# بررسی اثر کادمیوم و نیکل بر الگوی تولید آلکالوئیدها در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

رسول قاسمی*[1]، مرضیه نخعی[2] و مهدی نریمانی[3]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، [2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز اصفهان، ایران و [3] گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ٩٣/٠٤/٢٠، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٣/٠٩/١٠)

**چکیده:**

**گیاه گرمسیری *Catharanthus roseus* حاوی آلکالوئیدهای با ارزش دارویی مانند وین‌بلاستین و آجمالیسین است. از آنجا که مقدار و الگوی تولید آلکالوئید تحت تاثیر عوامل محیطی مختلفی قرار می‌گیرد، در این مطالعه تاثیر دو عنصر کادمیوم و نیکل بر پارامترهای تولید آلکالوئید بررسی شد. گیاهان در شرایط گلخانه و با استفاده از بستر خنثی پرلیت و محلول غذایی کاشته شدند و در یک طرح بلوک کامل تصادفی با غلظت‌های مختلف کادمیوم و نیکل تیمار شدند. غلظت عناصر کادمیوم و نیکل، کلروفیل و آلکالوئید کل برگ‌ها اندازه‌گیری شد و الگوی باندهای آلکالوئیدها با روش کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از نور ماوراء بنفش و معرف‌های اختصاصی آلکالوئیدها (سریک آمونیوم سولفات و معرف دراژندورف) تعیین شد. نتایج نشان داد که علائم بارز سمیت کادمیوم در گیاه در غلظت ١٠ و بیشتر از آن و نیکل در غلظت ٥٠ میکرومولار و بالاتر با کاهش محتوای کلروفیل و کلروز بین رگبرگی بروز می‌کند. با افزایش غلظت، محتوای هر دو عنصر و آلکالوئید قابل استخراج افزایش یافت اما در شرایط غلظت بالای کادمیوم غلظت آلکالوئید کاهش یافت. الگوی کروماتوگرافی آلکالوئیدها نیز نشان دهنده بروز تفاوت‌هایی بود. تیمار با کادمیوم و نیکل باعث پیدایش و یا تشدید باندهای آلکالوئیدهای با RF متوسط مانند وینکولیدین و آلکالوئیدهای با RF کم مانند سرپنتین شد. بر این اساس کادمیوم و نیکل با افزایش تولید آلکالوئیدهای فراوانتر، افزایش تجمع برخی از آلکالوئیدهایی که در شرایط عادی به میزان کم در گیاه تولید می‌شوند و همچنین افزایش نسبت محتوای آلکالوئید سلول‌ها به بیوماس، بر افزایش محتوای آلکالوئیدی برگ‌ها اثر دارند.**

**کلمات کلیدی: آلکالوئید، پروانش، فلزات سنگین، کادمیوم، نیکل**

**مقدمه:**

گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) از تیره خرزهره (Apocynaceae) و بومی جزیره ماداگاسکار است. این گیاه به دلیل تولید آلکالوئیدهای بسیار ارزشمند ضد سرطان مانند وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) و همچنین آلکالوئید ضد فشار خون به نام آجمالیسین (Ajmalicine) توجه زیادی را به خود معطوف کرده است و بر همین اساس گیاه دارویی که بیشترین تحقیقات روی آن انجام شده است، لقب گرفته است (Verpoorte and Alfermann, 2000). علاوه بر این حدود ٦٣ نوع آلکالوئید دیگر که بسیاری از آنها حد واسط تولید سایر آلکالوئیدها هستند در پیکره این گیاه قابل شناسایی است (Verpoorte *et al.*, 1997). آلکالوئیدهای موجود در این گیاه از گروه ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها هستند. بیوسنتز آنها با اتصال دو پیش‌ساز تریپتامین (Tryptamine) حاصل از دکربوکسیلاسیون اسید آمینه تریپتوفان و سکولوگانین

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: ghasemi@nj.isfpnu.ac.ir

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

(Secologanine) شروع می‌شود. سکولوگانین خود در ادامه مسیر متابولیکی موالونات که منجر به بیوسنتز ایزوپرنوئیدها می‌شود، ساخته می‌شود. با اتصال بین تریپتامین و سکولوگانین توسط آنزیم استریکتوزیدین سنتاز (SSS) اولین ترپنوئید-ایندول آلکالوئید به نام استریکتوزیدین (Strictosidine) ساخته می‌شود و در ادامه، در مسیرهای بیوسنتزی مختلف منجر به تولید ده‌ها نوع آلکالوئید مختلف دیگر از جمله سرپنتین، آجمالیسین، ویندولین و کاتارانتین می‌شود. (El-Sayed and Verpoorte, 2007). با الحاق دو آلکالوئید ویندولین و کاتارانتین به یکدیگر در نهایت آلکالوئیدهای موسوم به بیس ایندول آلکالوئید مانند وین‌بلاستین و وین‌کریستین به وجود می‌آیند. همه مراحل مذکور مراحلی آنزیمی و کاملا تحت کنترل ژنتیکی گیاه می‌باشند و بسته به شرایط محیطی که گیاه در آن قرار می‌گیرد می‌تواند موجب بروز پاسخ‌های ویژه‌ای در گیاه گردد (El-Sayed and Verpoorte, 2007).

غلظت آلکالوئیدهای با ارزش تولید شده در این گیاه کم و یا بسیار کم است و از طرفی تولید مصنوعی این آلکالوئیدها نیز موفق نبوده است، روش‌ها و راهکارهای متعددی برای تحریک این گیاه برای تولید بیشتر آنها مورد آزمون قرار گرفته است که در بیشتر موارد نتیجه نهایی به تولید بیشتر محصول آلکالوئیدی منجر نشده است. در این میان می‌توان به موارد زیر که منجر به تغییر تولید آلکالوئیدهای مختلف شده است، اشاره کرد:

نور به دلیل اعمال اکسیداسیون موجب افزایش تبدیل آجمالیسین به سرپنتین (Loyola-Vergas *at al.*, 1992) و همچنین افزیش تولید ویندولین در کلروپلاست‌ها (St-pierre and Deluca, 1995) می‌شود. مواد شیمیایی مانند بتائین، اسید مالیک و تترا متیل آمونیوم بروماید تا شش برابر موجب افزایش تولید آجمالیسین می‌شود (Zhao *et al*., 2000c). افزودن پیش‌سازهای تولید انواع آلکالوئیدها مانند سکولوگانین موجب افزایش زیاد تولید برخی آلکالوئیدها مانند آجمالیسین شده است (Whitmer *et al*., 1998; Moreno *et al*., 1993). عوامل مهار کننده اکسیژناز به مقدار قابل توجهی تولید آلکالوئید lochnericine را در سیستم کشت ریشه مویین احتمالاً از طریق تاثیر بر آنزیم‌های سیتوکروم p450 که مسئول بیوسنتز این آلکالوئید هستند، کاهش می‌دهند (Morgan and Shanks, 1999). به طور کلی در بین عوامل هورمونی اکسین‌ها مهار کننده (Arvey *et al*., 1994) و سیتوکینین‌ها، آبسیزیک اسید و جاسمونیک اسید افزاینده تولید آلکالوئیدهایی مانند آجمالیسین و سرپنتین است (Garnier *et al*., 1996; Smith *et al*., 1987; El-Sayed and Verpoorte, 2002). سالیسیلیک اسید تاثیر زیادی بر تولید آلکالوئیدها در دانه رست‌ها و ریشه‌های مویین کشت شده ندارد (El-Seyed and Verpoorte, 2002) و سایر عوامل مانند الیسیتورهای قارچی و باکتریایی و نور ماوراء بنفش اثر محرک دارند (Smith *et al*. 1989; Moreno *et al*., 1996; Verpoorte *et al*. 1997). تنظیم بیوسنتز آلکالوئیدها در این گیاه تحت تاثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد. به عنوان مثال در حال حاضر پذیرفته شده که در شرایط کشت سلولی، نیتروژن و فسفات هر دو افزایش دهنده رشد و بازدارنده تولید آلکالوئیدها هستند و نسبت نیتروژن به کربن (کربن موجود در ترکیباتی مانند گلوکز یا ساکارز) در محیط کشت در مهار یا تحریک تولید آلکالوئید مؤثر است (Kubota *et al*., 1989; Scragg *et al*., 1990).

امروزه مهمترین راهی که برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مورد بحث است شامل استفاده از روش‌های مهندسی متابولیکی است. گیاه پروانش به عنوان گیاه مدل برای بررسی آنزیم‌های کلیدی مانند تریپتوفان دکربوکسیلاز و استریکتوزیدین سنتاز و انتقال ژن‌های آن به سایر گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Whitmer 1999; Verpoorte *et al*., 2002; Hughes *et al*., 2004). با همه پیشرفت‌هایی که حاصل شده است اما مهمترین چالش‌ها در این زمینه عدم شناخت کامل مسیر بیوسنتز همه آلکالوئیدها، عدم شناخت ژنوم گیاه و در نتیجه عدم اطلاع از عوامل تنظیمی ژن‌های مسئول بیوسنتز است (El-Sayed and Verpoorte, 2007).

بر اساس آنچه بیان شد و تا زمان شناخت جامع ژنوم گیاه، استفاده از سایر عواملی که بتواند تغییرات وسیعی بر جنبه‌های مختلف هوموستازی سلولی برجا بگذارد به همراه بررسی

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

اثرات حاصل با روش‌های مختلف ارزشمند خواهد بود. در مطالعه‌هایی که با استفاده از فلزات سنگین و یا شبه فلزاتی که اثراتی شبیه فلزات سنگین در سلول‌ها بر جا می‌گذارند، اساسا جنبه‌های مختلفی در نظر گرفته می‌شود. از شناخته شده‌ترین این اثرات بروز استرس اکسیداتیو در شرایط غلظت‌های بالاتر از حد توان سمیت زدایی در سلول‌هاست. فلزاتی مانند آهن و مس به دلیل تغییر درجه اکسایش اتم‌هایشان به طور مستقیم به واسطه واکنش‌های فنتون (Fenton) و یا هابر-ویس (Haber-Weiss) تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌کنند. اما فلزاتی مانند کادمیوم و نیکل اساساً از این نظر خنثی هستند و بروز استرس اکسیداتیو توسط آنها غیر مستقیم است و به دلیل تداخل با مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی سلولی عمل می‌کنند (Benavides *et al*., 2005). فلزات به علاوه در وضعیت تغذیه معدنی گیاه، بر فتوسنتز و تولید انرژی، واکنش‌های آنزیمی و تقسیم سلولی نیز تأثیر دارند. در پاسخ به اثرات وسیع فلزات در گیاهان واکنش‌های زیادی شروع می‌شود که تعدادی واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر غلظت‌های بالای فلزات است و تعدادی واکنش‌هایی است که به طور جانبی در سلول‌ها بر اثر حضور فلز رخ می‌دهد. در موجودات زنده مختلف، طیف وسیعی از ژن‌ها که عمدتا در انتقال پیام درون سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، کلیت کردن، انتقال و انباشت فلزات در واکوئول عمل می‌کنند، در پاسخ به فلزات در سلول‌ها بیان می‌شوند (Manara, 2012; Roelofs *et al*., 2007).

مطالعات نشان داده است که فلزات پتانسیل بالایی برای تحریک مسیرهای بیوسنتزی در کشت‌های سلولی دارند. افزودن وانادیل سولفات در کشت سلولی پروانش موجب افزایش آجمالیسین شد (Smith *et al*., 1987). برخی از عناصر کمیاب مانند Cerium و Neodymium موجب تحریک تولید آجمالیسین و کاتارانتین شد (Zhao *et al*., 2000b) و تیمار با کادمیوم نیز موجب افزایش آجمالیسین شد (Zheng and Wu, 2004). در شرایط بیورآکتور و همچنین استفاده از شیکر، افزودن تترامتیل آمونیوم بروماید موجب القای افزایش تولید آجمالیسین گردید (Zhao *et al*., 2000c). فلزات کبالت، نیکل، کروم، مس، بر، مولیبدن، آهن و وانادیوم پاسخ های متفاوتی در تولید آلکالوئید در دانه رست های ٤ تا ٦ روزه پروانش ایجاد کرد (Lovkova *et al*., 2005) اما بررسی‌هایی مبنی بر اینکه این اثرات در گیاهان کامل هم دیده شود وجود ندارد.

در جذب و انتقال فلزات سنگین به اندام‌های هوایی و همچنین میزان مقاومت گیاهان به غلظت‌های بالای فلزات، گیاهان به سه گروه تقسیم می‌شوند (Baker, 1981): گروه اول به نام گیاهان سد کننده (excluder) هستند که در برابر نفوذ فلز به ریشه و انتقال به بخش هوایی مقاومند و در صورت افزایش زیاد فلز سد دفاعی گیاه شکسته شده و فلز به داخل گیاه با مکانیسم‌های غیر اختصاصی نفوذ می‌کند. گروه دوم شامل گیاهان نشانگر (indicator) است که به تدریج با افزایش غلظت فلز در محیط غلظت آن در گیاه نیز زیاد می‌شود اما معمولاً مقاومت بالایی در گیاه وجود دارد و علائم سمیت در غلظت‌های بسیار بالا پدید می‌آید. گروه سوم گیاهان انباشتگر فلز هستند که با توجه به مقاومت بالایی که به فلز دارند، به طور فعال فلز را از محیط جذب کرده و در اندام‌های هوایی ذخیره می‌کنند. بنابراین در این مطالعه با توجه به اثر گذاری بالای دو فلز کادمیوم و نیکل بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی سلولی، این دو فلز در تیمار گیاه پروانش استفاده شد، توانایی انتقال این فلزات توسط گیاه اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل در رابطه با تولید آلکالوئید مورد آنالیز قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها:

بذر گیاه پروانش در گلدان‌های پلاستیکی ۱ لیتری حاوی پرلیت کاشته شد (۵ بذر در هر گلدان) و تا جوانه زنی با آب معمولی آبیاری شدند. پس از جوانه زنی و ظهور برگچه اول، با محلول غذایی هوگلند تغییر یافته آبیاری شدند. ترکیب محلول غذایی مورد استفاده شامل نیترات کلسیم (۱ میلی‌مولار)، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (۰/۱ میلی‌مولار)، سولفات منیزیم (۰/۵ میلی‌مولار)، نیترات پتاسیم (۰/۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۲ میکرومولار)، سولفات مس (۰/۲ میکرومولار)، سولفات روی (۰/۲ میکرومولار)، سولفات منگنز

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

(۲ میکرومولار)، اسید بوریک (۱۰ میکرومولار)، Fe EDDHA (فریک اتیلن دی آمین دی ۲-هیدروکسی فنیل استات؛ ۵ میکرومولار) و مولیبدات سدیم ( ۰/۱ میکرومولار) بود. شرایط رشد گیاهان شامل دوره نوری ۱٦-۸ ساعته نور-تاریکی بود که علاوه بر نور خورشید با استفاده از نور لامپ‌های فلورسانت تکمیل می‌شد. شرایط دمایی در محدوده ۳۷-۲۵ درجه سانتیگراد بود. محلول غذایی در ظروف زیر گلدانی ریخته شد و در تمام مدت آزمایشات، تبخیر آب با افزودن آب مقطر به طور روزانه جبران می‌شد. محلول غذایی به طور کامل هر هفته تعویض می‌شد.

پس از رشد گیاهان تا مرحله تعداد ۸ برگی، تیمار با دو فلز سنگین نیکل و کادمیوم انجام شد. غلظت‌های مورد استفاده کادمیوم شامل ۰، ۲/۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار با استفاده از نمک کلرید کادمیوم و غلظت‌های مورد استفاده در تیمار نیکل ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار با استفاده از نمک سولفات نیکل بود. تیمارها به مدت ۳ هفته ادامه پیدا کرد. در این مدت زمان علائم سمیت فلزات نیز بروز کرد. تیمارها با افزودن کادمیوم و نیکل به محلول غذایی انجام شد. کل محلول غذایی در این مرحله هر ۵ روز تعویض شد و برای جلوگیری از تجمع و تغلیظ عناصر، میزان تبخیر روزانه با افزودن آب مقطر جبران شد.

اندازه‌گیری کلروفیل در برگ‌ها با استفاده از روش معرفی شده توسط Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) و با استفاده از متانول خالص انجام شد.

برای اندازه‌گیری غلظت عناصر کادمیوم و نیکل در برگ‌ها و همچنین بررسی تغییرات آلکالوئیدها، پس از ظهور علائم سمیت فلز در گیاهان (ظهور کلروز بین رگبرگی)، برگ‌های بالغ شده بالایی (اول تا پنجم از راس) برداشت شده، پس از شستشو با آب مقطر، آنها را در دمای ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در پاکت‌های کاغذی خشک کرده و مورد آنالیز عنصری و بررسی آلکالوئیدی قرار گرفتند.

۰/۱ گرم پودر خشک شده برگ را در لوله آزمایش ریخته و ۱ میلی‌لیتر اسید نیتریک ٦۵٪ به آن اضافه کرده تا جایی که روی سطح پودر را بپوشاند. پس از۲٤ساعت آنها را به مدت ۱-۲ ساعت داخل بن ماری ۹۰ درجه قرار داده تا هضم اسیدی کامل شود. سپس تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خنک کرده و به آنها ۱ میلی‌لیتر $H_2O_2$ اضافه شده و مجددا در بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. این عمل تا بدست آمدن محلول‌های کاملا شفاف تکرار گردید. حجم نهایی محلول‌ها با استفاده از آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت محلول‌ها برای حذف ذرات معلق، با دور ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شدند.

اندازه‌گیری غلظت نیکل با استفاده از دستگاه طیف سنج جذب اتمی (فیلیپس مدل PU9100X) و اندازه‌گیری کادمیوم با استفاده از دستگاه جذب اتمی کوره گرافیتی GBC Scientific equipment مدل SensAA انجام شد.

استخراج و اندازه گیری آلکالوئید محتوی نمونه‌ها: استخراج آلکالوئید کل با استفاده از روش‌های استاندارد به شرح زیر انجام شد (Svendsen and Verpoorte, 1983; Evans and Evans, 2002). به ۱ گرم پودر گیاهی خشک ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ اضافه کرده و ۲٤ ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۸۵٪ به آن اضافه کرده و در بن ماری ٦۰ درجه قرار داده شد. محلول رویی را صاف کرده به باقیمانده مجددا ۱۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۸۵٪ اضافه شد و مجدداً ۱۵ دقیقه دردمای ٦۰ درجه قرار داده شد. عمل استخراج سه بار تکرار شد و سرانجام محلول‌ها باهم مخلوط شدند.

با انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوبات از محلول الکلی جدا شده، محلول الکلی در بشر ریخته شده و در دمای ۵۰ درجه تبخیر گردید. با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵٪ و ۱۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر دیواره ظرف شستشو شد. عصاره حاصل را در دکانتور ریخته و فاز اسیدی زیرین جدا شد. فاز اسیدی به کمک سود ۱۰ نرمال به pH ۱۰ رسانده شد. هم حجم محلول قلیایی کلروفرم اضافه کرده و فاز کلروفرمی زیرین به کمک دکانتور جدا شد. این عمل سه بار تکرار شد و مجموع فاز کلروفرمی جمع آوری گردید. کلروفرم‌های جمع آوری شده در دمای پایین

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

تبخیر شد و در نهایت با استفاده از ۳ میلی‌لیتر متانول خالص، دیواره ظرف شستشو شد. عصاره حاصل حاوی آلکالوئیدها می‌باشد که از آن برای لکه گذاری روی صفحه TLC و همچنین اندازه‌گیری محتوای آلکالوئیدی کل استفاده شد.

برای انجام کروماتوگرافی لایه نازک از متانول خالص به عنوان فاز متحرک استفاده شد. فاز ثابت شامل صفحات سیلیکا ژل (60F 254, 20*20 cm, Merck, Germany) بود. حلال داخل تانک کروماتوگرافی ریخته شد و در ظرف را بسته تا پس از مدتی فضای داخل ظرف از بخار حلال اشباع شود. پس از لکه گذاری روی صفحه سیلیکاژل آن را داخل تانک کروماتوگرافی گذاشته بطوریکه فاصله لکه ها تا خط حلال ۱ سانتیمتر باشد. برای لکه گذاری مقدار عصاره مورد استفاده ۳۵ میکرولیتر و برای همه نمونه‌ها مساوی بود. پس از ران شدن، باندها زیر نور UV-c وهمچنین با استفاده از معرف‌های دراژندورف و سریک آمونیوم سولفات مشاهده و عکس برداری شد. از ماده تریپتامین به عنوان یک استاندارد در این بخش از مطالعه، استفاده شد. تفسیر نتایج بر اساس مرجع استاندارد کروماتوگرافی لایه نازک آلکالوئیدها انجام شد (Svendsen and Verpoorte, 1983).

برای مقایسه مقدار کل آلکالوئید موجود در عصاره، مقدار دو میلی‌لیتر از عصاره نهایی کاملا خشک شد و وزن باقیمانده اندازه گیری شد. با توجه به اینکه بیشتر ماده جامد باقیمانده که با روش مذکور استخراج شده است آلکالوئید است، بنابراین می توان با تقریب مناسب مقدار کل آلکالوئید را بدست آورد.

**آنالیز آماری داده‌ها:** کلیه تیمارها در سه تکرار و هر تکرار شامل ٤-٥ گیاه انجام شد. داده‌های کمی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش آماری ANOVA و آزمون توکی مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

## نتایج:

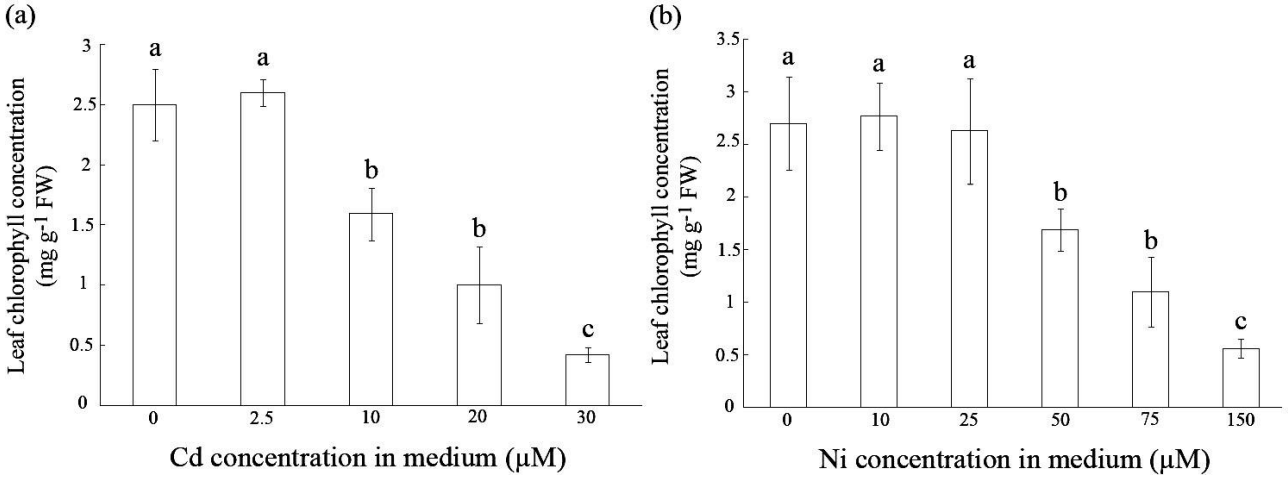
تیمار گیاهان با کادمیوم و نیکل موجب بروز کلروز بین رگبرگی در غلظت‌های بالای این فلزات شد. در غلظت‌های ۱۰ میکرومولار و بیشتر کادمیوم در محیط کشت کلروز بین رگبرگی مشاهده شد و شدت آن در غلظت ۳۰ میکرومولار بسیار زیاد بود چنانچه برگ‌ها به طور کامل زرد شده، اندازه برگ‌ها کوچک مانده و غلظت کلروفیل در برگ‌ها به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۱ a). در تیمار با غلظت‌های مختلف نیکل، کلروز بین رگبرگی به طور مشهود بروز کرده و کاهش معنی‌دار در غلظت کلروفیل برگ‌ها (شکل ۱ b) در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار و بیشتر نیکل در محیط کشت دیده شد.

غلظت عناصر کادمیوم و نیکل در برگ با افزایش غلظت این دو عنصر در محلول غذایی افزایش داشت (شکل ۲). بر اساس غلظت کادمیوم در برگ، سه گروه تیماری قابل تشخیص بود چنانچه در غلظت‌های ۲/۵ و ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده شد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت به ۲۰ و ۳۰ میکرومولار، غلظت آن در برگ نسبت به دو غلظت کمتر مورد استفاده افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲a). بر اساس غلظت نیکل در برگ تفاوت معنی‌داری بین همه گروه‌های تیمار بجز بین غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار در محلول غذایی مشاهد شد (شکل ۲b).

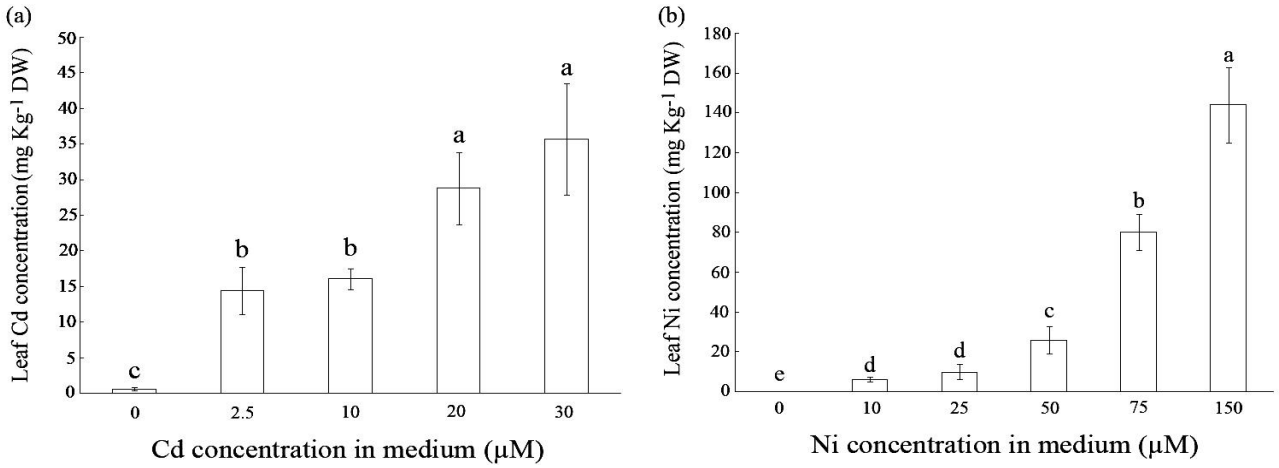
اندازه‌گیری مقادیر آلکالوئید قابل استخراج از برگ‌ها حاکی از تاثیر معنی دار فلزات مورد استفاده بر محتوای آلکالوئید برگ‌ها بود. با مقایسه مقدار آلکالوئید برگ تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کادمیوم مشخص شد که غلظت ۲/۵ میکرومولار کادمیوم در محیط کشت موجب تغییر معنی دار در محتوای آلکالوئید نشد اما تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار کادمیوم در محیط کشت موجب افزایش معنی‌دار در محتوای آلکالوئید قابل استخراج شد به نحوی که در هر دو تیمار تا ۵۰ درصد بر محتوای آلکالوئید افزوده شد. با افزایش غلظت کادمیوم به ۳۰ میکرومولار، کاهش نسبی تا ۳۵ درصد در محتوای آلکالوئید مشاهده شد (شکل ۳a). در تیمار گیاهان با نیکل، غلظت ۱۰ میکرومولار موجب افزایش نسبی در محتوای آلکالوئید نشد اما با افزایش غلظت نیکل محتوای

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

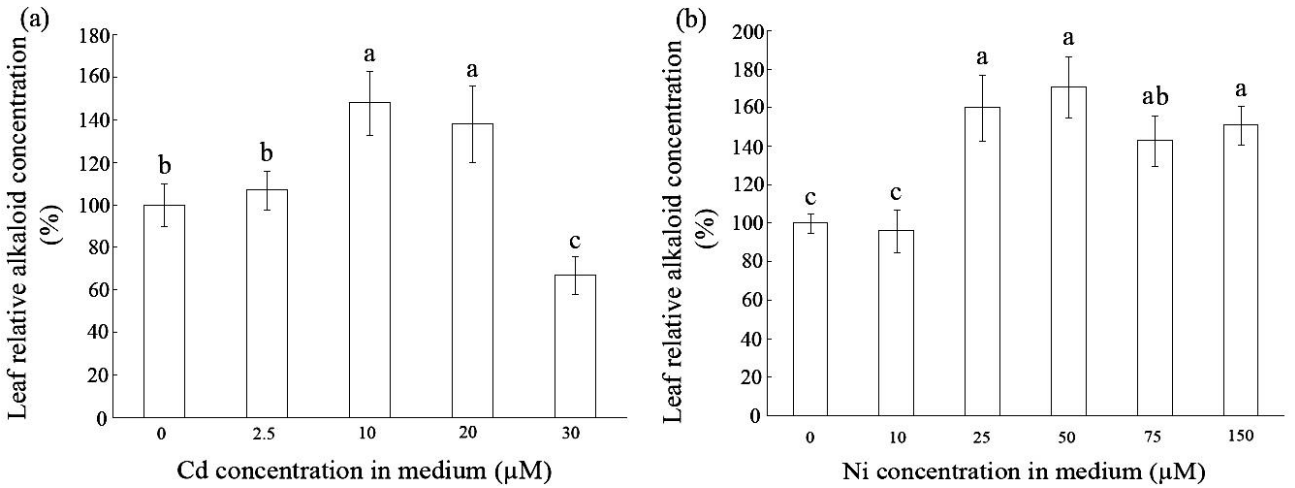
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]




**شکل ۱ – میزان کلروفیل در برگ گیاه پروانش تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم (a) و نیکل (b). مقادیر شامل میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشابه بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون توکی (P≤0.05) است.**



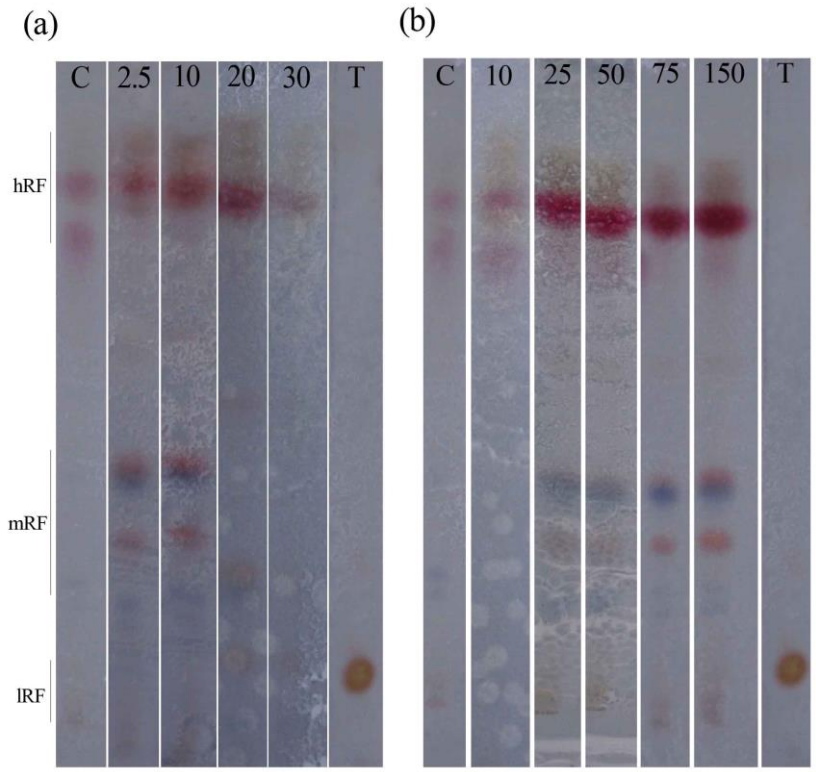

**شکل ۲– غلظت عناصر کادمیوم (a) و نیکل (b) در برگ گیاه پروانش تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم و نیکل. مقادیر شامل میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشابه بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون توکی (P≤0.05) است.**




**شکل ۳– مقادیر نسبی آلکالوئید استخراج شده از برگ گیاه پروانش تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم (a) و نیکل (b). مقادیر نسبت به گیاه شاهد (تیمار صفر) محاسبه شده است و شامل میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشابه بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون توکی (P≤0.05) است.**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

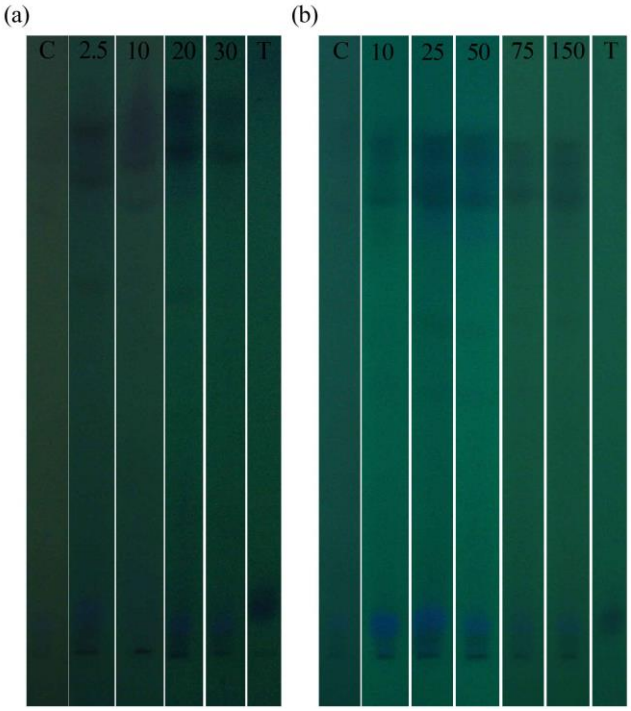



**شکل ٤- الگوی کروماتوگرافی لایه نازک آلکالوئیدهای استخراج شده از برگ گیاه پروانش تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم (a) و نیکل (b) پس از استفاده از معرف سریک آمونیوم سولفات. هر ستون نشان دهنده وضعیت عمومی تکرار پذیر از حداقل ۳ تکرار است. اعداد نشان دهنده غلظت کادمیوم یا نیکل مورد استفاده در تیمار گیاهان است. C، الگوی مربوط به گیاه شاهد؛ T، ترپیتامین؛ hRF، باند های با RF بیشتر از ۰/٦٥؛ mRF، باند های با RF حدود ۰/۳؛ lRF، باندهای با RF کمتر از ۰/۱.**

آلکالوئید برگ تا ٦۰ درصد افزایش پیدا کرد. تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نیکل بیشتر از ۲۵ میکرومولار در محتوای آلکالوئید مشاهده نشد (شکل b۳).

استفاده از معرف‌های اختصاصی آلکالوئیدها (سریک آمونیوم سولفات و دراژندورف) و همچنین مشاهده صفحات TLC ران شده زیر نور UV-c حاکی از وجود تفاوت‌هایی در الگوی قابل مشاهده آلکالوئیدی برگ گیاهان در تیمارهای با غلظت‌های مختلف کادمیوم و نیکل بود (شکل های ٤ و ٥). به طور کلی باندهای قابل تفکیک و مشاهده با استفاده از هر سه روش مذکور، در سه گروه کلی باندهای با RF بالا، باندهای با RF متوسط و باندهای با RF کم تقسیم بندی شدند (در شکل ٤ این موارد به ترتیب با نمادهای hRF، mRF و lRF نشان داده شده است). مقدار RF برای باندهای آلکالوئیدهای با RF بالا، بیشتر از ۰/٦٥، آلکالوئیدهای با RF متوسط حدود ۰/۳ و برای RF کم، کمتر از ۰/۱ در نظر گرفته شد. بر اساس رنگ حاصل از معرف سریک آمونیوم سولفات (شکل ٤) نوع آلکالوئیدهای قابل شناسایی با توجه به نزدیک ترین RF و گروه رنگی گزارش شده (Svendsen and Verpoorte, 1983) عبارتست از Catharine (بالاترین باند مشاهده شده به رنگ نارنجی با RF ۰/۷٥) که در گیاهان شاهد بسیار ضعیف اما در تیمارهای با غلظت‌های مختلف کادمیوم و نیکل بصورت باند با شدت بیشتری دیده شد؛ باند با RF ۰/۷۲ به رنگ قرمز که می‌تواند مجموعه‌ای از آلکالوئیدها مانند آجمالیسین و رزرپین باشد. باند با RF ۰/٦۳ به رنگ صورتی که انطباق خوبی با RF و گروه رنگی گزارش شده با آلکالوئیدهایی مانند ویندولین دارد. این باند در گیاهان تیمار شده با کادمیوم در مقایسه با گیاهان شاهد بسیار ضعیف دیده شد اما در گیاهان تیمار شده با نیکل کم و بیش با همان شدت دیده شد. تفاوت عمده در

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]




**شکل ٥- الگوی کروماتوگرافی لایه نازک آلکالوئیدهای استخراج شده از برگ گیاه پروانش تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم (a) و نیکل (b) قابل مشاهده تحت نور ماوراء بنفش در محدوده طول موج‌های UV-c. هر ستون نشان دهنده وضعیت عمومی تکرار پذیر از حداقل ۳ تکرار است. اعداد نشان دهنده غلظت کادمیوم یا نیکل مورد استفاده در تیمار گیاهان است. C، الگوی مربوط به گیاه شاهد؛ T، تریپتامین.**

تغییر الگوی آلکالوئیدها مربوط با باندهای mRF بود. این باندها عمدتاً در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم (۲/۵ و ۱۰ میکرومولار) و نیکل (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار) مشاهده شدند اما در گیاهان شاهد، غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میکرومولار کادمیوم و غلظت ۱۰ میکرومولار نیکل با شدت ضعیف دیده شدند و یا قابل مشاهده مستقیم نبودند. انطباق این باندها با مراجع موجود نشان داد که باند آبی رنگ با ۰/۳۵RF می‌تواند مربوط به آلکالوئید leurocristine و باند نارنجی با ۰/۲۸ RF مربوط به آلکالوئید vincolidine باشد. باندهای mRF اساسا با استفاده از نور ماوراء بنفش قابل مشاهده نبودند (مقایسه شکل‌های ٤ و ٥). مشاهده صفحات کروماتوگرافی در زیر نور ماوراء بنفش نشان دهنده وجود باندهای lRF و وجود تفاوت‌هایی در الگوهای آنها در غلظت های مختلف فلزات مورد استفاده با گیاهان شاهد بود. این باندها به طور مشهود در غلظت ۲/۵ میکرومولار کادمیوم و غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار نیکل دیده شدند. مهمترین آلکالوئیدهایی که با توجه به مقدار RF می‌توان به این باندها نسبت داد serpentine و alstonine هستند. در هیچکدام از گیاهان تیمار شده و همچنین گیاهان شاهد باندی معادل باند تریپتامین که در همه صفحات به عنوان کنترل استفاده شد، به طور عادی و با شدت بالا مشاهده نشد (شکل‌های ٤ و ٥).

**بحث:**

بر اساس تعریف‌هایی که در رابطه با چگونگی مواجهه گیاهان با فلزات محیط وجود دارد (Baker, 1981)، گیاه پروانش از گروه گیاهان سد کننده به حساب می‌آید. به عبارتی این گیاه قادر به جذب، انتقال به بخش‌های هوایی، انباشت و سم زدایی مقادیر زیادی از فلزات کادمیوم و نیکل نیست و اثرات سمیت در غلظت‌های نسبتاً کم، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار به ترتیب برای کادمیوم و نیکل بروز کرد. بر اساس این یافته‌ها، می‌بایستی واکنش‌های مقاومتی گیاه به غلظت فلز در این محدوده بروز کند.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که طیف وسیعی از آلکالوئیدها می‌توانند در حضور کادمیوم و نیکل افزایش یابند که با برخی از دیگر مطالعه‌ها همخوانی دارد (Zheng and wu, 2004; Lovkova *et al.*, 2005). اساساً مکانیسم‌های سلولی و مولکولی که موجب افزایش بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها می‌شود، هنوز شناخته نشده است اما شواهدی بر وابستگی این فرایند به چند مکانیسم مختلف وجود دارد. این مکانیسم‌ها شامل چهار مورد اصلی است.

**اول نقش برخی از فلزات در ساختار متالوآنزیم‌های مسئول مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه:** این مکانیسم اثر نمی‌تواند در مورد نیکل و کادمیوم به طور مستقیم اثر گذار باشد زیرا این دو فلز در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گیاه پروانش در ساختار متالوآنزیم‌ها وجود ندارند اما در هر حال می‌توانند اثر غیر مستقیم تغذیه‌ای داشته باشند. به این ترتیب که با جایگزینی و آزادسازی فلزات تغذیه‌ای مانند آهن از آپوپلاست، نقش تحریک کنندگی داشته باشند.

**دوم تغییر توزیع ترکیبات تغذیه‌ای**: تغییر توزیع ترکیبات فتوسنتزی در گیاه کامل و یا انتقال بیشتر مواد غذایی محیط کشت به داخل سلول‌ها بر اثر تغییر نفوذ پذیری غشاءها در کشت های سلولی از اثرات حضور فلز در محیط است. چنین اثری در مطالعه بر روی گیاه نعناع در شرایط استرس منگنز دیده شده است (Srivastava and Luthra, 1994).

**سوم اثر استرس اکسیداتیو بر تولید آلکالوئیدها**: یکی از شواهدی که دراین مطالعه حاکی از بروز استرس اکسیداتیو است کاهش کلروفیل است. چند مرحله از تولید آلکالوئیدها وابسته به واکنش‌های اکسید-احیا است. اولین مرحله مسیر بیوسنتز سکولوگانین (یعنی تولید ژرانیول) در حضور $NAD^+$ و یا $NADP^+$ به واسطه عملکرد آنزیم ژرانیول ۱۰-هیدروکسیلاز وابسته به سیتوکروم p450 انجام می‌شود (Madyastha and Coscia, 1979). به علاوه تبدیل آلکالوئید آجمالیسین به سرپنتین توسط عمل پراکسیدازی رخ می‌دهد (Blom *et al.*, 1991) و به عبارتی حضور سوبسترای $H_2O_2$ برای انجام واکنش نیاز است. همین امر می‌تواند بیانگر نوعی نقش آنتی اکسیدانی برای آلکالوئید آجمالیسین در این گیاه باشد. یکی از اثرات شناخته شده حضور فلزات سنگین و از جمله کادمیوم بروز استرس اکسیداتیو و تولید زیاد پراکسید هیدروژن و تجمع فرم $NAD^+$ و همچنین $NADP^+$ (فرم‌های اکسید شده عوامل احیایی) است (Dietz, 2010). الگوی TLC بدست آمده در این مطالعه نیز بر تولید و انباشت زیاد آلکالوئید سرپنتین (الگوی قابل مشاهده در نور UV) دلالت دارد. این دلیلی است بر بروز استرس اکسیداتیو در حضور غلظت‌های مورد استفاده فلزات نیکل و کادمیوم. تشکیل آلکالوئید آلستونین از تتراهیدروآلستونین نیز به واسطه عمل پراکسیدازی انجام می‌شود (Roytrakul, 2004). این آلکالوئید نیز دارای RF کم بوده و به وضوح در گیاهان تیمار شده با فلزات بیشتر تشکیل شده است. تولید آلکالوئید سرپنتین به نظر می‌رسد از واکنش‌های مهم این گیاه به شرایط محیطی باشد و مطالعه دیگر هم موید تغییر مقدار این آلکالوئید با تغییر شرایط محیطی مانند نور است (Knobloch *et al*., 1982).

**چهارم تاثیر فلزات بر انتقال درون سلولی ترکیبات مختلف:** اثر مهم دیگر فلزات سنگین در سلول‌ها با تغییر شرایط احیایی سلول و تجمع پراکسید هیدروژن شروع می‌شود. تجمع این مواد از عوامل پاسخ موثر و شروع واکنش‌های سلولی در پاسخ به فلزات است (Dietz, 2008; Dietz, 2010). یکی از پاسخ‌های مهمی که در این رابطه در سلول‌های گیاهی بروز می‌کند انتقال کمپلکس‌های فیتوکلاتین-فلز تشکیل شده در سیتوزول به واکوئول است. این انتقال به واسطه عملکرد ناقل‌های موسوم به ABC (ATP-Binding Cassette) واقع در تونوپلاست همراه با مصرف ATP انجام می‌شود (Ortiz *et al*., 1992). فعالیت این ناقل‌ها در حضور عوامل استرس‌زای زیستی و غیر زیستی مانند فلزات سنگین (از جمله کادمیوم) افزایش می‌یابد (Yazaki *et al*., 2009). نکته مرتبط با انباشت آلکالوئیدها این است که این ترانسپورترها طیف وسیعی از سوبستراها از جمله ترکیبات هیدروفوب مانند آلکالوئیدها را به واکوئول منتقل می‌کنند (Higgins, 2001; Shitan and Yazaki, 2007). اخیرا بررسی‌هایی نیز نشان داده است که انواع دیگری از ناقل‌ها که

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

وابسته به پتانسیل الکتروشیمیایی پروتون در دو طرف غشاء واکوئول هستند در انتقال آلکالوئید ویندولین به داخل واکوئول به طور اختصاصی نقش دارند (Carqueijeiro *et al*., 2013). بر اساس این یافته‌ها عواملی که بتوانند شیب الکتروشیمیایی پروتون را در دو طرف تونوپلاست افزایش دهند می‌توانند موجب بهبود انتقال آلکالوئیدها به داخل واکوئول شوند. فعالیت عوامل ایجاد کننده پتانسیل الکتروشیمیایی پروتون یعنی V-$H^+$-ATPase و V-$H^+$-ppase برای فعالیت‌های مختلف سلول‌ها و برقراری هوموستازی سلولی نیاز است و در حضور عوامل مختلف محیطی نظیر غلظت بالای نمک و فلزات سنگین تحریک می‌شود (Gaxiola *et al*., 2007).

بر اساس این یافته‌ها می‌توان اینگونه استنباط کرد که در فرایند مشاهده شده افزایش آلکالوئید بر اثر تیمار گیاهان با غلظت‌های کمتر از سمیت کامل در گیاه پروانش، فلزات سنگین حداقل در دو فرایند نقش دارند: یکی تحریک بیوسنتز برخی از آلکالوئیدها به دلیل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و دیگر تحریک انتقال آلکالوئیدهای ساخته شده به اندام‌ها و یا اندامک‌های سلولی محل ذخیره. به این ترتیب مهار فیدبک از مسیر بیوسنتز برداشته شده و موجب بیوسنتز بیشتر آلکالوئیدها می‌شود. اهمیت انتقال آلکالوئیدها به محل ذخیره از آنجایی مهم است که مشخص شده تعدادی از سلول‌های مزوفیل برگ که Idioblast نامیده می‌شوند، بدون اینکه خود نقش بالایی در تامین پیش‌سازهای تولید آلکالوئیدها داشته باشند اما محل ذخیره آلکالوئیدهای ساخته شده در سایر سلول‌ها هستند (Samanani *et al*., 2005).

## نتیجه گیری کلی:

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که فلزات کادمیوم و نیکل تولید و تجمع آلکالوئیدها را در گیاه پروانش تحت تاثیر قرار می‌دهند به نحوی که تولید آلکالوئیدهای کم غلظت، افزایش می‌یابد. با ورود فلزات به بخش‌های هوایی گیاه، واکنش‌هایی در پاسخ به فلزات سنگین رخ می‌دهند که بر اساس مطالعات متعدد در این زمینه، طیف وسیعی از اثرات تغذیه‌ای، پیام‌رسانی سلولی و بیان ژن‌ها را شامل می‌شوند. نتایج مشاهده شده در این مطالعه می‌بایستی به طور مبسوط با اندازه‌گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو و بررسی بیان ژن‌ها مورد آنالیز قرار گیرد تا شرایط پایداری برای تولید اقتصادی آلکالوئیدهای کم غلظت فراهم شود.

## تشکر و قدردانی:

این پژوهش با استفاده از حمایت‌های مالی دانشگاه پیام نور استان اصفهان انجام شده است و بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع:

Arvy, M. P., Imbault, N., Naudascher, F., Thiersault, M. and Doireau, P. (1994) 2,4-D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. Biochimie 76: 410–416.

Baker, A. J. M. (1981) Accumulators and excluders-Strategies in response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.

Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology17: 21–34.

Blom, T. J. M., Sierra, M., van Vliet, T. B., Franke-van Dijk, M. E. I., de Koning, P., van Iren, F., Verpoorte, R. and Libbenga, K. R. (1991) Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L) G. Don. and its conversion into serpentine. Planta 183: 170–177.

Carqueijeiro, I., Noronha, H., Duarte, P., Geros, H. V. and Sottomayor, M. (2013) Vacuolar transport of the medicinal alkaloids from *Catharanthus roseus* is mediated by a proton driven antiport. Plant physiology. In Press. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.

Dietz, K. J. (2008) Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. Physiologia Plantarum 133: 459–468.

Dietz, K. J. (2010) Redox-dependent regulation, redox control and oxidative damage in plant cells subjected to abiotic stress. In: Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology 639 (ed. Sunkar, R.). Pp. 57-70. Springer Science+Business Media, LLC. Heidelberg.

El-Sayed, M. and Verpoorte, R. (2002) Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

Moreno, P. R. H., van der Heijden, R. and Verpoorte, R. (1993) Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 12: 702–705.

Morgan, J. A. and Shanks, J. V. (1999) Inhibitor studies of tabersonine metabolism in *C. roseus* hairy roots. Phytochemistry 51: 61–68.

Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. and Ow, D. W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO Journal 11: 3491–99.

Roelofs, D., Marien, J. and van Straalen, N. M. (2007) Differential gene expression profiles associated with heavy metal tolerance in the soil insect *Orchesella cincta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37: 287–295.

Roytrakul, S. (2004) Transport of alkaloids and its precursors through the vacuolar membrane of *Catharanthus roseus*. Ph.D thesis. University of Leiden, The Netherlands.

Samanani, N., Park, S. and Facchini, P. J. (2005) Cell type–specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. The Plant Cell 17: 915–926.

Scrag, A. H., Ashton, S., York, A., Stepan-SSarkissian, G. and Grey, D. (1990) Growth of *Catharanthus roseus* suspension for maximum biomass and alkaloids accumulation. Enzyme and Microbial Technology 12: 292-298.

Shitan, N. and Yazaki, K. (2007) Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. Current Pharmaceutical Biotechnology 8: 244-252.

Smith, C. J., Newton, R. P., Mullins, C. J. and Walton, T. J. (1989) Plant host-pathogen interaction: elicitation of phenylalanine ammonia-lyase activity and its mediation by $Ca^{2+}$. Biochemical Society of Transplants 6:1069-1070.

Smith, J. I., Smart, N. J., Kurz, W. G. W. and Misawa, M. (1987) Stimulation of indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by abscisic acid. Planta Medica 53: 470–474.

Smith, J. I., Smart, N.J., Misawa, M., Kurg, W. G., Tallevi, S. G., Dicosmo, F. (1987) Increased accumulation of indole alkaloids by some lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of Vanadyl sulphate. Plant Cell Reports. 6:142–5.

Srivastava, N.K., Luthra, R. (1994) Relationship between photosynthetic carbon metabolism and essential oil biogenesis in peppermint under Mn-stress. Journal of Experimental Botany 45:1127-32.

St-Pierre, B. and De Luca, V. (1995) A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 109: 131–139.

tryptamine and loganin. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68: 265–270.

El-Sayed, M. and Verpoorte, R. (2007) Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochemical Review 6: 277–305.

Evans, W. C., Evans, D. (2002) Trease and Evans Pharmacognosy. Saunders publisher, 585 pp.

Garnier, F., Carpin, S., Label, P., Cre`che, J., Rideau, M. and Hamdi, S. (1996) Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light inducible ipt gene. Plant Science 120: 47–55.

Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G. and Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. FEBS Letters 581: 2204–2214.

Higgins, C. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. Research in Microbiology 152: 205–210.

Hughes, E. H., Hong, S. B., Gibson, S. I., Shanks, J. V. and San, K. Y. (2004) Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. Metabolic Engineering 6: 268–276.

Knobloch, K. H., Bast, G. and Berlin, J. (1982) Medium and light induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry 21: 591-594.

Kubota, K., Li, X. N. and Ashihara, H. (1989) The short term effects of inorganic phosphate on the levels of metabolites in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. Z Naturfordch 44: 802-806.

Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Porotocols in Food Analytical Chemistry. F4.3.1-F4.3.8.

Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M., Buzuk, L. N. (2005) Role of elements and physiologically active compounds in the regulation of synthesis and accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* L. Applied Biochemistry and Microbiology41:299–302.

Loyola-Vargas, V., Mendez-Zeel, M., Monforte-Gonzalez, M. and Miranda-Ham, M. L. (1992) Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus*. Journal of Plant Physiology 140: 213–217.

Madyastha, K. M. and Coscia, C. J. (1979) Enzymology of indole alkaloid biosynthesis. Recent Advances in Phytochemistry 13: 85–129.

Manara, A. (2012) Plant responses to heavy metal toxicity. In: Plants and heavy metals- briefs in biometals (ed. Furini, A.). Pp. 55-87, Springer, Berlin.

Moreno, P. R. H., Poulsen, C., van der Heijden, R. and Verpoorte, R. (1996) Effects of elicitation on different secondary metabolic pathways in Catharanthus roseus cell suspension cultures. Enzyme and Microbial Technology 18: 99–107.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]

cell line of *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 116: 853–857.

Yazaki, K., Shitan, N., Sugiyama, A. and Takanashi, K. (2009) Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. International Review of Cell and Molecular Biology 276: 263-299.

Zhao, J., Wei-Hua, Z., Qui, H. (2000a) Enhanced ajmalicine production of *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatments: From shake flasks to 20L airlift Bioreactor. Biotechnology Letters 22:509–514.

Zhao, J., Zhu, W. H., Lu, Q. (2000b) Promotion of indole alkaloids production in *Catharanthus roseus* cell cultures by rare earth elements. Biotechnology Letters 22:825–828.

Zhao, J., Zhu, W., Hu, Q. and He, X.W. (2000c) Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cultures by various chemicals. Biotechnology Letters 22: 1221–1226.

Zheng, Z. and Wu, M. (2004) Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. Plant Science 166: 507–514.

Svendsen, A. B. and. Verpoorte, R. (1983) Chromatography of alkaloids Part A: thin-layer chromatography. Journal of Chromatography Library 23, Part A, 3-534.

Verpoorte, R. and Alfermann, A. W. (2000) Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J. (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemical Review 1: 13–25.

Verpoorte, R., van der Heijden, R. and Moreno, P. R. H. (1997) Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. In: The Alkaloids (ed. Cordell, G. A.) .Pp. 221–299. Academic Press, San Diego.

Whitmer, S. (1999) Aspects of terpenoid indole alkaloid formation by transgenic cell lines of *Catharanthus roseus* over-expressing tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase. PhD thesis, Leiden University, The Netherlands.

Whitmer, S., Canel, C., Hallard, D., Goncalves, C., Verpoorte, R. (1998) Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-06-23 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.12.2 ]