

تأثیر ایسیتورهای 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 رضانی^۱، رحیم حداد^{۲*} و بهنام صداقتی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۰۵

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) گیاهی دارویی است که به دلیل تولید آلکالوئیدهای فراوان از جمله داروهای ضدسرطان وین کریستین و وین بلاستین اهمیت دارد. وین کریستین و وین بلاستین از جمله مهم‌ترین داروها در درمان سرطان می‌باشند ولی باین حال عملکرد این دو ترکیب به طور 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 به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. به این منظور بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی، عصاره قارچ‌های *Priformospora* و *Trichoderma tomentosum* *indica* و ترکیب عصاره‌های قارچی *p. indica* و *T. tomentosum* با غلظت ۱٪ حجمی - حجمی به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. نمونه برداری در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام شد و میزان آلکالوئیدهای وین بلاستین و وین کریستین 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 وین بلاستین نسبت به شاهد شد و بیش‌ترین تأثیر مربوط به عصاره قارچ *T. tomentosum* بود. مقایسه میانگین میزان وین کریستین بین عصاره‌های قارچی نشان داد که بیش‌ترین میزان وین کریستین در نمونه شاهد بود و عصاره‌های قارچی باعث کاهش میزان وین کریستین شد.

واژه‌های کلیدی: عصاره قارچی، سوسپانسیون سلولی، وین کریستین، وین بلاستین، پروانش

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

Email: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

*: نویسنده مسوول

گیاه پروانش (*Catharanthus roseuse*) یکی از گیاهان دارویی مهم خانواده خرزه گیان است که متابولیت‌های ثانویه زیادی تولید می‌کند. این گیاه حاوی ۱۳۰ نوع ایندول آلکالوئید است ساین و شارما (Sain and Sharma, 2013) و از دوران باستان به دلیل ترکیبات فیتوشیمیایی و اثر درمانی‌اش مورد استفاده قرار گرفته است. متابولیت‌های ثانویه گیاه پرپوش خواص دارویی مختلفی از جمله خواص ضدسرطان، ضددیابت، ضداسهال، ضد میکروبی دارد. آلکالوئیدهایی مثل وین‌بلاستین و وین‌کریستین که به طور عمده در بخش‌های هوایی گیاه وجود دارند، از جمله متابولیت‌های ثانویه هستند که در درمان انواع سرطان‌های انسان استفاده می‌شوند/سلام و همکاران (Aslam et al., 2010). این آلکالوئیدها میوز را در مرحله متافاز متوقف کرده و با اتصال به توبولین‌ها مانع از تشکیل دوک تقسیم می‌شوند و به این ترتیب اثر مهار رشدی بر برخی از تومورهای انسان 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 سرطان خون کودکان استفاده می‌شود. با این‌که داروهای وین‌کریستین و وین‌بلاستین از جمله مهم‌ترین داروها در درمان سرطان می‌باشند ولی باین‌حال عملکرد این دو ترکیب به طور نسبی پایین و مقدار تقریبی آن‌ها در گیاه ۰/۰۰۵ 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 است. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که می‌توانند از طریق القاء پاسخ‌های دفاعی و تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی شوند. الیسیتورهای زیستی شامل، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولوز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشند. الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص باشند مانند کیتین و کیتوزان و یا مانند همگنای قارچ و عصاره مخمر مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند. الیسیتورهای زیستی به طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهان دارویی زیادی به کار رفته‌اند. دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از الیسیتورهای زیستی 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 شریفی (۱۳۹۱). نامدو و همکاران (Namdeo et al., 2002) تأثیر الیسیتورهای قارچی را بر تولید آجمالیسین در کشت سو سپانسیون سلولی پروانش بررسی کردند. آن‌ها اثر عصاره قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Fusarium moniliforme* را در غلظت‌های ۰/۵ و ۵ درصد حجم به حجم و زمان‌های مختلف بر روی سو سپانسیون 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 ریشه موئین و تولید لیگنان‌ها در ریشه موئین کتان مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها غلظت‌های مختلف عصاره قارچ *P. indica* شامل غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ درصد حجم به حجم بر روی ریشه موئین کتان اعمال کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره ۳ درصد حجم به حجم قارچ *P. indica* پدوفیلوتوکسین را به میزان ۳/۸ برابر و میزان متوکسی 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 پلی‌ساکاریدی را بر میزان بیوسنتز تانوشینون در ریشه موئین مریم‌گلی بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که *Trichoderma atroviride* و (PSF) هر دو اثر مثبتی بر میزان تولید تانوشینون داشتند. جایارامان و محمد (Jayaraman and Mohamed, 2015) تأثیر عصاره قارچ *Trichoderma Aquilaria malaccensis* Lam درخت گرمسیری مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها میزان ۸ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره قارچ *Trichoderma malaccensis* را به سو سپانسیون سلولی درخت *A. malaccensis* اضافه کردند و میزان ماده معطر سو سپانسیون را اندازه گرفتند. اندازه‌گیری آگار چوب توسط GC-MS نشان داد عصاره قارچ تأثیر مثبتی بر میزان آگار چوب داشت. تشکری و همکاران (2016) تأثیر عصاره قارچ *P. indica* را بر میزان لیگنان و اسید فنولیک در ریشه موئین کتان مورد بررسی قرار دادند در این تحقیق آن‌ها ریشه موئین کتان را با عصاره ۱ درصد حجم به حجم قارچ *P. indica* تیمار کردند. نتایج نشان داد عصاره قارچ باعث کاهش رشد شده ولی بعد از ۲۴ ساعت موجب افزایش اسید فنولیک گردید. اهلاوات و همکاران (Ahlawat et al., 2016) تأثیر عصاره قارچ *P. indica* را بر بیوسنتز ویتافرین A (Withaferin A) در سو سپانسیون سلولی

و سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا رشد میسلیومها و اسپورزایی قارچ به حداکثر زیست توده خود برسد. قارچ *T. tomentosum* نیز ابتدا در محیط کشت 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 این که رشد قارچها به حد کافی رسید، زیست توده زنده قارچها که شامل میسلیومها و اسپورهای قارچی بود توسط کیف بوختر فیلتر شدند و سپس سلولهای قارچی به مدت 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 آب مقطر حل و به مدت 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. در نهایت عصاره فیلتر شده به عنوان الیسیتور استفاده شد (نامدو و همکاران، ۲۰۰۲). برای اعمال تیمار، استوک ۲۵۰ پی پی ام از عصاره های قارچی تهیه شد و پس از اتوکلاو کردن عصاره ها، عصاره قارچ به ترتیب جدول (۳-۴)، *P. indica* ۱ درصد، عصاره قارچ *T. tomentosum* ۱ درصد و هم چنین اثر متقابل هر دو قارچ از ترکیب عصاره های قارچ *P. indica* و *T. tomentosum* با غلظت ۱ درصد حجم به حجم در سه تکرار به سوسپانسیون سلولی اضافه شد (تشکری و همکاران، ۲۰۱۶). نمونه برداری از سلولها در زمانهای صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام گرفت (حسنلو و همکاران، ۱۳۹۲). برای نمونه برداری، سوسپانسیون سلولی توسط کیف بوختر فیلتر شده و سلولها جهت اندازه گیری متابولیت های ثانویه با قرار گرفتن در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

عصاره گیری، کروماتوگرافی و تجزیه داده ها

جهت عصاره گیری، نمونه های خشک شده با استفاده از هاون به طور کامل خرد شد. ۱۰۰ میلی گرم از آن در درون لوله دو میلی لیتری ریخته و پس از آن یک میلی لیتر متانول به آن ها اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه شیک و سپس به مدت یک ساعت درون دستگاه اولتراسونیک با دمای ۳۰ درجه قرار داده شد. پس از اولترا سونیکا سیون، 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 وین بلاستین (کد ۷۰۳۰۰۰ شرکت سیگما آلدریک) و وین کریستین (کد ۷۷۹۸۸ سیگما) خریداری

Withania somnifera بر سی کردند. آنها غلظت های مختلف عصاره قارچ *P. indica* شامل غلظت های 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 زیست توده و تولید ویتافین A دارد.

در مطالعه حاضر تأثیر الیسیتورهای زیستی عصاره قارچ های *P. indica* و *Trichoderma tomentosum* بر میزان تولید وین کریستین و وین بلاستین در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش بررسی شده است.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی و سوسپانسیون سلولی

ابتدا بذور گیاه پروانش از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تهیه گیاهچه استریل بذور با استفاده از قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شده و پس از سه بار شست و شو با آب مقطر استریل، درون محیط کشت MS بدون هورمون کشت داده شد. نمونه ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. پس از جوانه زنی گیاه و تهیه گیاهچه استریل به منظور تهیه کالوس ریزنمونه های مناسب از ریشه گیاه برش داده شد و درون محیط کشت MS حاوی هورمون یک میلی گرم بر لیتر 2,4-D کشت داده شد. به مدت یک ماه درون اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه و تاریکی کامل قرار داده شدند.

برای تهیه سوسپانسیون سلولی کالوس های نرم و با رنگ روشن درون محیط MS حاوی یک میلی گرم بر لیتر هورمون 2,4-D درون ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری 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 واکش های متوالی تکثیر شد. منحنی رشد سلولها از طریق روش اندازه گیری حجم سلول های ساکن (SCV: Settled Cell Volume) و اندازه گیری شمارش سلولی تعیین گردید فرجامی نژاد و همکاران (Farjaminezhad et al., 2013).

آماده سازی و به کار گیری عصاره قارچی

قارچ اندوفیت *P. indica* در محیط کشت جامد کفر (Käfer, 1997) کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. قارچ سپس به محیط کشت مایع کفر منتقل و به مدت دو هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد

گشت. و جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. میزان آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در تیمارهای مختلف محاسبه و مقایسه شد *سرانوان 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.

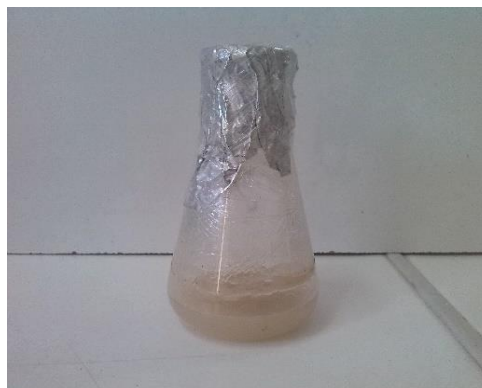
نتایج

سوسپانسیون سلولی پروانش تهیه شد (شکل ۱) و با توجه به نتایج رسم منحنی رشد سلولی بر اساس 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.

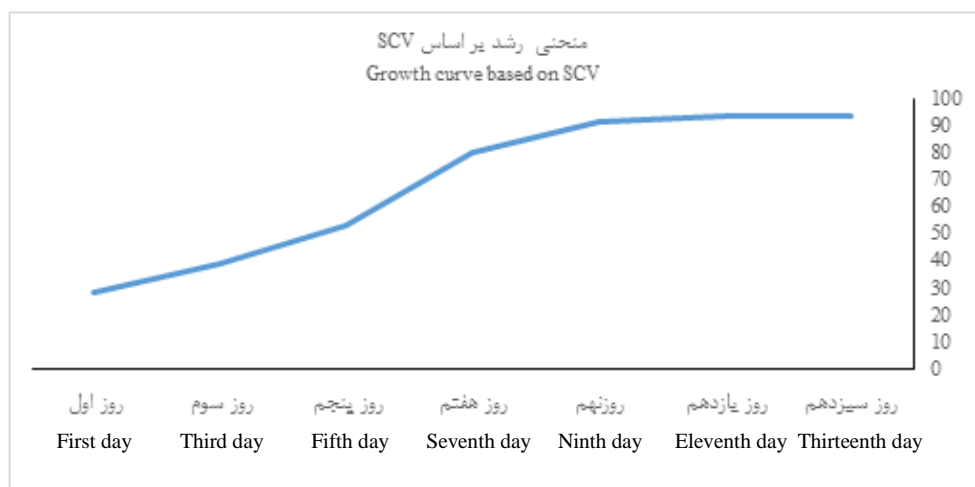
شد. سپس ۰/۵ میلی‌گرم از هرکدام وزن شد و سپس وین‌کریستین در ۰/۵ میلی‌لیتر متانول HPLC گرید و وین‌بلاستین در ۰/۵ میلی‌لیتر استونیتریل حل گردید.

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.

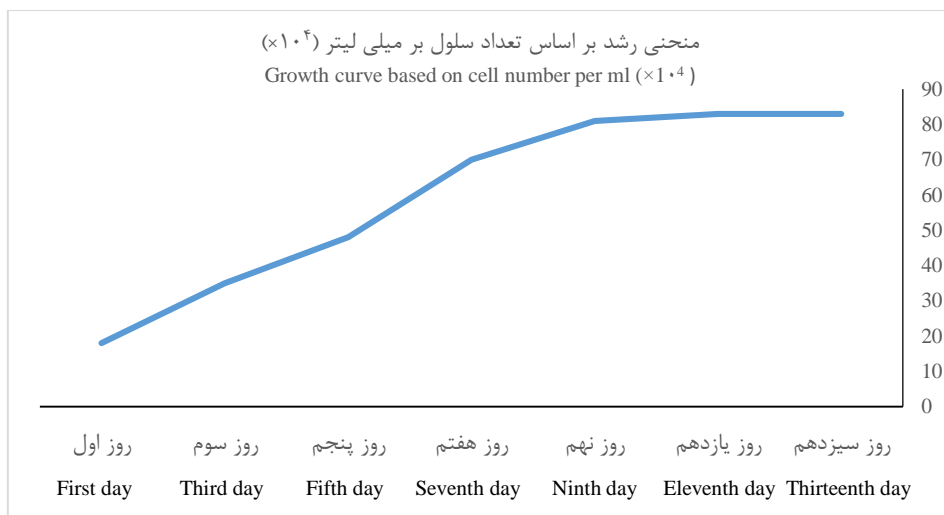
کروماتوگرافی با استفاده از دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER آلمان، UV دکتور و با ستون C هجده (میلی‌متر 4/6×250 میکرومتر TSKgel-ODS-100V 5) (ساخت شرکت TOSOH BIOSCIENCE ژاپن) انجام شد. برای فاز متحرک دستگاه از محلول آب HPLC و استونیتریل با نسبت ۵۰:۵۰ استفاده شد. سرعت حرکت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود و جذب نوری در طول موج ۲۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای انجام HPLC، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق



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

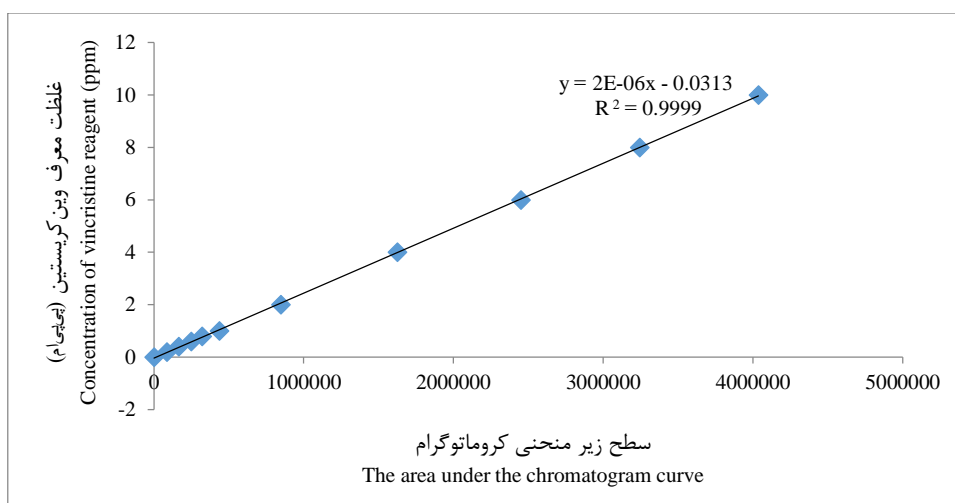


شکل ۲: منحنی رشد سلول‌ها بر اساس اندازه‌گیری SCV
Fig. 2: Cell growth curve based on measurement SCV



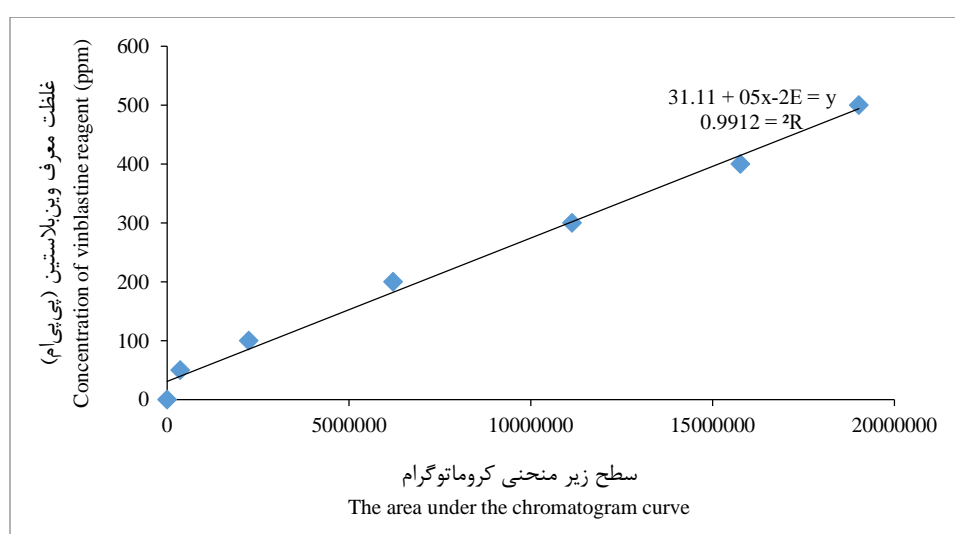
شکل ۳: منحنی رشد سلول‌ها بر اساس شمارش سلولی

Fig. 3: Cell growth curve based on cell counting



شکل ۴: منحنی استاندارد معرف وین کریستین

Fig. 4: Vincristine standard curve



شکل ۵: منحنی استاندارد معرف وین بلاستین

Fig. 5: Vinblastine standard curve

تأثیر عصاره قارچی و زمان بر میزان وین بلاستین

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

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

تأثیر عصاره قارچی و زمان بر میزان وین کریستین

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

مقایسه اثر متقابل تیمارهای عصاره قارچی و زمان نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید وین کریستین 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 وین بلاستین 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

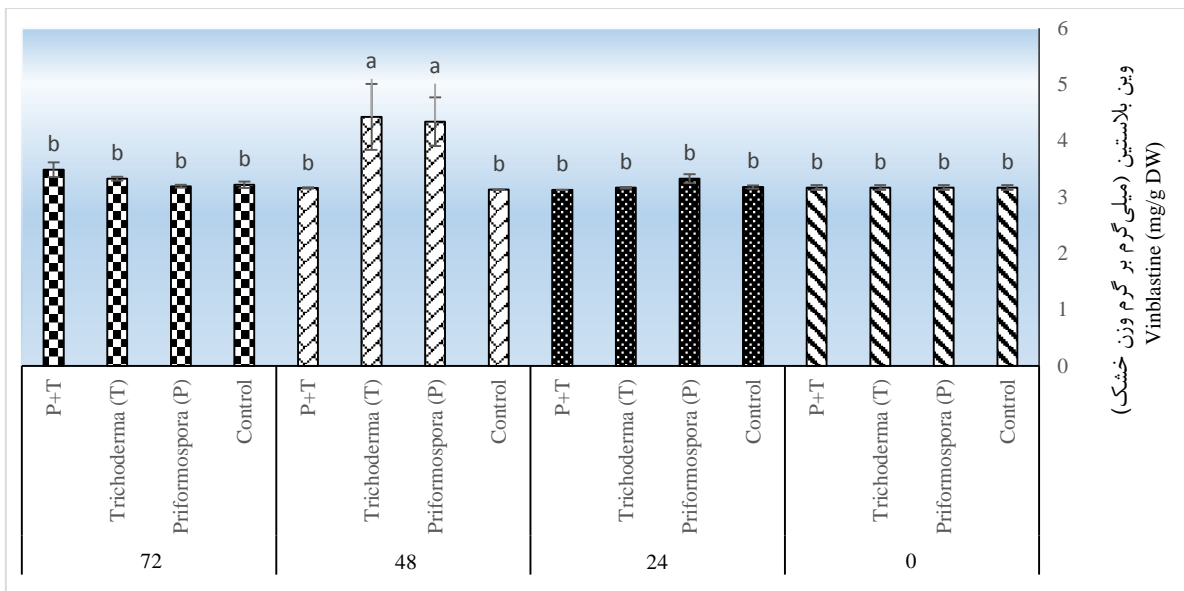
Table 2: Results of variance analysis of vincristine levels under the influence of fungal extracts and time

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	

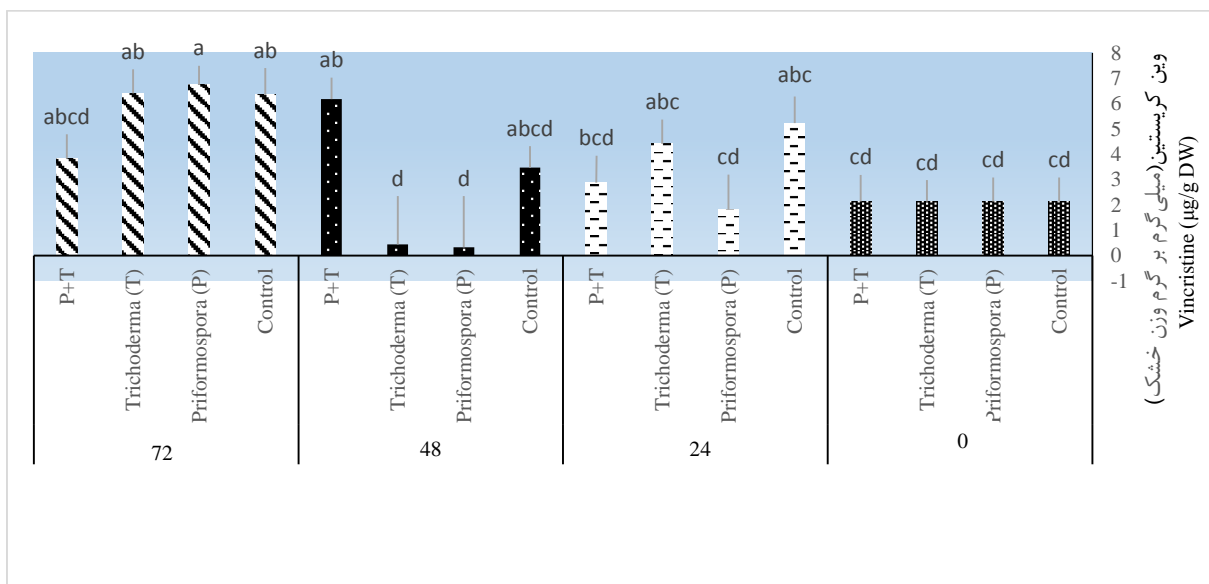
CV= 17.7

***: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

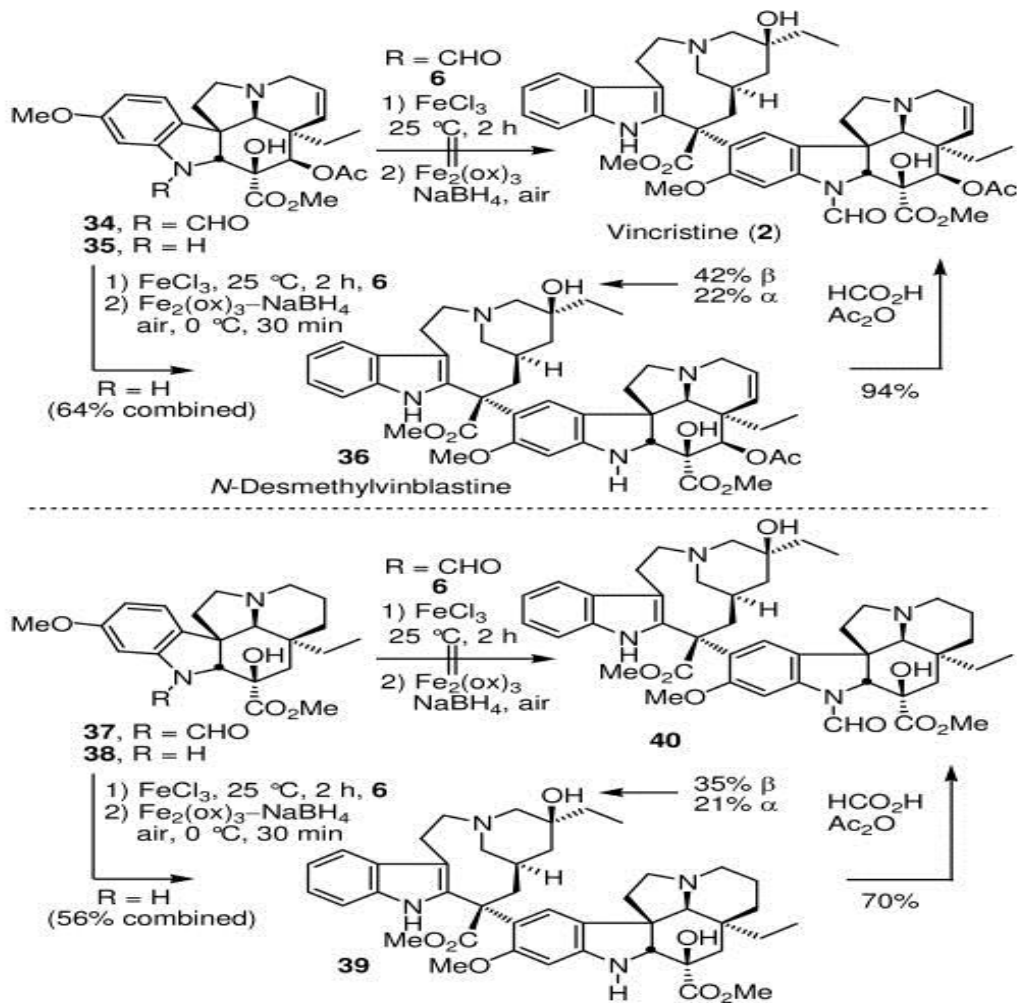
***: Significant at the 1% level



شکل ۶: مقایسه میانگین تولید وین بلاستین 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 وین کریستین بین عصاره‌های قارچی در زمان‌های مختلف
 Fig. 7: The average comparison of vincristine between fungal extract in different time period



شکل ۸: واکنش تبدیل وین بلاستین به وین کریستین
Fig. 8: The reaction of vinblastine to vincristine

بحث

آلکالوئید آجمالیسین، فنل، ترپنوئیدها و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فنول در ریشه موئین پروانش، عصاره قارچی باعث افزایش آجمالیسین 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 ایسیتور بر متابولیت ثانویه نقش دارد غلظت ایسیتور است. به‌عنوان مثال غلظت بالای ایسیتور 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) منجر به 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 ایسیتور قرار می‌گیرند نیز نقش مهمی در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه دارد. در کشت سلولی کتان سفید حضور ایسیتورهای قارچی در زمان‌های مختلف اثر متفاوتی بر میزان

تأثیر ایسیتور روی افزایش و یا کاهش متابولیت ثانویه به عوامل متعددی بستگی دارد که یکی از این عوامل نوع ایسیتور است و زمانی که ایسیتور مورد استفاده عصاره قارچی باشد به نوع عصاره قارچی بستگی دارد اسماعیل‌زاده و همکاران (Esmailzade *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 ایسیتور ممکن است اثر متفاوتی روی دو متابولیت ثانویه مختلف بگذارد. به‌طور مثال در بررسی اثر عصاره قارچی *Phytium* بر میزان

درک مکانیسم برهم کنش 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 در نتیجه 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 (یشیکاوا 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).

لیگنان دارد. به گونه‌ای که بیش‌ترین میزان پدوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در سلول‌های کتان سفید تیمار شده با الیسیتورهای قارچی *Rhizoctonia*، *Fusarium graminearum* و *Rhizopus stolonifera solani* و *Trichoderma viride* در روز پنجم بعد از تیمار و عصاره قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در روز سوم پس از تیمار مشاهده شد (اسماعیل‌زاده و همکاران، 2011). افزایش میزان وین‌بلاستین در تحقیق حاضر ممکن است به دلیل وجود ترکیبات ناشناخته مثل ایندول استیک اسید، فلاونوئیدها و آنزیم‌های دیواره سلولی مانند سلولاز و زایلناز و ترکیباتی مثل الیگوساکاریدها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدها در عصاره قارچ باشد که می‌توانند به‌عنوان محرک عمل کنند (کومار و همکاران، 2016). هم‌چنین علت افزایش میزان وین‌بلاستین توسط عصاره قارچی ممکن است به دلیل 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 (الهوات 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). شنا سایی ترکیبات فعال عصاره‌های قارچی در

منابع:

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