فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2017.13547.1344
Archive of SID

تأثیر الیسیتورهای زیستی بر تولید آلکالوئیدها در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

Effect of Biotic Elicitors on Alkaloids Production in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures

اکرم رمضانی[۱]، رحیم حداد[۲*] و بهنام صداقتی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) گیاهی دارویی است که به‌دلیل تولید آلکالوئیدهای فراوان ازجمله داروهای ضدسرطان وین‌کریستین و وین‌بلاستین اهمیت دارد. وین‌کریستین و وین‌بلاستین ازجمله مهم‌ترین داروها در درمان سرطان می‌باشند ولی بااین‌حال عملکرد این دو ترکیب به‌طور نسبی پایین و مقدار تقریبی آن‌ها در گیاه ۰/۰۰۰۵ درصد است. با توجه به قیمت بالای این ترکیبات و مقادیر اندک آن‌ها در این گیاه، تلاش در جهت افزایش تولید این ترکیبات، منجر به تحقیقات وسیع روی این گیاه شده است. در این تحقیق جهت بررسی تأثیر عصاره‌های قارچی و زمان بر میزان تولید آلکالوئیدها در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. به‌این منظور بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی، عصاره قارچ‌های *Priformospora indica*، *Trichoderma tomentosum* و ترکیب عصاره‌های قارچی *p. indica* و *T. tomentosum* با غلظت ۱٪ حجمی- حجمی به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام شد و میزان آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش نشان داد که هر سه عصاره‌های قارچی *P. indica*، *T. tomentosum* و مخلوط هر دو عصاره قارچی (*P+T*) باعث افزایش میزان تولید وین‌بلاستین نسبت به شاهد شد و بیش‌ترین تأثیر مربوط به عصاره قارچ *T. tomentosum* بود. مقایسه میانگین میزان وین‌کریستین بین عصاره‌های قارچی نشان داد که بیش‌ترین میزان وین‌کریستین در نمونه شاهد بود و عصاره‌های قارچی باعث کاهش میزان وین‌کریستین شد.

واژه‌های کلیدی: عصاره قارچی، سوسپانسیون سلولی، وین‌کریستین، وین‌بلاستین، پروانش

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
*: نویسنده مسوول Email: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir
www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه پروانش (*Catharanthus roseuse*) یکی از گیاهان دارویی مهم خانواده خرزه گیان اســت که متابولیت‌های ثانویه زیادی تولید می‌کند. این گیاه حاوی ۱۳۰ نوع ایندول آلکالوئید ا ست *ساین* و *شارما* (Sain and Sharma, 2013) و از دوران با ستان به‌دلیل ترکیبات فیتوشیمیایی و اثر درمانی‌اش مورداستفاده قرار گرفته اســت. متابولیت‌های ثانویه گیاه پریوش خواص دارویی مختلفی ازجمله خواص ضـدسـرطان، ضـددیابت، ضـداسـهال، ضـــدمیکروبی دارد. آل کالوئ ید هایی م ثل وین‌بلاســـتین و وین‌کری ستین که به‌طور عمده در بخش‌های هوایی گیاه وجود دارند، ازجمله متابولیت‌های ثانویه هســـتند که در درمان انواع سرطان‌های انسان استفاده می‌شوند *اسلام* و همکاران (Aslam *et al.*, 2010). این آلکالوئیدها میوز را در مرحله متافاز متوقف کرده و با اتصـال به توبولین‌ها مانع از تشـکیل دوک تقسـیم می‌شوند و به این ترتیب اثر مهار رشدی بر برخی از تومورهای انســـان دارند *کالیداس* و همکاران (Kalidass *et al.*, 2016). وین‌بلاستین برای درمان نئوپلاسماس هوجکین و سرطان چریو (پرده بیرونی جنین) توصیه می‌شود و وین‌کریستین در درمان ســـرطان خون کودکان اســـتفاده می‌شـــود. با این‌که داروهای وین‌کریستین و وین‌بلاستین ازجمله مهم‌ترین داروها در درمان سرطان می‌با شند ولی بااین‌حال عملکرد این دو ترکیب به‌طور نسبی پایین و مقدار تقریبی آن‌ها در گیاه ۰/۰۰۰۵ درصد است احمدی و همکاران (۱۳۹۱)، *یوکویاما* و همکاران (Yokoyama *et al.*, 1998). با توجه به قیمت بالای این ترکیبات و مقادیر اندک آن‌ها در این گیاه، تلاش در افزایش تولید این ترکیبات در گیاه منجر به تحقیقات وسیع روی این گیاه شده است.

استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ا ست. الی سیتورها ترکیباتی با منـ شأ زیســـتی یا غیرزیســـتی هســـتند که می‌توانند از طریق القاء پا سخ‌های دفاعی و تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوآلکسین باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی شوند. الیسیتورهای زیســتی شـامل، پلی‌سـاکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و قطعات دیواره ســـلول قارچ‌ها، گیاهان (ســـلولز و پکتین) و میکروارگانیســـم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشـد. الیســیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص با شند مانند کیتین و کیتوزان و یا مانند همگنای قارچ و ع صاره مخمر مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند. الیسیتورهای زیستی به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهان دارویی زیادی به‌کار رفته‌اند. دســـت‌ورزی محیط‌های کشـــت سلولی با ا ستفاده از الی سیتورهای زی ستی یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. طی تحقیقات زیادی اثر الیسیتورهای زیستی بر افزایش متابولیت‌های ثانویه بررسی شده است اسماعیل‌زاده و شـــریفی (۱۳۹۱). *نامدو* و همکاران (Namdeo *et al.*, 2002) تأثیر الیســیتورهای قارچی را بر تولید آجمالیســین در کشـــت سو سپان سیون سلولی پروانش برر سی کردند. آن‌ها اثر ع صاره قـارچ‌هـای *Aspergillus niger*، *Fusarium moniliforme* و *Trichoderma viride* را در غلظت‌های ۰/۵ و ۵ درصد حجم به حجم و زمان‌های مختلف بر روی سو سپان سیون سلولی اعمال دادند و مشاهده کردند که غلظت‌های بالاتر عصاره قارچی تأثیر مثبتی بر میزان آجمالیسین دارد. *کومار* و همکاران (Kumar *et al.*, 2012) تأثیر عصاره قارچ *Priformospora indica* را بر رشد ریشـــه موئین و تولید لیگنان‌ها در ریشـــه موئین کتان مورد بررســـی قرار دادند. آن‌ها غلظت‌های مختلف عصـــاره قارچ *P. indica* شـــامل غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ درصـــد حجم به حجم بر روی ریشه موئین کتان اعمال کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصـــاره ۳ درصـــد حجم به حجم قارچ *P. indica* پدوفیلوتوکســـین را به میزان ۳/۸ برابر و میزان متوکســـی پدوفیلوتوکسین را به میزان ۴/۴ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. مینگ و همکاران (Ming *et al.*, 2013) تأثیر عصاره قارچی *Trichoderma atroviride* و بخش پلی‌سـاکاریدی را بر میزان بیوسـنتز تانشـینون در ریشـه موئین مریم‌گلی بررسـی کردند. نتایج آن‌ها نشـان داد که *Trichoderma atroviride* و (PSF) هر دو اثر مثبتی بر میزان تولید تانشینون دا شتند. *جایارامان و* محمد (Jayaraman and Mohamed, 2015) تأثیر ع صاره قارچ *Trichoderma* را بر میزان تولید آگار چوب در سو سپان سیون ســـلولی درخت گرمســـیری *Aquilaria malaccensis* Lam موردمطالعه قرار دادند. آن‌ها میزان ۸ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره قارچ *Trichoderma* را به ســوســپانســیون ســلولی درخت *A. malaccensis* اضافه کردند و میزان ماده معطر سوسپانسیون را اندازه گرفتند. اندازه‌گیری آگار چوب توسط GC-MS نشان داد ع صاره قارچ تأثیر مثبتی بر میزان آگار چوب دا شت. *ت شکری* و همکاران (2016) تأثیر عصـــاره قارچ *P. indica* را بر میزان لیگنان و ا سید فنولیک در ری شه موئین کتان موردبرر سی قرار دادند در این تحقیق آن‌ها ریشـه موئین کتان را با عصـاره ۱ در صد حجم به حجم قارچ *P. indica* تیمار کردند. نتایج نشان داد ع صاره قارچ باعث کاهش ر شد شده ولی بعد از ۲۴ ساعت مو جب افزایش اســـید فنولیک گرد ید. *اهلاوات* و همکاران (Ahlawat *et al.*, 2016) تأثیر عصـــاره قارچ *P. indica* را بر بیوسنتز ویتافرین A (Withaferin A) در سوسپانسیون سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

Withania somnifera برر سی کردند. آن‌ها غلظت‌های مختلف عصاره قارچ *P. indica* شامل غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ درصد حجم به حجم روی سوسپانسیون سلولی اعمال کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که غلظت ۳ درصد عصاره بیش‌ترین تأثیر را بر زیست‌توده و تولید ویتافرین A دارد.

در مطالعه حاضر تأثیر الیسیتورهای زیستی عصاره قارچ‌های *P. indica* و *Trichoderma tomentosum* بر میزان تولید وین‌کریستین و وین‌بلاستین در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و سوسپانسیون سلولی

ابتدا بذور گیاه پروانش از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور تهیه گیاهچه استریل بذور با استفاده از قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و پس از سه‌بار شست‌وشو با آب‌مقطر استریل، درون محیط‌کشت MS بدون هورمون کشت داده شد. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. پس از جوانه‌زنی گیاه و تهیه گیاهچه استریل به‌منظور تهیه کالوس ریزنمونه‌های مناسب از ریشه گیاه برش داده شد و درون محیط‌کشت MS حاوی هورمون یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کشت داده شد. به‌مدت یک ماه درون اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه و تاریکی کامل قرار داده شدند.

برای تهیه سوسپانسیون سلولی کالوس‌های نرم و با رنگ روشن درون محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری کشت و درون شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و شیک شدند (شکل ۱). پس از تثبیت رشد سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی از طریق واکشت‌های متوالی تکثیر شد. منحنی رشد سلول‌ها از طریق روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های ساکن (SCV: Settled Cell Volume) و اندازه‌گیری شمارش سلولی تعیین گردید *فرجامی‌نژاد* و همکاران (Farjaminezhad *et al.*, 2013).

آماده‌سازی و به‌کارگیری عصاره قارچی

قارچ اندوفیت *P. indica* در محیط‌کشت جامد کفر (Käfer, 1997) کشت و به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قارچ سپس به محیط‌کشت مایع کفر منتقل و به‌مدت دو هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا رشد میسیلیوم‌ها و اسپورزایی قارچ به حداکثر زیست‌توده خود برسد. قارچ *T. tomentosum* نیز ابتدا در محیط‌کشت PDA و سپس در محیط PDB و شرایط مشابه با *P. indica* کشت داده شد تا رشد آن به حداکثر برسد (یعقوبیان، ۱۳۹۴). پس از این‌که رشد قارچ‌ها به حد کافی رسید، زیست‌توده زنده قارچ‌ها که شامل میسیلیوم‌ها و اسپورهای قارچی بود توسط قیف بوخنر فیلتر شدند و سپس سلول‌های قارچی به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک شدن، سلول‌ها درون هاون کوبیده شده و با نسبت ۱۰ گرم بر لیتر در آب‌مقطر حل و به‌مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه اتوکلاو شدند. پس از اتوکلاو عصاره قارچی فیلتر شد تا کاملاً عصاره شفاف شده و سلول‌ها حذف شوند. درنهایت عصاره فیلتر شده به‌عنوان الیسیتور استفاده شد (*نامدو* و همکاران، 2002). برای اعمال تیمار، استوک ۲۵۰ پی‌پی‌ام از عصاره‌های قارچی تهیه شد و پس از اتوکلاو کردن عصاره‌ها، عصاره قارچ به‌ترتیب جدول (۳-۴)، *P. indica* ۱ درصد، عصاره قارچ *T. tomentosum* ۱ درصد و هم‌چنین اثر متقابل هر دو قارچ از ترکیب عصاره‌های قارچ *P. indica* و *T. tomentosum* با غلظت ۱ درصد حجم به حجم در سه تکرار به سوسپانسیون سلولی اضافه شد (*تشکری* و همکاران، 2016). نمونه‌برداری از سلول‌ها در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام گرفت (حسنلو و همکاران، ۱۳۹۲). برای نمونه‌برداری، سوسپانسیون سلولی توسط قیف بوخنر فیلتر شده و سلول‌ها جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه با قرار گرفتن در دمای ۵۰ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت خشک و در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شدند.

عصاره‌گیری، کروماتوگرافی و تجزیه داده‌ها

جهت عصاره‌گیری، نمونه‌های خشک شده با استفاده از هاون به‌طور کامل خرد شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از آن در درون لوله دو میلی‌لیتری ریخته و پس از آن یک میلی‌لیتر متانول به آن‌ها اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه شیک و سپس به‌مدت یک ساعت درون دستگاه اولتراسونیک با دمای ۳۰ درجه قرار داده شد. پس از اولترا سونیکاسیون، سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ و زمان ۱۵ دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته و درون تیوپ جدید ریخته شد *پن* و همکاران (Pan *et al.*, 2010). برای اطمینان از شفاف بودن عصاره مرحله آخر که سانتریفیوژ است دو بار تکرار شد.

ابتدا استانداردهای وین‌بلاستین (کد V۰۳۰۰۰ شرکت سیگما آلدریک) و وین‌کریستین (کد V۷۹۸۸ سیگما) خریداری

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس ۰/۵ میلی‌گرم از هرکدام وزن شد و سپس وین‌کریستین در ۰/۵ میلی‌لیتر متانول HPLC گرید و وین‌بلاستین در ۰/۵ میلی‌لیتر استونیتریل حل گردید.

به‌منظور رسم منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (پی‌پی‌ام) وین‌کریستین و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر وین‌بلاستین تهیه و ۲۰ میکرولیتر به‌دستگاه HPLC تزریق گشت. جذب نوری در ۲۱۰ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردید.

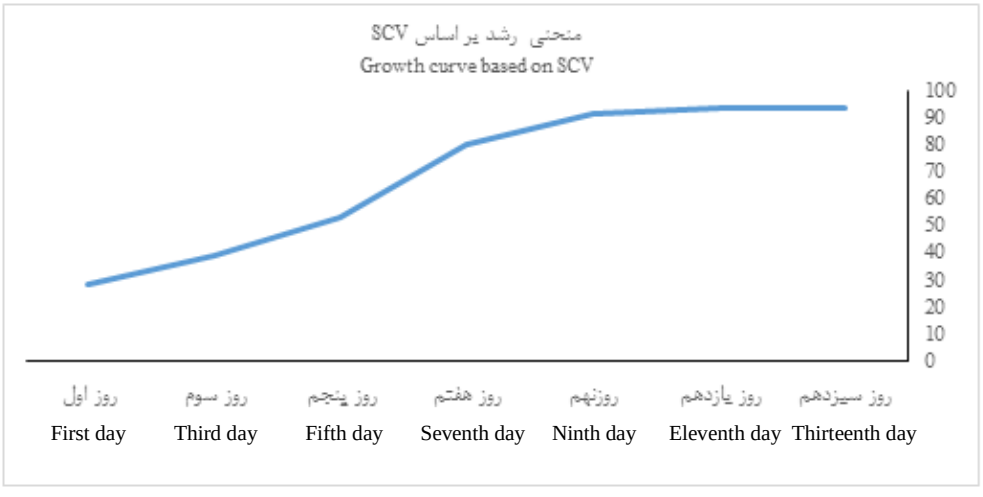
کروماتوگرافی با استفاده از دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER آلمان، UV دتکتور و با ستون C هجده (میلی‌متر 4/6×250 میکرومتر TSKgel-ODS-looV 5) (ساخت شرکت TOSOH BIOSCIENCE ژاپن) انجام شد. برای فاز متحرک دستگاه از محلول آب HPLC و استونیتریل با نسبت ۵۰:۵۰ استفاده شد. سرعت حرکت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود و جذب نوری در طول‌موج ۲۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای انجام HPLC، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق گشت. و جذب نوری نمونه ها اندازه‌گیری شد. میزان آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در تیمارهای مختلف محاسبه و مقایسه شد *سراوانان* و همکاران (Saravanan *et al.*, 2014).

در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد و برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند.

نتایج

سوسپانسیون سلولی پروانش تهیه شد (شکل ۱) و با توجه به نتایج رسم منحنی رشد سلولی براساس SCV (شکل ۲) و شمارش سلولی (شکل ۳) مشخص شد که بهترین زمان برای اعمال تیمار روز هفتم پس از یکنواخت‌سازی سلول‌ها بود. منحنی استاندارد معرف‌های وین‌کریستین و وین‌بلاستین مطابق شکل (۴ و ۵)رسم گردید و با توجه به آن داده‌های HLLC اندازه‌گیری شد.

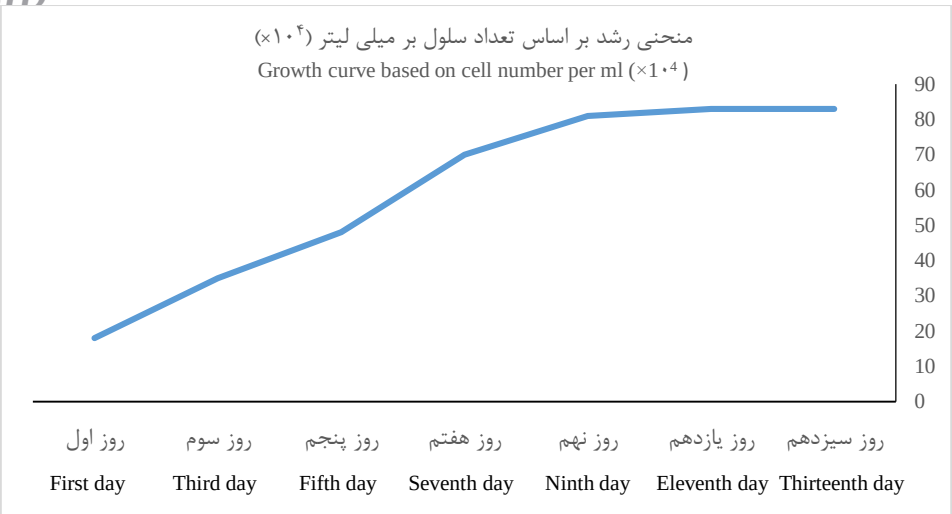
شکل ۱: سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش
Fig. 1: Periwinkle plant cell suspension



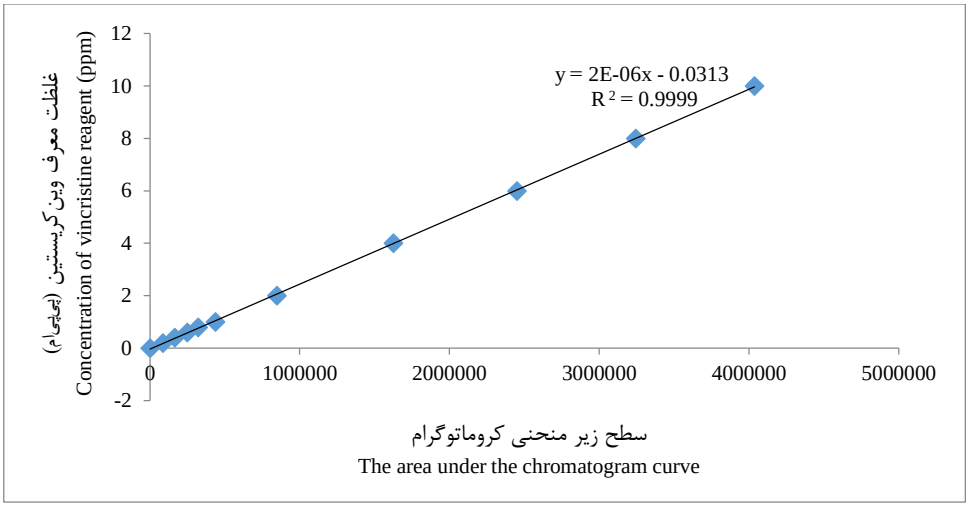
شکل ۲: منحنی رشد سلول‌ها براساس اندازه‌گیری SCV
Fig. 2: Cell growth curve based on measurement SCV

www.SID.ir

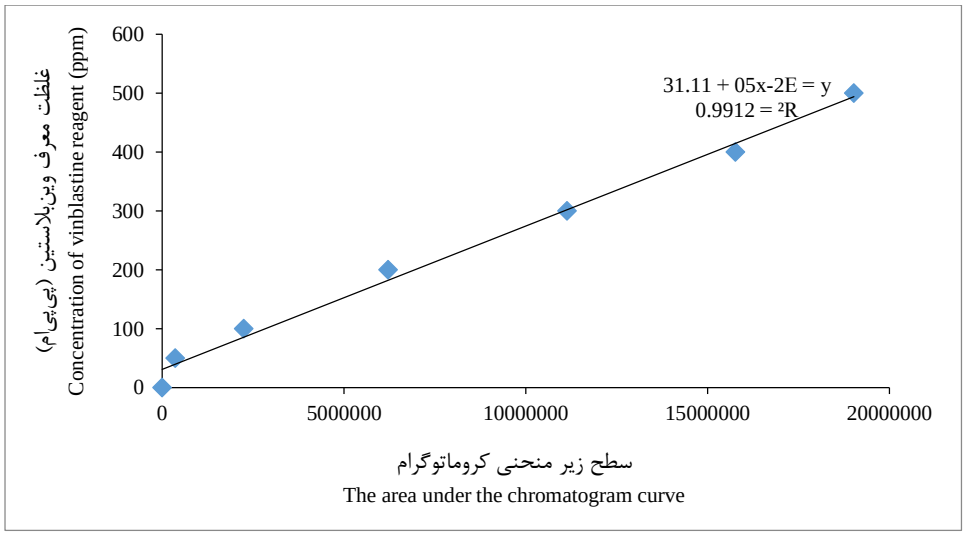
Archive of SID



شکل ۳: منحنی رشد سلول‌ها براساس شمارش سلولی
Fig. 3: Cell growth curve based on cell counting



شکل ۴: منحنی استاندارد معرف وین‌کریستین
Fig. 4: Vincristine standard curve



شکل ۵: منحنی استاندارد معرف وین‌بلاستین
Fig. 5: Vinblastine standard curve

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر عصاره قارچی و زمان بر میزان وین‌بلاستین

نتایج تجزیه واریانس وین‌بلاستین در تیمار عصاره قارچی و زمان نشان داد که تأثیر عصاره‌های قارچی و زمان و اثر متقابل عصاره و زمان بر روی تولید وین‌بلاستین در سطح ۱٪ معنی‌دار بوده است (جدول ۱).

مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و عصاره قارچی نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید وین‌بلاستین مربوط به زمان ۴۸ ساعت برای عصاره‌های قارچی *Priformospora* و *Trichoderma* بود (شکل ۶).

تأثیر عصاره قارچی و زمان بر میزان وین‌کریستین

نتایج تجزیه واریانس مقدار وین‌کریستین نشان داد که اثر عصاره‌های قارچی و زمان و اثر متقابل آن‌ها بر میزان تولید وین‌کریستین در سطح ۱٪ معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

مقایسه اثر متقابل تیمارهای عصاره قارچی و زمان نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید وین‌کریستین در زمان ۷۲ ساعت و مربوط به عصاره قارچ *Priformospora* و کم‌ترین آن در زمان ۴۸ ساعت مربوط به عصاره‌های قارچ *Priformospora* و *Trichoderma* بود (شکل ۷).

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس میزان وین‌بلاستین تحت تأثیر عصاره‌های قارچی و زمان

Table 1: Results of variance analysis of vinblastine levels under the influence of fungal extracts and time

منابع تغییر S.O.V.	مجموع مربعات SS	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
عصاره قارچ Fungal extract	1.168	3	0.389**
زمان Time	2.729	3	0.910**
عصاره قارچ × زمان Fungal extract × Time	3.650	9	0.406**
خطا Error	3.420	32	0.107
کل Total	553.088	48	
			CV= 9.7

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

**: Significant at the 1% level

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس میزان وین کریستین تحت تأثیر عصاره‌های قارچی و زمان

Table 2: Results of variance analysis of vincristine levels under the influence of fungal extracts and time

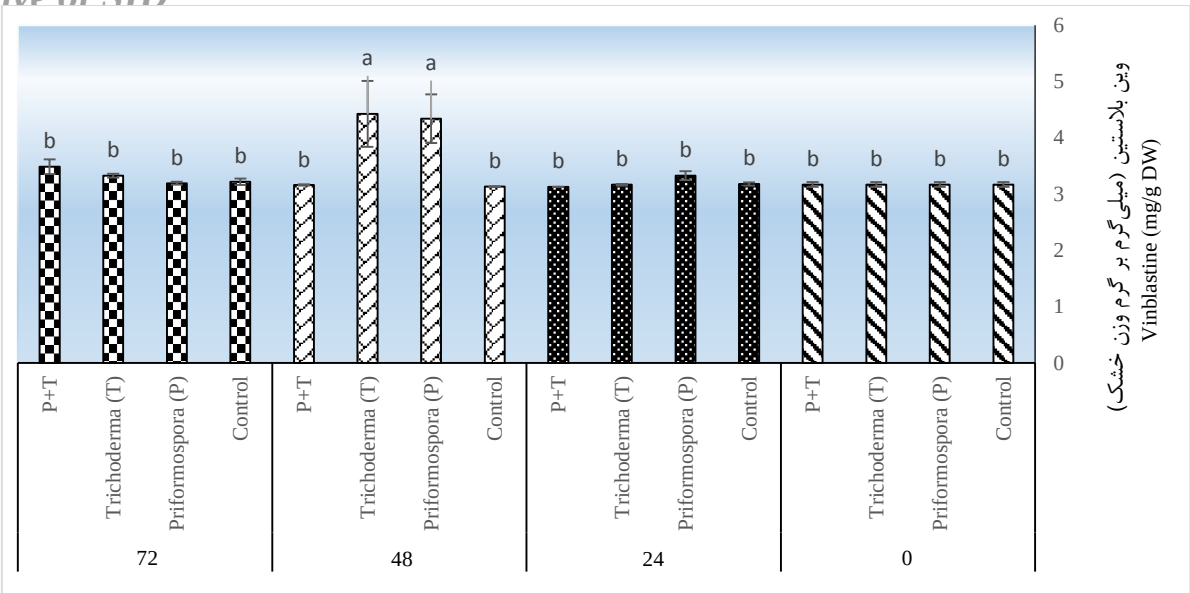
منابع تغییر S.O.V.	مجموع مربعات SS	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
عصاره قارچ Fungal extract	1.236	3	0.997**
زمان Time	2.990	3	0.412**
عصاره قارچ × زمان Fungal extract × Time	3.635	9	0.404**
خطا Error	2.635	32	0.085
کل Total	17.109	48	
			CV= 17.7

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

**: Significant at the 1% level

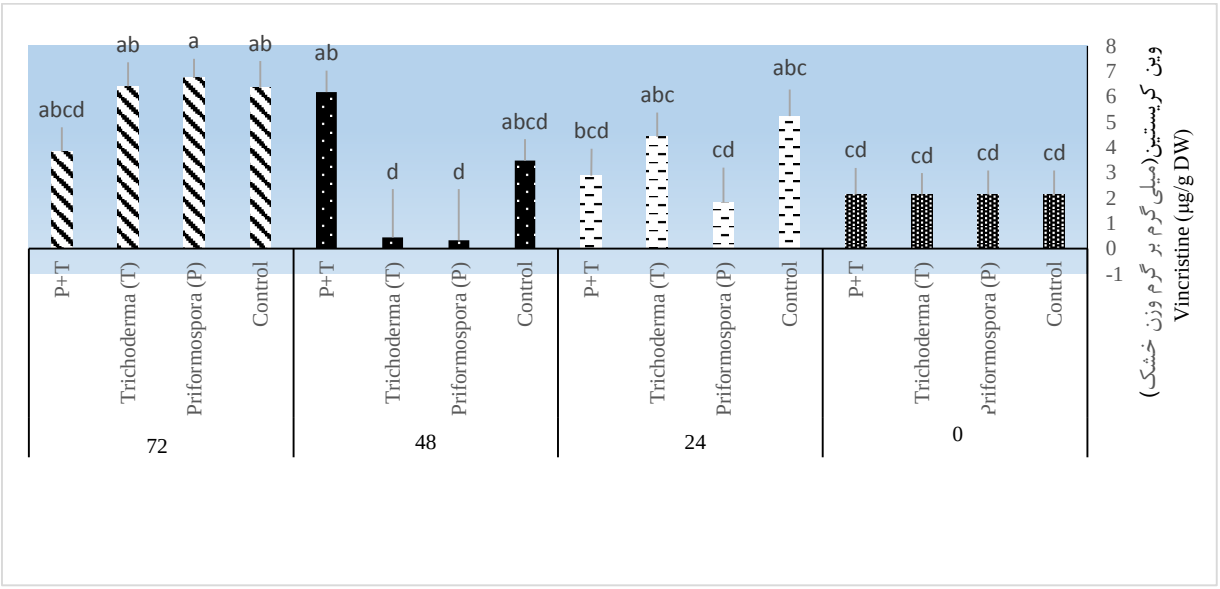
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: مقایسه میانگین تولید وین‌بلاستین بین تیمارهای عصاره قارچی در زمان‌های مختلف

Fig. 6: The average comparison of vinblastine between fungal extract in different time period

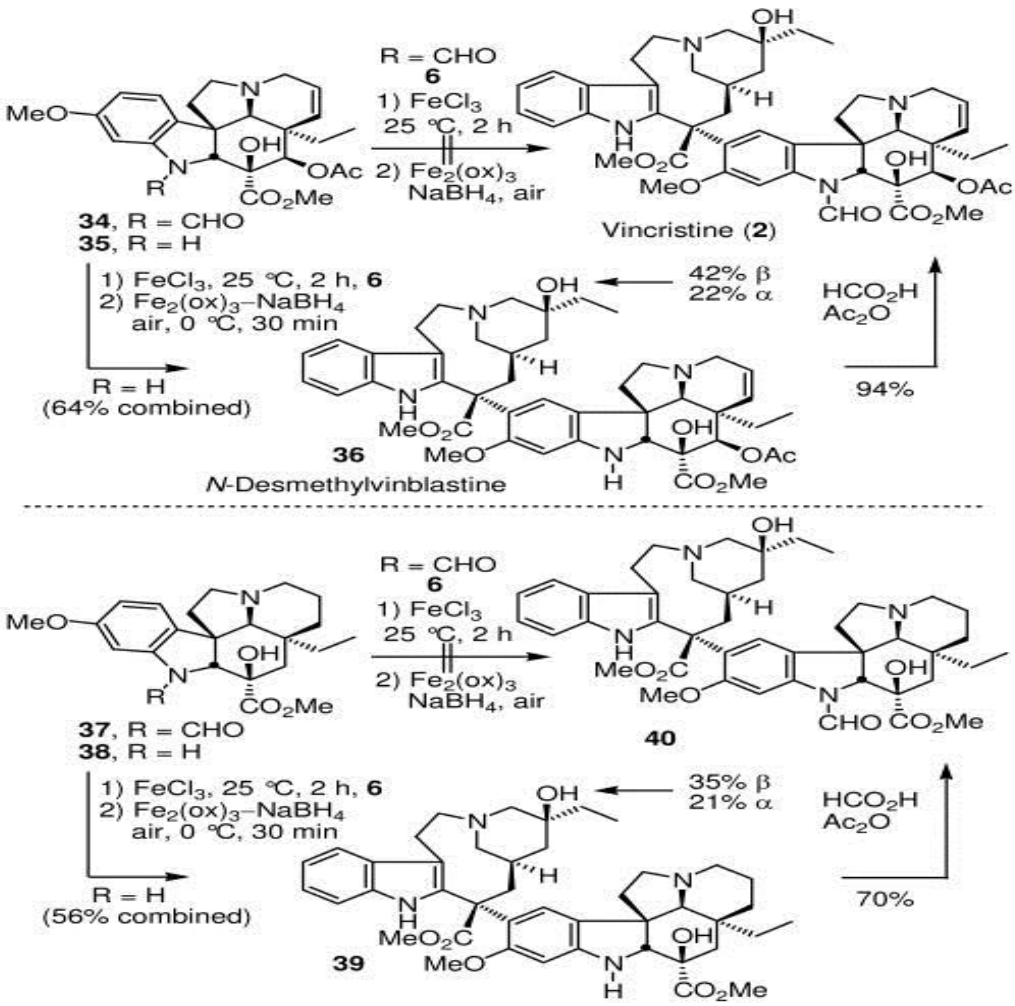


شکل ۷: مقایسه میانگین وین‌کریستین بین عصاره‌های قارچی در زمان‌های مختلف

Fig. 7: The average comparison of vincristine between fungal extract in different time period

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸: واکنش تبدیل وین‌بلاستین به وین‌کریستین
Fig. 8: The reaction of vinblastine to vincristine

بحث

تأثیر الیسیتور روی افزایش و یا کاهش متابولیت ثانویه به عوامل متعددی بستگی دارد که یکی از این عوامل نوع الیسیتور است و زمانی که الیسیتور مورد استفاده عصاره قارچی باشد به نوع عصاره قارچی بستگی دارد *اسماعیل‌زاده* و همکاران (Esmaeilzade *et al.*, 2011). عصاره قارچ‌های مختلف روی گیاهان مختلف و متابولیت‌های مختلف تأثیر متفاوتی دارند به‌عنوان مثال قارچ‌هایی مانند *Penicillium citrium* و *P. spimulorum* باعث افزایش تولید آجمالیسین در کشت سلول *C. roseus* شده‌اند و عصاره قارچ *Absidia cristata* باعث افزایش تولید سرپنتین می‌شود درحالی‌که عصاره قارچ *Mucor* اثر ضعیفی دارد *تانگ* و همکاران (Tang *et al.*, 2011). عامل دیگری که بر روی تولید متابولیت ثانویه اثر می‌گذارد نوع متابولیت ثانویه است. عصاره یک نوع قارچ و یک نوع الیسیتور ممکن است اثر متفاوتی روی دو متابولیت ثانویه مختلف بگذارد. به‌طور مثال در بررسی اثر عصاره قارچی *Phytium* بر میزان آلکالوئید آجمالیسین، فنل، ترپنوئیدها و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فنول در ریشه موئین پروانش، عصاره قارچی باعث افزایش آجالیسین ولی کاهش میزان فنول، ترپنوئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر ترپنوئیدی شد *مورنو* و همکاران (Moreno *et al.*, 1996). یک از عوامل دیگر که روی تأثیر الیسیتور بر متابولیت ثانویه نقش دارد غلظت الیسیتور است. به‌عنوان مثال غلظت بالای الیسیتور قارچی *Rhizopus stolonifera* (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در کشت سلول سرخدار منجر به بیش‌ترین میزان مرگ سلول‌ها و کم‌ترین میزان تاکسول شده است، درحالی‌که غلظت پایین آن (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منجربه تولید بیش‌ترین میزان تاکسول و کم‌ترین میزان مرگ و میر سلول‌ها شده است (*خسروشاهی* و همکاران (Khosroushahi *et al.*, 2006). مدت زمانی که سلول‌ها در معرض الیسیتور قرار می‌گیرند نیز نقش مهمی در میزان تولید متابولیت‌های ثانوی دارد. در کشت سلولی کتان سفید حضور الیسیتورهای قارچی در زمان‌های مختلف اثر متفاوتی بر میزان

www.SID.ir

Archive of SID

لیگنان دارد. به گونه‌ای که بیش‌ترین میزان پدوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در سلول‌های کتان سفید تیمار شده با الیسیتورهای قارچی *Fusarium graminearum*، *Rhizoctonia solani*، *Rhizopus stolonifera* و *Trichoderma viride* در روز پنجم بعد از تیمار و عصاره قارچ *Sclerontinia sclerotiorum* در روز سوم پس از تیمار مشاهده شد (*اسماعیل‌زاده* و همکاران، 2011). افزایش میزان وین‌بلاستین در تحقیق حاضر ممکن است به‌دلیل وجود ترکیبات ناشناخته مثل ایندول استیک اسید، فلاونوئیدها و آنزیم‌های دیواره سلولی مانند سلولاز و زایلاناز و ترکیباتی مثل الیگوساکاریدها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدها در عصاره قارچ باشد که می‌توانند به‌عنوان محرک عمل کنند (*کومار* و همکارن، 2016). هم‌چنین علت افزایش میزان وین‌بلاستین توسط عصاره قارچی ممکن است به‌دلیل فعال شدن مسیرهای دفاعی گیاه توسط ترکیبات دیواره سلولی قارچ باشد. فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه منجر به ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک شده که تصور می‌شود نقش مهمی در فعالیت دفاعی گیاه دارند (*الهاوات* و همکاران، 2016). احتمال دیگری که در مکانیسم اثر عصاره قارچی بر افزایش متابولیت ثانویه دارد این است که ترکیبات عصاره قارچ با تأثیر بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی وین‌بلاستین و افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی باعث افزایش تولید وین‌بلاستین شده است. در تحقیق *کیم* و همکاران الیسیتور زیستی باعث افزایش بیان ژن‌ها در سوسپانسیون سلولی برنج رشد *کیم* و همکاران (Kim *et al.*, 2000). شناسایی ترکیبات فعال عصاره‌های قارچی در درک مکانیسم برهم‌کنش سلول‌های گیاهی-الیسیتورهای قارچی و پاسخ‌های دفاعی کمک خواهد کرد. هم‌چنین نتایج نشان داد که اثر هر دو عصاره قارچ هم‌زمان بر میزان وین‌بلاستین تأثیرگذار نبود. این ممکن است به این دلیل باشد که وجود هورمون‌ها و آنزیم‌ها در ترکیب عصاره دو قارچ به یک تعادلی مشابه تعادل اولیه سوسپانسیون سلولی رسیده باشد و درنتیجه تغییر قابل مشاهده‌ای در میزان تولید متابولیت ثانویه ایجاد نکرده باشد (*کومار* و همکاران، 2016).

در مسیر بیوسنتز این دو آلکالوئید در پروانش، ابتدا وین‌بلاستین سنتز می‌شود و سپس وین‌بلاستین با از دست دادن گروه متیل دمتیله شده و سپس واکنش فرمیلاسیون صورت گرفته و با گرفتن گروه فرمیل وین‌بلاستین به وین‌کریستین تبدیل می‌شود (*ایشیکاوا* و همکاران Ishikawa *et al.*, 2009) که در این میان اسید انیدریک HC_2O و اسید فرمیک HCOOH نیز در انجام این واکنش نقش دارند (شکل 8). ممکن است عصاره قارچی با تأثیر بر این دو ترکیب و تأثیر بر دمتیلاسیون و فرمیلاسیون وین‌بلاستین باعث کاهش میزان تولید وین‌کریستین شده باشند. نتایج مشابه، تحقیق *سراوانان* و همکاران است که اثر CO_2 را بر میزان بیوسنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین بررسی کردند و در نتایج آن‌ها میزان وین‌کریستین علی‌رغم افزایش وین‌بلاستین در ماه ششم آزمایش نسبت به ماه اول آزمایش کاهش داشت (*سراوانان* و همکاران، 2014).

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۰-۱۱ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir