نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هشتم، شماره دوم، ۱۴۰۰
۵۳-٦٦
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2021.17622.2629

بررسی برخی صفات ریخت‌شناختی و برخی ترکیبات آلکالوئیدی در اندام‌های ارقام مختلف گیاه پروانش کبیر (*Catharanthus roseus* (L.) G. DON)

نسترن همتی[۱]، مجید عزیزی*[۲]، حسین آرویی[۳]، محسن سعیدی[۴] و احد یامچی[۵]

[۱]دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،
[۲]استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،
[۳]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،
[۴]دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان، گرگان، ایران،
[۵]دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱٤

چکیده

سابقه و هدف: پروانش گیاهی است که به دلیل دارا بودن ترکیبات آلکالوئیدی، در صنایع دارویی ارزش بسیار زیادی دارد. از میان ۱۳۰ نوع آلکالوئید شناخته شده در پروانش، آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین به‌دلیل خاصیت آنیوپلازی (ضد توموری) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. از آن‌جا که پروانش تنها منبع تولید این نوع ترکیبات آلکالوئیدی است، جایگاه خاصی در میان گیاهان دارویی دارد. با توجه به مقدار پائین آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش و اهمیت این ترکیبات در صنایع دارویی، هم‌چنین ارزش بسیار بالای اقتصادی برخی متابولیت‌های ثانویه آن، در این آزمایش شش رقم مختلف پروانش از نظر صفات ریخت‌شناسی و زیست‌شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به صورت گلدانی و در گلخانه و آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۹٦-۱۳۹۵ انجام شد. تیمارها شامل ٦ رقم Icy Pink، Lilac، Polka Dot، Apricot، Purple، Red Bright و دو اندام (برگ و ریشه) بودند. صفات اندازه‌گیری شده شامل وزن تر و خشک ریشه و برگ، تعداد شاخه‌های فرعی، تعداد ریشه‌های فرعی، طول ریشه، طول ساقه، قطر ساقه، قطر ریشه و میزان آلکالوئیدهای وین‌بلاستین، وین‌کریستین و آجمالایسین بودند. بررسی میزان آلکالوئیدها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا صورت پذیرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج، بین ارقام از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی و زیست‌شیمیایی در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان قطر ساقه (۰/۵۳۳ سانتی‌متر)، قطر ریشه (۰/٦۱۰ سانتی‌متر) و طول ساقه (٤٥/۹۹ سانتی‌متر) در رقم Purple مشاهده شد. بیش‌ترین میزان وین‌بلاستین در برگ رقم Purple (۱/۷ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) و کم‌ترین میزان آن در ریشه رقم Icy Pink (۰/۰۲ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) مشاهده شد. هم‌چنین

* مسئول مکاتبه: azizi@um.ac.ir

بیش‌ترین میزان آجمالایسین و وین‌کریستین نیز در برگ رقم Apricot (به ترتیب به میزان ۱/۸۹ و ۳/۶۱ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) اندازه‌گیری شد. در صورتی که در ریشه ارقام Apricot و Red Bright و همچنین در برگ رقم Lilac آلکالوئید آجمالایسین وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: ارقام مختلف گیاه پروانش از لحاظ میزان آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی دارای تفاوت قابل‌توجهی هستند. اگرچه ارقام مختلف یک گیاه زیر مجموعه یک گونه محسوب می‌شوند ولی مشاهده تفاوت‌های ایجاد شده در ارقام مختلف قابل بحث می‌باشد. با توجه به این مطلب که ترکیبات ثانویه از ترکیبات اولیه در گیاه ایجاد می‌گردند، مشاهده می‌شود که ارقام مختلف یک گیاه، مقادیر متفاوتی از یک آلکالوئید را در شرایط یکسان تولید نموده‌اند. این مسأله علاوه بر قابلیت تعمیم به مواد مؤثر دیگر، به‌خصوص با توجه به ارزش اقتصادی برخی آلکالوئیدهای این گیاه می‌تواند اهمیت بسیار بالایی داشته باشد. با توصیه کشت رقم برتر در زمینه تولید آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی، می‌توان کمک زیادی به افزایش کارایی تولید آن‌ها نمود.

واژه‌های کلیدی: ایندول ترپنوئید، پروانش، کروماتوگرافی مایع، مورفولوژی

مقدمه

امروزه با پیشرفت علم شیمی آلی بسیاری از ترکیبات سازنده داروهای مورد استفاده به‌صورت سنتتیک و شیمیایی تهیه و با قیمت مناسب‌تری عرضه می‌شوند. اما با این وجود برخی از مواد مؤثره مورد استفاده در صنایع داروسازی را به‌علت داشتن ساختمان شیمیایی ناشناخته یا بسیار پیچیده و هم‌چنین هزینه بسیار زیاد تولید، نمی‌توان به‌صورت مصنوعی تولید کرد. به همین دلیل تنها منبع تهیه آن‌ها گیاهان هستند. از این میان می‌توان به آلکالوئیدهای موجود در گیاه پروانش اشاره کرد (۳۰).

پروانش[1] متعلق به خانواده خرزهره بوده و ۱۶ کروموزوم دارد (2n=16). گیاهی است چند ساله که البته در مناطق سرد به صورت یکساله کشت می‌شود. خاستگاه این گیاه جزایر ماداگاسکار بوده و مخصوص نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر مانند هند و اندونزی است و در دشت‌ها و تپه‌هایی که ۵۰۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارند، می‌روید (۱۰).

پروانش گیاهی است که به‌دلیل دارا بودن ترکیبات آلکالوئیدی بسیار ارزشمند است. از میان ۱۳۰ نوع آلکالوئید شناخته شده در پروانش، آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین به‌دلیل خاصیت آنیوپلازی (ضد توموری) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. از آن‌جا که پروانش تنها منبع تولید این نوع ترکیبات آلکالوئیدی است، جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی دارد (۱۶). تقاضای سالانه جهانی برای وین‌کریستین، وین بلاستین و آجمالایسین به ترتیب یک کیلوگرم، ۱۲ کیلوگرم و ۵۰۰۰ کیلوگرم تخمین زده شده است که ارزش تجاری آن به ترتیب معادل ۳۵۰۰۰۰۰ دلار، ۱۰۰۰۰۰۰ دلار و ۵۰۰۰ دلار (در هر کیلوگرم) می‌باشد (۱۴).

وین‌بلاستین[2] از آلکالوئیدهای استخراج شده از گیاه پروانش است که به‌صورت نمک سولفات (سولفات وین‌بلاستین) و با نام تجاری ولبان[3] برای درمان سرطان سینه، سرطان بیضه، لنفوم هوچکینی و کوریوکارسینوما (نوعی سرطان رحم)، سرطان ریه، مایکوزیس فونگوئیدس (نوعی سرطان پوست) به کار می‌رود. هم‌چنین وین‌کریستین[4] یکی دیگر از آلکالوئیدهای استخراج شده از گیاه پروانش بوده که

1- *Catharanthus roseus* (L.) G. DON

2- $C_{46}\ H_{58}\ N_4\ O_9$
3- Velban
4- $C_{46}\ H_{56}\ N_4\ O_{10}$

نمک سولفات آن (سولفات وین‌کریستین) با نام تجاری اونکوین[1] برای درمان لوسمی (لوکمیا) حاد و سایر لوسمی‌ها، استئوژنیک (نوعی سرطان استخوان)، سرطان ریه و سینه مصرف می‌شود. تنها تفاوت آن با وین‌بلاستین وجود یک عامل آلدئیدی به جای متیل در ساختار مولکولی آن است (۱۹ و ۲۸). آجمالایسین[2] آلکالوئید دیگری‌ست که با نام‌های دلتا یوهیمبین[3] و رابازین نیز شناخته می‌شود و به عنوان یک داروی ضد فشار خون در درمان فشار خون بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آلکالوئید به طور طبیعی در گیاهان مختلفی از جمله گونه‌های راوولفیا[4]، پروانش و *Mitragyna speciosa* یافت می‌شود (۳۰).

آلکالوئیدهای پروانش یک گروه از داروهای ضد میتوزی مورد استفاده در شیمی درمانی هستند. این آلکالوئیدهای علیه انواع مختلفی از تومورهای هماتولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات برای ممانعت نمودن از خودآرایی میکروتوبول با زیر واحدهای توبولین آن برهمکنش می‌دهند که این حالت موجب القا و جداسازی غیرطبیعی کروموزوم‌ها در سلول‌ها می‌شوند و در شرایط درون شیشه‌ای در غلظت‌های نسبتاً پائین، خود آرایی توبولین به صورت میکروتوبول‌ها را مهار می‌کنند و در غلظت‌های بالاتر، مستقیما با میکروتوبول‌ها برهمکنش می‌دهند (۱).

عوامل مختلفی از جمله نوع گونه، رقم و اقلیم منطقه بر رشد و عملکرد گیاهان در بوم نظام‌ها مختلف تأثیرگذار می‌باشند (۱۱ و ۱۷). گزارش‌ها نشان دادند همبستگی بالایی بین ترکیبات مواد مؤثره و منشأ ژنتیکی گیاهان وجود دارد (٤). در پژوهشی نشان داده شد بین رقم‌های مختلف Alba و Rosea گیاه پروانش از نظر خصوصیات زیست-شیمیایی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد به‌طوری‌که رقم Alba در مقایسه با رقم Rosea دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بیش‌تری است (۸). در پژوهشی دیگر مشخص شد بین ژنوتیپ‌های مختلف از سه گونه نعناع، در درصد و عملکرد اسانس آن‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد و پژوهشگران بیان داشتند که ژنوتیپ‌های اصفهان و همدان به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین عملکرد اسانس را داشتند (۲٦). از آنجا که نوع ارقام نقش عمده‌ای در میزان متابولیت‌های ثانویه دارند، همواره باید به مطالعات تأثیر آن‌ها و تغییرات بوم نظام بر تولیدات متابولیتی گیاهان به خصوص متابولیت‌های ثانویه پرداخت (۲۱ و ۲۲). با توجه به ارزش دارویی پروانش، تفاوت‌ها و شباهت‌هایی از نظر فیتوشیمیایی در ارقام مختلف این جنس مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد که این تفاوت می‌تواند در پروفایل آلکالوئیدی گیاه مؤثر باشد (۲). بنابراین، با توجه به مقدار پائین آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش و اهمیت این ترکیبات در صنایع دارویی، هم‌چنین ارزش بسیار بالای اقتصادی برخی متابولیت‌های ثانویه آن، در این آزمایش شش رقم مختلف پروانش از نظر صفات ریختشناختی و زیست‌شیمیایی به‌منظور تشخیص بهترین رقم مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به صورت گلدانی در گلخانه و آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۹٦-۱۳۹۵ انجام شد. برای انجام این آزمایش ابتدا بذرهای ٦ رقم پروانش (Lilac، Polka Dot، Icy Pink، Red Bright، Apricot، Purple) از کشور هلند (شرکت سینجنتا) خریداری شد. سپس در اواسط فروردین ماه سال ۱۳۹۵، بذرها در سینی کشت حاوی پیت و کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) کشت شده و در

1- Oncovin
2- $C_{21}\ H_{24}\ N_2\ O_3$
3- Yohimbine
4- Rauvolfia

ادامه گیاهچه‌های پروانش بعد از این‌که در اواسط اردیبهشت‌ماه ٦ برگی شدند، به گلدان‌های سایز ۷ حاوی خاک زراعی، کوکوپیت و پیت (به نسبت ۱:۱:۲) منتقل شدند. در پایان، اندام‌های مختلف پروانش (اندام هوایی، ریشه) در زمان گلدهی (تیرماه) برداشت شدند (شکل ۱).

شکل ۱- ارقام مختلف مورد بررسی گیاه پروانش:
الف) Apricot، ب) Icy Pink، ج) Lilac، د) Red Bright، ه) Polka Dot، و) Purple.

Fig. 1. Studied cultivars of Periwinkle:
A) Apricot, B) Icy Pink, C) Lilac, D) Red Bright, E) Polka Dot, F) Purple.

صفات اندازه‌گیری شده

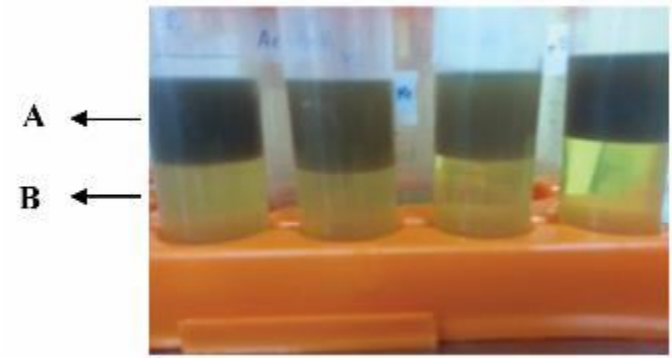
قطر ساقه و ریشه: قطر ساقه از قسمت وسط هر ساقه اندازه‌گیری و قطر ریشه نمونه‌های گیاهی نیز از ۵ سانتی‌متر زیر طوقه با استفاده از دستگاه کولیس بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

وزن تر و وزن خشک ریشه و برگ: وزن هر کدام از اندام‌ها قبل و بعد از فرآیند خشک کردن به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

خشک کردن نمونه‌ها: به‌منظور خشک کردن نمونه‌ها اندام‌های مورد نظر به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای معمولی در سایه قرار داده شدند. پس از آن به آون با دمای ٦۰ درجه منتقل و به‌مدت ٤۸ ساعت خشک شدند و سپس میزان رطوبت هر نمونه (۱٤-۱۲ درصد) با استفاده از دسیکاتور بررسی شد. نمونه‌های خشک شده به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک با ترازوی دیجیتال توزین شدند. نمونه‌ها با استفاده از آسیاب برقی به خوبی پودر شده و به جهت یکنواختی بیش‌تر، از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. برای جلوگیری از اختلاط نمونه‌ها در هر بار استفاده از آسیاب، دستگاه با الکل شستشو داده شد.

استخراج آلکالوئید گیاه پروانش: برای استخراج آلکالوئیدها ابتدا به ۱۰ گرم پودر خشک اندام‌های مختلف گیاه پروانش، ٤٠ میلی‌لیتر متانول خالص گرید HPLC[1] اضافه گردید. سپس ۲۰ دقیقه در اولتراسوند[2] (مدل پاناسونیک C2600s) با شدت ۲۸ کیلو هرتز قرار داده شد و بعد از آن به مدت ٢٤ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. محلول حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ[3] شد. بخش فوقانی محلول سانتریفیوژ شده پس از عبور از کاغذ صافی واتمن سایز ٤٢ جمع‌آوری شد. در انتها رسوبات لوله سانتریفیوژ و فیلتر با ۱۰ میلی‌لیتر متانول شستشو و به بقیه عصاره اضافه شد و حجم نهایی عصاره با استفاده از متانول به ۵۰ میلی‌لیتر رسید.

برای استخراج آلکالوئید وین‌کریستین، وین‌بلاستین و آجمالیسین متانول موجود در عصاره را با بن‌ماری[4] در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و ته‌مانده تبخیر در ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط آب و اسید کلریدریک (pH<۱) و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد. فاز اسیدی حاوی آلکالوئید که در قسمت بالا قرار می‌گیرد به‌وسیله دکانتور[5] جدا و برای مرحله بعد نگه داشته شد و فاز کلروفرمی که حاوی چربی‌ها، ترپنوئیدها و رنگیزه‌ها است نیز حذف شد. سپس با استفاده از هیدروکسید آمونیوم[6]، pH فاز اسیدی را به ۱۱ رسانده و بعد ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم[7] به عصاره افزوده و ۵ دقیقه تکان داده شد و سپس فاز کلروفرمی را که حاوی آلکالوئید است توسط ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسیدآمونیوم شستشو داده و فاز هیدروکسیدآمونیوم، با دکانتور جدا و حذف شد. در انتها فاز کلروفرمی را جدا نموده و با سولفات سدیم (Na_2SO_4) آبگیری شد. کلروفرم به وسیله تبخیر در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد از عصاره جدا شده و نهایتاً ته مانده تبخیر در ۲ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC حل شده و برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آماده شد (شکل ۲) (۲۳).



شکل ۲- استخراج ایندول ترپنوئید آلکالوئیدها

A: فاز هیدروکسید آمونیوم، B: فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئید.

Fig. 2. Extraction of Indole Terpenoid Alkaloid
A: Ammonium hydroxide phase, B: Chloroform phase (containing Alkaloid).

1- High-performance liquid chromatography
2- Ultrasound
3- Centrifuge
4- Bain-marie
5- Decanter
6- Ammonium hydroxide
7- Chloroform

تهیه نمودار کالیبراسیون برای وین‌کریستین، وین‌بلاستین و آجمالایسین: استانداردهای سه آلکالوئید وین‌بلاستین، وین‌کریستین و آجمالایسین از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. به‌منظور تهیه منحنی کالیبراسیون و معادله خط مربوطه، از غلظت‌های (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰) میلی‌گرم بر لیتر وین‌کریستین، (۰، ۰/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰) میلی‌گرم بر لیتر وین‌بلاستین و (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰) میلی‌گرم بر لیتر آجمالایسین استفاده شد. برای تهیه غلظت‌های متفاوت از هر کدام ابتدا یک محلول پایه از پودر وین‌کریستین، وین‌بلاستین و آجمالایسین با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با استفاده از حلال متانول تهیه و سپس حجم معینی از آن در بالن ژوژه ۱۰ سی‌سی با حلال موجود رقیق شده تا هر یک از غلظت‌های فوق حاصل گردد.

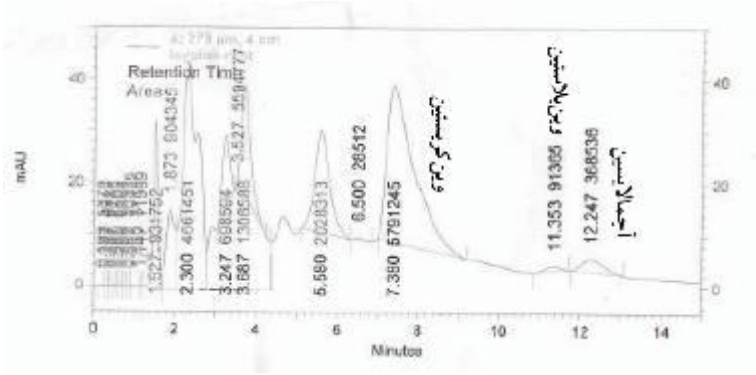
هر یک از استانداردهای فوق سه بار به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد تا از کالیبره بودن دستگاه اطمینان حاصل گردد. سپس با استفاده از مساحت سطح زیر منحنی هر یک از استانداردها نمودار کالیبراسیون مربوطه رسم شد. از معادله خط به‌دست آمده از منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت وین‌کریستین، وین‌بلاستین و آجمالایسین استفاده شد. معادله خط وین‌کریستین، وین‌بلاستین و آجمالایسین به شرح زیر است:

$$\text{Vincristine: } Y = 68556.1\,x - 170352.6 \quad (R^2 = 0.98) \quad (1)$$

$$\text{Vinblastine: } Y = 169865.4\,x - 167905.3 \quad (R^2 = 0.99) \quad (2)$$

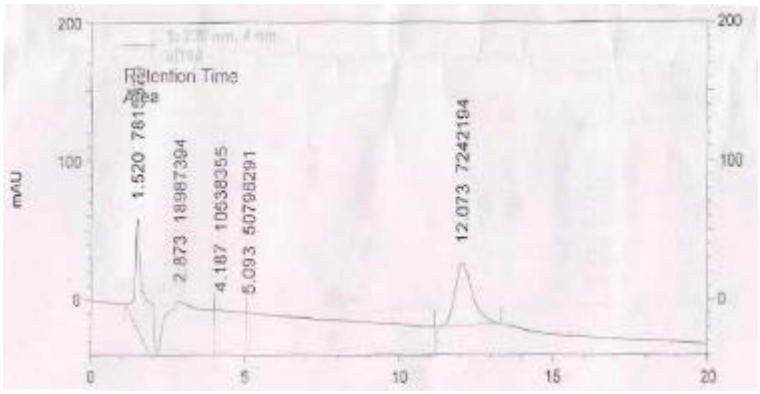
$$\text{Ajmalicine: } Y = 47191.73\,x - 117732.66 \quad (R^2 = 0.98) \quad (3)$$

تزریق عصاره‌های گیاهی: در این آزمایش از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل مرک- هیتاچی مجهز به پمپ لاکروم و دتکتور UV استفاده شد. برای تجزیه نمونه‌ها از ستون c_{18} با ابعاد ٤/٦ × ۲۵۰ میلی‌متر با اندازه ذرات پنج میکرومتر استفاده شد. سرعت جریان نمونه‌ها یک میلی‌لیتر در دقیقه با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۲۲۰ نانومتر بود. به منظور شناسایی پیک، نمونه‌ای از استاندارد وین‌بلاستین، وینکریستین و آجمالایسین به دستگاه تزریق شد. زمان بازداری آن‌ها در نمونه با زمان بازداری ترکیب استاندارد در هر تزریق مقایسه شد. فاز متحرک در این آزمایش تشکیل شده از ٤/٥ میلی‌لیتر دی اتیل امین است که توسط آب دیونیز شده به حجم ۳۰ رسانده شد و با اسید فسفریک غلیظ pH آن روی ۷/۵ تنظیم شد. سپس با متانول مخصوص HPLC، به حجم نهایی ۱۰۰ رسید. در آخرین مرحله ۲ میلی‌لیتر از هر نمونهٔ آماده شده و ۲۰ میکرولیتر نمونه‌های استاندارد به دستگاه تزریق شد (شکل‌های ۳، ٤ و ۵).



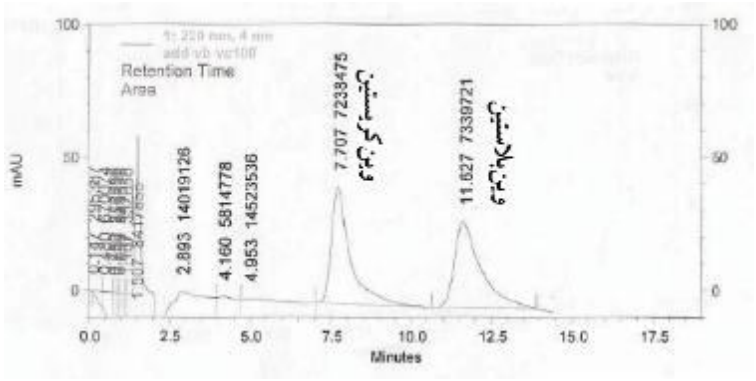
شکل ۳- کروماتوگرام HPLC نمونه ریشه رقم Icy Pink.

Fig. 3. HPLC Chromatogram of Icy Pink root.



شکل ٤- کروماتوگرام HPLC نمونه استاندارد آجمالایسین.

Fig. 4. HPLC Chromatogram of ajmalicine standard.



شکل ٥- کروماتوگرام HPLC نمونه استاندارد وین‌بلاستین و وین‌کریستین.

Fig. 5. HPLC Chromatogram of vinblastine and vincristine standard.

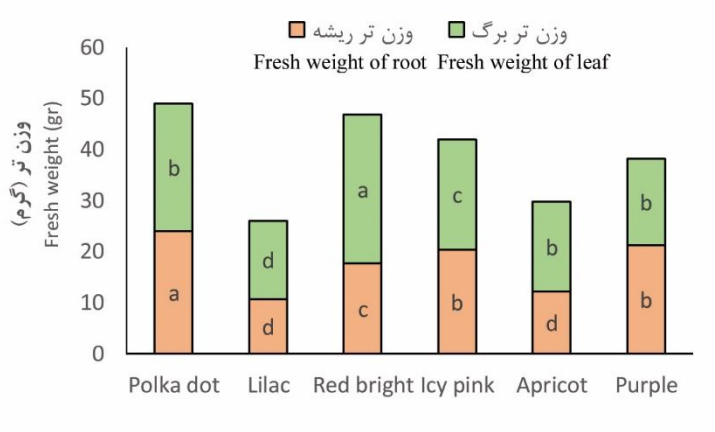
تجزیه تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی در ۳ تکرار صورت گرفت. هر تکرار شامل ۵ گلدان بود و در هر گلدان ۳ گیاه کشت شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد

با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

نتایج و بحث

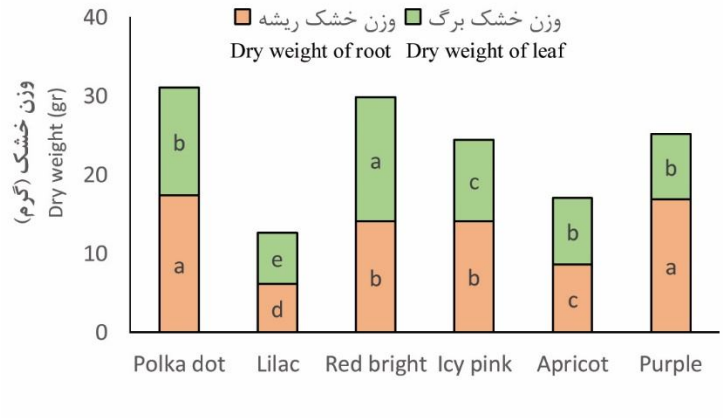
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، بین ارقام از نظر صفات ریختی (وزن تر و خشک ریشه و برگ، قطر ساقه، قطر ریشه، تعداد ریشه‌های فرعی، تعداد ساقه‌های فرعی، طول ساقه و طول ریشه) و فیتوشیمیایی (آلکالوئیدهای وین‌بلاستین، وین کریستین و آجمالایسین) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

با توجه به نتایج به دست آمده مقایسه میانگین‌ها، بیش‌ترین میزان وزن تر (۲۴/۰۳ گرم) و خشک (۱۷/۳۵ گرم) ریشه در رقم Polka dot و کم‌ترین میزان آن‌ها (به ترتیب ۱۰/۷۳ و ۶/۲ گرم) در رقم Lilac ثبت شد (شکل‌های ۱ و ۲). هم‌چنین بیش‌ترین میزان وزن تر و خشک برگ در رقم Red bright (به‌ترتیب ۲۹/۰۹ و و ۱۵/۷۴ گرم) مشاهده شد در حالی‌که کم‌ترین میزان این صفات (به‌ترتیب ۱۵/۲۸ و ۶/۴۴ گرم) در رقم Lilac ثبت شد (شکل‌های ۶ و ۷).



شکل ۶- اثر رقم بر وزن تر ریشه و برگ گیاه پروانش کبیر.

Fig. 6. Cultivar effect on fresh weight of *Catharanthus roseus* leaf and root.



شکل ۷- اثر رقم بر وزن خشک ریشه و برگ گیاه پروانش کبیر.

Fig. 7. Cultivar effect on dry weight of *Catharanthus roseus* leaf and root.

بر اساس مقایسه میانگین اثر رقم بر خصوصیات ریختی، بیش‌ترین میزان قطر ساقه (۰/۵۳۳ سانتی‌متر)، قطر ریشه (۰/٦۱۰ سانتی‌متر) و طول ساقه (٤٥/۹۹ سانتی‌متر) در رقم Purple مشاهده شد. در صورتی‌که کم‌ترین میزان قطر ساقه (۰/۳۰۰ سانتی‌متر) در رقم Red Bright مشاهده شد که با ارقام Lilac، Icy Pink، Apricot تفاوت معنی‌داری نداشت. هم‌چنین کم‌ترین میزان قطر ریشه (۰/۱۸۰ سانتی‌متر) و طول ساقه (۱۸/۲۵ سانتی‌متر) در رقم Lilac ثبت شد (جدول ۱).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیش‌ترین میزان طول ریشه (۲۰/۷٦ سانتی‌متر) در رقم Apricot مشاهده شد که با مقدار طول ریشه در رقم Icy Pink (۱۸/۹۱ سانتی‌متر) تفاوت معنی‌داری نداشت. کم‌ترین میزان طول ریشه (۱۰/۳۸ سانتی‌متر) نیز، در رقم Lilac ثبت شد. هم‌چنین بیش‌ترین تعداد ساقه فرعی (۲٦ عدد) در رقم Apricot مشاهده شد که با رقم Red Bright تفاوت معنی‌داری نداشت و کم‌ترین تعداد آن (۱۱/٦٦) در رقم Icy Pink مشاهده شد. بیش‌ترین تعداد ریشه فرعی (۲۲/٦٦) در رقم Red Bright و کم‌ترین تعداد (۱۲) در ارقام Apricot و Purple مشاهده شد (جدول ۱). بریزینوا و همکاران (۲۰۰۹)، با بررسی ۲۲ صفت ریخت‌شناسی در ۲٤ ژنوتیپ خشخاش در اسلواکی بیان نمودند که بین ژنوتیپ‌های یک گیاه از نظر ریخت‌شناسی تفاوت بسیار زیادی وجود دارد (۳). استرانسکا و همکاران (۲۰۱۳) و جانکولووسکا و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی صفات مختلف به تفاوت وسیع ریخت‌شناسی در ژنوتیپ‌های مختلف گیاه خشخاش اشاره کردند (۱۵ و ۲۹). در پژوهش دیگری، پژوهش‌گران به بررسی تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین ارقام داخلی و خارجی تنباکو پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که در میان ۱۳ رقم محلی تنباکو که جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند، ۱۱ رقم محلی به لحاظ ریخت‌شناسی و ژنتیکی با برخی از ارقام وارداتی شباهت داشتند (۷). هم‌چنین در پژوهشی دیگر، برای ارزیابی تنوع صفات ریخت‌شناسی و زراعی در ژرم‌پلاسم تنباکو، ۱۰۰ ژنوتیپ توتون از مجموعه مرکز تحقیقات توتون ارومیه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که از بین صفات مورد بررسی عملکرد برگ خشک و تعداد برگ در بوته مهم‌ترین عامل تمایز بین ژنوتیپ‌های توتون بود (٦). پیرخزری و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی ریخت‌شناسی جمعیت‌های بابونه جنوب ایران، اعلام کردند تفاوت بین صفات ریخت‌شناسی اندازه‌گیری شده بسیار زیاد است به‌طوری‌که بیش‌ترین ارتفاع مربوط به جمعیت شماره ۱ (۵۵ سانتی‌متر) و کم‌ترین مربوط به جمعیت شماره ۱۸ (۲۹ سانتی‌متر) بود (۲٤). هدایی و همکاران (۲۰۱۷) صفات ریخت‌شناسی ، ترکیب اسانس و محتوای آنتوسیانین ۱۷ رقم گل داوودی[1] مورد بررسی قرار دادند. براساس شاخص تنوع شانون (I)، خصوصیات ریخت‌شناسی مانند قطر گل تنوع بیش‌تری نسبت به سایر صفات نشان داد (۱۲).

1- *Chrysanthemum. morifolium*

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر رقم بر خصوصیات مورفولوژیک گیاه پروانش کبیر.

Table 1. Mean comparison of cultivar effect on morphological traits of *Catharanthus roseus*.

تعداد ریشه فرعی Number of lateral root	تعداد ساقه فرعی Number of Lateral stem	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length	طول ساقه (سانتی‌متر) Stem length	قطر ریشه (سانتی‌متر) Root diameter	قطر ساقه (سانتی‌متر) Stem diameter	تیمار (رقم) Treatments (Cultivar)
20 b	21.33 b	15.66 b	37.69 b	0.440 b	0.413 b	Polka Dot
15 c	14.33 c	10.38 d	18.25 d	0.180 d	0.310 c	Lilac
22.66 a	25 a	12.84 c	34.51 b	0.243 c	0.300 c	Red Bright
13.33 cd	11.66 d	18.91 a	31.22 c	0.220 cd	0.336 c	Icy Pink
12 d	26 a	20.76 a	29.57 c	0.270 c	0.333 c	Apricot
12 d	14 c	13.23 bc	45.99 a	0.610 a	0.533 a	Purple

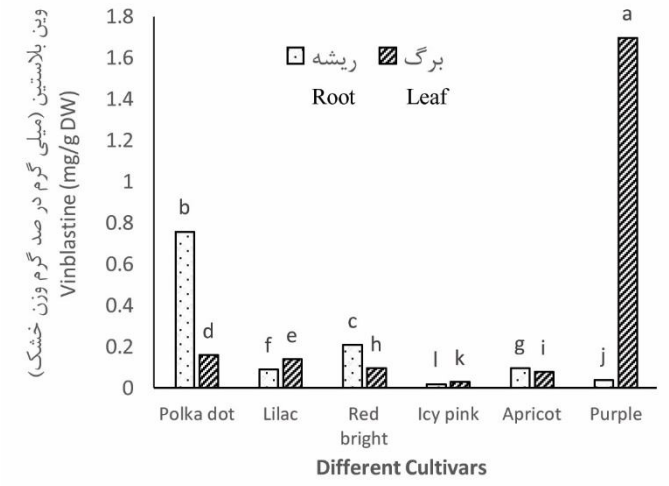
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Numbers followed by the same letter are not significantly differents (P≤0.05).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین میزان وین‌بلاستین در برگ رقم Purple (۱/۷ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) و کم‌ترین میزان آن در ریشه رقم Icy Pink (۰/۰۲ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) مشاهده شد (شکل ۸). هم‌چنین بیش‌ترین میزان آجمالایسین و وین‌کریستین نیز در برگ رقم Apricot (به ترتیب به میزان ۱/۸۹ و ۳/۶۱ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۹ و ۱۰). در صورتی که در ریشه ارقام Apricot و Red Bright و هم‌چنین در برگ رقم Lilac آلکالوئید آجمالایسین وجود نداشت (شکل ۱۰). چانگ و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی میزان آلکالوئیدهای سرپنتین، ویندولین و کاتارانتین ارقام مختلف گیاه پروانش کبیر بیان نمودند بیش‌ترین میزان سرپنتین در رقم Cooler Rose Hot (۴۶۱ میکروگرم در گرم وزن خشک) و بیش‌ترین میزان ویندولین (۲۰۸۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و کاتارانتین (۲۹۰۳ میکروگرم در گرم وزن خشک) در رقم Pacifica Peach مشاهده شد (۵). مگنوتا و همکاران (۲۰۰۶) میزان ویندولین در دو رقم پروانش را در اندام‌های مختلف بررسی کردند و عنوان داشتند که کم‌ترین میزان ویندولین در برگ‌های جوان رقم Little Delicata (۰/۱ µg/ml) مشاهده شده است (۱۸). سجادی و ورپورت (۱۳۷۹) ۴۳ رقم پروانش را از نظر محتوای وین‌بلاستین تجزیه کردند و نتیجه گرفتند که رقم Pacifia Punch کم‌ترین میزان وین‌بلاستین را دارد (۲۷). پژوهشگران به بررسی تفاوت‌های فیتوشیمیایی و فیزیولوژیکی دو رقم Alba و Rosea در دو گونه پروانش پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که رقم Rosea آلکالوئید بیش‌تری نسبت به رقم دیگر دارد. هم‌چنین آن‌ها تفاوت در عملکرد ارقام مختلف پروانش را به تنوع در آرایش ژنتیکی آن‌ها نسبت دادند (۱۳). زاویر و ردی (۲۰۱۷) با بررسی فیتوشیمیایی دو رقم کارلا نتیجه گرفتند که میزان متابولیت‌های ثانویه این دو رقم با یک‌دیگر متفاوت است. به طوری‌که رقم سفید نسبت به رقم سبز مقدار قابل‌توجه بیش‌تری از پلی‌فنول‌ها را داشت (۳۱). هم‌چنین بر اساس نتایج اسافی و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد، نوع مواد فنولی و میزان آن‌ها در ارقام مختلف برگ زیتون متفاوت بود (۹). هدایی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی فیتوشیمیایی ۱۷ رقم داوودی با استفاده از جی‌سی‌مس[1] عنوان کردند، تغییرات مهم ژنوتیپی در میزان (از رنج ۰/۱ تا ۰/۵۶ درصد وزنی) و نوع ترکیبات به‌صورت گسترده مشاهده شد (۱۲). پیستلی و همکاران (۲۰۱۷) اسانس

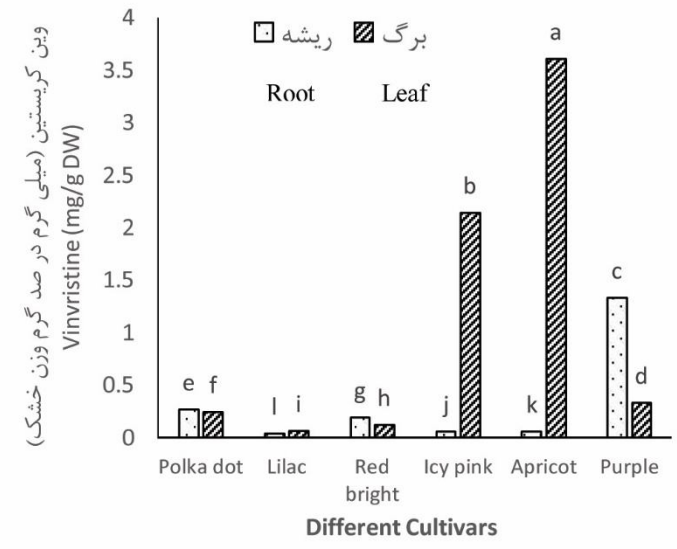
1- GC-MS

رقم‌ها و گونه‌های مختلف گیاه دارویی اسطوخودوس را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تمام ترکیبات اسانس به‌جز موترپن‌های اکسیژنه تحت‌تأثیر نوع رقم و گونه بود (۲۵). در پژوهشی دیگر، پژوهش‌گران به بررسی تغییرات فیتوشیمیایی در ۱۳ رقم *Moringa oleifera* پرداختند. بر اساس نتایج آن‌ها تغییرات زیادی در میزان فنل کل و فلاونوئید کل این ۱۳ رقم مشاهده شد. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان فنل کل در رقم‌های TOT5169 (۱/۴۳ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم) و SH (۱/۵۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم) اندازه‌گیری شد در حالی‌که کم‌ترین میزان فنل کل در رقم TOT5028 (۰/۳۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم) مشاهده شد که پنج برابر کم‌تر از بیش‌ترین مقدار فنل کل بود (۲۰).



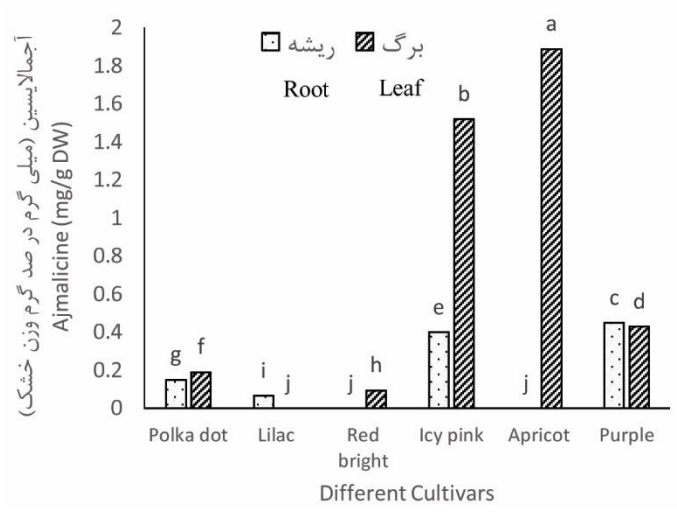
شکل ۸- اثر رقم و اندام بر میزان آلکالوئید وین‌بلاستین گیاه پروانش کبیر.

Fig. 8. Effect of organ and cultivar on Vinblastine alkaloid in *Catharanthus roseus.*



شکل ۹- اثر رقم و اندام بر میزان آلکالوئید وین‌کریستین گیاه پروانش کبیر.

Fig. 9. Effect of organ and cultivar on Vincristine alkaloid in *Catharanthus roseus.*



شکل ۱۰- اثر رقم و اندام بر میزان آلکالوئید آجمالایسین گیاه پروانش کبیر.

Fig. 10. Effect of organ and cultivar on Ajmalicine alkaloid in *Catharanthus roseus*.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج بیش‌ترین میزان وین‌بلاستین در برگ رقم Purple (۱/۷ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک)، بیش‌ترین میزان آجمالایسین و وین‌کریستین نیز در برگ رقم Apricot (به ترتیب به میزان ۱/۸۹ و ۳/۶۱ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) اندازه‌گیری شد. رقم‌های مختلف گیاه پروانش از لحاظ میزان آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید دارای تفاوت قابل‌توجهی هستند. اگرچه رقم‌های مختلف یک گیاه زیر مجموعه یک گونه محسوب می‌شوند ولی به هر حال مشاهده تفاوت‌های ایجاد شده در رقم‌های مختلف قابل بحث می‌باشد. با توجه به این مطلب که ترکیبات ثانویه از ترکیبات اولیه در گیاه ایجاد می‌گردند، مشاهده می‌شود که رقم‌های مختلف یک گیاه، مقادیر متفاوتی از یک آلکالوئید را در شرایط یکسان تولید نموده‌اند. این مسأله علاوه بر قابلیت تعمیم به مواد مؤثر دیگر، به‌خصوص با توجه به ارزش اقتصادی برخی آلکالوئیدهای این گیاه می‌تواند اهمیت بسیار بالایی داشته باشد. با توصیه کشت رقم برتر در زمینه تولید آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید، می‌توان کمک زیادی به افزایش بهره‌وری تولید آن‌ها نمود.

منابع

1. Almagro, L., Fernández-Pérez, F. and Pedreño, M.A. 2015. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. Molecules. 20: 2. 2973-3000.
2. Arora, A. 2013. Phytochemical analysis of methanolic extracts of leaves of some medicinal plants. Biol Forum–An Int J. 5: 2. 91-93.
3. Brezinova, B., Macak, M. and Eftimova, J. 2009. The morphological diversity of selected traits of world collection of poppy genotypes (genus Papaver). Central Europ. Agri. 10: 2. 183-192.
4. Brown B. 2003. Mint soil fertility research in the PNW. Western Nutr. Manage. Conf. 5: 3. 54-60.
5. Chung, I.M., Kim, E.H., Li, M., Peebles, C.A., Jung, W.S., Song, H.K. and San, K.Y. 2011. Screening 64 cultivars *Catharanthus roseus* for the production of vindoline, catharanthine, and serpentine. Biotechnol. Prog. 27: 4. 937-943.

6.Darvishzadeh, R. and Hatami, M.H. 2012. Analysis of genetic variation for morphological and agronomic traits in Iranian oriental tobacco (*Nicotiana tobaccum* L.) genotypes. Plant OMICS Crop Breed. 2: 1. 57-61.
7.Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panha, S. 2010. Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. Chiang Mai J. Sci. 37: 2. 293-303.
8.Duttagupta, S., Paul, M., Bag, S. and Bhattacharya, M. 2019. Assessment of variation in biochemical characteristics and radical scavenging properties of two cultivars of the medical plant *Catharanthus roseus*. Pharma Innovat. J. 8: 4. 315-317.
9.Essafi, H., Trabelsi, N., Benincasa, C., Tamaalli, A., Perri, E. and Zarrouk, M. 2019. Phytochemical profile, antioxidant and antiproliferative activities of olive leaf extracts from autochthonous Tunisian cultivars. Acta Aliment. 48: 3. 384-390.
10.Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S. and Devi, R.V. 2013. Pharmacological activities of *Catharanthus roseus*: a perspective review. Int. J. Pharma Bio. Sci. 4: 2. 431-439.
11.Habibi, H., Mazaheri, D., Majnoon Hoseini, N. and Chaeechi, M.R. 2007. Effect of altitude on essential oil and components in wild thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss.) Taleghan region. Research Construct. 73: 2-10. (In Persian)
12.Hodaei, M., Rahimmalek, M. and Arzani, A. 2017. Variation in morphological characters, chemical composition, and anthocyanin content of different *Chrysanthemum morifolium* cultivars from Iran. Biochem. Syst. Ecol. 7: 4: 1-10.
13.Idrees, M., Naeem, M. and Khan, M.M.A. 2010. The superiority of cv 'rosea' over cv 'alba' of periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) in alkaloid production and other physiological attributes. Turk. J. Biol. 34: 1. 81-88.
14.Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D. and Verpoorte, R. 2004. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Curr. Med. Chem. 11: 5. 607-628.
15.Jankulovska, M., Ivanovska, S., Stefkov, G., Acevska, J., Boshev, D. and Jankuloski, L. 2013. Morphological diversity of some opium poppy genotypes (*Papaver somniferum* L.). In IV Int Symposium "Agrosym.
16.Jordan, M.A. and Wilson, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat. Rev. Cancer. 4: 4. 253-265.
17.Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M. and Sala, F. 2004. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Sci. 167: 4. 725-731.
18.Magnotta, M., Murata, J., Chen, J. and De Luca, V. 2006. Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by alkaloid and enzymatic profiling. Phytochemistry. 67: 16. 1758-1764.
19.Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N. and Ghosh, A.C. 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. Curr. Med. Chem. 8: 12. 1467-1486.
20.Ndhlala, A., Mulaudzi, R., Ncube, B., Abdelgadir, H., du Plooy, C. and Van Staden, J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. Molecules. 19: 7. 10480-10494.
21.Née Pal, M.D. and Raychaudhuri, S.S. 2003. Estimation of genetic variability in *Plantago ovata* cultivars. Plant. Biol. 47: 3. 459-462.
22.Omidbeaigi R. 2013. Production and processing of medicinal plants. Vol. I. *Behnashr Press*. Mashhad, Iran. 347p. (In Persian)
23.Peyvandi, M. 1992. Investigation of indole alkaloids of three species of vinca in plant, tissue and cell culture. *M.Sc. Thesis*, Islamic Azad University, Tehran. (In Persian)
24.Pirkhezri, M., Hassani, M. and Hadian, J. 2010. Genetic diversity in different populations of *Matricaria chamomilla* l. Growing in southwest of Iran based on morphological. Adv. Med. Plant Res. 4: 1. 1-13.

25. Pistelli, L., Najar, B., Giovanelli, S., Lorenzini, L., Tavarini, S. and Angelini, L.G. 2017. Agronomic and phytochemical evaluation of lavandin and lavender cultivars cultivated in the Tyrrhenian area of Tuscany (Italy). Ind. Crops Prod. 109: 37-44.
26. Rai-Dehagi, H., Razmjoo, J., Sabzaliyan, M.R. and Arzani, A. 2014. Effect of shading on morphological characteristics and essential oil content in different of genotypes of three species of mint. Plant Process Funct. 4: 13. 58-69.
27. Sajadi, S.E. and Verpoort, R. 2000. Comparison of 43 cultivars of Periwinkle for Vinblastine anti-cancer alkaloids. Res. Med. Sci. 5: 2. 20-23. (In Persian)
28. Shabani, M., Farsi, M. and Mirshamsi Kakhaki, M. 2014. Evaluation of the effect of ethylene on the expression of T16H, G10H, DAT and AVLBS genes in the Periwinkle (*Catharanthus roseus*). Mod. Genet. 9: 2. 151-160.
29. Stranska, I., Skalicky, M., Novak, J., Matyasova, E. and Hejnak, V. 2013. Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids. Ind. Crops Prod. 41: 120-126.
30. Thakore, D., Srivastava, A.K. and Sinha, A.K. 2015. Model based fed batch cultivation and elicitation for the overproduction of ajmalicine from hairy roots of *Catharanthus roseus*. Biochem. Eng. J. 97: 73-80.
31. Xavier, J. and Reddy, J. 2017. A Study on Antioxidant and antibacterial activities of the fruit and seed extracts of two different cultivars of Momordica *charantia* L. J. Pharma. Phyto. 6: 6. 1182-1187.