

Нүцгэн намуу ургамлын *in vitro* биомасс дахь алкалоид

С.Отгонпүрэв¹, Б.Мөнгөнцоож¹, Б.Ариунжаргал², Д.Мөнхцэцэг^{3*}

¹-Мал аж ахуй, биотехнологийн сургууль, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

²-Шинжлэх ухааны сургууль, МУИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

³-Ургамал хамгааллын эрдэм шинжилгээний хүрээлэн, ХААИС,
Улаанбаатар, Монгол Улс

*Холбоо барих хаяг: muunuushka@yahoo.com

ХУРААНГУЙ

Нүцгэн намуу (*Papaver nudicaule*) нь эмийн болон чимэглэлийн ач холбогдолтой ургамал юм. Уг ургамлын үрээс каллусын болон эсийн суспензийн биомассыг гарган авахдаа нафтален цууны хүчил болон бензил аденин өсөлтийн бодисын хослол бүхий тэжээлт орчинд өсгөвөрлөн өсөлтийн параметруудийг тогтоолоо. Ургамлын *in vitro* биомасс т нимгэн үеийн хроматографийн аргаар сангвинарин алкалоидыг стандарт бодистой харьцуулан тодорхойлов. Сангвинарин нь ургамлын эд эрхтэний төрөлжилтөөс үл хамааран үүсдэг биологийн өндөр идэвхтэй хоёрдогч нийлэгжилтийн бүтээгдэхүүн юм.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: өсөлтийн гормоны хослол, каллусын эд, суспензийн нягт, нимгэн үеийн хроматографи

ОРШИЛ

Намуутан овгийн ургамал нь биологийн идэвх өндөртэй эмийн найрлаганд ордог бензоикохинолины бүлгийн алкалоидыг агуулдаг билээ. Алкалоид нь нийт ургамлын нөмрөгийн 20%-д тохиолдох 12000 орчим молекул масстай азот агуулсан нэгдлүүд байдаг. Сангвинарин нь бензоикохинолины бүлгийн алкалоид бөгөөд гербицид болон зарим бактерийн эсрэг онцгой нөлөө үзүүлдэг нэгдэл юм [1,2]. Энэхүү нэгдлийн шүдний өнгөр тогтоох бактерийн эсрэг идэвхтэй нь тодорхой болсон цаг буюу 1980 оны дунд үеэс шүдний оо, ам зайлагч бэлдмэлийн найрлаганд оролцуулан үйлдвэрлэх болсон юм. Иймээс энэхүү бодисын хэрэгцээ шаардлага ихэссэн бөгөөд байгалийн зарим намуутан ургамлын нөөцийг маш ихээр шаардан бага гарцтай нөөцийг ихээр ашиглан шавхах болсон байдаг [3]. Ургамлын эд, эсийн өсгөврийн аргаар эмийн ургамлаас биологийн идэвхт нэгдлийг цаг уур, улирлын нөцхлөөс үл хамааран байгалийн нөөцийг устгахгүйгээр гарган авах орчин үеийн өндөр

технологийн нэг билээ [4,5]. Сангвинарин алкалоидын эсийн суспензийн өсгөврийн аргаар төрөл бүрийн өдөөгч ашиглан намуутан овгийн ургамлууд болох тамхины намуу *Papaver somniferum*, Их шүүдэргэнэ *majus* L, *Eschshcoltzia colifornica*, *Macleaya cordata*, Нүцгэн намуу *Papaver nudicaule* зэрэг ургамалаас гарган авсан байна [6-14]. Их шүүдэргэний эдийн өсгөвөрт сангвинарин алкалоид агуулагдаж байгаа болохыг урьд нь тогтоосон билээ [15]. Энэхүү судалгааны ажлаар нүцгэн намуу ургамлын каллусын эдийн биомасс гарган авах тохиромжтой гормоны хослол болон эсийн суспензийн биомасс гарган авах өсөлтийн параметруудийг судлан тогтоосон юм. Гарган авсан *in vitro* биомасс сангвинарин нийлэгжсэн байгаа уг бодисыг энэхүү ургамлын өсгөврөөс байгаль цаг уур, гадаад орчин нөхцлөөс үл хамааран дагалдах хольцгүйгээр цэврээр ялган авах боломж олгох юм.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН АРГАЗҮЙ

ХААИС-ийн МААБС-ийн ургамлын өсгөврийн лабораторид хадгалагдаж байсан нүцгэн намуу ургамлын үрийг 1/2 MS орчинд өсгөвөрлөв. Каллус үүсгэх зорилгоор уг ургамаланцраас навчны эксплантыг авч MS суурь тэжээлт орчинд 2,4-дихлорфенокси цууны хүчлийг (2.4-Д) дангаар (0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0 мг/л), нафталан цууны хүчил (НЦХ) болон бензил аденин (БА) гормоныг тодорхой харьцаагаар (1.0:0.0; 1.0:0.1; 1.0:0.5; 1.0:1.0; 0.5:1.0; 0.1:1.0) хольсон нийтдээ 14 төрлийн тэжээлт орчинд суулгалт хийж харанхуй болон 650 lux гэрэлтэй 25±2°C-д 4-8 долоо хоног өсгөвөрлөн каллусын ургах эрчим, морфологийн шинж чанарыг долоо хоног бүр ажиглан тэмдэглэл хөтлөв. Хяналт болгон өсөлтийн бодисгүй MS орчинд эксплантуудыг өсгөвөрлөв. Хамгийн эрчимтэй каллус үүсгэж байгаа тэжээлт орчинд ургасан 4 долоо хоногтой каллусыг

цуглуулан эсийн суспензийн өсгөврийг MS суурь шингэн тэжээлт орчинд каллус хамгийн эрчимтэй үүсч байсан гормоны хослолыг ашиглан 25±2 °C-тай тасалгааны нөхцөлд сэгсрэгч төхөөрөмжөөр 140 эрг/мин 3-4 долоо хоног өсгөвөрлөв. Эсийн суспензийн идэвхтэй өсөлтийн үеийг түүний нягтыг тодорхойлох аргаар тодорхойлов. Тэжээлт орчин дэх эсийн нягтыг хэмжихдээ 3-28 хоногт нийт 8 удаа микроскопоор харж 4 том нүдэнд диагностиар тоолох ажиллагааг 5 удаа давтан хийсэн. Гарган авсан эсийн суспензийн биомасст биологийн идэвхтэй бодисын найрлагыг нимгэн үеийн хроматографийн аргаар тодорхойлов. Хөдөлгөөнт фазаар хлороформ ба метанол (7:3) систем хөдөлгөөнгүй фазаар силикагель ялтас, харьцуулах стандарт бодисоор сангвинарин хлоридыг ашиглан туршилтын тоон үзүүлэлтэд Excel программ ашиглан боловсруулалт хийв.

СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Каллусын эд бол эд эрхтэний төрөлжилтөнд ороогүй эсийн бөөгнөрөл юм. Ургамлын хоёрлогч нийлэгжилтийн бүтээгдэхүүнийг хурдан хугацаанд *in vitro* орчинд гарган авах үндсэн аргын нэг нь эх ургамлын аль нэг эксплантаас каллусын эд гарган авах юм. Каллус өсгөвөрлөх зорилгоор ариун ургаманцраас 10x10 мм хэмжээтэйгээр

эксплантыг жижиглэн нэг петрийн аяганд 4-6 ширхэгийг авч суулгалт хийснээс 14 хоногийн дараагаар эксплантын огтлосон гадаргуугаас каллус үүсч эхлэв. Эхний үед каллус бүдэг шар ногоон өнгөтэй байснаа аажмаар улбар шар өнгийн туяатай болж байв.

Хүснэгт 1

Тэжээлт орчны хувилбаруудад нүцгэн намуугийн каллусын ургалтын эрчим.

№	Үндсэн тэжээлт орчин	Гормон мг/л	Каллус ургах эрчим%			
			Эксплантын төрөл			
	Ургуулсан орчин		Х*	Үр Г**	Х	Навч Г
0	Хяналт MS	0	0	0	0	0
1	MS+2,4Д	0,1	-	-	-	-
2	MS+2,4Д	0,5	-	-	-	-
3	MS+2,4Д	1,0	-	-	-	-
4	MS+2,4Д	1,5	-	-	-	-
5	MS+2,4Д	2,0	-	++	-	-
6	MS+2,4Д	2,5	-	-	-	--
7	MS+2,4Д	3,0	-	-	-	-
8	MS+2,4Д	4,0	-	-	-	-
9	MS+NAA	1,0	-	-	-	-

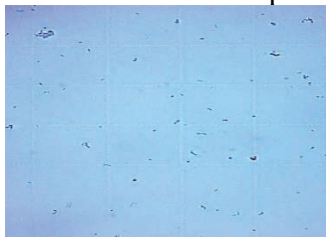
10	МС+NAA+BA	1,0:0,1	-	+	-	-
11	МС+NAA+BA	1,0:0,5	--	+++	-	+
12	МС+NAA+BA	1,0:1,0	-	++	--	-
13	МС+NAA+BA	0,5:1,0	-	-	-	-
14	МС+NAA+BA	0,1:1,0	-	-	-	-

14 хоногийн хугацаанд каллус үүсээгүй – тэмдэгээр, ургалтын эрчим 30%”-иас дээш бол +, 60%иас дээш бол ++, 80%-иас дээш бол +++ гэж тэмдэглэв. *-харанхуй нөхцөл, **-гэрэлтэй нөхцөл

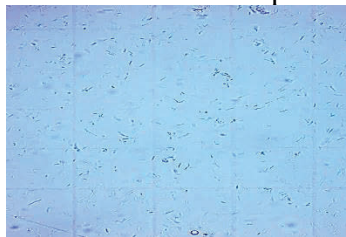
14 хоногийн хугацаанд 2.4-Д нэмсэн тэжээлт орчноос зөвхөн 2мг/л концентрацитай нэмсэн 5-р тэжээлт орчинд үрээс каллус гэрэлтэй орчинд үүсэж байсан бөгөөд энэхүү каллусын ургалтын эрчим 64.5% байв. Харин НЦХ ба БА гормоныг тодорхой харьцаагаар хослуулсан орчинд 10,11,12-р тэжээлт орчинд каллус үүсч байв. 10-р тэжээлт орчин дахь үрээс гэрэлтэй орчинд үүссэн каллусын ургалтын эрчим 48.7%, 12-р тэжээлт орчинд дахь 67%, 11-р тэжээлт орчин буюу 1 мг/л НЦХ ба 0.5мг/л БА агуулсан орчноос хамгийн эрчимтэй буюу үрээс гэрэлтэй орчинд үүссэн

каллусын ургалтын эрчим нь 84.6% байв. Харин навчны эксплантаас каллус үүсэх нь муу байсан ба зөвхөн энэхүү 11-р тэжээлт орчинд гэрэлтэй орчинд 46%-н ургалтын эрчимтэй каллус үүсч байв. Каллусын эдээс богино хугацаанд их хэмжээний эсийн биомасс гарган авахын тулд шингэн тэжээлт орчинд суспензийн өсгөвөр гарган авах юм. 4 долоо хоногтой калуссын эдийг 2-4 хувааж MS ба 1/3 MS шингэн тэжээлт орчинд суспензлэн өсгөвөрлөв. Уг орчинд 84,6% каллус үүсгэж байсан гормоны хослыг нэмэв.

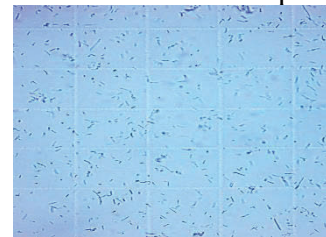
14 хоногтой өсгөвөр



21 хоногтой өсгөвөр



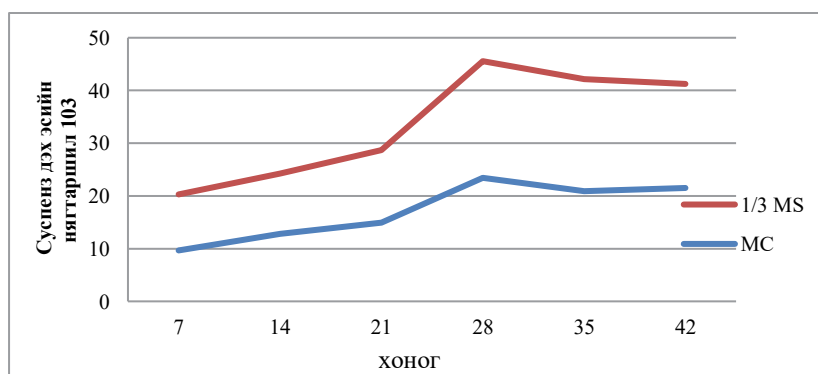
28 хоногтой өсгөвөр



1-р зураг. Суспенз дэх эсийн тоо. Эсийг 400-2000 дахин өсгөн харуулав.

Суспенз дэх эсийн өсөлтийн график S хэлбэртэй байх бөгөөд ургамлын зүйлийн хэлбэрээс шалтгаалаад идэвхтэй өсөлтийн хугацаа нь харилцан адилгүй байдаг. Өсгөвөрлөлтийг хийснээс хойш эхний 14

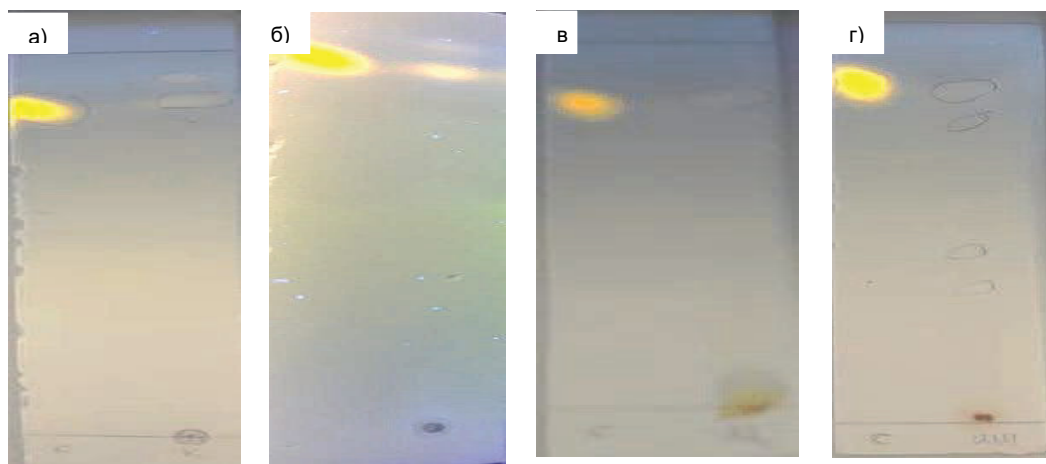
хоногт эсийн тоо аажим өсөж байснаа 21-28 хоногт огцом өсөлт ажиглагдав. 35 хоногтой болоход эсийн тоо буурах зүй тогтолтой байв (2-р зураг).



2-р зураг. Шингэн тэжээлт орчинд өсгөвөрлөсөн эсийн нягт ба хугацааны хамаарал

Эрдэс бодисын агуулгыг 3 дахин багасган шингэрүүлсэн хувилбарт эсийн нягт нь шингэрүүлээгүй хувилбараас 1.8 дахин их байв. Иймээс эрдсийн агуулга бага агуулсан орчинд эсийг 28 хоногийн турш өсгөвөрлөн хураан авч хөлдөөн хатааж хандлаад

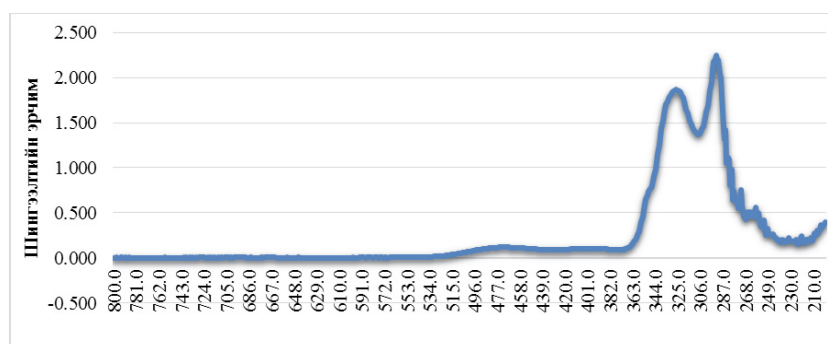
сангвинарин алкалоид нийлэгжсэн эсэхийг тогтоолоо. Үүний тулд эх ургамлын иш, цэцгийг мөн метаноолоор хандлан нимгэн үеийн хроматоргафиар харьцуулан илрүүлэв (3-р зураг).



3-р зураг. Нүцгэн намуу ургамлын биомасуудын сангвинарин алкалоидтай харьцуулсан нимгэн үеийн хроматограмм а) стандарт сангвинарин ба каллус б) стандарт сангвинарин ба суспензийн биомасс, в) стандарт сангвинарин ба намуугийн цэцгийн ханд, г) стандарт сангвинарин ба ишний ханд.

Хөдөлгөөнт фаз хлороформ метанолын (7:3), Хэт ягаан туяаны 254 нм бүхий гэрэл ашиглан толбыг тодруулан харуулав. Нимгэн үеийн хроматографи явуулахад нүцгэн намуугийн иш, цэцэг төдийгүй каллусын болон суспензийн биомасст сангвинарин алкалоид нийлэгжсэн болох нь стандарт бодистой ижил өнгийн болон ижил Rf-0.83 утга бүхий хэт ягаан туяаны гэрэлд шар өнгийн флуоресценци өгдөг толбо үүссэнээс тодорхой харагдаж байна (зураг 2). Энэхүү толбыг сангвинарин мөн болохыг хэт ягаан туяаны

спекрофометрээр уншуулан шалгав. Хэт ягаан туяаны мужид 340 ба 290 нм-т эрчимтэй шингээлт өгсөн нь дөрөвдөгч алкалоид мөн болохыг илгэх нэг үзүүлэлт болох юм. Иш болон цэцгэнд олон толбо илэрсэн нь бүтэн эрхтэнд үүссэн намуу ургамалд агуулагддаг бусад биологийн идэвхтэй нэгдлүүд болон алкалоидууд юм. Харин каллусын болон эсийн суспензийн биомасст маш цөөхөн толбо илэрсний дотор сангвинарин алкалоид зонхилон нийлэгжсэн байна.



4-р зураг. Ялгарсан бодис хэт ягаан туяаны шингээлтийн эрчим

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Нүцгэн намуу ургамал нь том шар, улбар шар гоёмсог өнгийн цэцэгтэй тул гоёл чимэглэлийн зориулалтаар их хэмжээгээр тариалдаг төдийгүй *in vitro* орчинд олшруулан үржүүлэх арга протоколууд нэлээд хэвлэгдсэн байна [16,17]. Харин нүцгэн намуу ургамлаас каллусын эд гарган авахад нафтилен цууны хүчил болон бензил аденин гормоны хослолыг ашиглах үр дүнтэй болохыг тогтоосон бөгөөд энэ нь бидний судалгааны дүнтэй дүйж байгаа юм. Ерөнхийдөө сангвинарин алкалоидын нийлэгжлийг төрөл бүрийн өдөөгч ашиглан бусад намуутан овгийн ургамлаас гарган авах ажил эрчимтэй хийгдсэн байна [3,5,6,7,8]. Намуугийн төрлийн ургамлын суспензийн өсгөвөрт хүйтний стрессийн нөлөөгөөр сангвинарин алкалоидын нийлэгжилтийг өдөөхөд нүцгэн намуугийн биомасст уг алкалоид 0.07% -иар үүсч байсан байна [14]. Монгол орны өвөрмөц хатуу ширүүн уур амьсгалыг тэсвэрлэн ургадаг энэхүү ургамлын биологийн идэвхт нэгдлийн агуулга онцлог ялгаатай байх боломжтой төдийгүй уг ургамлын газрын дээд хэсгээс 8 төрлийн алкалоид ялган бүтэц байгуулалтыг тогтоосны дотор нэг шинэ алкалоид илэрсэн байна [18]. Эдгээр судлаачдын ажлын үр дүнд сангвинарин ялгаараагүй байсан бөгөөд бидний гарган авсан биомасст үүссэн байгаа

нь ихээхэн сонирхол татав. Алкалоидуудыг нийлэгжилт ургамлын эрхтний ялгаралаас, наснаас хамааралтай байдаг. Харин сангвинарине ба коптисине алкалоид нь эрхтний ялгаралаас үл хамааран нийлэгждэг [7]. Амны хөндийн эрүүлжүүлэхэд ашигладаг, бактерийн өндөр идэвхитэй цэвэр сангвинарин алкалоидыг ялгах тохиолдолд каллусын болон суспензийн биомассаас ялгах нь илүү хялбар бөгөөд цэвэршилт сайн байх давуу талтай юм. Учир нь бүтэн ургамлаас сангвинарин алкалоидыг ялган авахын тулд зөвхөн байгалийн жамаар ургамал ургах үед нь хураан авч уламжлалт аргаар хатаан олон удаагийн фракцлан хандлалтанд оруулан шүлтжүүлэн, өндөр үнэтэй хортой (хлороформ) органик уусгагчаар хандлан ялган авдаг. Харин эд, эсийн өсгөвөрт бусад дагалдах нэгдэл байхгүй учраас хямд төсөр уусгагчаар (этонол) нэг удаагийн хандлалтаар цэвэршилт өндөртэй нэгдлийг улирлаас үл хамааран ялган авах боломжтой юм. Бидий судалгааны үр дүнд нүцгэн намуу ургамлын каллусын болон суспензийн өсгөвөрт сангвинарин алкалоид нийлэгжсэн болохыг илрүүлсэн бөгөөд энэ нь хими, физик, биологийн өдөөгч ашиглан уг бодисын хэмжээг ихэсгэх бионийлэгжлийг судлах нарийн судалгааны ажлын эхлэл суурь болж байгаа юм.

ДҮГНЭЛТ

Нүцгэн намуу *Papaver nudicaule* ургамлын каллусын ба суспензийн биомасст гарган авах тохиромжтой гормоны хослол нь 1 мг/л нафтален цууны хүчил ба 0.5мг/л бензил аденин агуулсан MS шингэн болон хатуу тэжээлт орчин хамгийн тохиромжтой болохыг судлан тогтоов. Суспензийн

дараагийн өсгөвөрлөлт хийх эсийн суспензийн идэвхтэй өсөлтийн үе нь 28 хоног байв. Гарган авсан каллусын ба суспензийн биомасст сангвинарин алкалоид нийлэгжсэн болохыг нимгэн үеийн хроматоргафийн аргаар стандарт сангвинаринтай харьцуулан тодорхойллоо.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

[1] Отгонпүрэв С (2015) Их шүүдэргэний *in vitro* биомасст гарган авч биологийн идэвхт нэгдлийг харьцуулан тодорхойлсон дүн., докторы диссертаци. ХААИС. УБ

[2] Andrew Croaker., Graham J. King ., John H. Pyne ., Shailendra Anoopkumar Dukie ., Lei Liu (2016) *Sanguinaria canadensis*: Traditional Medicine, Phytochemical

- Composition, Biological Activities and Current Uses. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1414
- [3] Archambault J., Williams R D., Bedard C., Chavarie C.(1996) Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension culture. *Journal of biotechnology.*, 46: 95-105
- [4] Ramachandra,S, Rao., Ravishankar, G.A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances.*, 20, 101–153
- [5] Karla Ramirez-Estrada., Heriberto Vidal-Limon., Diego Hidalgo., Elisabeth Moyano., Marta Golenioswki., Rosa M. Cusidó., Javier Palazon.(2016) Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories-review. *Molecules.*, 21(2), 182
- [6] Frantisek Bilka., Andrea Balařová ., Andrea Bilková., Ivana Holková (2012). Comparison of sanguinarine production in suspension cultures of the *Papaveraceae* plants. *Čes.slov. arm.*, 61,267-270
- [7] Colombo M. L., Tome F.(1995) *In vitro* culture and the production sanguinarine, Coptisine, and Other Isoquinoline Alkaloids. *Biotechnology in Agriculture and forestry.*, Vol.33:157-175
- [8] Bilka F., Balazova A., Blanarikova V., Bilkova. A. (2008) Effect of elicitation with *botrytis cineraea* hydrolysate on sanguinarine formation in suspension cultures of *Chelidonium majus* L. *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianaе tomus.*, 39-45
- [9] Colombo M. L., Tome F.(1991) Production of Sanguinarine by *Chelidonium majus* L Callus Cultures. *Planta med.*, 57:428-429
- [10] Balařová, A., Blanáriková, V., Bilka, F., Bilková, A. (2008) Effect of combined biotic and abiotic elicitor on the sanguinarine formation in the cell suspension cultures of *eschscholtzia californica* cham. *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianaе tomus.*, 58-63
- [11] Joenel Alcantara., David A. Bird., Vincent R. Franceschi., Peter J. Facchini.(2005) Sanguinarine Biosynthesis Is Associated with the Endoplasmic Reticulum in Cultured Opium Poppy Cells after Elicitor Treatment. *Plant Physiology*, May, Vol. 138,173–183
- [12] Ivana Holková., Lýdia Bezáková., František Bilka., Andrea Balařová., Marián Vanko, Vítazoslava Blanáriková. (2010) Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry.*,48, 887-892
- [13] Ju, Young-Woon., Chul Kim., Sang-Yo Byun. (1993) Phytohormone effects with Elicitation on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *escholtzia californica*. *Journal of Microbiology and biotechnology.*, Vol 3, 4, 238-243
- [14] Brain G Lockwood (1984) Alkaloids of cell suspensions derived from four papaver spp. And the effect of temperature stress. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 114(4):361–363
- [15] Отгонпүрэв С., Цэвэгсүрэн Н., Алтанцэцэг (2016) Их шүүдэргэний эс, эдийн өсгөвөрт изохинолины бүлгийн алколоидын бүрдлийг тодорхойлсон дүн. ХАА-шинжлэх ухаан.
- [16] Jing Li Yang., Bo Zhao., Eun Soo Seong ., Myong Jo Kim ., Won Hee Kang., Na Young Kim, Chang Yeon Yu., Cheng Hao Li (2010) Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L., an ornamental medicinal plant *Plant Biotechnol Rep* 4:261–267
- [17] Savona M., Semeria L., Allavena A., Carli S., Profumo P. (2001) In vitro culture of *papaver nudicaule* L. *Acta Horticulturae* 560 IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. 469-472
- [18] Ralitsa Istatkova, Stefan Philipov, Gerelt-Od Yadamsuren, Javzan samdan (2008) Alkaloids from *Papaver nudicaule* L. *Natural Product Research* 22(7):607-11

Alkaloids of *in vitro* biomass of *papaver nudicaule* L

Otgonpurev S.¹, Munguntsooj B.¹, Ariunjargal B.², Munkhtsetseg D.^{3*}

¹-School of Animal Science and Biotechnology, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

²-School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolia

³-Institute of Plant Protection, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia,

*Corresponding email: muunuushka@yahoo.com

ABSTRACT

Papaver nudicaule L has a long history as a being useful for the treatment of many diseases in Asian and European countries. Aim of this study was to cultivate callus and cell suspension culture *in vitro* using plant phytohormones. The proliferative capacity was tested on shoot cultivated on Murashige-Skoog (MS) basal medium testing auxins: -Naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with cytokinine: 6-Benzylaminopurine. We determined production of alkaloids by four-week old callus and cell suspension biomass of *Papaver nudicaule* using thin layer chromatography comparing standard sanguinarine. This result displayed us the easier approach to isolate pure one alkaloid from the biomass that those whole- plant.

KEY WORDS: Plant growth regulator, callus tissue, density of suspension, thin layer chromatography