

بررسی میزان تولید بنزیل ایزو کوئینولین آلکالوئیدها (BIA) در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Papaver bracteatum* با استفاده از تنظیم کننده‌های

رشد گیاهی

Evaluation of Benzyloquinoline Alkaloids (BIA) production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture using plant growth regulators

ترانه دستمالچی^۱، منصور امید^{۲*}، رضا عزیزی نژاد^۱، شمسعلی رضا زاده^۳، علیرضا اطمینان^۴
۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی،
تهران، ایران

۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۴- استادیار، گروه اصلاح نباتات، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Dastmalchi T¹, Omid M^{2*}, Azizinezhad R¹, Rezazadeh S³, Etminan A⁴

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology,
Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj,
Iran

3- Asistant Professor, Pharmacognosy and pharmaceutics, Academic Center for
Education, Culture and Research, Karaj, Iran

4- Asistant Professor, Department of Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad
University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

فیتوهورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از فاکتورهای موثر در تولید متابولیت‌های ثانویه هستند. گیاه *Papaver bracteatum* از تیره پاپاوراسه شامل آلکالوئیدهای تجاری ارزشمندی است. بنزیل ایزو کوئینولین آلکالوئیدها گروه بزرگ و متنوعی از محصولات طبیعی با خاصیت‌های دارویی منحصر به فرد هستند که شامل بیش از ۲۵۰۰ ترکیب مشخص می‌باشند و به‌طور عمده در پنج خانواده گیاهی از جمله Papaveraceae یافت می‌شوند. در این مطالعه اثر متیل جاسمونات (MJ) و فلوروگلیسینول (PG) در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با یک‌دیگر روی تولید تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشک‌شده ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. افزودن هر دو الیستور به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش بازدهی تولید تبائین و سنگوئینارین در مقایسه با شاهد شد. تولید تبائین در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بعد از تیمار با ۲۰۰ uM متیل جاسمونات و ۱۰۰ mg/L فلوروگلیسینول، ۶۸/۶۳ برابر شاهد و بازدهی سنگوئینارین در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بعد از تیمار با ۲۰۰ uM متیل جاسمونات و ۲۰۰ mg/L فلوروگلیسینول ۱۰۷/۷۱ برابر شاهد شد. به‌نظر می‌رسد این افزایش ناشی از هم‌افزایی تأثیر الیستورهای به‌کار رفته است. افزودن متیل جاسمونات و فلوروگلیسینول هر کدام به تنهایی نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تبائین و سنگوئینارین نسبت به شاهد شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند چرخه بیوستز تولید و تجمع آلکالوئیدهای مورفینان در گیاهان را تحریک کند و منجر به دست‌یابی سطوح بالایی از آلکالوئید در مقایسه با شاهد شود.

واژه‌های کلیدی

متیل جاسمونات
فلوروگلیسینول
متابولیت‌های ثانویه
بنزیل ایزو کوئینولین آلکالوئیدها
تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۱، تقریباً ۸۰ درصد مردم دنیا هنوز به داروهای گیاهی وابسته‌اند. از مزایای بیشمار این داروها می‌توان به عدم ایجاد عوارض جانبی، دسترسی آسان و قابلیت استفاده‌ی متناوب آن‌ها اشاره کرد (Dixon 2001). آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها و استروئیدهای تولید شده توسط گیاهان دارای پتانسیل دارویی اثربخش بر بدن انسان هستند (Edeoga et al. 2005). این ترکیبات شیمیایی پیچیده و متنوع با وزن مولکولی کم، به‌منظور تعامل با محیط اطراف و به جهت بقا و پایداری تولید می‌شوند (Pichersky and Gang 2000; Moore et al. 2014). این مواد که در ساخت عطرها، آفت‌کش‌ها، رنگدانه‌ها، مکمل‌های غذایی و داروها استفاده‌ی فراوان دارند، متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (Yadav and Yadav 2016). خشخاش ایرانی^۲ به‌دلیل قابلیت تولید و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه‌ی ارزشمند دارویی (گروه آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزو کوئینولین‌ها^۳) بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Le Flem- Bonhomme et al. 2004; Facchini 2003). بنزیل ایزو کوئینولین آلکالوئیدها گروه بزرگ و متنوعی از محصولات طبیعی با خاصیت‌های دارویی منحصر به فرد هستند که شامل بیش از ۲۵۰۰ ترکیب مشخص می‌باشند که به‌طور عمده در پنج خانواده گیاهی از جمله Papaveraceae یافت می‌شوند (Facchini 2001). برای نمونه می‌توان به تبائین^۴ به‌عنوان حد واسط سنتز دیگر مشتقات مورفینان‌های پنج حلقه‌ای دارویی^۵، کدئین^۶ (ضد سرفه)، مورفین^۷ (داروی مسکن)، نوسکاپین^۸ (فاکتور ضد تومور)، سنگوئینارین^۹ (داروی ضد میکروبی) و پاپاورین^{۱۰} (گشاد کننده عروق) اشاره کرد (Pienky et al. 2009).

P. bracteatum گیاهی چند ساله از خانواده Papaveraceae خودناسازگار، دگرگشن و دیپلوئید (2n=14) که منشأ آن نواحی شمالی ایران و قفقاز است (Ilahi and Ghauri, 1994; Goldblatt 1974). تبائین، آلکالوئید اصلی این گیاه، به‌راحتی در صنعت قابل تبدیل به طیف وسیعی از داروهای مسکن و غیرمخدر ازجمله کدئین، اکسیمورفون^{۱۱}، اکسیکودون^{۱۲}، نالوکسون^{۱۳}، نالتراکسون^{۱۴} می‌باشد (Tisserat and Behrow 2009; Milo et al. 2006; Mannino and Zdrodowski 2009). در دهه‌ی هفتاد میلادی، به‌دلیل مشکل کشت *P. somniferum* و موانع قانونی استفاده از صمغ آن به‌عنوان شیریه‌ی تریاک برای استحصال مورفین و کدئین و مشتقات نیمه صنعتی آن مانند هرویین، سازمان ملل خواستار مطالعه درباره‌ی امکان جایگزینی *P. bracteatum* به‌عنوان منبع تبائین برای تولید مورفین شد (Fairbairn and Hakim 1973; Fairbairn and Helliwell 1977). با این حال، چندساله بودن، بازدهی پایین تولید متابولیت‌های ثانویه که وابسته به مراحل تکوین و فیزیولوژیک گیاه نیز است (Oksman-Caldentey and Inze 2004) و هم‌چنین سیستم خودناسازگاری که مانع تولید رقم خالص می‌شود، جایگزینی *P. bracteatum* را غیراقتصادی ساخت. بنابراین تحقیقات بر روی پتانسیل استفاده از تکنولوژی کشت سلول برای تولید آلکالوئیدهای مورفینان متمرکز شد (Leonard et al. 2009).

تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی، بخشی از پاسخ‌های دفاعی در مقابله با پاتوژن و تنش‌های فیزیکی و شیمیایی است. این واکنش‌ها می‌توانند توسط مولکول‌های مختلف درون^{۱۵} یا برون^{۱۶} سلولی که الیستور نامیده می‌شوند، به‌وجود آیند. متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به محرک (الیستور) پس از واکنش‌های فسفرافزایی (فسفریلاسیون) و فسفرزدایی (دفسفریلاسیون) پروتئین‌های غشای سلول، ایجاد جریان‌های کلسیمی، فعال شدن پروتئین‌کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید ROS و در نهایت بیان ژن‌های دفاعی در یاخته‌های گیاهی

¹ World Health Organization

² *Papaver bracteatum* Lindl

³ Benzyisoquinoline Alkaloids (BIA)

⁴ Thebaine

⁵ Pentacyclic morphinan-based drugs

⁶ Codeine

⁷ Morphine

⁸ Noscapine

⁹ Sanguinarine

¹⁰ Papaverine

¹¹ Oxymorphone

¹² Oxycodone

¹³ Naloxone

¹⁴ Naltrexone

¹⁵ Exogenous

¹⁶ Endogenous

کشت سلولی خشخاش ایرانی باعث افزایش مورفین و کدئین نسبت به شاهد شد (Jahangiri 2014). (Holkova et al. 2010) نقش آنزیم لیپواکسیژناز را در تولید سنگوئینارین در کشت‌های سلولی *P. somniferum* تیمار شده با الیستورهای زیستی و غیرزیستی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که فعالیت این آنزیم ۱۰ ساعت پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات، ۸/۹ برابر و پس از تیمار با *B. cinerea* به ۲/۹ برابر رسیده است. همچنین در تحقیقی دیگر تاثیر نانو الیستورهای اکسید روی، اکسید سیلیسیم و نقره روی سوسپانسیون سلولی گیاه *P. bracteatum* مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج، مقدار کدئین و مورفین بیشتری را نسبت به شاهد نشان دادند (Asadollahi 2014). (Kodayari 2014) تاثیر الیستورهای زیستی و نانو الیستورها بر افزایش تولید آلکالوئیدها در کشت سلولی گیاه *P. somniferum* را بررسی کرد. نتایج حاصله افزایش میزان تبائین و سنگوئینارین را نسبت به شاهد نشان دادند. در پژوهشی دیگر اثر ۱۲ عنصر بر تجمع آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین *P. somniferum* توسط Lovkova et al. (2005) بررسی شد و عناصر مس، کبالت، مولبدن، کروم و تنگستن به منزله فعال‌کننده و عناصر کلسیم، منگنز، بر، آهن و وانادیوم به منزله بازدارنده در این مسیر مشخص شدند. (Bondarian 2013) با استفاده از سه نانو ذره اکسید مس، اکسید سیلیسیم و اکسید روی موفق به افزایش پاپاورین، تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی خشخاش شد. در مطالعه‌ای دیگر تیمار ریشه‌های موئن شقایق شرقی با متیل جاسمونات (MJ) و سالیسیک اسید (SA) موجب تجمع آلکالوئیدها شد، به گونه‌ای که بیش‌ترین افزایش در پاسخ به تیمار ۴۸ ساعت اعمال متیل جاسمونات مشاهده شد (Hashemi and Naghavi 2016). در بررسی اثر ترکیبی از الیستورهای زیستی و غیرزیستی به منظور افزایش سنگوئینارین در کشت سلولی خشخاش کالیفرنایی (*Eschscholtzia californica*)، بیش‌ترین تجمع این ماده بعد از تیمار با سولفات مس گزارش شد و همچنین سلول‌های تیمار شده با الیستورهای ترکیبی، مقدار کمی سنگوئینارین در محیط کشت ترشح کردند (Balazova et al. 2008).

تولید می‌شوند. با این حال تحریک، فرآیند پیچیده‌ای است که به فاکتورهای متعددی از قبیل غلظت و نوع محرک، مرحله‌ی رشد سلول در زمان تیمار و مدت زمان تیمار بستگی دارد (Bhagwath 2000; Zhao et al. 2005). به علاوه، پاسخ به یک الیستور خاص ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر و بین سلول‌های مختلف بسیار متفاوت باشد، بنابراین تعیین غلظت‌های مناسب الیستورها برای بهینه‌سازی تولید ضروری است (Shinde et al. 2009). از محرک‌های مهم و موثر در تولید متابولیت‌های ثانویه، هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی^۱ (PGRs) هستند (Muthulakshmi and Pandiyarajan 2013) که از آن جمله می‌توان به متیل جاسمونات (MJ) و فلوروگلوکوسینول (PG) اشاره کرد. مطالعات نشان می‌دهد کاربرد خارجی متیل جاسمونات (MJ) در کنترل بیماری‌های گیاهی موثر است و منجر به بیان مجموعه‌ای از ژن‌های دفاعی برای القا مقاومت علیه پاتوژن و در نتیجه تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Chen et al. 2014). متیل جاسمونات اغلب به عنوان یک الیستور درون سلولی برای القا بنزوفناتریدین آلکالوئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Farber et al. 2003). فلوروگلوکوسینول (PG) یک ترکیب فنولیک با خاصیت تنظیم‌کنندگی رشد است (Kumar et al. 2005) که فعالیتی مانند اکسین و سیتوکینین و تشابه بسیاری با تیدیاژورون (TDZ) دارد. بنابراین پتانسیل قابل توجهی برای کاربرد در طیف وسیعی از مطالعات کشت بافت و سلولی دارد (Jaim et al. 2013). از این رو می‌توان از آن‌ها جهت بهینه‌سازی پروتکل تولید تجاری آلکالوئیدهای دارویی استفاده کرد.

تاکنون مطالعات قابل توجهی جهت افزایش تولید بنزیل ایزوکوئینولین در جنس *Papaver* انجام شده است. در بررسی اثر الیستورها در میزان تجمع آلکالوئیدها، (Nasser zare et al. 2014) نشان دادند که اثر متیل جاسمونات و امواج فراصوت به صورت جداگانه و همراه با تیمار پیش‌ماده‌ی ال-تیروزین بر عملکرد تبائین در خشخاش ایرانی بسیار مؤثر بوده است. ترکیب متیل جاسمونات و ال تیروزین، افزایش عملکرد تبائین تا ۸۴/۶۲ درصد در شش روز پس از تیمار را به همراه داشت. در بررسی دیگری، استفاده از الیستورهای عصاره‌ی مخمر، کیتوزان و ال-تیروزین در

¹ Plant Growth Regulator

در پژوهش حاضر به منظور انتخاب الیستور مناسب برای افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی تبائین و سنگوئینارین، از محرک‌های فلوروگلوکوسینول و متیل جاسمونات، به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، روی کشت سلولی ریزنمونه‌ی ریشه گیاه *P. bracteatum* در شرایط *in vitro* استفاده و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار، مقدار متابولیت‌های مورد نظر تولید شده اندازه‌گیری شدند. در ارتباط با تاثیر فلوروگلوکوسینول بر تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولن تاکنون در هیچ گیاهی مطالعه‌ای صورت نگرفته و این نخستین بار است که از فلوروگلوکوسینول به عنوان الیستور استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

بذور خشک *P. bracteatum* (متعلق به منطقه مهاباد) مورد استفاده در این تحقیق از بانک ژن پژوهشکده‌ی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه و سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلیت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۸ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. در انتها پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل و هرکدام به مدت ۵ دقیقه به محیط کشت (Murashige and Skoog 1962) فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار منتقل شدند.

برای جوانه زنی بهتر، بذور کشت شده به مدت دو هفته در یخچال نگهداری و سپس در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۶ هزار لوکس) و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند (Park and Facchini 2001). جوانه‌زنی بعد از گذشت ۳ هفته آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی با ارتفاع حدود ۸-۱۰ سانتی‌متر، ریز نمونه‌های مناسب از ناحیه‌ی ریشه، ساقه و برگ برای مرحله کال‌زایی انتخاب و به محیط MS تغییر یافته (Karimaneh et al. 2009) با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D انتقال یافتند. کالوس‌های مورد نظر پس از دو بار واکشت سه هفته‌ای، از نظر درصد کال‌زایی، وزن خشک (DW) و وزن تر (FW) مورد ارزیابی قرار گرفتند و کالوس‌های ریشه به عنوان بهترین کالوس، به محیط سوسپانسیون MS ۳/۴ (فاقد آگار) با همان ترکیب هورمونی منتقل شده و در

شیکر انکوباتور یخچال‌دار در محیطی تاریک با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۱۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی (۲۳ روز)، تمام سوسپانسیون‌ها با محلول متیل جاسمونات در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و فلوروگلوکوسینول در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر و بعد از عبور از فیلتر ۰/۲۲um مورد تیمار قرار گرفتند. هر سوسپانسیون به عنوان یک نمونه و به سوسپانسیون شاهد (فاقد هر الیستوری) به مقدار برابر آب مقطر اضافه شد. کالوس‌های رشد یافته در سوسپانسیون سلولی در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری و با استفاده از فریز درایر خشک شدند.

برای استخراج عصاره‌ی آلکالوئیدی این گیاه روش (Youngcho et al. 2008) مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۵ گرم کالوس‌های فریز درای شده را با یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۰/۵ درصد HCL (حجمی/حجمی) مخلوط و پس از ۶۰ دقیقه تیمار در حمام اولتراسونیک، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری و پس از عبور از فیلتر، تبائین و سنگوئینارین با دستگاه HPLC مدل Knauer، ستون (mm, C18 Phenomenex ۲۵۰x۴/۶) و دکتور (-UV Detector 2501-Wellchrom) اندازه‌گیری و آلکالوئیدهای مورد نظر در طول موج ۲۸۰ nm شناسایی شدند. از ترکیب ۹۰ درصد متانول و ۵ درصد آب به منزله‌ی فاز متحرک و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه به صورت ایزوکراتیک استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، غلظت‌های متفاوت استاندارد‌های آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین (Sigma St. Louis USA) با سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق شدند.

در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد و دو فاکتور الیستور (متیل جاسمونات در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و فلوروگلوکوسینول نیز در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، بعد از طی ۴۸ ساعت بر تولید دو متابولیت تبائین و سنگوئینارین مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق با نتایج تحقیقات قبلی، بهترین زمان برای

(FW) و خشک (DW) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) ریزنمونه‌های ریشه برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. بهترین کالوس‌ها در محیط کشت $\frac{3}{4}$ MS (Asadollahi 2014; Jahangiri 2014) همراه با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و اعمال الیستورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوکوسینول به قهوه‌ای تغییر رنگ دادند که احتمالاً می‌تواند ناشی از تولید و ترشح آلکالوئیدهای بسیار زیاد این گیاه در این محیط کشت باشد (Khodayari 2014; Behzadira 2016) (شکل ۱). نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به میزان تغییرات آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون خشخاش ایرانی نشان داد که اثر هر یک از الیستورها به تنهایی و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نمونه‌ای از کروماتوگرام HPLC عصاره‌ی سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* در شکل ۲ آورده شده‌است.

اندازه‌گیری آلکالوئیدهای بنزوفنانتری‌دینی در خشخاش ایرانی بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بود که در این تحقیق نیز استفاده شد (Behzadira 2016). تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی 18.0 صورت گرفت. مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی بذور *P. bracteatum* در محیط MS فاقد هورمون بعد از گذشت ۲۱ روز کشت و نگهداری در یخچال و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۰۰ درصد بود. پس از دست‌یابی به گیاهچه‌هایی با بنیه‌ی قوی و مناسب، ریزنمونه‌هایی از ریشه، ساقه و برگ تهیه و پس از کال‌زایی، با بررسی درصد کال‌زایی، وزن تر

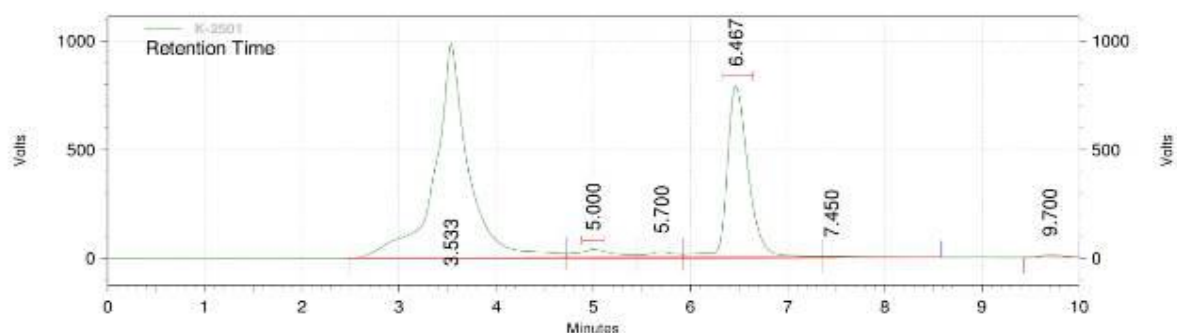


شکل ۱- از چپ نمای مقطع عرضی انتهای ارلن مایر ۲۵۰CC پیش از القای الیستور و راست همان نما بعد از القای الیستور

جدول ۱- تجزیه واریانس تغییرات میزان آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	تبائین	سنگوئینارین
متیل جاسمونات	۲	۶۴۸۵/۵۴۵ *	۷۳۸۴۱/۸۱۷ *
فلوروگلوکوسینول	۲	۱۷۴۶/۷۵۸ *	۱۷۴۰۱/۱۰۹ *
متیل جاسمونات x فلوروگلوکوسینول	۴	۱۴۴۹/۱۳۸ *	۱۲۸۱۲/۴۹۸ *
خطا	۱۸	۷/۶۴۸ *	۵۱/۵۴۴ *
ضریب تغییرات (درصد)		۱۴/۳۲	۱۰/۰۲

* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد



شکل ۲- کروماتوگرام HPLC نمونه سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون خشک‌اش ایرانی

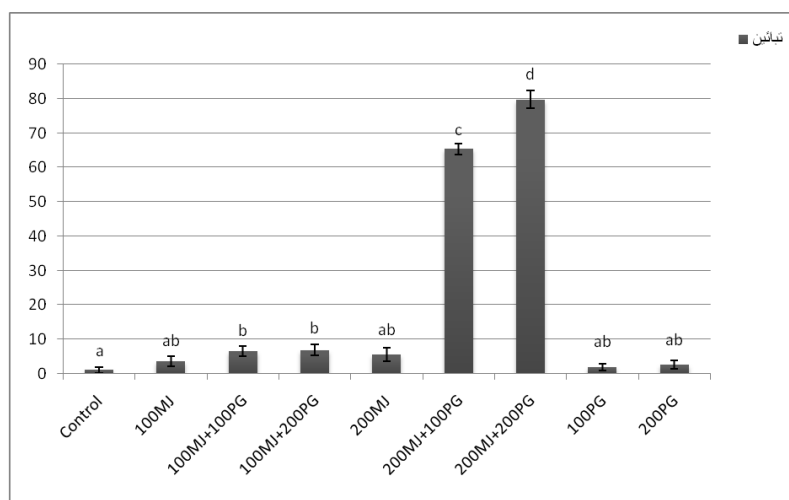
میلی گرم فلوروگلوکوسینول به ترتیب افزایش ۱/۱۶ و ۲/۲۵ برابری تبائین و ۲/۰۴ و ۳/۶۱ برابری سنگوئینارین نسبت به شاهد مشاهده شد. مشخص شده که استفاده از الیستورهای زیستی و غیرزیستی، سبب افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی می‌شود (Yamaner et al. 2013) پس در طی فرآیند القا، سلول‌های گیاهی در ابتدا با برهم کنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی و یا سیتوپلاسمی و الیستور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند، در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی موجب انتقال سیگنال‌های الیستوری شده و در نهایت پاسخ‌های دفاعی نظیر قلیایی شدن محیط، تنش اکسیداتیو و فعال شدن ژن‌های دفاعی منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zhao et al. 2003).

Almagro et al. (2015) از روش‌های بیوتکنولوژی مانند به‌کارگیری هم‌زمان محیط با هورمون‌های تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی برای افزایش تولید آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید در گیاه *Catharanthus roseus* استفاده کردند. هم‌چنین مشخص شده است که رشد، تکثیر و محتوای آلکالوئید کالوس توسط اکسین‌ها مانند 2,4-D افزایش می‌یابد و ترکیب اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها باعث افزایش رشد کالوس و تولید آلکالوئید می‌شود (Verma et al. 2012).

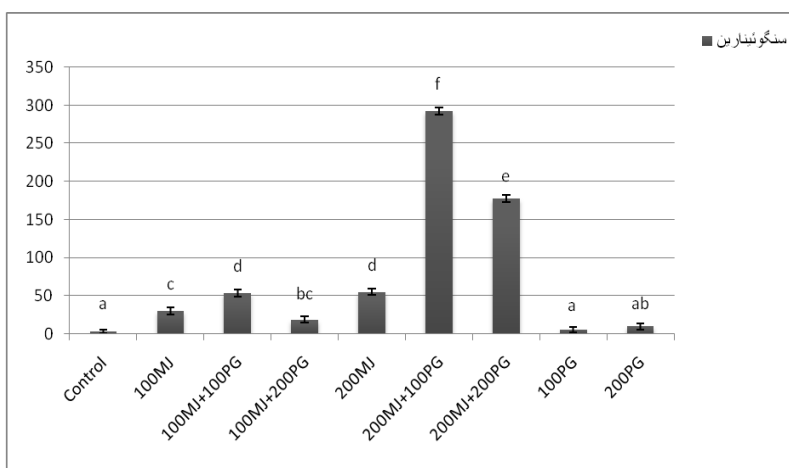
با وجود این که در اکثر مطالعات، تبائین آلکالوئید اصلی *P. bracteatum* گزارش شده‌است (Rostampour et al. 2010; Zare et al. 2014) تحقیقات نشان می‌دهند که آلکالوئیدهای دیگری در کشت سلولی این گیاه می‌تواند به‌عنوان آلکالوئید غالب نمایان شود.

در مقایسه اثر الیستورها در غلظت‌های مختلف بر تولید متابولیت‌های تبائین و سنگوئینارین در سوسپانسیون سلولی، بیش‌ترین مقدار تبائین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوکوسینول و بیش‌ترین مقدار سنگوئینارین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوکوسینول به‌دست آمد که به‌ترتیب ۶۸/۶۳ و ۱۰۷/۷۱ برابر شاهد بودند. این افزایش می‌تواند ناشی از اثر متقابل بین^۱ الیستورهای به‌کار رفته روی تولید تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشک‌اش ایرانی باشد که با توجه به شکل ۳ و ۴ می‌توان عنوان کرد افزایش غلظت فلوروگلیکسینول در تولید تبائین باعث افزایش اثر سینرژی و در تولید سنگوئینارین باعث کاهش اثر می‌شود در حالی‌که افزایش غلظت متیل جاسمونات هم در تولید سنگوئینارین و هم تبائین باعث تقویت اثر سینرژی می‌شود. (Zare et al. 2014) اثر سینرجیستیک متیل جاسمونات و ال تیروزین در افزایش تبائین روی همین گیاه و (Qu et al. 2011) اثر سینرجیستیک الیستور و فیل آلانین برای تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون سلولی *Vitis vinifera* را گزارش کردند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، افزودن متیل جاسمونات و فلوروگلوکوسینول، هرکدام به تنهایی نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تبائین و سنگوئینارین نسبت به شاهد شده، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌ترتیب افزایش ۳/۱۸ و ۴/۸۲ برابری تبائین و ۱۰/۹۱ و ۲۰/۳۸ برابری سنگوئینارین نسبت به شاهد و هم‌چنین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰

¹ Synergy



شکل ۳- تجمع آلکالوئیدهای تباثین پس از اعمال الیستورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول در بازه زمانی ۴۸ ساعت، حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی دار در میانگین تیمار است.



شکل ۴- تجمع آلکالوئیدهای سنگوئینارین پس از اعمال الیستورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول در بازه زمانی ۴۸ ساعت، حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی دار در میانگین تیمار است.

الیستورهای به کار رفته با نوع محیط کشت (MS تغییر یافته) هم مرتبط باشد. احتمال می رود استفاده از این محیط برای کال زایی و تولید سلول، سبب تحریک ژن ها و عوامل رونویسی موثر در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین شده است که در شرایط عادی فعال نیستند. Behzadi Rad et al. (2017) نشان دادند محیط تغییر یافته MS در همین گیاه سبب تحریک ژن های مسیر بیوسنتزی مورفین در ترکیب های الیستوری متیل جاسمونات و سالیسیک اسید می شود. همچنین Algelova et al. (2006) نوع، غلظت الیستور و محیط کشت را فاکتور مهمی در تجمع آلکالوئیدهای خاص گزارش کردند. مقایسه ای اثر متقابل متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول و

تجمع سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون *P.bracteatum* پس از استفاده از الیستورهای قارچی و هورمونی و به عنوان آلکالوئید اصلی گزارش شده است (Steven et al. 1989). از طرف دیگر مشخص شده است که ارقام مختلف این گیاه حاوی آلکالوئیدهای گوناگون هستند، به طوری که ارقامی که از غرب آلمان جمع آوری شده بودند تباثین را به عنوان آلکالوئید غالب نشان دادند و در ارقام دیگر مورد استفاده این تحقیق ایزوتباثین آلکالوئید اصلی شناسایی شد (Kamimura et al. 1967). در این پژوهش علاوه بر تباثین به عنوان آلکالوئید اصلی خشخاش ایرانی، سنگوئینارین نیز مشاهده شد که ممکن است دلیل آن علاوه بر نوع و غلظت

آنچه در این مطالعه مشاهده شد، تحریک پذیری بالای سلول های ریشه در برابر تجمع هر دو آلکالوئید در اثر تیمار با الیستور بود. هم چنین محرک های استفاده شده روی چرخه بیوسنتزی تولید متابولیت های ثانویه گیاه *P.bracteatum* بسیار مؤثر بودند. بنابراین با استفاده از الیستورها، مخصوصاً رهیافت ترکیبی الیستور با هورمون و بهره مندی از اثر سینرجیستیک آن ها، می توان در کالوسی که فاقد ژن های فعال مولد تبائین و سنگوئینارین است چرخه بیوسنتزی این متابولیت ها را تحریک کرد. از آنجایی که تحریک تولید متابولیت های ثانویه در گیاه خشخاش ایرانی بستگی به نوع و غلظت الیستور دارد، بنابراین برای تولید این مواد با ارزش در شرایط درون شیشه ای، دستیابی به ترکیب و غلظت بهینه ی مواد محرک ضروری است.

معنی دار شدن آن نشان می دهد که تجمع آلکالوئیدها در غلظت های مختلف الیستورها می تواند متفاوت باشد. بنابراین با بررسی غلظت های متفاوت سعی برای دستیابی به بهترین ترکیب و غلظت الیستوری مؤثر با بیشترین بازدهی تولید آلکالوئید شد. به نظر می رسد اثر سینرجیستیک متیل جاسمونات همراه با غلظت پایین فلوروگلوکوسینول با تحریک سازوکار دفاعی، موجب افزایش سنگوئینارین در کالوس شده باشد. سنگوئینارین یکی از سمی ترین ترکیبات بنزوفنانتری دین در سلول است و افزایش آن پایداری ندارد زیرا که بر حسب استراتژی سلول برای مقابله با سمیت آن یا باید به خارج از سلول ترشح شود یا تبدیل به دی هیدرو سگنوئینارین شده تا از مرگ سلول جلوگیری شود (Weiss et al. 2006).

منابع

- Almagro L, Fernandez-Perez F, Pedreno MA (2015) Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. *Molecules* 20:2973-3000.
- Asadolahi E (2014) The effect of some nano elicitors on secondary metabolite production of *papaver bracteatum*, University of Tehran, Iran. (In Farsi).
- Balazova A, Blanarikova V, Bilka F, Bilkova A (2008) Effect of combined biotic and abiotic elicitor on the sanguinarine formation in cell suspension cultures of *Eschscholtziacalifornica*. *ACTA Facultatis Pharmaceuticae* 55: 58-63.
- Behzadirad M, Naghavi MR, Shahnejat Bushehri AA (2016) The effect of abiotic elicitors on the gene expression of some alkaloids of *Papaver bracteatum*. *Modern Genetic Journal* 11:483-490.
- Bhagwath SG, Hjortso MA (2000) Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine a production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology* 80:159-167.
- Bondarian F (2014) Effect of biotic and abiotic elicitors on *Papaveracea* Family. Islamic Azad University, Iran. (In Farsi).
- Chen J, Zou X, Liu Q, Wang F, Feng W, Wan N (2014) Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. *Crop Protection* 56:31-36.
- Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-847.
- Edeoga HO, Okwu DE, Mbabie BO (2005) Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4:685-688.

- Fairbairn JW, Hakim F (1973) *Papaver bracteatum* Lindl. A new plant source of opiates. *Journal of Pharmacology* 25: 353-58.
- Fairbairn JW, Helliwell K (1977) *Papaver bracteatum* Lindl. Thebaine content in relation to plant development. *Journal of Pharmacology* 29: 65-9.
- Farber K, Schumann B, Miersch O, Roos W (2003) Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* 62:491-500.
- Facchini PJ and Park SU. Developmental (2003) inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in *Opium Poppy*. *Phytochem* 64: 177-86.
- Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66.
- Goldblatt P (1974) Biosystematic studies in *Papaver* section *Oxytona*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61:264-296.
- Hashemi SM, Naghavi MR (2016) Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 125: 31-41.
- Holkova I, Bezakova L, Sek Bilka F, Bala_zova A, Blanarikova V (2010) Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:887-892.
- Khodayari M (2014) Effect of elicitors on some alkaloids gene expression in *papaver somniferum*. University of Tehran, Iran. (In Farsi).

- Ilahi I, Ghauri EG (1994) Regeneration in cultures of *Papaver bracteatum* as influenced by growth hormones and temperature. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 38: 81-83.
- Jahangiri B (2014) Effect of some biotic elicitors on secondary metabolite production of *papaver bracteatum*. University of Tehran, Iran. (In Farsi).
- Jaim A, Silva TD, Dobranszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 49:1-16.
- Kumar V, Gururaj HB, Narasimha Prasad BC, Giridhar P, Ravishankar GA (2005) Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae* 106:237-246.
- Kamimura S, Nishikawa M (1976) Tissue culture of *Papaver bracteatum* Part II. Growth and alkaloid production of *Papaver bracteatum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 40:904-911.
- Karimaneh Z, Omid M, Khialparast F, Sabokdast M (2009) The Study on the effect of plant growth regulators, concentration, medium and explants on the callus induction, regeneration and suspension culture of *Papaver somniferum* L. University of Tehran, Iran. (In Farsi)
- Le Flem-Bonhomme V, Laurain-Matter D, Fliniavx MA (2004) Hairyroot induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult to transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta* 218:890-893.
- Leonard E, Runguphan W, Connor SO, Prather KJ (2009) Opportunity in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology* 5:292-300.
- Lovkova M, Buzuk GN, Solkolova SM (2005) Regulatory role of elements in the formation and accumulation of alkaloids in *Papaver somniferum* L. Seedlings. *BMC Plant Biology* 10: 252-255.
- Mannino A, Zdrodowski J (2009) Processes for synthesis of opiate alkaloid derivatives. U.S. Patent Application 12:586-874.
- Milo J, Levy A, Palevitch D (2006). An alternative raw-the cultivation and breeding of *Papaver bracteatum*. In: Bernath J, editor. *Poppy the genus Papaver*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 279-289.
- Moore BD, Andrew RL, Kulheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist* 201:733-750.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Muthulakshmi S, Pandiyarajan V (2013) Influence of IAA on the vincristine content of *Catharanthus roseus* (L). *Asian Journal of Plant Science Research* 3:81-87.
- Oksman-Caldentey KM, Inze D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science* 9: 433-440.
- Park S, Facchini PJ (2001) Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of California Poppy *Eschscholzia californica* cham. *In vitro Cellular and Developmental Biology.Plant* 37: 35-39.
- Pichersky E, Gang DR (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites: an evolutionary perspective. *Trends Plant Science* 5:439-445
- Pienky S, Brandt W, Schmidt J, Karmell R, Zigler J (2009) Functional characterization of involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum*). *Plant Journal* 60:56-67.
- Qu J, Zhang W, Yu X (2011) A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 107:261-269.
- Rostampour S, Hashemi Sohi H, Dehestani A (2010) In vitro regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). *Biologia* 65/4: 647-652.
- Steven D, Cline J, Carmine J, Coscia (1989) Ultrastructural changes associated with the accumulation and secretion of sanguinarine in *Papaver bracteatum* suspension cultures treated with fungal elicitor. *Planta* 178:303-314.
- Shinde AN, Malpathak N and Fulzele DP (2009) Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 612 - 618.
- Tisserat B, Berhow M (2009) Production of pharmaceutical from papaver cultivars. *Engineering in Life Sciences* 3:190-196.
- Verma AK, Singh RR, Singh S (2012) Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. *Botanica Serbica* 36:123-130
- Weiss D, Baumert A, Vogel M, Roos W (2006) Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell Environment* 29: 291-302.
- Yadav R, Yadav N (2016) Secondary metabolites production in plant tissue culture: a review. *International Journal of Educational Research* 2:63-64.
- Yamaner O, Erdag B, Gokbulut C (2013) Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedling of *Hypericum denotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish Journal Botany* 37: 153-159.
- Young Choa H, Young Sona S, Soon Rhee H, Sung-Yong H, Yoon Carolyn WT, Parsons Jong L, Parka M (2008) Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Journal of Biotechnology* 135: 117-122.
- Zare N, Farjaminezhad R, Asghari-Zakaria R, Farjaminezhad M (2014) Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research* 28:711-717.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23:283-333.