فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۹ ص. ۱۶-۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد در بیوسنتز اندول الکالوییدهای پروانش *Catharanthus roseus* (L) G. Don. در شرایط کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه

علی کاظم زاده حقیقی[۱]، حمید سبحانیان[۲*]، غلامرضا بخشی خانیکی[۳]، محمد علی ابراهیمی[۴]

[۱] دانشجوی دوره دکتری گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[۳] استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[۴] استاد گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور ، تهران، ایران

*Email: motif3000@yahoo.com

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۹

چکیده

گیاه پروانش منبع غنی از آلکالوئیدها است که در همه بخش‌های گیاه پراکنده‌اند. وجود آلکالوئیدهای ارزشمند در تمام بخش‌های گیاه سبب شده است که، به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آن بررسی شود.این مطالعه به منظور بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشدی بر بیوسنتز اندول الکالوییدهای گیاه دارویی پروانش در شرایط کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه اجرا شد.آزمایش در سه کشت جداگانه،شامل کشت بافت، کشت سوسپانسیونی، کشت مزرعه و تاثیر استفاده هم زمان تنظیم کننده‌های رشدIAA و NAA بر میزان آلکالوئیدهای تولید شده توسط گیاه پروانش انجام شد. هورمون های IAA در سه غلظت(۰/۱، ۰/۵ ، ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر)و NAA (۰/۱، ۰/۵ ، ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) در سه تکراربصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج درسال۱۳۹۸اجرا شد. نتایج نشان داد که NAA، باعث افزایش میزان آلکالوئیدهای آجمالیسین، سرپانتین و افزایش میزان آلکالوئید کل در حدود ۲۰ درصد می‌باشد. در بین تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه، IAA اثر کاهشی را در تغییرات میزان آلکالوئیدها از خود نشان داد و این کاهش در برخی موارد در حدود ۱۰ درصد بود. استفاده از روش کشت سوسپانسیونی در بسیاری از موارد نسبت به دو روش دیگر باعث افزایش آلکالوئیدها شد، و در کشت مزرعه مقدار آلکالوئید کل نسبت به سایر روش‌ها افزایش نشان داد. براساس نتایج حاصل از این آزمایش استفاده از روش کشت سوسپانسیونی در بسیاری از موارد نسبت به دو گروه دیگر مزیت نسبتا مناسب‌تری را از خود نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: پروانش، کشت بافت، کشت سوسپانسیون سلول، کشت مزرعه، آلکالوئید-کل.

مقدمه

استفاده از پروانش در اروپا به ۵۰ سال قبل از میلاد مسیح باز می‌گردد، که در آن زمان عوام از این گیاه برای جلوگیری از خونریزی‌ها، درمان زخم‌ها و دندان درد استفاده می‌کردند. همچنین مردم هند و آفریقا از آن به عنوان ماده کاهش‌دهنده قند خون بهره می‌بردند [۱]. تحقیقات اخیر نشان داده است که ساقه و برگ‌های پروانش حاوی چندین نوع آلکالوئید، تانن، ساپونین، پکتین و رنگدانه‌های آلی می‌باشند، که سبب بروز خصوصیات دارویی، مانند آرام بخش، قابض، کاهش دهنده فشار خون، گشاد کننده رگ‌ها و مدر برای این گیاه می‌شود. بنابراین در درمان‌های سنتی از آن برای جلوگیری از انواع خونریزی ازجمله بینی استفاده می‌شده است. پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* (L) *G.Don*. گیاهی دو لپه، چند ساله و همیشه سبز که در مناطق سرد به صورت یکساله کشت می‌شود و در جهان با نام‌های مختلفی مانند *Madagascar Periwinkle*، *Vinca rosea* و *Lochnera rosea* شناخته شده است. منشا آن مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار گزارش شده، که امروزه کشت آن در سراسر دنیا گسترش یافته است. این گیاه در دشت‌ها و تپه‌هایی که ۵۰۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارند، می‌روید. طول ریشه اصلی پروانش ۲۰ الی۴۰ سانتی‌متر است و انشعاب‌های کمی دارد. ساقه آن، استوآن‌های و مستقیم و ارتفاع آن در شرایط اقلیمی مختلف، متفاوت و بین۴۰ الی ۹۰ سانتی‌متر متغییر می‌باشد. پروانش منبع غنی از آلکالوئیدها است که در همه بخش‌های گیاه پراکنده‌اند. محتوای آلکالوئیدهای *C. roseus* در قسمت‌های مختلف آن بسیار متفاوت است و بیشترین مقدار در پوست ریشه و بین ۰/۱۵ تا ۱/۳۴ درصد می‌باشد [۲] وجود آلکالوئیدهای ارزشمند در تمام بخش‌های گیاه سبب شده است که، به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آن بررسی شود [۱][۳]. بر اساس اکثر کتب داروشناسی بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی از این گیاه استخراج شده است. در میان آلکالوئیدهای مونومری آن، آجمالیسین (روباسین) و سرپانتین که در ریشه‌ها وجود دارد، کاربرد گسترده‌ای در درمان بیماری‌های گردش خون به ویژه بهبود جریان خون مغزی و کاهش فشار خون دارد [۲]. همچنین بیش از ۲۵ نوع آلکالوئید دایمری نیز شناسایی شده که از جمله، وین بلاستین (وینکالوکوبلاستین) و وین کریستین (لئوروکریستین) دو آلکالوئید دایمری مهم پروانش هستند که در ساقه و برگ‌ها ساخته و ذخیره می‌شوند. هر دو این آلکالوئیدها اثر آنتی نیوپلازی (ضد تومور) داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمی‌درمانی برخی سرطان‌ها استفاده می‌شوند [۲][۳]. بذر پروانش نیز دارای آلکالوئیدهای دایمری وینگرامینه و متیل وینگرامینه است که به طور اختصاصی در بذر تولید می‌شوند [۳][۵]. برخی دیگر از آلکالوئیدها نظیر، لئوروزین، کاتارانتین، تتراهایدوآلستونین، لاکنریسین، ویندولین و ویندولینین قند خون را کاهش داده و برخی دیگر سبب جلوگیری از خونریزی می‌شوند[۳]. در مورد محل بیوسنتز و ذخیره سازی آلکالوئیدها، واکئول‌های سلول‌های گیاهی نقش اصلی را در ذخیره‌سازی این گروه از متابولیت‌های ثانویه ایفا می کنند، همچنین واکوئل‌ها اسیدهای آلی، قندها، سایر متابولیت‌های ثانویه، کاتیون‌هایی نظیر سدیم و کلسیم را در خود نگهداری می‌کنند [۵][۶]. تنظیم مراحل انتقال از سیتوپلاسم به تنوپلاست برای ذخیره متابولیت‌های طبیعی در واکوئل‌ها ضروری است. ظرفیت ذخیره واکوئل‌ها می‌تواند عامل محدود کننده در تولید این ترکیبات توسط سلول‌های گیاهی باشد [۷]. مطالعاتی که بر روی پروتوپلاست‌های برگ‌های پروانش واریته little bright eye انجام شده است، نقش تله یونی را در ذخیره آلکالوئیدها مشخص کرده است. جذب اندول آلکالوئیدهای ویندولین، آجمالیسین ،تابرسونین و وین بلاستین دو مرحله ای بوده و شامل مرحله جذب سریع است که بدنبال آن مرحله جذب بطئی و طولانی صورت می‌گیرد[۸][۹]. وابستگی pH و غلظت در مرحله جذب سریع نشان می‌دهد که جذب به صورت انتشار ساده صورت می‌گیرد. نسبت Ci/Ce برای ویندولین و آجمالیسین مشخص می‌کند که تجمع این آلکالوئید از گرادیان pH بین واکوئل و محیط پیروی می‌کند. مرحله بعدی جذب ویندولین به بازدارنده‌هایی نظیر $NaNO_3$(۲۰ میلی‌مولار)

و $Cu^{+۲}$ (۰/۵ میلی‌مولار) حساس است. مرحله بطئی جذب آجمالیسین اگرچه حساس به مس(Cu^{+2}) است اما $NaNO_3$ هیچ تاثیری بر جذب آن ندارد. مطالعات نشان دادند جذب دو مرحله‌ای ایندول آلکالوئیدها ناشی از متابولیسم ویژه‌ای نیست بلکه تجمع و ذخیره ایندول آلکالوئیدها تنها ناشی از تله یونی آلکالوئیدها به وسیله pH پایین لومن می‌باشد [۸][۱۰][۱۱]. به نظر می‌رسد که جذب ویندولین به انرژی نیاز دارد ولی احتمالاً تجمع آجمالیسین ناشی از ایجاد کمپلکس با ترکیبات آلی و فنلی است. ذخایر فرعی دیگر نظیر تابرسونین به وسیله انتشار ساده از عرض تنوپلاست عبور می‌کنند[۱۳][۱۴][۱۵]. در کل، با توجه به مقادیر بسیار بالایی از آلکالوئیدها و به دلیل اهمیت این ترکیبات از نظر دارویی این مطالعه با هدف بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشدی، در بیوسنتز ایندول الکالوئیدهای پروانش در شرایط کشت بافت، کشت سلولی و کشت مزرعه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذر پروانش از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج بخش بیوتکنولوژی تهیه شد. برای مطالعات کشت بافت و کشت سلول محیط‌های کشت غذایی خاص مورد استفاده قرار گرفت. این محیط‌ها دارای مواد غذایی لازم برای ادامه رشد بافت‌ها و سلول‌ها بوده، چون نیاز غذایی بافت‌ها و اندام‌های گونه‌های مختلف گیاهی با یکدیگر متفاوت است، در این پژوهش از محیط‌های کشت مختلف استفاده شد. در ضمن محیط‌های کشت مختلف دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات معدنی و ترکیبات آلی است.

کشت بافت پروانش

ابتدا برای ضد عفونی نمودن، بذور پروانش ۱۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و ۳۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت کلسیم – سدیم ۲۰ درصد و سه بار با آب مقطر شستشو شدند، بذرها به دلیل تعدد شیارهای سطحی پوسته دانه کامل ضد عفونی نشده[۸][۱۳]، به همین دلیل جهت حذف این آلودگی‌ها از محتوی کپسول آموکسی‌سیلین ۲۵۰ میلی‌گرمی و کپسول آمپی‌سیلین ۲۵۰ میلی‌گرمی در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شده، و سپس بذور به محیط کشت منتقل شدند.

ضد عفونی نمودن قطعات گیاه پروانش

ابتدا برگ‌هاو ساقه‌های مسن و جوان با آب و صابون شستشو و ۱۰ دقیقه در محلول ۲۰ درصد تجاری آب ژاول قرار داده شده، برگ‌ها و ساقه‌ها سه بار با آب مقطر ضد عفونی شستشو شدند، سپس قطعات را در محلول کلرید جیوه ۰/۱۵درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده، و در آخرین مرحله سه بار با آب مقطر ضد عفونی شستشو شدند، تفکیک قطعات برگ و ساقه پس از ضد عفونی کردن انجام شد. این قطعات به محیط کشت پایه مختلف با غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد مورد پژوهش منتقل شدند.

روش‌های کشت سلول و بافت

برای کشت سوسپانسیونی از محیط‌های پایه MS و LS بدون آگار و برای کشت بافت از محیط پایه B5 استفاده شد [۷][۱۱][۱۳][۱۴][۱۶].

الف) روش کشت سوسپانسیون سلولی، یک مرحله‌ایی: در این روش تنها از محیط کشت پایه MS استفاده شد، در ضمن واکشت‌های ٤،۲-D از محیط حذف نشد، در تمام دوره کشت سوسپانسیونی سلول در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط بوده و ارلن‌ها روی شیکر افقی با سرعت ۱۳۰ rpm قرار داشتند [٤][۱۳].

ب) روش کشت سوسپانسیون سلولی، دو مرحله‌ایی: در این روش ابتدا کال‌ها را به محیط‌کشت تعلیقی MS دارای تنظیم کننده رشد ٤،۲-D و کینتین هر یک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل نموده و پس از یک ماه ۱۰ میلی‌لیتر از سلول‌های جدا شده را به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید آلکالوئید انتقال داده شدند، محیط تولید الکالوئید توسط زِنک و همکارانش(1991)معرفی شده بود. محیط LS دارای ۵۰ گرم در لیتر ساکارز ۱/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۷۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود [۱۰][۱۳][۱۵][۳۰].

جهت کشت سلولی از برگ‌های پروانش، کال‌های ۳۰ روزه تهیه و پس از۲۰ روز نگهداری در محیط‌های MS بدون آگار و فاقد تنظیم کننده رشد، قند و تریپتوفانریال، بعنوان محیط شاهد رشد یافته، و سپس با افزودن تنظیم کننده‌های رشد مورد پژوهش برای سنجش آلکالوئیدهای آجمالیسین، سرپانتین و آلکالوئید کل در وزن خشک گیاه، در طی ۴ دوره زمانی ۱۰ روزه مورد استفاده قرار گرفتند [۱۰][۱۷][۱۸].

کشت مزرعه: برای این منظور ۲۷ کرت دو مترمربعی را انتخاب و در اواسط بهار مبادرت به کاشت بذرها به مقدار دو گرم در هر کرت شد و کرت‌ها بطور مرتب و روزانه آبیاری شدند. هورمون‌های IAA در سه غلظت (10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} میلی‌گرم در لیتر)و NAA (10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} میلی‌گرم در لیتر) در سه تکراربصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج درسال۱۳۹۸اجرا شد. پس از دو برگی شدن گیاهان، تنظیم کننده رشد پاشی آغاز شد، به این ترتیب که برای هر کرت معین حدود ۲۰ میلی‌لیتر از محلول مورد آزمایش روی گیاه اسپری شد. دو برداشت پس از یک ماه تنظیم کننده رشد پاشی انجام شد. برداشت اول در هفته دوم و برداشت دوم در شروع مرحله گلدهی و سپس ۲ نمونه برداری نیز پس از گلدهی با فواصل زمانی ۱۴ روزه از گیاهان انجام شد. پس از برداشت ، گیاهان در دمای معمولی اتاق ($25^{\circ}C$) خشک شده و سپس آلکالوئیدها استخراج، و سنجش شدند [۱۱][۲۰][۲۱].

روش اجرای آزمایش

به‌منظور بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه در این تحقیق بر میزان ترکیبات مورد نظر، ابتدا تیمارها به طور دقیق در کرت‌های مورد تحقیق انجام گردید، پس از طی مرحله رشد گیاه، عملیات عصاره گیری انجام گردید و ترکیبات مورد نظر با استفاده از اسپکتروفلوئوریمتری مورد سنجش قرار گرفت، نتایج بین گروهی با استفاده از آزمون ANOVA و تست‌های تعقیبی شف درسطح احتمال ۱٪ مورد سنجش و مقایسه با هم قرار گرفت.

جداسازی آلکالوئیدها به روش TLC [۵][۶][۸]: در مطالعه به روش کروماتوگرافی لایه نازک از عصاره متانولی استفاده شد، که به صورت لکه‌هایی بر روی صفحات سیلیکاژل شیشه‌ایی با طول موج G-60- UV 254 nm فعال شده قرار داده و در تانک مخصوص کروماتوگرافی حاوی تراتیل آمین و یا محلول آمونیاک وارد شد. سپس هنگامی که فاز متحرک به اندازه ۱۰ سانتی‌متر در روی صفحات سیلیکاژل حرکت نمود از داخل تانک کروماتوگرافی خارج و در اتاقک- UVیا(UV-cabinet) در معرض نور مرئی و فرابنفش (UV) در طول موج ۳۶۶ و ۲۵۴ نانومتر قرار داده و نحوه جدا شدن باندها و رنگ آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت، سپس اندازه گیری آلکالوئیدها توسط روش‌های اسپکتروفتومتری و دانسیتومتری انجام شد [۵][۶][۲۲][۲۳][۲۵].

اندازه‌گیری آلکالوئید کل

استخراج آلکالوئید کل با استفاده از روش پیشنهادی Svendsen در سال ۱۹۸۳ انجام شد، در این روش کار به ۱ گرم پودر گیاهی خشک ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵% اضافه گردید و ۲۴ ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک۸۵% به آن افزوده شد. و در دمای بن ماری ۶۰ درجه قرار گرفت. در ادامه محلول رویی صاف گردید و به باقیمانده مجدداً ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار داده شد. عمل استخراج ۳ بار تکرار شد و در انتها محلول‌ها باهم مخلوط گردید. با انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوبات از محلول الکلی جدا گردید، محلول الکلی در داخل بشر ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد عمل تبخیر انجام شد، با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوریک ۵% و ۱۰ میلی‌لیتر در اتیل اتر دیواره ظرف شستشو گردید. عصاره حاصل را در دکانتور ریخته و فاز اسیدی زیرین جدا شد. فاز اسیدی به کمک سود ۱۰ نرمال به pH ۱۰ رسانده شد، هم حجم محلول کلروفرم اضافه کرده و فاز کلروفرمی زیرین به کمک دکانتور جدا شد. این عمل سه بار تکرار شد و فاز کلروفرمی جمع‌آوری گردید، کلروفرم‌های جمع‌اوری شده

در دمای پایین تبخیر شد و در نهایت با استفاده از ۳ میلی‌لیتر متانول خالص دیوار ظرف شستشو شد، عصاره حاصل حاوی الکالوئید می‌باشد، که از آن برای لکه گذاری روی روش TLC و اندازه‌گیری محتوای آلکالوئید کل استفاده گردید.با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک آلکالوئید و مقایسه آن با مقدار ۲ میلی‌لیتر عصاره کاملا خشک شده (با توجه به این موضوع که بیشتر ماده جامد باقیمانده آلکالوئید است) مقدار آلکالوئید کل بدست آمد.

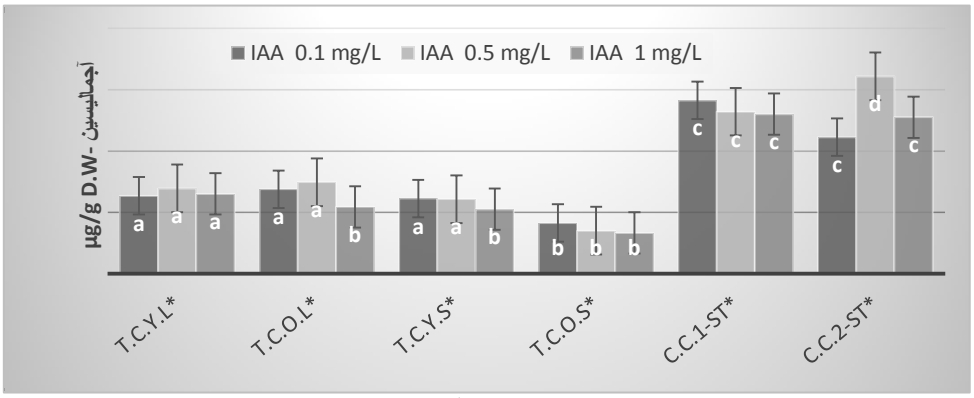
نتایج

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان تولید آجمالیسین، سرپانتین و آلکالوئید کل در گیاه پروانش: بررسی نتایج حاصل از کشت خود اندام‌های مختلف گیاه پروانش نشان داد که بین میزان آجمالیسین سنجش شده در این اندام‌ها اختلاف وجود دارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد IAA میزان آجمالیسین کم شد، به گونه‌ای که در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IAA به ترتیب بیشترین و کمترین میزان انباشت آجمالیسین شده است، در بررسی اثر متقابل محرک هتی مصرفی در اندام‌های مختلف بر میزان آجمالیسین هم مشاهده شد، که استفاده از ساقه مسن پروانش بیشترین و استفاده از کشت بافت برگ‌های جوان پروانش کمترین تغییر را در میزان آجمالیسین نشان داد. در هر دو نوع کشت سوسپانسیون یک و دو مرحله ایی نیز نتایج مشابه بدست آمد. همچنین مشاهده شد که استفاده از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آجمالیسین تاثیر معکوس داشته، به گونه‌ای که استفاده از غلظت‌های بیشتر این تنظیم کننده رشد باعث کاهش آجمالیسین شد، در بررسی اثر متقابل روش‌های کشت نیز مشاهده شد که استفاده از روش کشت دو مرحله ایی بیشتر از روش کشت یک مرحله‌ایی باعث افزایش آجمالیسین می‌شود. برخلاف نتایج کشت بافت در نتایج کشت سوسپانسیون دو مرحله‌ایی تاثیر غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IAA به ترتیب باعث افزایش و کاهش میزان آجمالیسین شد (نمودار ۱). در بررسی میانگین نتایج حاصل از بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان تولید آجمالیسین در گیاه پروانش در کشت بافت اندام‌های مختلف و کشت سوسپانسیونی مشاهده شد که بیشترین میزان آجمالیسین در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر از تنظیم کننده رشد IAA بوده و افزایش غلظت IAA باعث کاهش غلظت آجمالیسین در گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IAA نسبت به گروه دریافت کننده غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IAA می شود. همچنین نتایج نشان داد که این تنظیم کننده رشد پس از ۳۰ روز باعث کاهش میزان آجمالیسین نیز شد (نمودار ۲). در بررسی تاثیر متقابل نوع روش کشت پروانش و استفاده همزمان از تنظیم کننده رشد IAA با غلظت‌های مختلف مشاهده شد، که استفاده از این تنظیم کننده رشد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در روش کشت سوسپانسیونی نسبت به روش کشت بافت باعث افزایش معنی‌دار نمودار (امید بیگی، ۱۳۸۶) میزان آجمالیسین شده است. همچنین نتایج حاصل از مقایسه همه گروه‌های کشت نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان تجمع آجمالیسین تحت تاثیر تنظیم کننده رشد IAA در کشت مزرعه نسبت به سایر گروه‌ها وجود ندارد (نمودار ۲).

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان تولید سرپانتین در گیاه پروانش

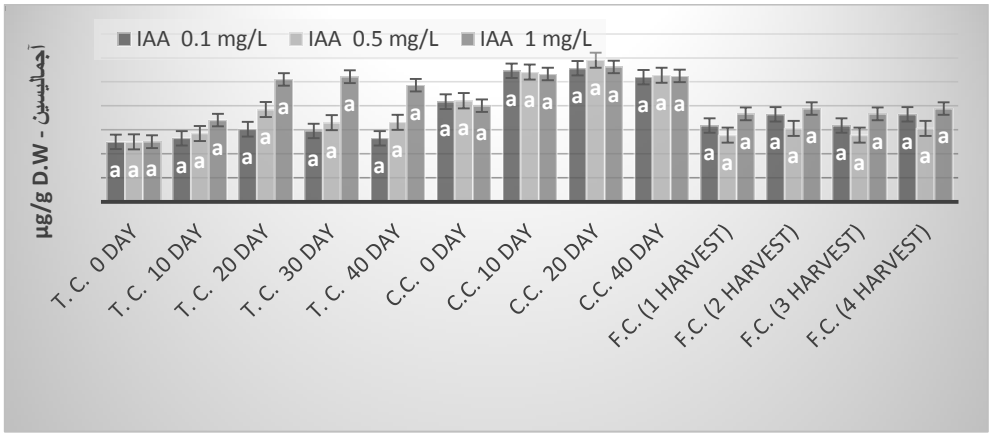
نتایج حاصل نشان داد که استفاده از روش‌های مختلف کشت بافت و کشت سوسپانسیونی، باعث تغییر در میزان سرپانتین اندازه‌گیری شده می‌شود. به‌گونه‌ای که در روش کشت بافت، کمترین تاثیر کاهشی را برگ جوان پروانش داشته و بقیه روش‌ها تقریبا به یک میزان اثر افزایشی از خود نشان داده اند. و روش کشت سوسپانسیونی دو مرحله ایی بیشترین تاثیر کاهشی را از خود نشان داد (نمودار ۳). بررسی نتایج نشان داد که افزایش غلظت این تنظیم کننده رشد از ۰/۱ به ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار بر میزان سرپانتین در هر دو گروه کشت بافت و کشت سوسپانسیونی شده است، اما با افزایش

زمان تا ٤٠ روز میزان تنظیم کننده رشد با افزایش مواجه شد (نمودار ٤)، در بررسی اثر متقابل غلظت‌های مورد استفاده از این تنظیم کننده رشد نیز مشاهده شد که غلظت ۰/۱ مناسب‌ترین غلظت برای افزایش سرپانتین در هر دو روش کشت بافت و سوسپانسیون است. بررسی تاثیر نوع کشت و استفاده همزمان از تنظیم کننده رشد IAA بر میزان سرپانتین نشان داد که، استفاده از کشت سوسپانسیونی، کشت بافت و یا کشت مزرعه تاثیر معنی‌داری بر میزان تنظیم کننده رشد سرپانتین ندارد (نمودار ٤).



نمودار ۱: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آجمالیسین گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی.

* علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان:*T.C.Y.L، کشت بافت برگ‌های مسن:*T.C.O.L، کشت بافت ساقه‌های جوان:*T.C.Y.S، کشت بافت ساقه‌های مسن:*T.C.O.S، کشت سلولی یک مرحله ایی:*C.C.1-stage، کشت سلولی دو مرحله ایی:*C.C.2- stage.



نمودار ۲: مقایسه میانگین نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آجمالیسین برگ مسن گیاه پروانش در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی دو مرحله‌ایی و کشت مزرعه.

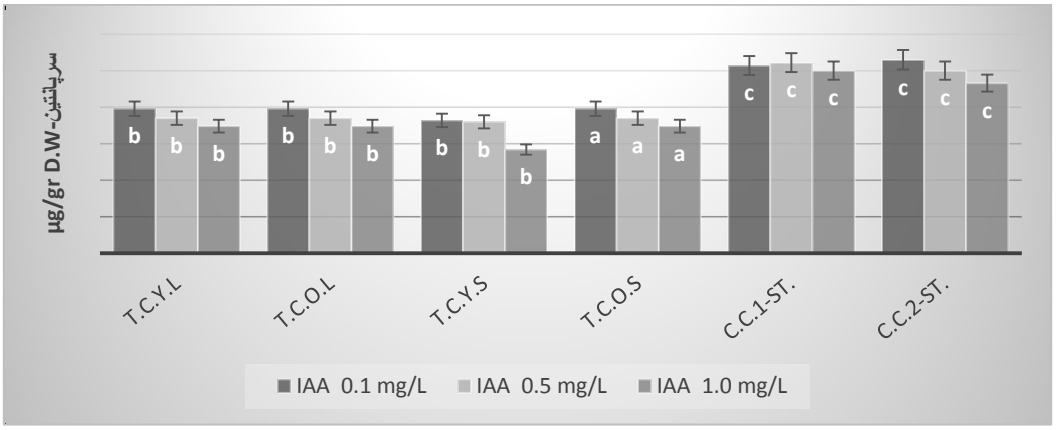
*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آجمالیسین برگ مسن گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.021	1	.021	2.236	.024
Within Groups	.070	7	.010		
Total	.091	8			

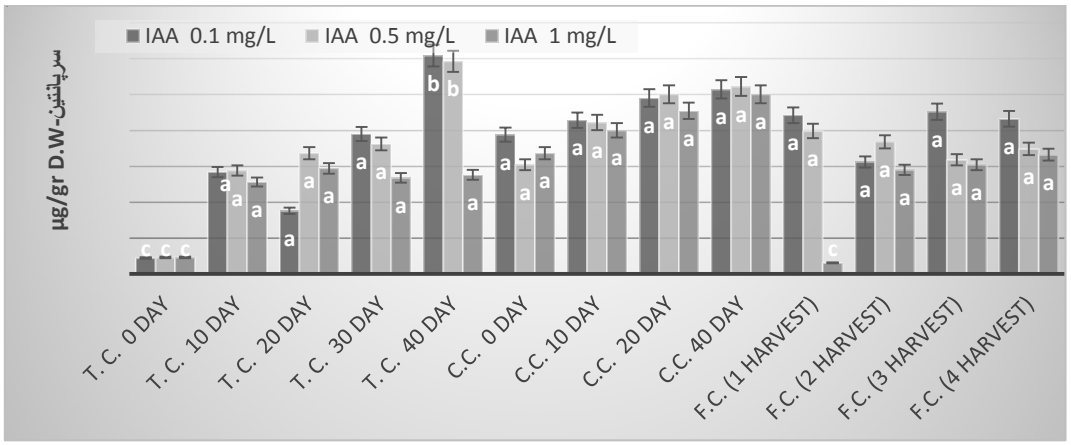
جدول ۲: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین روز و آخرین مرحله از کشت مزرعه

	IAA 0.1	IAA 0.5	IAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.487 ± 0.022^{A}	0.332 ± 0.026^{a}	0.265 ± 0.024^{a}
Cell culture 40 day	0.525 ± 0.063^{A}	0.528 ± 0.051^{A}	0.52 ± 0.016^{A}
Field cultivation (4 harvest)	0.389 ± 0.054^{a}	0.306 ± 0.016^{a}	0.365 ± 0.031^{a}



نمودار ۳: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان سرپانتین گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی.

*علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان:*T.C.Y.L، کشت بافت برگ‌های مسن:*T.C.O.L، کشت بافت ساقه‌های جوان:*T.C.Y.S، کشت بافت ساقه‌های مسن:*T.C.O.S، کشت سلولی یک مرحله ایی:*C.C.1-stage، کشت سلولی دو مرحله ایی:*C.C.2- stage.



نمودار ۴: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان سرپانتین برگ مسن گیاه پروانش در کشت سوسپانسیونی دو مرحله‌ایی، کشت بافت و کشت مزرعه.

*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان سرپانتین برگ مسن گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی

VAR00002	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.015	1	.011	1.952	.234
Within Groups	.044	7	.009		
Total	.059	8			

جدول ۴: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین مرحله و آخرین برداشت کشت مزرعه

	IAA 0.1	IAA 0.5	IAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.304 ± 0.011^{A}	0.296 ± 0.012^{A}	0.138 ± 0.031^{A}
Cell culture 40 day	0.257 ± 0.018^{A}	0.261 ± 0.011^{A}	0.250 ± 0.024^{A}
Field cultivation (4 harvest)	0.216 ± 0.021^{A}	0.174 ± 0.022^{a}	0.166 ± 0.061^{a}

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان تولید آلکالوئید کل در گیاه پروانش:

بررسی نتایج حاصل نشان داد که افزایش غلظت این تنظیم کننده رشد از ۰/۱ به ۱ میلی گرم در لیتر باعث کاهش معنی دار میزان آلکالوئید کل در هر دو گروه کشت بافت و کشت سوسپانسیونی شد. بررسی تاثیر نوع کشت و استفاده همزمان از تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آلکالوئید کل نیز از اختلاف بی‌معنی در سطح احتمال ۵ درصد خبر می‌دهد، یعنی استفاده همزمان از تنظیم کننده رشد IAA در کشت سوسپانسیونی و کشت بافت باعث افزایش معنی دار میزان آلکالوئید کل شد. در بررسی اثر متقابل روش کشت مشاهده شد که، استفاده از روش کشت سوسپانسیون دومرحله‌ایی نسبت به کشت بافت و سوسپانسیون یک مرحله‌ایی سبب افزایش بیشتر میزان آلکالوئید کل گیاه پروانش شده است، همچنین بررسی اثر متقابل روش‌های کشت سوسپانسیونی نشان داد که استفاده از روش کشت دو مرحله‌ایی نسبت به روش کشت یک مرحله‌ایی باعث افزایش بیشتر میزان آلکالوئید کل شده است. همچنین در بررسی کشت بافت مشاهده شد که، کشت ساقه مسن پروانش نتایج کاهشی بیشتری نسبت به گروه‌های دیگر کشت بافت اندام گیاه از خود نشان داد (نمودار ۵). در بررسی اثر متقابل روش‌های مختلف کشت، نتایج نشان داد که، روش کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه نتایج بهتری را در تمام غلظت‌های مورد پژوهش در تجمع آلکالوئید کل از خود نشان داده‌اند (نمودار ۶).

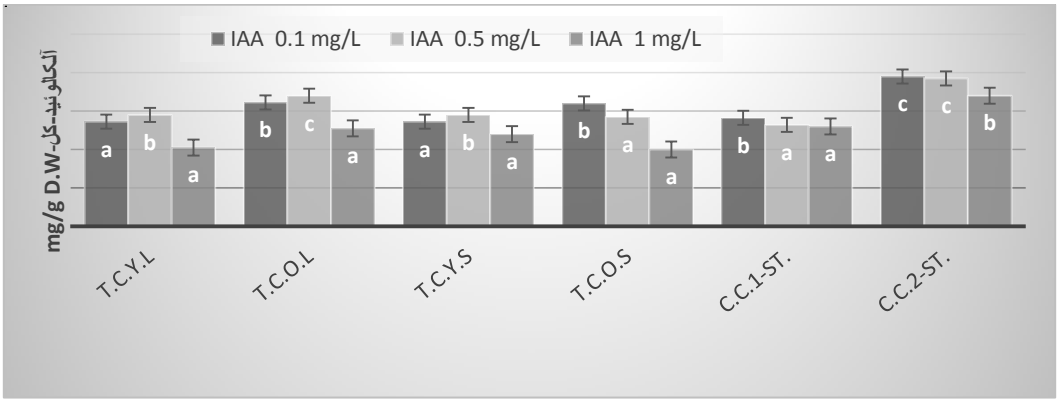
بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان تولید آجمالیسین در گیاه پروانش:

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که در تمام روش‌های مختلف کشت سلولی و کشت سوسپانسیونی یک و دو مرحله‌ایی در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر تنظیم کننده رشد NAA نسبت به دو غلظت دیگر اثر افزایشی معنی داری بر میزان آجمالیسین نشان داده است (نمودار ۷). بررسی نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آجمالیسین نشان داد که، استفاده از این تنظیم کننده رشد هم در روش کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و هم در کشت مزرعه باعث افزایش میزان آجمالیسین شد، در بررسی تاثیر نوع روش کشت بر میزان آجمالیسین نیز مشاهده شد که استفاده از غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر این تنظیم کننده رشد در روش کشت مزرعه باعث افزایش معنی‌دار آجمالیسین نسبت به دو گروه دیگر کشت گردیده است. در بررسی اثر متقابل روش‌های مختلف کشت بافت مشاهده شد که، کشت بافت برگ‌های مسن پروانش بیشترین تاثیر و استفاده از کشت ساقه مسن پروانش کمترین تاثیر را بر میزان آجمالیسین تولیدی از خود نشان داد. در بررسی تاثیر روش کشت نیز استفاده از کشت سوسپانسیونی یک مرحله‌ایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اثر افزایشی بیشتری بر میزان آجمالیسین نسبت به کشت دو مرحله‌ایی از خود نشان داد (نمودار ۷). برخلاف کشت بافت و کشت سوسپانسیونی، در کشت مزرعه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد NAA تقریبا در تمام برداشت‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داده است (نمودار ۸).

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان تولید سرپانتین در گیاه پروانش

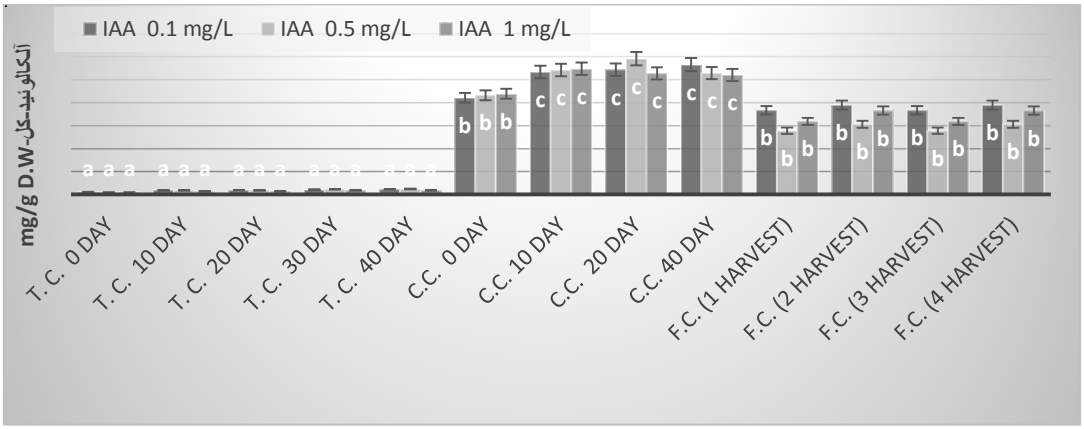
نتایج حاصل از بررسی تاثیر متقابل روش کشت بافت نشان داد که استفاده از کشت بافت برگ مسن پروانش بیشترین اثر افزایشی و استفاده از کشت بافت برگ جوان پروانش کمترین اثر افزایشی را از خود نشان داده است، همچنین در هر دو نوع کشت بافت و کشت سوسپاسیونی

میزان سرپانتین پس از ۲۰ روز روند افزایشی معنی داری در تمام غلظت‌ها نشان داده است. در بررسی روش سوسپانسیونی نیز مشاهده شد که استفاده از کشت یک مرحله‌ایی بیشترین تاثیر و کشت دو مرحله‌ایی کمترین اثر افزایشی را از خود نشان داد (نمودار ۹). بررسی نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان سرپانتین نشان داد که، افزایش غلظت تنظیم کننده رشد هم در روش کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و هم در کشت مزرعه باعث افزایش میزان سرپانتین شده است، همچنین در بررسی تاثیر زمان برداشت کشت مزرعه بر میزان سرپانتین نیز مشاهده شد که، باافزایش زمان برداشت از ۱ به ۴ میزان سرپانتین با افزایش معنی دار مواجه شد. بررسی اثر متقابل غلظت‌های مورد نظر تنظیم کننده رشد NAA نشان داد که، غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر مناسب‌ترین غلظت برای کشت سوسپانسیونی و کشت بافت، و غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر به عنوان مناسب‌ترین غلظت برای کشت مزرعه معرفی شد (نمودار ۱۰).



نمودار ۵: مقایسه میانگین نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آلکالوئید کل گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی.

*علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان: T.C.Y.L*، کشت بافت برگ‌های مسن: T.C.O.L*، کشت بافت ساقه‌های جوان: T.C.Y.S*، کشت بافت ساقه‌های مسن: T.C.O.S*، کشت سلولی یک مرحله ایی: C.C.1-stage*، کشت سلولی دو مرحله ایی: C.C.2- stage*.



نمودار ۶: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آلکالوئیدکل برگ مسن کل گیاه پروانش در کشت سوسپانسیونی دو مرحله‌ایی، کشت بافت و کشت مزرعه.

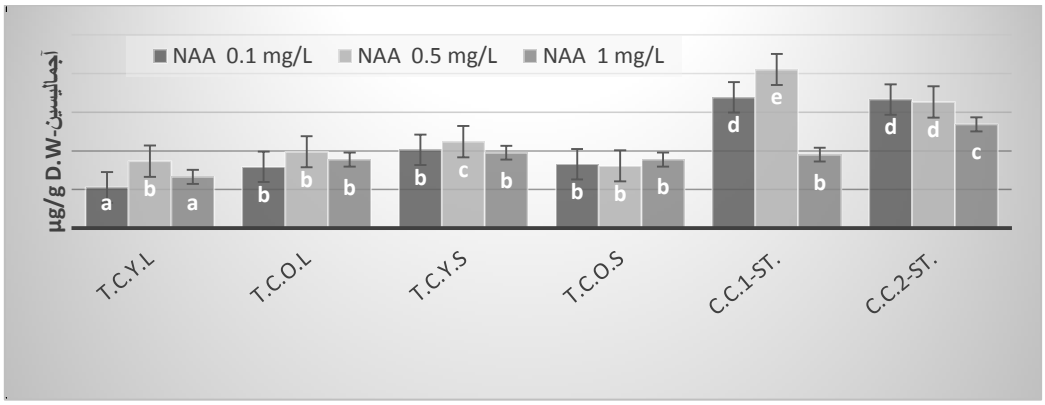
*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

جدول ۵: نتایج تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد IAA بر میزان آلکالوئیدکل برگ مسن گیاه پروانش در دو گروه کشت بافت و کشت سوسپانسیونی

VAR00002	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.540	1	.541	244.232	.001
Within Groups	.011	7	.002		
Total	.551	8			

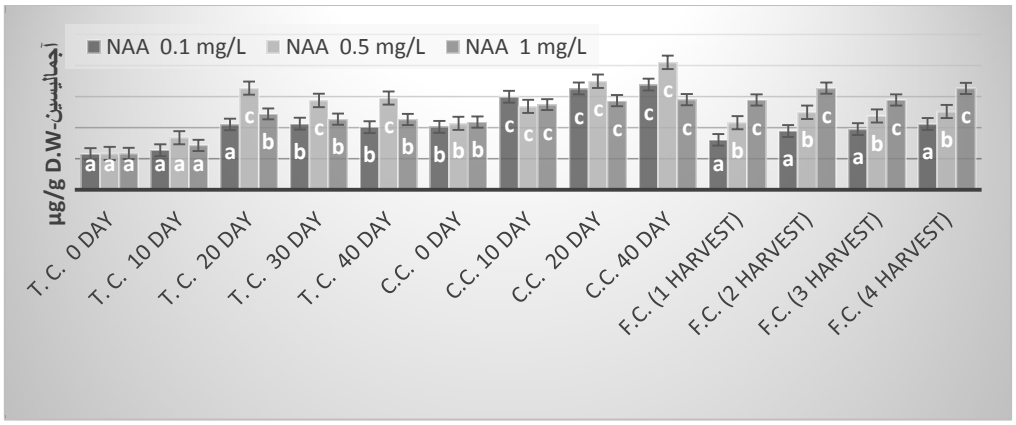
جدول ۷: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین مرحله و آخرین برداشت کشت مزرعه

	IAA 0.1	IAA 0.5	IAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.023 ± 0.002^{A}	0.024 ± 0.004^{A}	0.018 ± 0.008^{A}
Cell culture 40 day	0.565 ± 0.029^{a}	0.591 ± 0.037^{a}	0.527 ± 0.033^{a}
Field cultivation (4 harvest)	0.346 ± 0.089^{a}	0.306 ± 0.054^{a}	0.365 ± 0.062^{a}



نمودار ۷: مقایسه میانگین نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آجمالیسین گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی.

*علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان:T.C.Y.L*، کشت بافت برگ‌های مسن:T.C.O.L*، کشت بافت ساقه‌های جوان:T.C.Y.S*، کشت بافت ساقه‌های مسن:T.C.O.S*، کشت سلولی یک مرحله ایی:C.C.1-stage*، کشت سلولی دو مرحله ایی:C.C.2- stage*.



نمودار ۸: مقایسه میانگین نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آجمالیسین ساقه جوان گیاه پروانش در کشت سوسپانسیونی یک مرحله‌ایی، کشت بافت و کشت مزرعه.

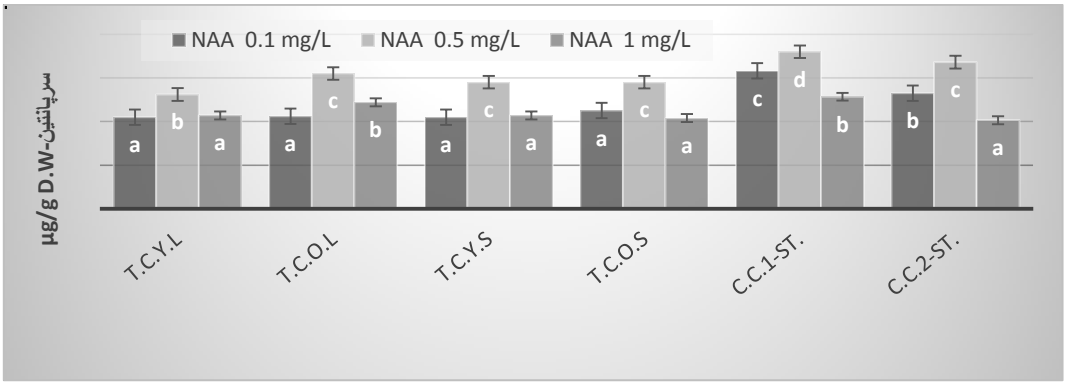
*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

جدول ۷: میانگین نتایج حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آجمالیسین ساقه جوان گیاه پروانش در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Tissue culture	cell culture	-.142430	3.696512	.442	-10.85621	10.43226
	Farm cultivation	-5.243350	3.696512	.000	-15.74523	5.35621
cell culture	Tissue culture	.142430	3.696512	.186	-10.54126	10.84521
	Farm cultivation	-5.100511	3.896466	.000	-16.35261	6.08541
Farm cultivation	Tissue culture	5.243350	3.696512	.000	-5.24351	15.75326
	cell culture	5.100511	3.896466	.000	-6.05642	16.15963

جدول ۸: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین مرحله و آخرین برداشت کشت مزرعه.

	NAA 0.1	NAA 0.5	NAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.403 ± 0.071^{A}	0.59 ± 0.062^{A}	0.452 ± 0.044^{A}
Cell culture 40 day	0.676 ± 0.063^{a}	0.82 ± 0.055^{a}	0.58 ± 0.033^{A}
Field cultivation (4 harvest)	0.423 ± 0.074^{A}	0.503 ± 0.034^{A}	0.652 ± 0.019^{a}



نمودار ۹: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان سرپانتین گیاه پروانش در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه.

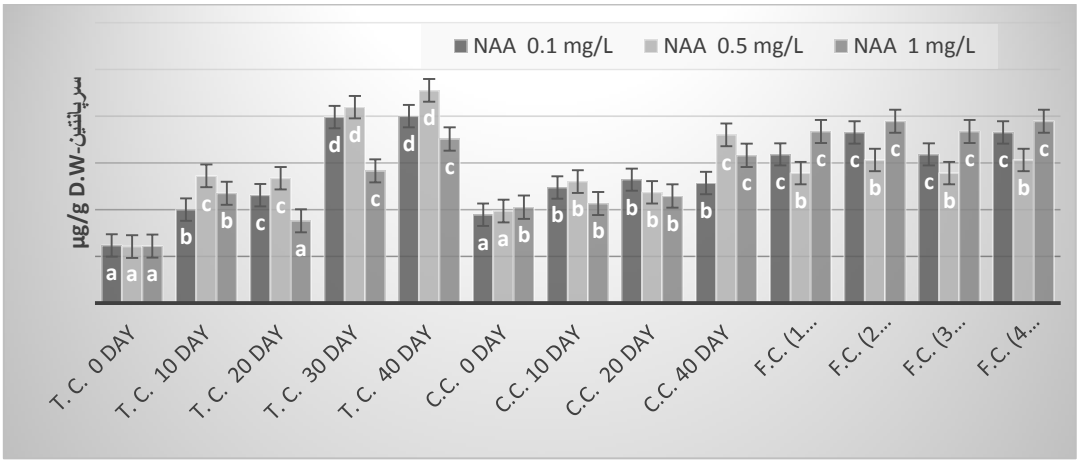
*علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان:*T.C.Y.L، کشت بافت برگ‌های مسن:*T.C.O.L، کشت بافت ساقه‌های جوان:*T.C.Y.S، کشت بافت ساقه‌های مسن:*T.C.O.S، کشت سلولی یک مرحله ایی:*C.C.1-stage، کشت سلولی دو مرحله ایی:*C.C.2- stage.

جدول ۹: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان سرپانتین گیاه پروانش در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه.

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Tissue culture	cell culture	.043300	.062607	.000	-.14236	.26532
	Farm cultivation	.014800	.062607	.000	-.17523	.15236
cell culture	Tissue culture	-.043300	.062607	.000	-.21256	.14255
	Farm cultivation	-.028500	.065993	.000	-.22356	.18524
Farm cultivation	Tissue culture	-.014800	.062607	.000	-.18526	.17542
	cell culture	.028500	.065993	.000	-.17523	.22325

جدول ۱۰: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین مرحله و آخرین برداشت کشت مزرعه

	NAA 0.1	NAA 0.5	NAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.351 ± 0.054^{a}	0.455 ± 0.023^{A}	0.4 ± 0.034^{A}
Cell culture 40 day	0.316 ± 0.016^{a}	0.360 ± 0.052^{A}	0.257 ± 0.061^{a}
Field cultivation (4 harvest)	0.389 ± 0.039^{A}	0.306 ± 0.026^{a}	0.365 ± 0.077^{A}

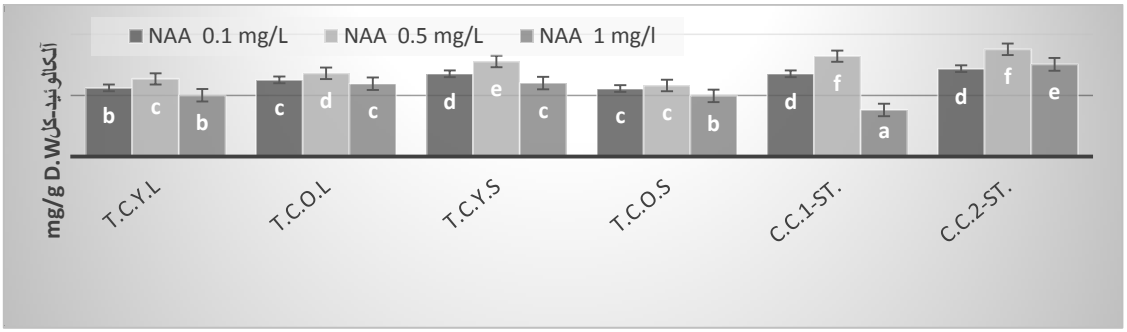


نمودار ۱۰: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان سرپانتین گیاه پروانش در کشت سوسپانسیونی دو مرحله‌ایی، کشت بافت و کشت مزرعه.

*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان تولید آلکالوئید کل در گیاه پروانش

بررسی نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آلکالوئید کل نشان داد که، روش کشت بافت در مقایسه با سایر روش‌ها تاثیر پذیزی کمتری از تغییرات غلظت NAA را از خود نشان داده است. همچنین افزایش دوز مصرفی این تنظیم کننده رشد در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی از غلظت ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش معنی‌دار سطح آلکالوئید کل شد. این در حالی است که با افزایش غلظت به ۱ میلی‌گرم در لیتر با کاهش میزان آلکالوئید کل مواجه شد (نمودار ۱۱). اما بر خلاف این روند در کشت مزرعه، با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش سطح آلکالوئید کل مشاهده شده، که این افزایش از هر دو گروه دیگر کشت بافت و سوسپانسیونی بیشتر بوده است (نمودار ۱۲). در بررسی اثر متقابل غلظت‌های مورد مطالعه NAA در این تحقیق مشخص شد که، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم کننده رشد در کشت بافت و سوسپانسیونی و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر برای کشت مزرعه به عنوان مناسب‌ترین دوز مصرفی در نظر گرفته شده است. در بررسی اثر متقابل روش‌های کشت مشاهده شد که، روش کشت سوسپانسیونی نسبت به روش کشت بافت باعث افزایش بیشتر میزان آلکالوئید کل در گیاه پروانش شد. همچنین در بررسی اثر متقابل روش‌های کشت سوسپانسیونی مشاهده شد که، استفاده از کشت دو مرحله‌ایی نسبت به کشت یک مرحله‌ایی سبب افزایش بیشتری در میزان آلکالوئید کل شده است، همچنین در بررسی کشت بافت اندام، کشت ساقه جوان پروانش نتایج بهتری نسبت به دو گروه دیگر کشت از خود نشان داد (نمودار ۱۱).



نمودار ۱۱: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آلکالوئید کل گیاه پروانش در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی.

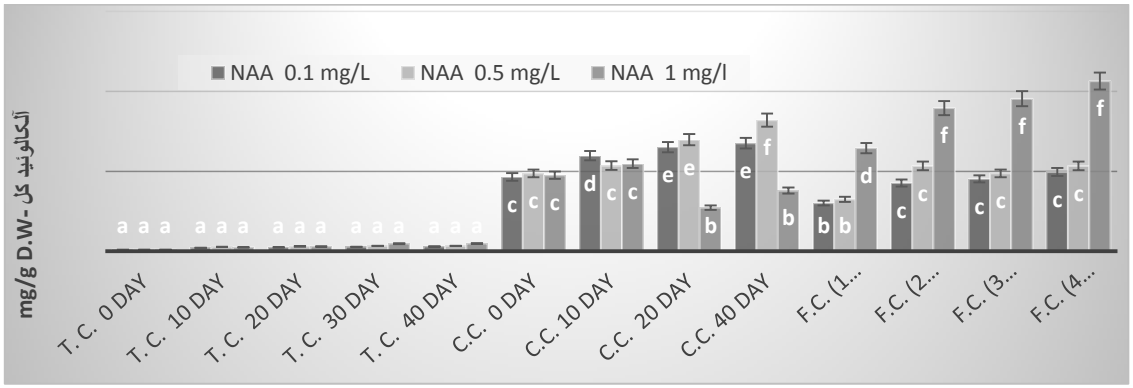
*علائم اختصاری نمودارها: *کشت بافت برگ‌های جوان: *T.C.Y.L، کشت بافت برگ‌های مسن: *T.C.O.L، کشت بافت ساقه‌های جوان: *T.C.Y.S، کشت بافت ساقه‌های مسن: *T.C.O.S، کشت سلولی یک مرحله ایی: *C.C.1-stage، کشت سلولی دو مرحله ایی: *C.C.2- stage.

جدول ۱۲: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه داده‌های مربوط به تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آلکالوئید کل گیاه پروانش درکشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه.

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Tissue culture	cell culture	-.386850*	.078441	.002	-.63256	-.14256
	Farm cultivation	-.857100*	.078441	.000	-1.07451	-.65236
cell culture	Tissue culture	.386850*	.078441	.002	.15234	.56326
	Farm cultivation	-.470250*	.083122	.001	-.65231	-.22153
Farm cultivation	Tissue culture	.857100*	.078836	.000	.62356	1.07564
	cell culture	.470250*	.083122	.001	.33265	.84526
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.						

جدول ۱۳: مقایسه نتایج حاصل از سه روش کشت در آخرین مرحله و آخرین برداشت کشت مزرعه.

	NAA 0.1	NAA 0.5	NAA 1.0
Tissue culture 40 day	0.03 ± 0.002^{a}	0.034 ± 0.003^{a}	0.007 ± 0.034^{A}
Cell culture 40 day	0.086 ± 0.016^{a}	0.074 ± 0.052^{a}	0.051 ± 0.061^{a}
Field cultivation (4 harvest)	0.496 ± 0.033^{b}	0.534 ± 0.055^{b}	1.064 ± 0.102^{c}



نمودار ۱۲: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر تنظیم کننده رشد NAA بر میزان آلکالوئید کل گیاه پروانش در کشت سوسپانسیونی دو مرحله ایی، کشت بافت و کشت مزرعه.

*علائم اختصاری نمودارها: T.C کشت بافت، C.C کشت سوسپانسیون سلولی، F.C کشت مزرعه.

بحث

به طور کلی می‌توان بیان نمود که اقدامات زیادی در مورد تولید آلکالوئیدها با استفاده از کشت های سوسپانسیون سلولی صورت پذیرفته و در مواردی نیز با کمك الیسیتورها و سایر استراتژی‌ها موفقیت‌هایی حاصل شده است، ولی به‌طورکلی برای ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف مانند مورفین، کدئین، هیوسیامین، اسکوپولامین، وین بلاستین و وین کریستین برخلاف آجمالیسین و سرپانتین نتایج خوبی در کشت سلول دیده نشده است [۵][۱۱][۱۷][۲۳]. نوردهی کشت های گیاهی اغلب منجر به افزایش تجمع ترکیبات ثانویه می‌شود به ویژه هنگامی که این ترکیبات در اندام‌های هوایی گیاهان تولید می‌شوند. هر چند که بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی به ریشه محدود شده است، باز هم گزارشهایی مبنی بر اثرات مثبت نوردهی بر کشت های ریشه و افزایش این آلکالوئیدها وجود دارد [۱۰][۱۳][۲۵]. بسیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. قندها علاوه بر منبع کربن به عنوان ترکیبات ایجاد سیگنال در تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت‌های ریشه عمل می‌کنند. هگزوکیناز و کلسیم نیز در انتقال سیگنال نقش دارند. مسیر سیگنالی قند با تأثیرات تنظیم کننده رشد های گیاهی و نور برهم کنش دارد. در حالی که اکسین در حضور ساکارز تأثیر بازدارندگی بر روی ژن *pmt* (PhosphoethanolamineN-methyltransferase) دارد، در ترکیب با سوربیتول نقش مثبت در تولید آلکالوئیدها نشان داده است [۱۱][۱۶][۲۲]. در تحقیق پاولف و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده که تأثیر منبع نیتروژن و تنظیم کننده‌های رشد مختلفی مانند IAA و NAA در تولید آلکالوئیدها بیشتر وابسته به گونه بوده و نقش آن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است [۱۲][۱۸]، بنسدک و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش نمودند که غلظت تنظیم کننده‌های رشد NAA و KIN در محیط‌کشت تأثیر زیادی در نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در ریشه‌های مویین دارد به نحوی که با افزایش غلظت آن‌ها این نسبت ۲ تا ۳ برابر افزایش می‌یابد [۱۶][۱۸][۲۳]. گِاُرگیو و همکاران (۲۰۰۷) پس از بررسی تنظیم کننده‌های رشد مختلف بر کشت‌های ریشه مویین *Hyosyamus muticus* گزارش نمودند که کشت‌های ریشه مویین، غلظت‌های ۰/۰۱الی ۰/۰۵ میکرومول اکسین را در محیط کشت به راحتی تحمل نموده و روی رشد آن‌ها تأثیر چندانی نداشته است. تجمع آلکالوئید در آنها نسبت به ریشه های رشد یافته در شرایط عاری از تنظیم کننده رشد دو برابر بوده است. سیتوکنین تأثیری بر رشد نداشته اما تلفیق IAA و BA تولید آلکالوئیدها را شدیداً کاهش داده است [۶][۱۱][۱۴]. به طور کلی مجموع تحقیقاتی که در زمینه بهینه سازی شرایط کشت برای ریشه‌های مویین *H. muticus* صورت گرفته است، نشان داد که ریشه‌های مویین در کشت سوسپانسیون سلولی به راحتی به تغییر شرایط کشت پاسخ نداده و غلظت بهینه مواد مغذی مورد نیاز برای رشد آنها با مقادیر بهینه برای تولید مطلوب آلکالوئید متفاوت است [۵][۱۷][۲۳][۲۷][۳۰]. تولید آلکالوئیدها در کشت بافت بستگی زیادی به ترکیب محیط‌کشت دارد .اثر فاکتورهای مختلف مثل منابع تغذیه‌ای، تنظیم کننده‌های رشد رشد و شرایط رشدی مختلف بر تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت بافت مطالعه شده است [۲٤][۲٦]. مشخص شده است که انواع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد رشد مثل اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها آثار مختلفی بر رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. کشت کالوس‌های برگی گیاه *D. stramonium* توسط EL-Bahr و همکاران (۱۹۸۹)، افزایش رشد و محتوای آلکالوئیدی را در در حضور غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر D۲٬٤-، NAA، Kinو BA به تنهایی یا به صورت متقابل نشان داد. نقش مستقیمی برای اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها در مسیر متابولیسمی تروپان آلکالوئیدها گزارش نشده است [٤][۲۱][۲۹]، ولی نتایج مطالعات، وجود نقشی غیرمستقیم را برای این تنظیم کننده رشدها تأیید می‌کند. در این پژوهش نیز در حضور BA با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد NAA افزایش محتوای آلکالوئید تام نسبت به شاهد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از

کشت مزرعه باعث ایجاد گیاهانی با مقادیر بالایی از آلکالوئید-کل نسبت به گروه کشت بافت و سوسپانسیونی می‌گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که استفاده از روش‌های مختلف کشت باعث تغییر در میزان پارامترهای اندازه‌گیری شده می‌گردد، و این تغییرات در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است، نتایج نشان داد که استفاده از روش کشت سوسپانسیونی به نسبت سایر روش‌های کشت گیاه پروانش، باعث افزایش آجمالیسین سرپانتین و آلکالوئید کل می‌گردد. در بررسی اثر متقابل غلظت‌ها نیز مشخص گردید که در همه تنظیم کننده رشدها به جز تنظیم کننده رشد IAA با افزایش غلظت مصرفی، میزان تولید الکالوئید نیز با افزایش معنی داری مواجه شد. این در حالی بود که استفاده از تنظیم کننده رشد IAA باعث کاهش میزان الکالوئیدهای مورد مطالعه می‌گردید، بررسی تاثیر نوع محیط‌کشت و تاثیر استفاده همزمان استفاده از تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه در این تحقیق نیز نشان داد که استفاده از روش کشت سوسپانسیونی در بسیاری از موارد نسبت به دو گروه دیگر مزیت نسبتا مناسب‌تری را از خود نشان می‌دهد.

منابع

[۱] اميد بيگي، ر.، ۱۳۸٦. رهيافت‌هاي توليد و فرآوري گياهان دارويي، جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوي

[2] Ahmad, S. A. Khan, A. Mujib and M. P. Sharma. 2010. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. an important drug: it's applications and production. Pharm. Globale (IJCP). 4(12): 1-16.

[3] Aslam, J., S. H. Khan, Z. H.2010 Siddiqui, Z. Fatima, M. Maqsood, M. A. Bhat, S. A. Nasim, A. Ilah, I. Z. Artur, C. L. and J. Pawliszyn. 1990. Solid phase microextraction with thermal. Desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 62: 2145-2148.

[4] Aurolia, S., and T.Naaranahti, 1991. Determination of Catharanthus roseus alkaloids by high performance Liquid chromatography isotpe dilution thermospray-mass spectrometry. Journal of chromatography, vol. 554, 227-231.

[5] Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M. H. 1967, Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section B, held at the University of Munich, Germany September 6-10.

[6] Bensddek, L., Gillet, F., Saucedo, J. E., Fliniaux, M. A. 2009, The effect of nitrate ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of Atropa belladonna hairy roots. J. of Biotechnol.; 85: 935 - 50.

[7] Blom, T. J. M., M. Sierra, T. B., Vanvliet, M. E. I., franke-vanoijk, P., Dekoning, F., Van Iren, R., Verpoorte, and Libbeuga, K. R. 2011. Uptake and accumulayion of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. Planta, vol. 183, 170-177.

[8] Bruyn, A., M. Verzele, J. P. Dejonghe, K.S.P.B.Rao, M.P.Collard, A. Trouet, and J. Hannort, 2008. Modiffication of Catharanthus roseus alkaloids: A Lacton derived from deacetylvinblastine. Planta Medica, vol. 55, 364-366.

[9] Bulgakov, P. Functions of rol-genes in plant secondary metabolism. Biotechnology advances 2008; 23 (4): 318 - 24.

[10] Carnier, J. and Morol, G. 2012. Influence des condition de culture des tissue de vinca rosea L. sur la production d,ahkaloides totax. physiol. veg, vol. 10, No. 4, 617-625.

[11] Conan, M., C. Frier, J. Andreeux, M. Plat, L. Cosson, and C. Bohan, 2010. Monoclonal antibodies to bis-indole alkaloids of Catharanthus roseus and their use in enzyme-linked immune-sorbent-assay. Phytochemistry, vol. 29, No. 7, 2109-2114.

[12] Deluca, V., J. Balsevich, R. T. Tyler, and W. G.W Kurz, 2007. Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from cathranthus

roseus plants.plant cell Reports, vol.6,458-461.

[13] Deluca, V. and W. G. W Kurz, 2008. Monoterpene indole alkaloids (catharanthus rosus) . in cell culture and somatic cell genetics of plant, vol. 5 edited by F.Constable, and I.Vasil.

[14] Deluca, V., J. Balsevich and W. G. W Kurz, 2005. Acetyl coenzyme-A: deacetylvindoline-O-acetyltransferase, a novel enzyme from catharanthus rosuse. Journal of plant physiology, Vol. 121, 417-428.

[15] Deus-Neumann, B. M. H. Zenk, 1984. A Highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. Planta, Vol. 162, 250-260.

[16] DharaThakore, Ashok KumarSrivastava, Alok Krishna Sinha, 2017. Mass production of Ajmalicine by bioreactor cultivation of hairy roots of *Catharanthus roseus*.Biochemical Engineering Journal, Vol, 119. 84-91.

[17] El-Sayed, M. and R. Verpoorte. 2007. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochem Rev. 6: 277-305.

[18] Flores H, Dai Y, Cuello J, Maldonado M, Loyola I. Green roots: Photosynthesis and photo autotrophy in an underground plant organ. Plant Physiol. 1993; 101: 363 - 71.

[19] Georgiv M, Pavlov A, Bley T, 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. Appl. Microbiol. Biotechnol.; 79. 1157 - 1185.

[20] Giuseppe Torzillo. 2015, Italian National Research Council, CNR ' Biology and Technologies of Photosyntetic Micro-Organisms Research Uni,Almeria university, With permission of Fundacíon CAJAMAR, Spain. Rare Earth Elements and Algae: Physiological Effects, Biorefinery and Recycling, Vol, 2. 187-212.

[21] Gritothe G, Drager B. 2012. Tropane alkaloids metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of Atropa belladonna. Plant Sci. 163, 979 - 985.

[22] Hisiger, S. and M. Jolicoeur. 2007. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. Phytochem. Rev. 6: 207-234.

[23] Kareem T .Khashan. Mohammed A. H. Al-Athary, 2016. Faculty of Science ,Kufa University Collage of Agriculture ,Al-Qasim University.Alkafu journal for bioloigy, vol. 8, No.2.

[24] Merillon, J. M., J. M. chenieux, M. Rideau, 2013. Cine,tique de crossance,evolution du me,tabolisme glucido-azote et accumulation alcaloidiquue dans une suspension cellulaire de chatharanthus roseus .plant research Medica, vol. 4, 169-176.

[25] Morris, P., A. H. Scragg, N. J. smart and A. A. Stafford, 1987. Secodary product formation by cell suspension cultures. In plant cell culture, practical approach . Edited by Dixon, R. A.

[26] Murashige, T., and F. Skooge, 2002. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. plantarum, vol. 15, 473-497.

[27] Pavlov S, Berkov J, Weber T. Hyoscyamine Biosynthesis in Datura stramonium Hairy Root In Vitro Systems with Different Ploidy Levels. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 157 (2): 210 - 25.

[28] Pedersen, L. G., M. S. Ostenfeld, M. H. Hansen, J. Nylandsted and M. Jaattela. 2007. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. Canc. Res. 67(5): 2217-2225.

[29] Yamamada,Y.,2014. Selection of cell lines for high yields of secondary metabolites. In cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 1, Edited by I. K. Vasil.

Evaluation of the hormonal treatments effect on biosynthesis of *Catharanthus roseus* (L) G.Don. indol alkaloids in tissue culture, suspension culture and field culture

Kazemzadeh Haghighi A.[1], Sobhanian H. [2*], Bakhshi Khaniki G. R.[3], Ebrahimi M. A.[4]

[1] Ph. D. Student, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

*Email: motif3000@yahoo.com

Received: September 2020 Accepted: January 2021

Abstract

The plant is a rich source of alkaloids that are distributed in all parts of the plant. The presence of valuable alkaloids in all parts of the plant has led to its introduction as a very important medicinal plant and its properties to be investigated. This study was conducted to investigate the effect of growth regulatory treatments on the biosynthesis of indole alkaloids of *catharanthus roseus* medicinal plant in culture. Tissue, suspension culture and field culture were performed. The experiment was performed in three separate cultures, including tissue culture, suspension culture, field culture and the effect of simultaneous use of IAA and NAA growth regulators on the amount of alkaloids produced by the butterfly plant. IAA hormones in three concentrations (0.1, 0.5 mg / L) and NAA (0.1, 0.5 0.5 mg / L) in three replications in a completely randomized field design Karaj Seed and Plant Breeding Research Institute was established in 1398. The experimental results showed that NAA increased the alkaloids of ajmalicine, serpentine and increased the total alkaloids by about 20% Among the growth regulators studied, IAA showed a decreasing effect on changes in alkaloid levels, and in some cases this decrease was about 10%. Also, the use of suspension culture method increased alkaloids in many cases compared to the other two methods, and in field cultivation, the amount of total alkaloids increased compared to other methods. Based on the results of this experiment, it seems that the use of this method in many cases such as suspension cultivation has a relatively better advantage than the other two groups. Meanwhile amount of total-alkaloid has shown a significant increase in comparison to other methods in field culture.

Keywords: Periwinkle, tissue culture, suspension culture, field cultivation, total alkaloid, ajmalicine, serpentine.