ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۱۳ - ۲۰۵

بررسی میزان تولید بنزیل ایزوکوئینولن آلکالوئیدها (BIA) در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Papaver bracteatum* با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

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

ترانه دستمالچی[۱]، منصور امیدی*[۲]، رضا عزیزی نژاد[۱]، شمسعلی رضا زاده[۳]، علیرضا اطمینان[٤]

۱- به‌ترتیب 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

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

Dastmalchi T[1], Omidi M*[2], Azizinezhad R[1], Rezazadeh S[3], Etminan A[4]

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: ۹٦/۱۲/٤ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

فیتوهورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از فاکتورهای موثر در تولید متابولیت‌های ثانویه هستند. گیاه *Papaver bracteatum* از تیره پاپاوراسه شامل آلکالوئیدهای تجاری ارزشمندی است. بنزیل ایزوکوئینولین 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 فلوروگلیسنول (PG) در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با یک‌دیگر روی تولید تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. افزودن هر دو الیسیتور به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش بازده‌ی تولید تبائین و سنگوئینارین در مقایسه با شاهد شد. تولید تبائین در بازه‌ی زمانی ٤۸ ساعت بعد از تیمار با ۲۰۰ uM متیل جاسمونات و ۱۰۰ mg/L فلوروگلیسینول، ٦۸/٦۳ برابر شاهد و بازده تولید سنگوئینارین در بازه‌ی زمانی ٤۸ 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 تاثیر الیسیتورهای به‌کار رفته است. افزودن متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول هرکدام به تنهایی نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تبائین و سنگوئینارین نسبت به شاهد شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند چرخه بیوسنتز 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 ایزوکوئینولین آلکالوئیدها
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)[1]، تقریبا 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[2] به‌دلیل قابلیت تولید و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه‌ی ارزشمند دارویی (گروه آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین‌ها[3]) بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Le Flem-Bonhomme et al.2004; Facchini 2003). بنزیل ایزوکوئینولین 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[4] به‌عنوان حد واسط سنتز دیگر مشتقات مورفینان‌های پنج حلقه‌ای دارویی[5]، کدئین[6] (ضد سرفه)، مورفین[7] (داروی مسکن)، نوسکاپین[8] (فاکتور ضد تومور)، سنگوئینارین[9] (داروی ضد میکروبی) و پاپاورین[10] (گشاد کننده عروق) اشاره کرد (Pienky et al. 2009).

[1] World Health Organization
[2] *Papaver bracteatum Lindl*
[3] Benzylisoquinoline Alkaloids (BIA)
[4] Thebaine
[5] Pentacyclic morphinan-based drugs
[6] Codeine
[7] Morphine
[8] Noscapine
[9] Sanguinarine
[10] Papaverine

P. bracteatum گیاهی چند ساله از خانواده Papaveraceae، خودناسازگار، دگرگشن و دیپلوئید (2n=14) که منشا 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 وغیرمخدر ازجمله کدئین، اکسیمورفون[11]، اکسیکودون[12]، نالوکسون[13]، نالترکسون[14] 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 شیره‌ی تریاک برای استحصال مورفین و کدئین و مشتقات نیمه صنعتی آن مانند هروئین، سازمان ملل خواستار مطالعه درباره‌ی امکان جایگزینی *P. bracteatum* به‌عنوان منبع تبائین برای تولید مورفین شد (Fairbairn and Hakim 1973; Fairbairn and Helliwell1977). 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[15] یا برون[16] سلولی که الیسیتور نامیده می‌شوند، به‌وجود آیند. متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به محرک (الیسیتور) پس از واکنش‌های فسفرافزایی (فسفریلاسیون) و فسفرزدایی (دفسفریلاسیون) پروتئین‌های غشای سلول، ایجاد جریان‌های کلسیمی، فعال شدن پروتئین‌کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید ROSها و در نهایت بیان ژن‌های دفاعی در یاخته‌های گیاهی

[11] Oxymorphone
[12] Oxycodone
[13] Naloxone
[14] Naltrexone
[15] Exogenous
[16] Endogenous

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

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 And Hjortsø 2000; Zhao et al. 2005). به‌علاوه، پاسخ به یک الیسیتور خاص ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر و بین سلول‌های مختلف بسیار متفاوت باشد، بنابراین تعیین غلظت‌های مناسب الیسیتورها برای بهینه‌سازی تولید ضروری است (Shinde et al. 2009). از محرک‌های مهم و موثر در تولید متابولیت‌های ثانویه، هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی[1] (PGRs) هستند (Muthulakshmi and Pandiyarajan 2013) که از آن جمله می‌توان به متیل جاسمونات (MJ) و فلوروگلوسینول (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 به‌عنوان یک الیسیتور درون‌سلولی برای القا بنزوفنانتریدین آلکالوئیدها مورد استفاده قرار می گیرد (Farber et al. 2003). فلوروگلوسینول (PG) یک ترکیب فنولیک باخاصیت تنظیم‌کنندگی رشد است (Kumar et al. 2005) که فعالیتی مانند اکسین و سیتوکنین و تشابه بسیاری با تیدیازورون (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 الیسیتورها در میزان تجمع آلکالوئیدها، Nasser zare et al (2014) نشان دادند که اثر متیل جاسمونات و امواج فراصوت به‌صورت 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 ۸٤/٦۲ درصد در شش روز پس از تیمار را به‌همراه داشت. در بررسی دیگری، استفاده از الیسیتورهای عصاره‌ی مخمر، کیتوزان و ال-تیروزین در 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 الیسیتورهای 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 الیسیتورهای اکسید روی، اکسید سلیسیوم 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 الیسیتورهای زیستی و نانو الیسیتورها بر افزایش تولید آلکالوئیدها در کشت سلولی گیاه *P. somnifrum* 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. somnifrum* توسط Lovkova et al. (2005) بررسی شد و عناصر مس، کبالت، مولبیدن، کروم و تنگستن به منزله‌ی فعال‌کننده و عناصر کلسیم، منگنز، بر، آهن و وانادیوم به منزله‌ی بازدارنده در این مسیر مشخص شدند. Bondarian (2013) با استفاده از سه نانو ذره‌ی اکسید مس، اکسید سیلسیوم و اکسید روی موفق به افزایش پاپاورین، تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی خشخاش شد. در مطالعه‌ای دیگر تیمار ریشه‌های موئین شقایق شرقی با متیل جاسمونات (MJ) و سالسیلیک اسید (SA) موجب تجمع آلکالوئیدها شد، به‌گونه‌ای که بیش‌ترین افزایش در پاسخ به تیمار ٤۸ ساعت اعمال متیل جاسمونات مشاهده شد (Hashemi and Naghavi 2016). در بررسی اثر ترکیبی از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به‌منظور افزایش سنگوئینارین در کشت سلولی خشخاش کالیفرنیایی (*Eschscholtzia californica*)، بیش‌ترین تجمع این ماده بعد از تیمار با سولفات مس گزارش شد و هم‌چنین سلول‌های تیمار شده با الیسیتورهای ترکیبی، مقدار کمی سنگوئینارین در محیط کشت ترشح کردند (Balazova et al. 2008).

[1] Plant Growth Regulator

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

در پژوهش حاضر به‌منظور انتخاب الیسیتور مناسب برای افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی تبائین و سنگوئینارین، از محرک‌های فلوروگلوسینول و متیل جاسمونات، به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، روی کشت سلولی ریزنمونه‌ی ریشه گیاه *P. bracteatum* در شرایط *in vitro* استفاده و ٤٨ ساعت بعد از اعمال تیمار، مقدار متابولیت‌های مورد نظر تولید شده اندازه‌گیری شدند. در ارتباط با تاثیر فلوروگلوسینول بر تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین تاکنون در هیچ گیاهی مطالعه‌ای صورت نگرفته و این نخستین بار است که از فلوروگلوسینول به‌عنوان الیسیتور استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

بذور خشخاش *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 هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۸ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. در انتها پس از ۳ بار شستشو با آب‌مقطر استریل و هرکدام به مدت ۵ دقیقه به محیط کشت (Murashige and Skoog 1962) MS فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ٦/٥ 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 ١٦ ساعت روشنایی (٦ 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 تغییریافته (Karimaneh et al. 2009) با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ٦/٥ گرم در لیتر آگار به‌همراه 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 به‌عنوان بهترین کالوس، به محیط سوسپانسیون MS ٣/٤ (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 وفلوروگلوسینول 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 به‌عنوان 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 ٤٨ 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 (2008) YoungCho et al. مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۰۵ گرم از کالوس‌های فریز درای شده را با یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۰/۵ درصد HCL (حجمی/ حجمی) مخلوط و پس از ٦٠ 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 ٢٥٠×٤/٦) و دتکتور (UV Detector K-2501-WellchromUV) اندازه‌گیری و آلکالوئیدهای مورد نظر در طول موج nm ۲۸۰ شناسایی شدند. از ترکیب ۹۰ درصد متانول و ۵ درصد آب به‌منزله‌ی فاز متحرک و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه به‌صورت 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 کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده شد و دو فاکتور الیسیتور (متیل جاسمونات در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و فلوروگلوسینول نیز در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، بعد از طی ٤٨ ساعت بر تولید دو متابولیت تبائین و سنگوئینارین مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق با نتایج تحقیقات قبلی، بهترین زمان برای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

اندازه‌گیری آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدینی در خشخاش ایرانی بازه‌ی زمانی ٤٨ ساعت بود که در این تحقیق نیز استفاده شد (Behzadirad 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 ٥ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی بذور P. bracteatum در محیط MS فاقد هورمون بعد از گذشت ٢١ روز کشت و نگه‌داری در یخچال و دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد ١٠٠ 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 (FW) و خشک (DW) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) ریزنمونه‌های ریشه برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. بهترین کالوس‌ها در محیط کشت ¾MS (Asadollahi 2014; Jahangiri 2014) همراه با تیمار هورمونی ٠/٥ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و اعمال الیسیتورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول به قهوه‌ای تغییر رنگ دادند که احتمالا می‌تواند ناشی از تولید و ترشح آلکالوئیدهای بسیار زیاد این گیاه در این محیط کشت باشد (Khodayari 2014; Behzadirad 2016) (شکل ١). نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به میزان تغییرات آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون خشخاش ایرانی نشان داد که اثر هر یک از الیسیتورها به تنهایی و هم‌چنین اثر متقابل آن‌ها در سطح ٥ درصد معنی‌دار بود (جدول١). نمونه‌ای از کروماتوگرام HPLC عصاره‌ی سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* در شکل ٢ آورده شده‌است.

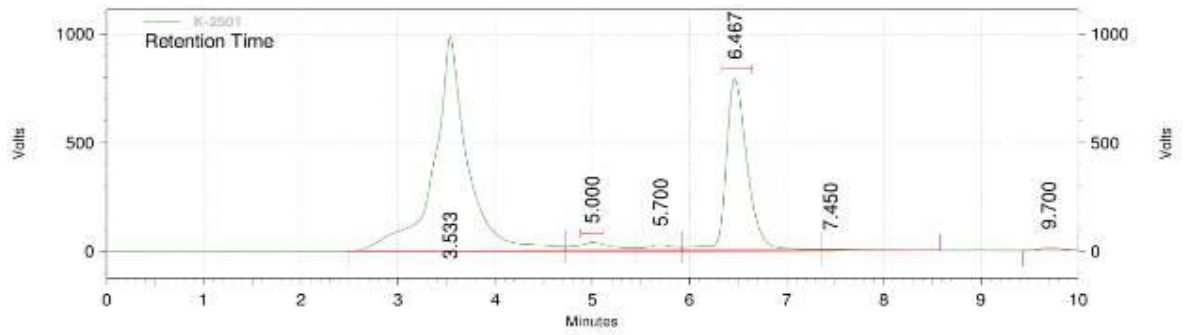
شکل١- از چپ نمای مقطع عرضی انتهای ارلن مایر ٢٥٠cc پیش از القای الیستور و راست همان نما بعد از القای الیستور

جدول ١- تجزیه واریانس تغییرات میزان آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	تبائین	سنگوئینارین
متیل جاسمونات	٢	٦٤٨٥/٥٤٥ *	٧٣٨٤١/٨١٧ *
فلوروگلوسینول	٢	١٧٤٦/٧٥٨*	١٧٤٠١/١٠٩*
متیل جاسمونات ×فلوروگلوسینول	٤	١٤٤٩/١٣٨*	١٢٨١٢/٤٩٨ *
خطا	١٨	٧/٦٤٨ *	٥١/٥٤٤ *
ضریب تغییرات (درصد)		١٤/٣٢	١٠/٠٢

*اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]



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

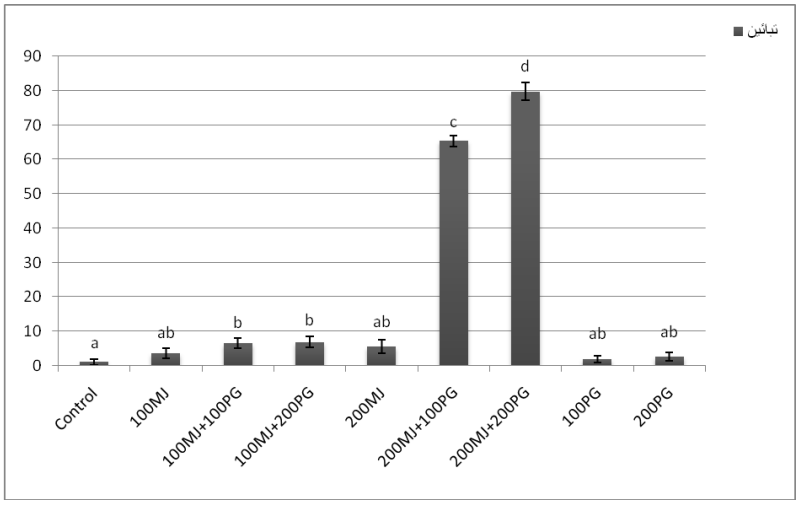
در مقایسه اثر الیسیتورها در غلظت‌های مختلف بر تولید متابولیت‌های تبائین و سنگوئینارین در سوسپانسیون سلولی، بیش‌ترین مقدار تبائین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوسینول و بیش‌ترین مقدار سنگوئینارین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوسینول به‌دست آمد که به‌ترتیب ٦٨/٦٣ و ١٠٧/٧١ برابر شاهد بودند. این افزایش می‌تواند ناشی از اثر متقابل بین[1] الیسیتورهای به‌کار رفته روی تولید تبائین و سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی باشد که با توجه به شکل ۳ و ٤ می‌توان عنوان کرد افزایش غلظت فلوروگلیسینول در تولید تبائین باعث افزایش اثر سینرژی و در تولید سنگوئینارین باعث کاهش این 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 فنیل آلانین برای تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون سلولی Vitis viniferag را گزارش کردند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، افزودن متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول، هرکدام به تنهایی نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تبائین و سنگوئینارین نسبت به شاهد شده، به‌طوری که در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌ترتیب افزایش ۳/۱۸ و ٤/٨٢ برابری تبائین و ۱۰/۹۱ و ۲۰/۳۸ برابری سنگوئینارین نسبت به شاهد و هم‌چنین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم فلوروگلوسینول به ترتیب افزایش ۱/۱٦ و ۲/۲۵ برابری تبائین و ۲/۰٤ و ۳/٦۱ برابری سنگوئینارین نسبت به شاهد مشاهده شد. مشخص شده که استفاده از الیسیتورهای 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 الیسیتور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند، در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی موجب انتقال سیگنال‌های الیسیتوری 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 تنظیم کننده‌ی 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 می یابد 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.

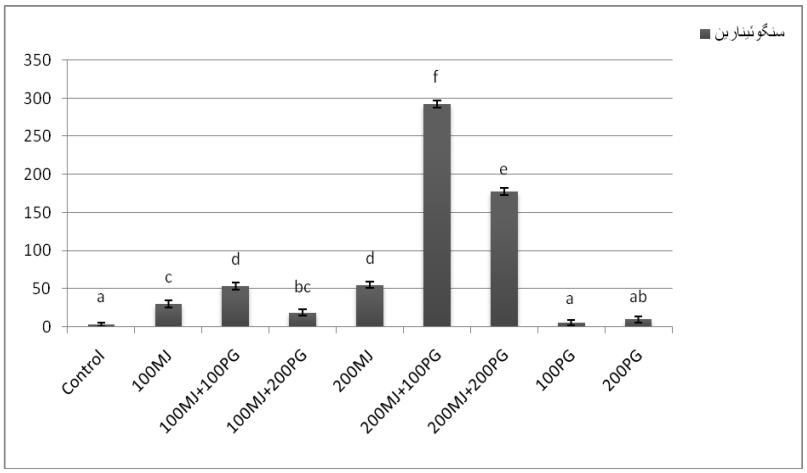
[1] Synergy

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]



شکل۳- تجمع آلکالوئیدهای تبائین پس از اعمال الیسیتورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول در بازه زمانی ٤٨ ساعت، حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار در میانگین تیمار است.



شکل٤- تجمع آلکالوئیدهای سینگوئینارین پس از اعمال الیسیتورهای متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول در بازه‌ی زمانی ٤٨ ساعت، حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار در میانگین تیمار است.

تجمع سنگوئینارین در کشت سوسپانسیونی *P.bracteatum* پس از استفاده از الیسیتورهای قارچی و هورمونی و به‌عنوان آلکالوئید اصلی گزارش شده‌است (Steven et al. 1989). از طرف دیگر مشخص شده‌است که ارقام مختلف این گیاه حاوی آلکالوئیدهای گوناگون هستند، به‌طوری که ارقامی که از غرب آلمان جمع‌آوری شده بودند تبائین را به‌عنوان آلکالوئید غالب نشان دادند و در ارقام دیگر مورد استفاده این تحقیق ایزوتبائین آلکالوئید اصلی شناسایی شد (Kamimura et al. 1967). در این پژوهش علاوه بر تبائین به‌عنوان آلکالوئید اصلی خشخاش ایرانی، سنگوئینارین نیز مشاهده شد که ممکن است دلیل آن علاوه بر نوع و غلظت الیسیتورهای به‌کار رفته با نوع محیط کشت (MS تغییر یافته) هم مرتبط باشد. احتمال می‌رود استفاده از این محیط برای کال‌زایی و تولید سلول، سبب تحریک ژن‌ها 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 یافته‌ی MS در همین گیاه سبب تحریک ژن‌های مسیر بیوسنتزی مورفین در ترکیب‌های الیستوری متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید می‌شود. هم‌چنین Algelova et al. (2006) نوع، غلظت الیسیتور و محیط کشت را فاکتور مهمی در تجمع آلکالوئیدهای خاص گزارش کردند. مقایسه‌ی اثر متقابل متیل جاسمونات و فلوروگلوسینول و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

معنی‌دار شدن آن نشان می‌دهد که تجمع آلکالوئیدها در غلظت‌های مختلف الیسیتورها می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین با بررسی غلظت‌های متفاوت سعی برای دستیابی به بهترین ترکیب و غلظت الیستوری موثر با بیش‌ترین بازدهی تولید آلکالوئید شد. به‌نظر می‌رسد اثر سینرجیستیک متیل جاسمونات همراه با غلظت پایین فلوروگلوسینول با تحریک سازوکار دفاعی، موجب افزایش سنگوئینارین در کالوس شده باشد. سنگوئینارین یکی از سمی‌ترین ترکیبات بنزوفنانتریدین 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 دی‌هیدروسنگوئینارین شده تا از مرگ سلول جلوگیری شود (Weiss et al. 2006).

آن‌چه در این مطالعه مشاهده شد، تحریک‌پذیری بالای سلول‌های ریشه در برابر تجمع هر دو آلکالوئید در اثر تیمار با الیسیتور بود. هم‌چنین محرک‌های استفاده شده روی چرخه بیوسنتزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه *P.bracteatum* بسیار مؤثر بودند. بنابراین با استفاده از الیسیتورها، مخصوصا رهیافت ترکیبی الیسیتور با هورمون و بهره‌مندی از اثر سینرجیستیک آن‌ها، می‌توان در کالوسی که فاقد ژن‌های فعال مولد تبائین و سنگوئینارین است چرخه بیوسنتزی این متابولیت‌ها را تحریک کرد. از آنجایی که تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه خشخاش ایرانی بستگی به نوع و غلظت الیسیتور دارد، بنابراین برای تولید این مواد با ارزش در شرایط درون شیشه‌ای، دست‌یابی به ترکیب و غلظت بهینه‌ی مواد محرک ضروری است.

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 Faccultatis Pharmaceutical 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 rootcultures 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) Combinationeffect of chitosan and methyl jasmonate on controlling Alternariaalternata and enhancing activity of cherry tomato fruit defensemechanisms. 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) Selectivedesensitization of jasmonate- and pH-dependent signalingin the induction of benzophenanthridine biosynthesis incells 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.Phtochem 64: 177-86.

Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cellbiology, 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).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]

IlahiI, 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, RavishankarGA (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, Omidi 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) Opportunityin 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 synthesisin 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 poopy (*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 elicitationand 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
WeissD, BaumertA, VogelM, 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 seddling of *Hypericuma denotrichum* by som biotic elicitors.Turkish Journal Botany 37: 153-159.
Young Choa H, Young Sona S, Soon Rheea H, Sung-Yong H, Yoonb Carolyn WT, Parsonsc 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.4.3]