نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره چهارم، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

افزایش تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیّت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در کشت سلول *Linum album* توسط متیل جاسمونات

صفیه فخاری[۱] و *مظفر شریفی[۲]
[۱]کارشناسی‌ارشد گروه علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،
[۲]دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۹

چکیده

کتان سفید با نام علمی (*Linum album* L.)، شامل ترکیب دارویی پودوفیلوتوکسین می‌باشد که به‌عنوان پیش‌ساز داروهای ضدسرطان etoposide، teniposide و etophose استفاده می‌شود. کشت سلولی منبع مهمی برای تولید پودوفیلوتوکسین می‌باشد. راه‌کارهای متعددی از جمله تیمار با الیسیتورها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در سیستم کشت سلولی مشخص شده‌اند که شامل غلظت الیستور، طول زمان تحریک و نوع محیط کشت می‌باشد. این عوامل با تأثیر بر مسیرهای انتقال سیگنال، منجربه تغییر در تنظیم بیان ژن‌ها و در نهایت تولید متابولیت‌ها به‌عنوان پاسخ دفاعی در برابر تنش ایجاد شده می‌باشند. در این مطالعه تأثیر متیل جاسمونات بر میزان تولید پودوفیلوتوکسین در دوره زمانی ۱، ٦، ۱۲، ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت در کشت سلولی بررسی شد. با توجه به نتایج تفاوت معنی‌داری بین رشد سلول‌های تیمار شده نسبت به شاهد، در زمان‌های مختلف مشاهده نمی‌شود اما تولید پودوفیلوتوکسین تحت‌تأثیر متیل جاسمونات با گذشت زمان روند افزایشی داشت و پس از ٤٨ ساعت به ۰/۳۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک رسید. برای درک عملکرد متیل جاسمونات بر مسیر بیوسنتز پودوفیلوتوکسین فعالیت آنزیم PAL بررسی شد. فعالیت این آنزیم ٦ ساعت پس از تیمار افزایش یافت. در این مطالعه تغییرات محتوی پودوفیلوتوکسین با تغییرات الگوی فعالیت آنزیم PAL متناسب بود.

واژه‌های کلیدی: پودوفیلوتوکسین، کتان سفید، کشت سلول، متیل جاسمونات

---

* مسئول مکاتبه: msharifi@modares.ac.ir

مقدمه

کتان سفید، گیاهی علفی، چندساله از خانواده Linaceae و بومی ایران است. این گیاه شامل ترکیبات لیگنانی متعددی است. لیگنان‌ها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانوی هستند که در گونه‌های مختلفی از گیاهان حضور داشته و فعالیت زیستی مختلفی از خود نشان می‌دهند. پودوفیلوتوکسین و ترکیبات مشتق آن، از جمله ترکیبات لیگنانی هستند که دارای خواص ضدویروسی و ضدسرطانی می‌باشند. ترکیبات نیمه‌مصنوعی از پودوفیلوتوکسین (etoposide، teniposide و etophose) در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان و تومورهای مغزی مورد مصرف قرار می‌گیرند. این ترکیبات ضدسرطانی با اتصال به آنزیم توپوایزومراز II باعث تخریب DNA می‌شوند (فرکیا و همکاران، ۲۰۰٤). مسیر ساخت پودوفیلوتوکسین از آمینو اسید فنیل آلانین شروع شده (مسیر فنیل پروپانوئیدی) و پیش‌ماده کونیفریل الکل حاصل می‌شود و از اتصال دو مولکول از این ماده ترکیب پینورسینول به‌دست می‌آید. از این مرحله به بعد، مسیر بیوسنتزی انواع ترکیبات لیگنانی آغاز می‌شود که یکی از این ترکیبات پودوفیلوتوکسین می‌باشد. از آنزیم‌های مهم این مسیر می‌توان به فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، سینامویل الکل دهیدروژناز (CAD) و سینامیک اسید ٤- هیدروکسیلاز (C_4H) اشاره کرد. از بین آنزیم‌های این مسیر آنزیم PAL نقش کلیدی دارد و با تبدیل آمینو اسید فنیل آلانین به سینامیک اسید مسیر فنیل پروپانوئیدی را راه‌اندازی می‌کند (هانو و همکاران، ۲۰۰٦).

یکی از روش‌هایی که امروزه در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است. با توجه به این‌که ساخت شیمیایی پودوفیلوتوکسین پیچیده و گران است بنابراین تولید آن با استفاده از کشت سلول و بافت اهمیّت چشم‌گیری دارد. مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول به‌وسیله دست‌ورزی تنظیم‌کننده‌های رشد، بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت مانند قند، نیترات، فسفات و افزودن پیش‌سازها، الیسیتورها و بهینه کردن شرایط کشت با تغییر متغیرهای مانند نور، pH و هوادهی باعث افزایش محصول می‌شود (کتچوم و همکاران، ۱۹۹۵). در کشت سلولی گونه‌های *Linum* مقدار قابل‌توجهی از پودوفیلوتوکسین و ٦- متوکسی پودوفیلوتوکسین تولید می‌شود بنابراین کشت سلولی می‌تواند به‌عنوان یک سیستم مناسب برای بیوسنتز لیگنان‌ها در این گیاه به‌کار رود (فوس، ۲۰۰۳). از آن‌جایی‌که پودوفیلوتوکسین به مقدار کم در گیاهان ساخته می‌شود و ساخت شیمیایی آن در سطح تجاری ارزش اقتصادی ندارد یک راه جایگزین برای به‌دست آوردن پودوفیلوتوکسین از طریق کشت سلولی است. مطالعات متعددی

برای افزایش تولید این ماده با استفاده از الیسیتورها در کشت سلولی انجام شده است (سیدل و همکاران، ۲۰۰۲؛ فرکیا و همکاران، ۲۰۰٤؛ فدرولف و همکاران، ۲۰۰۷؛ یوسف‌زادی و همکاران، ۲۰۱۰). استفاده از الیسیتورها در کشت سلولی به‌عنوان یک راه‌کار برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانوی می‌باشد. الیسیتورها تشکیل متابولیت‌های ثانوی را در کشت سلولی تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (ملابقال و تی‌سی، ۲۰۰٤). امروزه مشخص شده است تنظیم‌کننده‌های جاسمونات، اتیلن و اسیدسالسیلیک از مهم‌ترین ترکیباتی می‌باشند که باعث القا تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به دفاع می‌شوند (فوردن و همکاران، ۲۰۰۵). آنزیم PAL اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیبات فنولی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد و یک عامل کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات به‌شمار می‌رود (دیکسون و پایوا، ۱۹۹۵). عواملی مانند سن گیاه، فاکتورهای رشد، علف‌کش‌ها، زخمی شدن بافت (پیزر و همکاران، ۱۹۹۸؛ کامپوز- وارگاس و همکاران، ۲۰۰۵) حمله پاتوژن‌ها، اشعه UV، غلظت ازن هوا و دمای پایین (اولسون و بیدلاک، ۱۹۹۷) بر روی میزان بیان و فعالیت آنزیم PAL مؤثر می‌باشند.

با توجه به این‌که اثر متیل جاسمونات به غلظت و مدت زمانی‌که سلول در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد بستگی دارد، هدف از این پژوهش، بررسی زمان مؤثر برای عملکرد غلظت بهینه متیل جاسمونات و تأثیر این الیسیتور بر فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان آنزیم کلیدی این مسیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای *Linum album* L. از منطقه سوهانک تهران با مشخصات ۳۵ درجه و ٤۸ دقیقه و ۱۹ ثانیه شمالی، ۵۱ درجه و ۳۲ دقیقه و ۲۲ ثانیه شرقی جمع‌آوری گردید. به‌منظور ضدعفونی ابتدا بذرها به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار گرفتند سپس ۳ بار با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند و بعد از آن ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳ درصد قرار داده شدند و دوباره ۳ بار با آب استریل شستشو شدند و در مرحله آخر ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند و دوباره با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. بذرها به‌مدت ۱ ساعت در محلول ۰/۵ گرم در لیتر جیبرلین استریل شده توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر قرار گرفتند و سپس در محیط پایه MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) کشت داده شدند و به‌مدت ۲ هفته در فیتوترون با دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از گیاهچه‌های به‌دست آمده برای تشکیل کالوس استفاده شد. به‌این ترتیب که از اندام هوایی گیاهچه‌ها قطعات ۱ سانتی‌متری تهیه شد و بر روی محیط کشت

شامل تیمارهای هورمونی مختلف قرار گرفت. گیاهچه‌ها هر ۳۰ روز یک‌بار به‌مدت ۳ ماه واکشت شدند. برای کشت تعلیقی، ۲ گرم کالوس نرم و همگن شده که چندین بار واکشت شده بودند به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر که شامل ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن اسیداستیک به‌علاوه ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر کینتین بودند منتقل گردید و در شیکر با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۵ در تاریکی قرار گرفتند و به‌منظور ایجاد سازگاری چند بار در محیط کشت تعلیقی واکشت شدند. پس از ۳ ماه واکشت در فواصل ۱۰ روز محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی برای بررسی اثر متیل جاسمونات مورد استفاده قرار گرفتند.

تیمار متیل جاسمونات: با توجه به منابع موجود از غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات استفاده شد (فوردن و همکاران، ۲۰۰۵). براساس منحنی رشد به‌دست آمده، سلول‌ها در روز ششم در فاز رشد بودند، بنابراین متیل جاسمونات در روز ششم به محیط کشت‌های سلولی اضافه شد و نمونه‌برداری در زمان‌های ۱، ٦، ۱۲، ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از تیمار انجام شد.

اندازه‌گیری رشد سلولی: رشد سلولی با اندازه‌گیری تغییرات وزن خشک سلول‌ها به‌دست آمد. به این ترتیب که سلول‌ها بعد از این‌که از محیط کشت جدا شدند به‌مدت ٤٨ ساعت در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

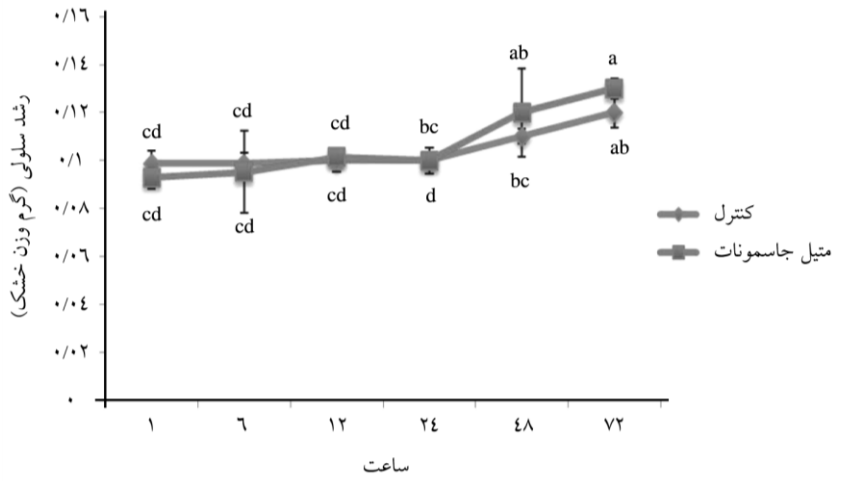
استخراج لیگنان‌ها: استخراج پودوفیلوتوکسین مطابق روش کلمن و کنوکلوگیل (۲۰۰٤) با اندکی تغییرات به این شرح انجام شد: از هر نمونه کشت سلولی ۲ گرم توده سلولی به‌همراه ٤ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون ساییده شد تا به‌صورت همگن درآمد. سپس ٤ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و ٤ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و با سانتریفوژ ۷۵۰۰ دور، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ۳ فاز کاملاً از هم جدا شدند. فاز زیرین که شامل پودوفیلوتوکسین محلول در دی‌کلرومتان بود جدا شد و به‌وسیله هوادهی کاملاً خشک گردید. پس از آن در ۱ میلی‌لیتر متانول حل شد و مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۳۵۰۰ سانتریفوژ گردید. نمونه‌ها برای سنجش لیگنان‌ها توسط دستگاه HPLC مورد تجزیه قرار گرفتند. ستون مورد استفاده از نوع C18-ODS3 دارای طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ٤/٦ میلی‌متر بود و در ۲۹۰ نانومتر جذب آن بررسی شد. فاز متحرک استونیتریل و آب به‌صورت گرادیان زمانی با جریان فاز مایع ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

تعیین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL): فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز مطابق روش واکابایاشی و همکاران (۱۹۹۷) سنجیده شد. به‌این ترتیب که ابتدا در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فنیل آلانین ٤ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره پروتئین استخراج شده و ۱ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم بورات ۰/۱ مولار با (pH=۸/۸) اضافه شد. نمونه به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، انکوبه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از HCl ٦ مولار برای غیرفعال کردن آنزیم به نمونه اضافه شد و با ٦ میلی‌لیتر از اتیل استات در ۳ مرحله شستشو انجام شد. سپس اتیل استات در معرض جریان هوا تبخیر شد و به رسوب به‌دست آمده ۳۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد تا کاملاً در آن حل شود. مقدار سینامیک اسید تولید شده، به کمک HPLC سنجیده شد. به این منظور سطح زیر منحنی به‌دست آمده از کروماتوگراف HPLC هر نمونه محاسبه گردید و با استفاده از منحنی استاندارد سینامیک‌اسید، غلظت سینامیک‌اسید تولید شده در مدت زمان ۱ ساعت حضور عصاره آنزیمی محاسبه شد در نهایت فعالیت آنزیم PAL بر حسب میکروگرم سینامیک‌اسید در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P≤۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

اثر متیل جاسمونات بر رشد سلول‌ها: اثر تیمار متیل جاسمونات بر رشد سلول‌های کتان سفید در شکل ۱ نشان داده شده است. وزن خشک توده سلولی در دوره زمانی ۱، ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۱- تغییرات رشد سلولی (گرم وزن خشک) در حضور الیسیتور متیل جاسمونات در طی دوره زمانی مختلف در کشت سلول کتان سفید (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است).

اثر متیل جاسمونات بر تولید پودوفیلوتوکسین: نتایج به‌دست آمده از تأثیر متیل جاسمونات در سلول‌های کتان سفید نشان داد که متیل جاسمونات اثر تحریکی بر میزان پودوفیلوتوکسین دارد (شکل ۲). میزان تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های شاهد تا ۲٤ ساعت تفاوت معنی‌داری نشان نداد. پس از آن روند افزایشی نشان داد و در ۷۲ ساعت به بالاترین مقدار خود رسید. تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های تیمار شده با گذشت زمان به ٤۸ ساعت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در مقایسه بین تیمار متیل جاسمونات با شاهد در طی زمان‌های مختلف نیز مشخص شد که در نمونه‌های ۱، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت تفاوت معنی‌داری بین تیمار و شاهد مشاهده نشد. در حالی‌که غلظت پودوفیلوتوکسین در حضور متیل جاسمونات در ٤۸ ساعت ۰/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود که نسبت به شاهد ۰/۱٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، مقدار آن ۱/۹ برابر افزایش یافته بود. با گذشت زمان به ۷۲ ساعت، تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری با سلول‌های شاهد نشان نداد.

اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL: بررسی فعالیت آنزیم PAL در طی دوره زمانی مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. با افزودن متیل جاسمونات در روز ششم از دوره رشد، فعالیت آنزیم PAL پس از ٦ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش نشان داد که این افزایش مقدار ۲٤ و

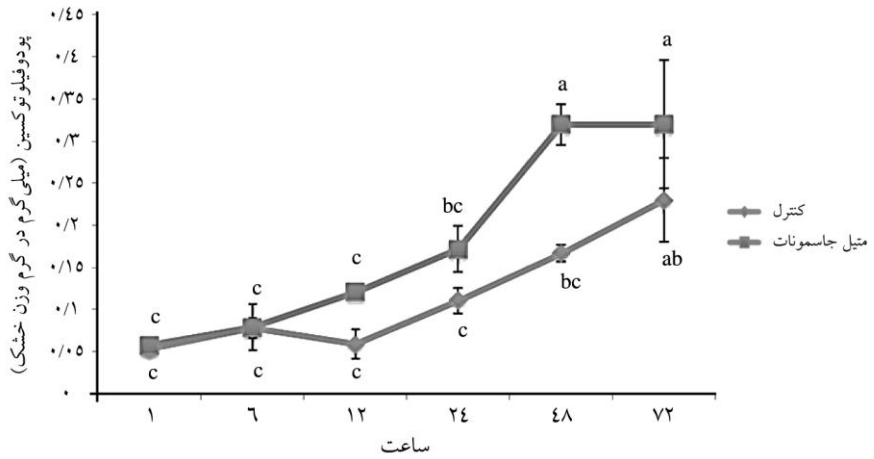
۷۲ ساعت پس از تیمار نیز مشاهده شد در صورتی‌که در ساعت‌های ۱، ۱۲ و ٤۸ ساعت پس از تیمار تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های تیمار و شاهد مشاهده نشد.

بحث

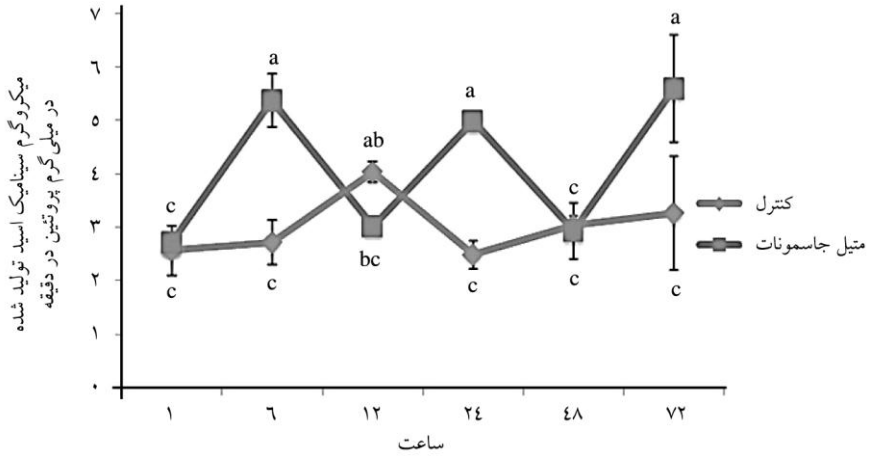
اثر متیل جاسمونات بر رشد سلول‌ها: یکی از روش‌های غلبه بر محدودیت‌هایی که در جهت رشد سلول و تولید متابولیت‌ها در کشت‌های سلولی وجود دارد استفاده از الیسیتورها است که به‌طور وسیعی در گیاهان برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی استفاده می‌شوند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از تیمار کشت سلول‌ها با متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بین رشد سلول‌ها در گروه‌های تیمار و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. تاکنون اثر مهارکنندگی متیل جاسمونات بر رشد سلولی در بسیاری از گیاهان نشان داده شده است. پلاتا و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که افزودن متیل جاسمونات به محیط کشت تأثیری بر رشد سلول‌های سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) نداشته است. هم‌چنین مطالعات فنگ و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد متیل جاسمونات در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اثری بر رشد سلول‌های (*Vaccinium pahalae*) نداشته است. اما گزارش انبازقان و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر متیل جاسمونات بر رشد سلول‌های جنینی و ریشه‌های نابجا *Podophyllum peltatum* نشان داد که تیمار متیل جاسمونات ۲۰ میکرومولار منجر به کاهش ۲۰ درصد در رشد سلول‌ها و ریشه‌های نابجا شد. جاسمونیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، تقسیم میتوز را در کالوس توتون (*Nicotiana tabacum*) مهار کرده و سلول‌ها را در مرحله G_1 متوقف می‌سازد (سویاتک و همکاران، ۲۰۰٤).

اثر متیل جاسمونات در افزایش تولید پودوفیلوتوکسین: استفاده از الیسیتورها باعث کاهش زمان به‌دست آوردن محصول و افزایش تولید متابولیت‌ها می‌شود (دیکوسمو و تالوی، ۱۹۸۵). در بررسی‌هایی که موراناکا و همکاران (۱۹۹۸) و اشمیت و پترسن (۲۰۰۲) به‌ترتیب بر روی *Juniperus chinensis* و *Forsythia intermedia* انجام دادند مشخص شده است که در این کشت‌ها بدون استفاده از الیسیتور مقدار کمی از لیگنان‌ها تولید می‌شود و استفاده از الیسیتورها منجربه افزایش چشم‌گیری در انباشته شدن لیگنان‌ها می‌شود. گزارش‌های مختلف نشان داده است که کاربرد متیل جاسمونات

می‌تواند بیان ژن‌های گیاهی را در مسیرهای بیوسنتزی متفاوت القاء کند (گوندلاچ و همکاران، ۱۹۹۲؛ پاولز و همکاران، ۲۰۰۸). بلهاج و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند متیل جاسمونات با فرا تنظیم ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز باعث افزایش استیلبن‌ها در کشت سلولی انگور (*Vitis vinifera* L.) می‌شود. متیل جاسمونات باعث افزایش انباشته شدن رزمارینیک اسید در *Lithospermum erythrorhizon* (میزوکامی و همکاران، ۱۹۹۳)، آنتوسیانین در توت‌فرنگی (*Fragari*a sp.) (میاناگا و همکاران، ۲۰۰۰) و انباشته شدن سیلیمارین در گیاه خار مریم (*Silybum marianu*m) (سنچز- سامپدرو و همکاران، ۲۰۰۵) شده است. در کشت سلولی گیاه کتان سفید، متیل جاسمونات به‌عنوان الیسیتور در افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد نقش مهمی داشته است. در گزارش مشابهی متیل جاسمونات در سلول‌های جنینی و ریشه‌های نابه‌جا *Podophyllum peltatum* باعث تولید پودوفیلوتوکسین به‌ترتیب ٤/۱ و ۱/٦۲ برابر شده است (انبازقان و همکاران، ۲۰۰۸). تولید پاکلیتاکسول در *Taxus media* با افزودن متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار القاء شد (یوکیمون و همکاران، ۱۹۹٦). هم‌چنین چونگ و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند محتوای آنتراکوئینون به‌ترتیب از ٤۸-۱۵ درصد در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در *Morinda elliptica* افزایش یافت. زمان قرار گرفتن در معرض الیسیتور می‌تواند عامل مهمی برای تشکیل متابولیت باشد (بلدی و همکاران، ۲۰۱۰). همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود تا ۲٤ ساعت پس از تیمار تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و تیمار مشاهده نمی‌شود، اما در ٤۸ ساعت پس از تیمار میزان پودوفیلوتوکسین در نمونه تیمار شده نسبت به شاهد ۱/۳ افزایش نشان داد. این افزایش نشان‌دهنده تأثیر عامل زمان در عملکرد متیل جاسمونات می‌باشد. به‌طور مشابه نیز گزارش شده است که در کشت سلول توتون (*Nicotiana tabacum*) خروج اسکوپولتین به محیط کشت سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات پس از ٤۸ ساعت به ٤-۳ برابر شاهد رسید (شاران و همکاران، ۱۹۹۸). هم‌چنین در بررسی کاریتو و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه درمنه (*Artemisia annua*) مشخص شد که بالاترین سطح آرتیمیزین ٤ ساعت پس از تیمار مشاهده شد که نسبت به شاهد ۲/٤ برابر افزایش نشان داد اما پس از ۲٤ ساعت تا ۵ روز سطح آرتیمیزین کاهش نشان داد. با توجه به این نتایج طول زمان تحریک عامل مهمی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلولی می‌باشد.



شکل ۲- تغییرات غلظت پودوفیلوتوکسین (میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در حضور متیل جاسمونات در غلظت‌های ۰ و ۱۰۰ میکرومولار در طی دوره زمانی مختلف در کشت سلول کتان سفید (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است).



شکل ۳- تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در حضور متیل جاسمونات در غلظت‌های ۰ و ۱۰۰ میکرومولار در طی دوره زمانی مختلف در کشت سلول کتان سفید (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است).

اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL: فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیمی ضروری در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که باعث ارتباط بین متابولیسم اولیه و برخی از متابولیسم‌های ثانویه می‌باشد (یو و همکاران، ۲۰۰٦). در بررسی فعالیت آنزیم‌هایی که در مسیر عمومی فنیل پروپانوئیدها درگیر هستند فعالیت ویژه PAL بیش‌ترین مقدار را در شروع دوره کشت دارد (کرانز و پترسن، ۲۰۰۳). در این پژوهش اثر متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در طی دوره‌های زمانی مختلف بر فعالیت PAL نشان داد که ٦ ساعت پس از تیمار مقدار آن افزایش پیدا کرد. این مشاهده با نتایج به‌دست آمده توسط شاران و همکاران (۱۹۹۸) مطابقت دارد که گزارش کرد در کشت سلول توتون (*Nicotiana tabacum*)، فعالیت PAL در طی ۲ ساعت پس از تیمار جاسمونات القاء می‌شود. مطالعات سیدل و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که بالاترین فعالیت این آنزیم قبل از انباشته شدن پودوفیلوتوکسین مشاهده می‌شود. در این مطالعات نیز به‌طور موافق با پژوهش ذکر شده، مشخص شد که در ٦ ساعت پس از تیمار مقدار فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد و در نتیجه آن میزان پودوفیلوتوکسین در ساعت ۱۲ نسبت به کنترل افزایش نشان داد. افزایش دوباره فعالیت آنزیم PAL در ساعت ٢٤ مشاهده می‌شود که در ادامه این افزایش میزان پودوفیلوتوکسین در ساعت ٤٨ تفاوت چشم‌گیری را نسبت به شاهد نشان داد. در مقایسه بین تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیت آنزیم PAL مشخص شده است که رابطه مستقیم وجود دارد. در این پژوهش اثر مثبت متیل جاسمونات بر افزایش تولید پودوفیلوتوکسین، این تیمار را مناسب برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین معرفی می‌نماید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهش‌گران به‌خاطر حمایت از این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

1.Anbazhagan, V.R., Ahn, C.H., Harada, E., Kim, Y.S. and Choi, Y.E. 2008. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllumpeltatum*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 44: 494-501.

2.Baldi, A., Farkya, S., Jain, A. and Gupta, N. 2010. Enhanced production of podophyllotoxin by co-culture of transformed *Linum album* cell with plant growth-promoting fungi. Pure Appl. Chem. 82: 227-241.

3.Belhadj, A., Telf, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S. and Merillon, J.M. 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilben and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiol. Biochem. 46: 493-499.

4.Campos-Vargas, R., Nonogaki, H., Suslow, T. and Saltveit, M.E. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity by altering its expression, not its induction in *Romaine lettuce (Lactuca sativa)* tissue. Physiol. Plant. 132: 82-91.
5.Chong, T.M., Abdullahd, M.A., Fadzillahb, N.M., Laia, O.M. and Lajisc, N.H. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. Biochem. J. 36: 469-477.
6.Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., Nisi, R., De Paolis, A., Blando, F. and Mita, G. 2011. Methyl jasmonate and miconazole differently affect arteminisin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. Plant Biol. 1: 51-58.
7.DiCosmo, F. and Tallevi, S.G. 1985. Plant cell cultures and microbial insult: interactions with biotechnological potential. Trends Biotech. 3: 110-111.
8.Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell. 7: 1085-1097.
9.Fang, Y., Smith, M.A.L. and Pepin, M.F. 1999. The effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*), In Vitro Cell. Dev-PL. 35: 1. 106-113.
10.Farkya, S., Bisaria, V.S. and Srivastava, A.K. 2004. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Appl. Microbiol. Biotech. 65: 504-519.
11.Federolf, K., Alfermann, A.W. and Fuss, E. 2007. Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. Phytochem. 68: 1397-1406.
12.Furden, B., Humburg, A. and Fuss, E. 2005. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 24: 312-317.
13.Fuss, E. 2003. Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. Phytochem Rev. 2: 307-320.
14.Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2389-2393.
15.Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Cronier, D., Baltora-Rosset, S., Doussot, J., Maury, S., Mesnard, F., Chabbert, B., Hawkins, S. and Lamblin, F. 2006. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linumusitatissimum*) cell suspension cultures. Planta. 223: 975-989.
16.Ketchum, R.E.B., Gibson, D.M. and Gallo, L.G. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. Plant Cell Tiss Org. 42: 185-193.

17.Koulman, A. and Konuklugil, B. 2004. Lignan profile of *Linum meletonis*. Biochem. Syst. Ecol. 32: 91-93.
18.Kranz, K. and Petersen, M. 2003. β-Peltatin 6-O-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum.* Phytochem. 64: 453-458.
19.Miyanaga, K., Seki, M. and Furusaki, S. 2000. Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. Biochem. Eng. J. 5: 201-207.
20.Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B.E. 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 12: 706-709.
21.Mulabagal, V. and Tsay, H.S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. IJASE. 2: 1. 29-48.
22.Muranaka, T., Miyata, M., Kazutaka, I. and Tachibana, S. 1998. Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. Phytochem. 49: 491-496.
23.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. Physiol. Planta. 15: 473-497.
24.Olson, P.E. and Bidlack, J.E. 1997. Yield and enzyme activity of sweet basil (*Ocimumbasilicum*) subjected to alternative pest control. J. Herbs. Spices Med. Plants. 4: 1-3.
25.Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inze, D. and Goossens, A. 2008. Mapping methyl jasmonate mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 1380-1385.
26.Plata, N., Konczak-Islam, I., Jayram, S., McClelland, K., Woolford, T. and Franks, P. 2003. Effect of methyl jasmonate and *p*-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture. Biochem. Engin. J. 14: 171-177.
27.Peiser, G., Lopez-Galvez, G., Cantwell, M. and Saltveit, M.E. 1998. Phenyl alanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. Post Biol. Technol. 14: 171-177.
28.Sa´nchez-Sampedro, M.A., Ferna´ndez-Ta´rrago, J. and Corchete, P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. J. Biotech. 119: 60-69.
29.Schmitt, J. and Petersen, M. 2002. Influence of methyl jasmonate and coniferyl alcohol on pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia* × *intermedia*cell suspension culture. Plant Cell Rep. 20: 885-889.
30.Seidel, V., Windhovel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroo, R.R.J., Medarde, M., Petersen, M. and Woolley, J.G. 2002. Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. Planta. 215: 1031-1039.

31.Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. and Okazaki, M. 1998. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. Plant Sci. 132: 13-19.
32.Swiatek, A., Van Dongen, W., Esmans, E.L. and Van Onckelen, H.A. 2004. Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 cells. Plant Physiol. 135: 161-172.
33.Wakabayashi, K., Takayushi, H. and Kamisaka, S. 1997. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and differulic acids in wheat coleoptiles. Plant Physiol. 113: 967-973.
34.Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Ghasempour, A., Moyano, E. and Palazon, J. 2010. Salycilic acid-induced changes to phenylpropanoid gene expression and podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album*. Biotech. Lett. 32: 1739-1743.
35.Yu, Z., Fu, C.X., Han, Y.C., Li, Y.X. and Zhao, D.X. 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotech. Lett. 8: 1027-1031.
36.Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. and Hara, Y. 1996. Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. Nat Biotech. 14: 1129-1132.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 20 (4), 2014
http://jopp.gau.ac.ir

Increased podophyllotoxin production and phenylalanine ammonia lyase activity in cell culture of *Linum album* by methyl jasmonate

S. Fakhari[1] and *M. Sharifi[2]
[1]M.Sc., Dept. of Plant Biology, Tarbiat Modares University, Tehran,
[2]Associate Prof., Dept. of Plant Biology, Tarbiat Modares University, Tehran
Received: 12/23/2012 ; Accepted: 06/19/2013

Abstract

Linum album L. contains pharmaceutical composition podophyllotoxin (PTOX) which is currently being used as a precursor to semi-synthetic anticancer drugs etoposide, teniposide and etopophos. Cell culture is an important source for the production of PTOX. Several strategies, including treatment with elicitors have shown for enhanced production of secondary metabolites in cell culture system as well as elicitor concentration, the time of application and type of medium culture. These factors affect signal transduction pathways, leading to changes in gen expression and the production of metabolites as defense responses against stress. In a time course study, the effect of 100 µM methyl jasmonate on accumulation of PTOX was studied after 1, 6, 12, 24, 48 and 72 h in cell culture system. According to the results, cell growth was not changed by treatments. Podophyllotoxin production was enhanced and received to 0.32 mg/g dry weight after 48 h. To understand the functional of methyl jasmonate on biosynthesis of PTOX was determined phenyl alanine ammonia lyase (PAL) activity. This activity promoted 6 h after the addition of methyl jasmonate to the cell suspension culture. The enhancement of PTOX correspond the PAL activity increment.

Keywords: Cell culture, *Linum album*, Methyl Jasmonate, Podophyllotoxin

* Corresponding Author, Email: msharifi@modares.ac.ir