)	37	16	5	47	95	24	26	90	14	17
Silt (%)	23	46	70	24	3	41	48	4	45	60
(%) clay	40	38	25	29	2	35	26	6	41	23
Texture	Sandy clay	Silty clay loam	Silty loam	Sandy clay loam	Sandy	clay loam	Lumi	Sandy	silty clay	Silty loam

Table 2. Comparison of the amount of alkaloids extracted from the seeds of henbane populations

Population	Species	Above mean sea level	Scopolamine	Hyoscyamine
Azarshahr	*H.reticulatus*	1468	0.06295	0.04881
Ardebil	*H.reticulatus*	1500	0.05694	0.06945
khalkhal	*H.reticulatus*	1843	0.05351	0.05833
Ahar	*H.pusillus*	1375	0.06704	0.03207
Tabriz	*H.pusillus*	1470	0.00149	0.00189
Sarab	*H.pusillus*	1365	0.08776	0.07740
Meshkinshahr	*H.pusillus*	1351	0.12215	0.09807
Shabestar	*H.niger*	1660	0.05382	0.04883
Givi	*H.niger*	1700	0.00151	0.00301
Heris	*H.niger*	1800	0.03235	0.03397
Minimum			0.00129	0.00152
Maximum			0.13452	0.11249
Average			0.053952	0.4989
Standard deviation			0.40887	0.324651
Coefficient of variation			75.784	65.073

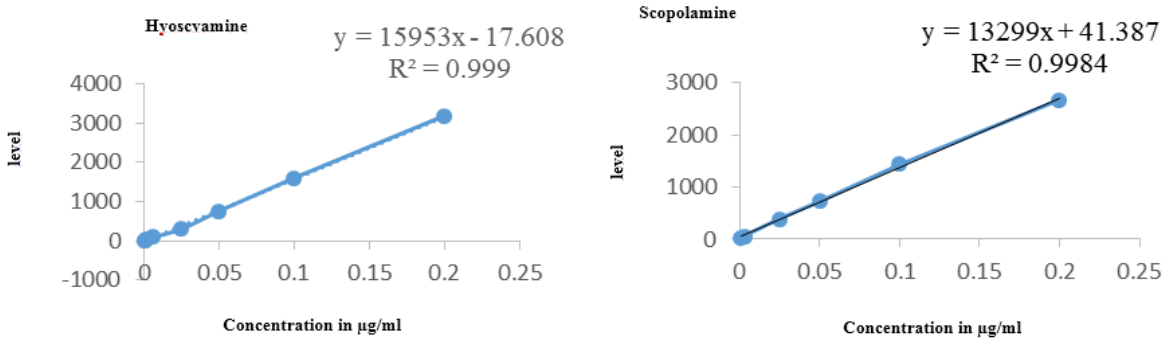


Figure 1. Calibration curves of studied alkaloids

نتایج و بحث

تجزیه نمونه‌های خاک نشان داد که بافت خاک در اکوتیپ مشکین‌شهر لومی بوده و بهترین نوع خاک برای رشد و افزایش میزان آلکالوئیدها در بنگ‌دانه است. ناچیز بودن میزان آلکالوئیدها در جمعیت‌های تبریز و شبستر به خاطر بافت شنی خاک و مواد مغذی بسیار کم، قابل توجیه است. هدایت الکتریکی خاک (EC) کمتر از ds/m ۴ و اسیدیته اغلب خاک‌های مناطق مورد مطالعه کمتر از ۸ می‌باشد. بنابراین خاک‌های مناطق مورد مطالعه شور نیستند. خاک تبریز و شبستر با کربن آلی کمتر از ۰/۵ درصد، نامرغوب هستند. در صورتی که خاک مناطق مشکین‌شهر، سراب، اردبیل، خلخال و آذرشهر با کربن آلی بیشتر از ۰/۷۵ درصد مرغوبیت بالایی دارند (جدول ۱). بیشترین میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در جمعیت مشکین‌شهر و در گونه *H.pusillus* و کمترین آن‌ها در جمعیت گیوی با گونه *H.niger* و جمعیت تبریز با گونه *H.pusillus* مشاهده شد. ارزیابی درصد ضریب تغییرات نشان می‌دهد که مقدار اسکوپولامین دارای بیشترین تغییرات و هیوسیامین دارای کمترین تغییرات در جمعیت‌های مورد مطالعه است (جدول ۲). میانگین غلظت اسکوپولامین و هیوسیامین در گونه *H.niger* از کمترین مقدار ولی در دو گونه *H.reticulatus* و*H.pusillus* از بیشترین مقدار برخوردار بود. بیشترین میزان اسکوپولامین در گونه *H.pusillus* و بیشترین میزان هیوسیامین در گونه *H.reticulatus* برآورد شد و اسکوپولامین تروپان‌آلکالوئید غالب در بذر گونه *H.pusillus* بود (جدول ۳). نتایج نشان داد که تنوع بالایی بین گونه‌ها، جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های بنگ‌دانه از نظر میزان آلکالوئیدها وجود دارد و بر این اساس، *H.pusillus* از نظر اسکوپولامین و *H.reticulatus* از نظر میزان هیوسیامین گونه برتر بودند. جمعیت مشکین‌شهر از لحاظ میزان اسکوپولامین و هیوسیامین در صدر و جمعیت‌های تبریز و گیوی از این لحاظ در جایگاه آخر جای گرفتند(جدول ۴). در این تحقیق، تأثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین کاملاً معنی‌دار شد (جدول ۵).

Table 3. The average concentration of tropane alkaloids extracted from the seeds of henbane species

Amount of hyoscyamine	Amount of scopolamine	Species
0.05886	0.0578	*H.reticulatus*
0.05236	0.06961	*H.pusillus*
0.02860	0.0292	*H.niger*

Table 4. Variance analysis of hyoscyamine and scopolamine values

S.O.V	d.f	Mean squares	
		Scopolamine	Hyoscyamine
Between speces	2	0.047**	0.086**
Between populations	7	0.209**	0.275**
Within populations	9	0.509**	0.140**

**Significant at the 1% probability level

Table 5. Variance analysis of the average content of hyoscyamine and scopolamine in the seeds of henbane populations at different altitudes above sea level

	S.O.V	d.f	Sum of squares	Mean squares	F
Scopolamine	R	2	0.01088	0.005442	13.738**
	Above mean sea level	9	0.036	0.004	10.098**
	Error	18	0.007130	0.000396	
	Total	29	0.05401	0.001862	
Hyoscyamine	R	2	0.01280	0.006400	25.412**
	Above mean sea level	9	0.027	0.003	11.91**
	Error	18	0.004534	0.0002519	
	Total	29	0.04433	0.001529	

** Significant at the 1% probability level

اکوتیپ مشـــکین‌شـــهر با ارتفاع از ســـطح دریای پایین‌تر نسبت به سایر مناطق مورد مطالعه، هیوسیامین و اسکوپولامین بیشـــتری دارد. بنابراین یافته این تحقیق با نتیجه Jan et al. (2016) کـه کاهش ارتفاع از سطح دریا را عامل افزایش میزان اسکوپولامین گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. علیرغم ارتفاع از سطح دریای نسبتاً پایین در رویشگاه تبریز، ژنوتیپ‌ها آلکالوئید ضـعیف‌تری داشتند که احتمال این امر به گرمای بیش از حد و تبخیر و تعرق بالا در این رویشگاه ارتباط دارد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر نیتروژن و فسفر محیط بر افزایش میزان آلکالوئید هیوسیامین در اکوتیپ‌های بنگ‌دانه بسیار معنی‌دار در حالی‌که تأثیر پتاسیم بر میزان هیوسیامین غیرمعنی‌دار است. همچنین تأثیر نیتروژن محیط بر میزان اسکوپولامین در اکوتیپ‌های بنگ‌دانه بسیار معنی‌دار در حالی‌که تأثیر فسفر و پتاسیم بر میزان اسکوپولامین غیرمعنی‌دار است. اثرات متقابل دوگانه NP، NK، PK و اثرات متقابل سه‌گانه NPK بر میزان هر دو آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین در اکوتیپ‌ها کاملاً معنی‌دار است (جدول ۶). دیلمقانی و همکاران نیز عامل افزایش آلکالوئیدها را به بیش‌بود نیتروژن و فسفر خاک و کمبود پتاسیم خاک نسبت داده‌اند (Dilamghani et al., 2006).

نتایج حاصل از همبستگی بین عناصر خاک با ترکیبات فیتوشیمیایی نشان دادکه بین میزان هیوسیامین در ژنوتیپ‌های آذرشهر، خلخال و سراب با نسبت کربن به نیتروژن (C/N) خاک، در ژنوتیپ‌های اردبیل و مشکین‌شهر با نیتروژن خاک، در ژنوتیپ‌های آذرشهر، اهر و مشکین‌شهر با فسفر خاک، در ژنوتیپ‌های اردبیل، سراب و مشکین‌شهر با کربن آلی خاک رابطه مثبت و معنی‌دار ولی بین میزان هیوسیامین در ژنوتیپ-های اهر، سراب و مشکین‌شهر با پتاسیم خاک رابطه منفی و معنی‌دار وجود دارد. همچنین میزان هیوسیامین در ژنوتیپ‌های خلخال و مشکین‌شهر با سیلت خاک و در ژنوتیپ‌های اردبیل با EC خاک رابطه مثبت و معنی‌دار نشان دادند. در ضمن نتایج آزمایش بین میزان اسکوپولامین در ژنوتیپ‌های خلخال، اهر و سراب با C/N خاک، در ژنوتیپ‌های اردبیل، خلخال، سراب، مشکین‌شهر با نیتروژن خاک، در ژنوتیپ‌های آذرشهر، اهر، سراب و مشکین‌شهر با فسفر خاک، در ژنوتیپ‌های اردبیل، سراب و مشکین‌شهر با کربن آلی خاک رابطه مثبت و معنی‌دار ولی در ژنوتیپ‌های اهر و مشکین‌شهر با پتاسیم خاک رابطه منفی و معنی‌دار نشان داد. همچنین رابطه بین میزان اسکوپولامین در ژنوتیپ‌های اهر با شن خاک و در ژنوتیپ‌های خلخال با سیلت خاک مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۷).

Table 6. Variance analysis of the influence of soil elements on the amount of hyoscyamine and scopolamine in henbane plant

Alkaloids	S.O.V	d.f	Sum of squares	Mean squares	F
hyoscyamine	R	2	0.000	0.000	0.146^{ns}
	N	3	0.005	0.002	37.521^{**}
	P	2	0.019	0.010	231.235^{**}
	K	1	0.000	0.000	4.851^{ns}
	NP	6	0.016	0.003	62.137^{**}
	NK	3	0.005	0.002	36.858^{**}
	PK	2	0.007	0.003	83.266^{**}
	NPK	6	0.010	0.002	40.567^{**}
	Error	46	0.002		
	Total	71	0.64		
scopolamine	R	2	0.003	0.001	4.454^{ns}
	N	3	0.005	0.002	5.342^{**}
	P	2	0.001	0.000	0.850^{ns}
	K	1	0.000	0.000	1.234^{ns}
	NP	6	0.041	0.007	22.906^{**}
	NK	3	0.014	0.005	15.661^{**}
	PK	2	0.004	0.002	7.290^{**}
	NPK	6	0.053	0.009	29.615^{**}
	Error	46	0.014	0.000	
	Total	71	0.135		

** Significant at the 1% probability level and ^{ns} Non-significant

Table 7. Correlation coefficient between hyoscyamine and scopolamine values with environmental factors

Alkaloids	Populations	clay	silt	sand	C	N	C/N	P	K	Ec	PH
Hyoscyamine	Azarshahr	-0.06222	0.05983	0.05967	0.05993	0.06025	0.92124*	0.93421*	-0.00159	0.06122	0.06039
	Ardebil	-0.06918	-0.07065	0.07627	0.93471*	0.93812*	0.07015	0.06062	-0.07826	0.95465*	0.07123
	khalkhal	0.05683	0.95912*	0.07227	0.05929	0.92157*	0.95127*	0.05548	-0.05525	-0.05627	0.05637
	Ahar	0.03041	0.03173	0.03021	-0.03252	0.03007	0.95231*	0.95115*	-0.95541*	0.03351	0.03182
	Tabriz	-0.00184	-0.00164	0.00198	-0.00174	-0.00152	-0.00205	-0.00217	0.00169	0.00211	0.00215
	Sarab	0.07741	0.07648	0.07627	0.97642**	0.07715	0.97124**	0.07772	-0.95891*	-0.07601	0.07739
	Meshkinshahr	0.08809	0.09881	0.08207	0.98921**	0.97841**	0.08104	0.98713**	-0.97561**	0.08402	0.09807
	Shabestar	-0.07064	-0.07265	0.07235	-0.00175	0.07032	0.00218	-0.05548	0.06854	0.00221	0.07215
	Givi	0.00381	0.00251	0.00231	-0.00392	-0.00242	0.00221	-0.00371	0.00262	-0.00225	0.00428
	Heris	0.03426	0.03187	0.03345	-0.03252	-0.03382	0.03283	-0.03571	0.03535	0.03592	0.03392
Scopolamine	Azarshahr	-0.08035	0.07531	0.08071	0.07501	0.08011	0.00145	0.93412*	-0.00165	0.07547	0.08052
	Ardebil	-0.05127	-0.05101	0.04692	0.92394*	0.92123*	0.04875	0.07937	-0.04845	0.03021	0.04689
	khalkhal	0.04931	0.95941*	0.07901	0.04731	0.04617	0.95421*	0.07682	-0.04741	-0.04957	0.04637
	Ahar	0.07974	0.07801	0.92451*	-0.01935	0.07952	0.92817*	0.92186*	0.92139*	0.07847	0.07992
	Tabriz	-0.00135	-0.00139	0.00129	-0.00162	-0.00145	-0.00149	-0.00152	0.00169	0.00171	0.00141
	Sarab	0.88187	0.088971	0.04698	0.97421**	0.98214**	0.97412**	0.97618**	-0.96412**	0.88187	0.08874
	Meshkinshahr	0.087451	0.08015	0.86541	0.97125**	0.98142**	0.96214**	0.974125**	-0.98765**	0.65421	0.08045
	Shabestar	-0.07661	-0.07802	0.07504	-0.00164	0.07532	0.00149	-0.07639	0.07698	0.00179	0.07492
	Givi	0.00156	0.00129	0.00171	-0.00167	-0.00136	0.00149	-0.00151	0.00142	-0.00165	0.00147
	Heris	0.02058	0.07818	0.01982	-0.01973	-0.02068	0.02168	-0.02149	0.02156	0.07848	0.02125

** correlation is very significant (α≤.01), * correlation is significant (α≤.05)

محققان دیگر نیز، افزایش فسفر خاک را عامل افزایش میزان آلکالوییدهای گونه *H.muticus* دانسته‌اند (Nassar et al., 2020). گزارش شده که سطح مناسبی از کربن آلی در خاک، تولید فرآورده‌های ثانویه را تحریک و باعث افزایش آن‌ها در گیاه می‌شود (Ghorbanpour et al., 2018). لذا پتانسیل بالای اکوتیپ‌های مشکین‌شهر و سراب از نظر میزان آلکالوئید می‌تواند به درصد بالای کربن آلی خاک مرتبط باشد. مطابق شکل۲، هیوسیامین و اسکوپولامین در بذور تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. بین جمعیت‌های اهر با هریس، گیوی با تبریز و شبستر با خلخال از حیث میزان هیوسیامین و اسکوپولامین حداکثر تشابه دیده می‌شود. این شباهت‌ها حکایت از شباهت ویژگی‌های اکولوژیکی در رویشگاه‌های مورد مطالعه مانند دما، رطوبت، ارتفاع از سطح دریا و سایر عوامل خاکی، جغرافیایی و عوامل ژنتیکی دارد.

اگرچه بنگ‌دانه از دامنه وسیع بردباری و سازگاری در قبال عوامل اکولوژیک و محیطی برخوردار است(Feher, 2018). ولی حصول آلکالوئیدهای با کیفیت و کمیت بالا در این گیاه به شرایط محیطی و اکولوژیکی مطلوب رویشگاه‌های این گیاه بستگی دارد. بر اساس نظر محققان، بنگ‌دانه‌های روییده در ارتفاعات کوهستانی، مواد موثره بیشتری دارند (Ravnikar and Kreft, 2021). بنابراین میزان آلکالوئیدهای بالا در ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر و سراب می‌تواند متاثر از مناطق کوهستانی محل جمع‌آوری نمونه‌ها باشد. نیتروژن‌دار بودن ترکیبات آلکالوئیدی، با تاثیر بالای نیتروژن در شکل‌گیری آلکالوئیدها و موثر بودن نیتروژن خاک در افزایش آلکالوئیدهای بنگ‌دانه در رویشگاه‌های مشکین‌شهر، سراب و اردبیل قابل توجیه است. پایین بودن میزان آلکالوئید در ژنوتیپ‌های هریس تا حدودی می‌تواند به دمای پایین هوا در فصل رشد و دوره یخبندان طولانی در این رویشگاه مرتبط باشد. نظر به بیشتر بودن درصد آلکالوئید در بنگ‌دانه‌های نواحی مرطوب نسبت به نواحی خشک، احتمالاً درصد بالای اسکوپولامین و هیوسیامین در تعدادی از ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر و سراب می‌تواند ناشی از شرایط اکولوژیکی و نواحی مرطوب ییلاقی دامنه‌های سبلان باشد. گونه *H.pusillus* پلی‌پلوئید ولی گونه‌های *H.reticulatus* و *H.niger* دیپلوئید هستند، قاعدتاً گونه *H.pusillus* به خاطر سطح پلوئیدی بالا، بایستی آلکالوئید بالایی داشته باشد (Madani et al., 2016) ولی این گونه فقط در ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر و سراب آلکالوئید بالایی داشت و در ژنوتیپ‌های تبریز و اهر از چنین قابلیت‌هایی برخوردار نبود. احتمالاً عوامل محیطی در کاهش و افزایش میزان آلکالوییدهای بنگ‌دانه نسبت به عوامل ژنتیکی نقش غالب‌تری داشته است. با افزایش سن گیاه، میزان هیوسیامین افزایش و مقدار اسکوپولامین کاهش می‌یابد (Ghorbanpour et al., 2018). احتمالاً گزینش ژنوتیپ‌هایی با بافت مسن در رویشگاه اهر، اسکوپولامین نسبتاً پایین را در بنگ‌دانه‌های این شهر رقم زده است.

نتیجه‌گیری

اگرچه سنتز آلکالوئیدها در اصل تحت کنترل فرآیندهای ژنتیکی است، ولی نقش عوامل محیطی را در فرایند بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه نمی‌توان نادیده گرفت. جمعیت مشکین-شهر با گونه *H.pusillus* با بیشترین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین می‌تواند با مطالعات تکمیلی بیشتر از جمله مطالعات به‌زراعی، به‌نژادی و بیوتکنولوژیک به عنوان گونه ارزشمند دارویی مورد استفاده قرار گیرد. وجود تنوع فیتوشیمیایی بسیار معنی‌دار در بین گونه‌ها، بین جمعیت‌ها و بین ژنوتیپ‌های بنگ‌دانه از لحاظ آلکالوئیدها، نقش بارز عوامل محیطی و اکولوژیکی را در تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه توجیه می‌نماید. افزایش روزافزون تقاضا برای آلکالوئیدی بنگ‌دانه و مشکل در تولید صنعتی آن‌ها، با شناسایی ژن‌های مهم دخیل در بیوسنتز این متابولیت‌ها و دست‌ورزی آن‌ها می-توان بنگ‌دانه‌هایی با درصد آلکالوئیدی بیشتر تولید کرد که در این بین با کارهای اصلاحی روی ژنوتیپ‌های مشگین‌شهر و سراب و زراعی‌سازی آن‌ها می‌توان به تولید انبوه آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در سطح تجاری دست یافت.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از زحمات مسئولین محترم آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه تبریز نهایت تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Cinelli, M. A., and Jones, A. D. (2021). Alkaloids of the genus Datura: Review of a rich resource for natural product discovery. *Molecules*, 26(9), 2629.

Dilamghani, K., Khavarinejad, R., Fahimi, H., & Hekmat Shaar, H. (2006). Extraction and Measurement of Tropane Alkaloids Hyoscyamine and Scopolamine from Different Organs of *Hyoscyamus pusillus* L. at Different Stages of Growth. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 22(1), 1-20. [In Persian]

Feher, A. (2018). The Historical Vegetation of South-west Slovaka. *Vegetation History and Cultural Landscapes*, 13-152. Springer, Cham.

Ghorbanpour, M., Salehi Arjamand, H., Hatami, M., & Hosseini, N. (2018). Investigation of morphological diversity and tropane alkaloids in some henbane populations. *Quarterly Journal of Medicinal Plants*, 1(69), 105-124.

Izadi, Z., Biabani, A., Sabouri, H., & Bahreininejad, B. (2022). The effect of different levels of urea and planting density on the phytochemical characteristics, alkaloids, and yield of the medicinal plant jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Crop Science*, 62(3), 1264-1276.

Jan, S., Kamili, A. N., Parray, J. A., Bedi, Y. S., & Ahmad, P. (2016). Microclimatic variation in UV perception and related disparity in tropane and quinolizidine alkaloid composition of *Atropa acuminata*, *Lupinus polyphyllus* and *Hyoscyamus niger*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 230235.

Khademi, M., Nazarian Firouzabadi, F., & Esmaili, A. (2021). The effect of phosphorus and nitrogen on the production of hairy roots in tobacco plant (*Nicotiana tobaccum*) as a model plant. *Plant Production*, (44)1, 13-24. [In Persian]

Kohnen-Johannsen, K. L., & Kayser, O. (2019). Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules*, 24(4), 796.

Madani, S. H., Hosseini, B., Dehghan, A., & Rezaei Chianeh, A. (2016). Investigating the effects of polyploidy induction under in vitro conditions on regenerated seedlings of *Hyoscyamus reticulatus*. *Journal of Crop Breeding*, 8(17), 66-76. [In Persian]

Moghaddam, M., Ghasemi Pirbalouti, A., & Farhadi, N. (2018). Seasonal variation in Juniperus polycarpos var. turcomanica essential oil from northeast of Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 30(3), 225-231.

Nassar, R., Seleem, E. A., Caruso, G., Sekara, A., & Abdelhamid, M. T. (2020). The Nitrogen-fixing bacteria- effective enhancers of growth and chemical composition of Egyptian henbane under varied mineral n nutrition. *Agronomy*, 10(7), 921.

Ravnikar, M., & Kreft, S. (2021). *Scopolia carniolica* var. hladnikiana: Alkaloidal Analysis and Potential Taxonomical Implications. *Plants*, 10(8), 1643.

Sadeghi, B., rayazi, G., & Zare Mobarakeh, Sh. (2014). *Chemotaxonomic and phytochemical studies in selected species of henbane genus based on some tropane alkaloids, phenolic and flavonoid compounds*. Master Thesis, Biology, University of Tehran, Tehran. [In Persian]

Shujaei, M., Rusta, H. R., Rozban, M. R., & Sufi, H. R. (2021). Investigating the interaction of nitrogen sources and sodium bicarbonate on growth and some morpho-physiological characteristics of garlic plant in hydroponic system. *Plant products*, 2(44), 221-234. [In Persian]

Taherabadi, S. H., Goldani, M., Taherabadi, S. H., & Fazeli Kakhki, S. F. (2015). Determination of cardinal temperatures of germination of weed seeds of *Hyoscyamus niger*, *Aconitum napellus* and *Cannabis sativa*. *Journal of plant protection*, 29, 16-22. [In Persian]

Torki-Harchegani, M., Ghasemi Pirbalouti, A., & Ghanbarian, D. (2018). Influence of microwave power on drying kinetic, chemical composition and antioxidant capacity of peppermint leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21, 430-439.

Yadav, R., Lal, R. K., & Singh, V. R. (2018). Intra-specific differentiation, genetic variability and their prospect for exploitation in medicinally important plant Black henbane (*Hyoscyamus niger* L.). *Trends in Phytochemical Research*, 2(3), 147-154.