تأثیر ال- تیروزین بر تولید تبائین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*)

رضا فرجامی‌نژاد[۱]، ناصر زارع[۲]*، رسول اصغری زکریا[۳]، منوچهر فرجامی‌نژاد[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
*آدرس مکاتبه: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات
کدپستی: ۵۶۱۹۹-۱۱۳۶۷، تلفن: ۳۳۵۱۰۱۴۰ (۰۴۵)، نمابر: ۳۳۵۱۲۲۰۴ (۰۴۵)
پست الکترونیک: zarenasser@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۷/۱۲

چکیده

مقدمه: استفاده از محرک‌ها و ترکیبات مختلف در محیط کشت سوسپانسیون سلولی راهکار مناسبی برای افزایش و بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه مهم در شرایط درون شیشه‌ای مهیا می‌کند.

هدف: بررسی تأثیر ال- تیروزین و ترکیب آن با محرک‌های زیستی کیتوسان و اسید سالیسیلیک بر تولید تبائین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش ایرانی در روزهای مختلف پس از تحریک بود.

روش بررسی: غلظت‌های مختلف ال- تیروزین (۱ و ۲ میلی‌مولار) به تنهایی و در ترکیب با کیتوسان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و اسید سالیسیلیک (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) روی کشت‌های سلولی اعمال شده و پس از دو، چهار و شش روز، **pH** و **EC** محیط کشت و همچنین مقدار تبائین سلول‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

نتایج: بیشترین مقدار تبائین (۴۲/۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) در تیمار یک میلی‌مولار ال- تیروزین و شش روز پس از اعمال تیمار به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از مقدار تبائین در تیمار شاهد بود. علاوه بر این، یک رابطه‌ای بین مقدار تبائین تیمارها با **pH** و **EC** محیط کشت وجود داشت. به طوری که با افزایش مقدار تبائین سلول‌ها، **pH** محیط کشت افزایش و **EC** آن کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: تغذیه کشت‌های سلولی خشخاش ایرانی با ال- تیروزین (پیش ماده مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها) در افزایش تولید تبائین مؤثر بود. به طوری که تیمار یک میلی‌مولار ال- تیروزین مقدار تبائین کشت‌های سلولی را در مقایسه با شاهد ۲۲/۲۶ برابر افزایش داد.

گل‌واژگان: ***Papaver bracteatum***، پیش‌ماده، متابولیت ثانویه، محرک

مقدمه

گیاهان منبع با ارزشی از متابولیت‌های ثانویه هستند که یکی از مکانسیم‌های دفاعی گیاه در برابر میکروب‌ها و موجودات دیگر بوده و به عنوان دارو، چاشنی، خوشبوکننده، رنگ، آفت‌کش زیستی و افزودنی‌های گیاهی به کار می‌روند. تولید محدود این ترکیبات باعث ایجاد چالش‌هایی در زمینه تولید گسترده این ترکیبات شده است. سیستم کشت سلول و بافت گیاهی می‌تواند به عنوان یک راهکار جایگزین مناسب جهت تولید گسترده این ترکیبات زیستی در شرایط کنترل شده باشد [۲، ۱]. راهکارهای متعددی مانند بهبود ژنتیکی، گزینش لاین‌های سلولی پر عملکرد، استفاده از مواد محرک (Elicitor)، تغذیه با پیش ماده و مهندسی متابولیت می‌تواند جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شود [۳]. محرک‌ها ترکیباتی با منشاء زیستی یا غیرزیستی هستند که به طور مؤثر تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلول‌های گیاهی تحریک می‌کنند [۴]. با این حال، تحریک (Elicitation) فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که به فاکتورهای زیادی از قبیل غلظت و نوع محرک، مرحله رشد سلول در زمان اعمال محرک و مدت زمان اعمال محرک بستگی دارد [۵]. به علاوه، پاسخ به یک محرک خاص ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر و بین لاین‌های سلولی مختلف بسیار متفاوت باشد، بنابراین تعیین غلظت‌های مناسب محرک‌ها برای بهینه‌سازی تولید بسیار ضروری می‌باشد [۶]. از جمله محرک‌ها می‌توان به ترکیبات سلول‌های میکروبی بویژه پلی و الیگوساکاریدها، یون‌های فلزات سنگین، تنش اسمزی، اشعه فرابنفش (Ultraviolet)، امواج فراصوت و ترکیبات علامت‌دهی پاسخ دفاعی گیاه مثل اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌باشد [۷]. اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات برای تحریک تولید انواع متابولیت‌های ثانویه نظیر ایزوفلاونوئیدها، ترپن‌ها، فیتواسترول‌ها و فنیل‌پروپانوئیدها استفاده شده است [۸]. عامل دیگری که تولید متابولیت ثانویه را در کشت سلول گیاهی تحت تاثیر قرار می‌دهد ذخیره‌سازی و ترشح آن توسط سلول‌ها است. اغلب متابولیت‌های ثانویه گیاهی عمدتاً در داخل سلول‌ها در واکوئل‌ها یا دیگر بخش‌های درون سلولی نگهداری می‌شوند. محصولات تجمع یافته در سلول‌ها یا محیط کشت ممکن است باعث مهار بیوسنتز آنها و همچنین باعث تبدیل و تضعیف آن شود. بنابراین، ترشح سریع محصولات از سلول‌ها به محیط پیرامون و جذب آنها از محیط کشت توسط جاذب‌های جامد یا حلال استخراج کننده ارگانیک می‌تواند تولید محصول را بهبود بخشد [۹]. از راهکارهای دیگر جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌توان به تغذیه سلول‌های کشت شده توسط پیش‌ماده اشاره نمود [۱۰]. پیش‌ماده‌هایی مانند اسید آمینه‌ها به طور موفقیت‌آمیزی در شرایطی که مقدار آن کمتر از مقدار مورد نیاز برای تولید محصول نهایی است، استفاده شده است [۱۱]. با این وجود، کاربرد خارجی پیش ماده در شرایط درون شیشه‌ای باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود [۱۲]. گیاهان تیره Papaveraceae منبع مهمی از آلکالوئیدهای دارویی و سایر ترکیبات مرتبط می‌باشند. آلکالوئید اصلی خشخاش ایرانی تبائین است که سال‌های زیادی است از آن برای تولید کدئین استفاده می‌شود [۱۳]. پیش ماده اولیه بیوسنتز این دسته آلکالوئیدها اسید آمینه ال- تیروزین است [۱۴]. بنابراین، در این مطالعه تأثیر پیش ماده ال- تیروزین به تنهایی و در ترکیب با اسید سالیسیلیک و کیتوسان روی تولید تبائین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سوسپانسیون سلولی

بذرهای گیاه *P. bracteatum* Lindl. از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. بذور با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۵ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۲ دقیقه استریل شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس، بذور روی محیط کشت MS جامد کشت شدند. برای تولید کالوس، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از بذرهای رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای تهیه شده و به محیط کشت MS حاوی

یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک انتقال داده شدند. کشت‌ها در تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر سه هفته یکبار زیر کشت شدند. استقرار سوسپانسیون سلولی با انتقال کالوس ترد و نرم به ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و نگهداری آنها روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm، دمای ۲ ± ۲۵ با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۵۰۰-۴۰۰ لوکس انجام گرفت. سپس هر ۱۰ روز پنج میلی‌لیتر محیط کشت جدید به کشت اضافه شد. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، سلول‌های رشد کرده به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط مایع مشابه انتقال و هر دو هفته یکبار واکشت شدند [۱۵].

اعمال محرک و پیش ماده

سوسپانسیون سلولی استقرار یافته در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع با تراکم اولیه $۳/۳ \times ۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر واکشت شد. شمارش سلولی با استفاده از روش هموسایتومتری انجام گرفت. تیمار پیش ماده و محرک ده روز پس از واکشت، روی سوسپانسیون سلولی اعمال شد. بر اساس منحنی رشد سلولی [۱۵]، سلول‌ها در این زمان در اواسط مرحله رشد سریع قرار داشتند. برای بررسی تأثیر پیش ماده، ال- تیروزین در غلظت‌های یک و دو میلی‌مولار به کشت مورد نظر اضافه شد. همچنین برای مطالعه تأثیر پیش ماده در ترکیب با مواد محرک، تیمارهای دو میلی‌مولار ال- تیروزین به همراه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک و دو میلی‌مولار ال- تیروزین به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوسان مورد استقاده قرار گرفتند. در تیمار شاهد، کشت‌ها به جای محرک و پیش ماده به مقدار برابر آب مقطر دریافت کردند. سپس دو، چهار و شش روز پس از اعمال تیمار pH و EC محیط کشت به طور مستقیم توسط دستگاه pH و EC متر (Mi 180Bench Meter; Martini Instrument, USA) اندازه‌گیری شد. سلول‌ها از طریق عبور دادن محیط کشت از کاغذ صافی جدا شده و پس از خشک شدن توسط فریزدرایر، توزین شدند. محلول‌های ذخیره اسید سالیسیلیک و کیتوسان توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل، ولی محلول ذخیره ال- تیروزین توسط اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار یک اتمسفر استریل شد.

استخراج و اندازه‌گیری مقدار تبائین

بیوماس سلولی کشت‌های سوسپانسیون جمع‌آوری و فریزدرای شد. آلکالوئیدها در ۲/۱- ۱/۶ گرم سلول فریزدرای شده به روش اسیدیک متانول [۱۶]. با کمی تغییر استخراج شد. به این صورت که هشت میلی‌لیتر از محلول استخراج متشکل از ۴۰ درصد متانول، ۵۹/۵ درصد آب و ۰/۵ درصد اسید استیک به نمونه‌ها اضافه و پس از ۱۲ دقیقه سونیکه شدن، حدود ۱۲ دقیقه نیز در دمای اتاق نگهداری شد. سپس، عصاره سلولی حاصل برای اندازه‌گیری توسط دستگاه HPLC، از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. نمونه‌های آماده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تجزیه و تحلیل HPLC توسط سیستم Agilent HPLC (1200 series, Diode array detector) انجام گرفت. ۲۵ میکرولیتر از نمونه به ستون C-18 فاز معکوس Agilent (Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4.6 × 150 mm) تزریق شد. فاز متحرک برای شستشوی آلکالوئیدها ۵ درصد متانول و ۹۵ درصد استات آمونیوم آبی (۰/۲ درصد استات آمونیوم، pH=۴/۶) بود. پساب خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سنجش کمی با استفاده از منحنی استاندارد تبائین انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (شرکت SPSS نسخه 22.0) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

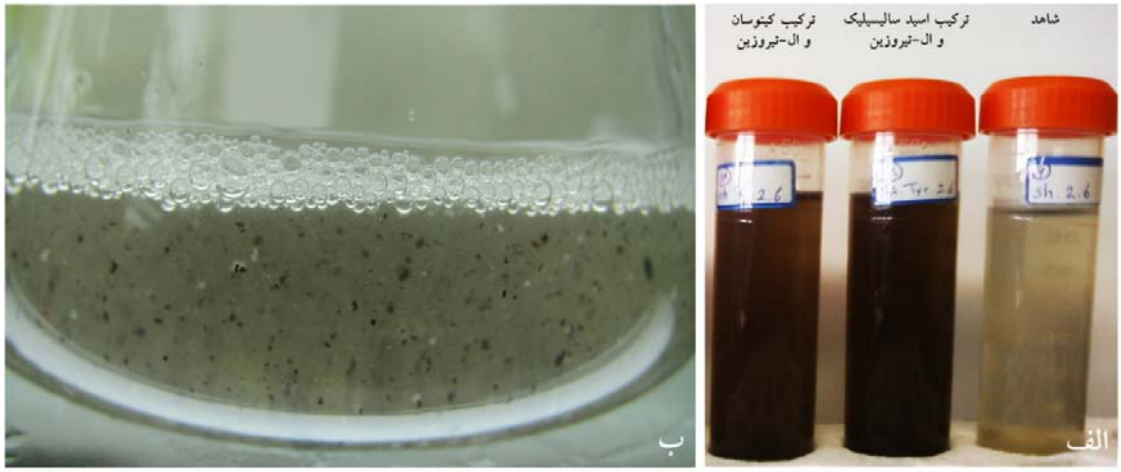
نتایج

کشت‌های سوسپانسیون سلولی پس اعمال تیمارهای مختلف پیش‌ماده (ال- تیروزین) و محرک تغییر رنگ داده و تیره‌تر شدند (شکل شماره ۱). این تغییر رنگ می‌تواند در اثر تولید و ترشح متابولیت‌های ثانویه از سلول‌های خشخاش ایرانی به محیط کشت باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر محتوای تبائین سلول‌ها و pH محیط کشت اختلاف معنی‌داری وجود دارد. زمان‌های مختلف پس از تحریک نیز از نظر محتوای تبائین سلول‌ها و EC محیط کشت اختلاف معنی‌داری باهم داشتند. علاوه بر این، اثر متقابل تیمار محرک و زمان‌های مختلف پس از تحریک برای محتوای تبائین سلول‌ها و EC محیط کشت معنی‌دار بود (جدول شماره ۱).

نمونه‌ای از کروماتوگرام HPLC عصاره سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش ایرانی در شکل شماره ۲ آورده شده است. اضافه نمودن ال- تیروزین به محیط کشت باعث افزایش محتوای تبائین سلول‌ها شده است. در تیمار ال- تیروزین به تنهایی بیشترین محتوای تبائین (۴۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) در غلظت یک میلی‌مولار ال- تیروزین شش روز پس از اعمال تیمار به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و تیمار دو میلی‌مولار ال- تیروزین بود. به عبارت دیگر، استفاده از یک میلی‌مولار ال- تیروزین باعث افزایش حدود ۲۲/۲۶ برابری در عملکرد تبائین نسبت به سلول‌های شاهد در روز ششم پس از اعمال تیمار شده است (شکل شماره ۳). تأثیر ال- تیروزین بر تولید تبائین به غلظت آن بستگی داشت. به طوری که، افزایش غلظت ال- تیروزین از یک به دو میلی‌مولار باعث کاهش ۵/۵۶ برابر در مقدار تولید تبائین شش روز پس از اعمال تیمار شد.

با اعمال ترکیب تیماری ال- تیروزین و اسید سالیسیلیک، مقدار تبائین سلول‌ها چهار روز پس از اعمال به حداکثر مقدار خود (۹/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) رسید که این مقدار ۵/۲۴ برابر بیشتر از عملکرد تبائین سلول‌های شاهد در همان روز بود. با اعمال ترکیب تیماری ال- تیروزین و اسید سالیسیلیک، اگرچه بیشترین مقدار تبائین سلول‌ها چهار روز پس از اعمال تیمار به دست آمد ولی این مقدار به طور معنی‌داری کمتر از مقدار تبائین در تیمار یک میلی مولار ال- تیروزین به تنهایی بود (شکل شماره ۲).

با اعمال ترکیب تیماری ال- تیروزین و کیتوسان، بیشترین مقدار تبائین سلول‌ها با میانگین ۱۶/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر شش روز پس از اعمال تیمار به دست آمد که به ترتیب حدود ۸/۷۸ و ۲/۲۰ برابر بیشتر از تیمار شاهد و تیمار دو میلی‌مولار ال- تیروزین در همان روز بود (شکل شماره ۲).

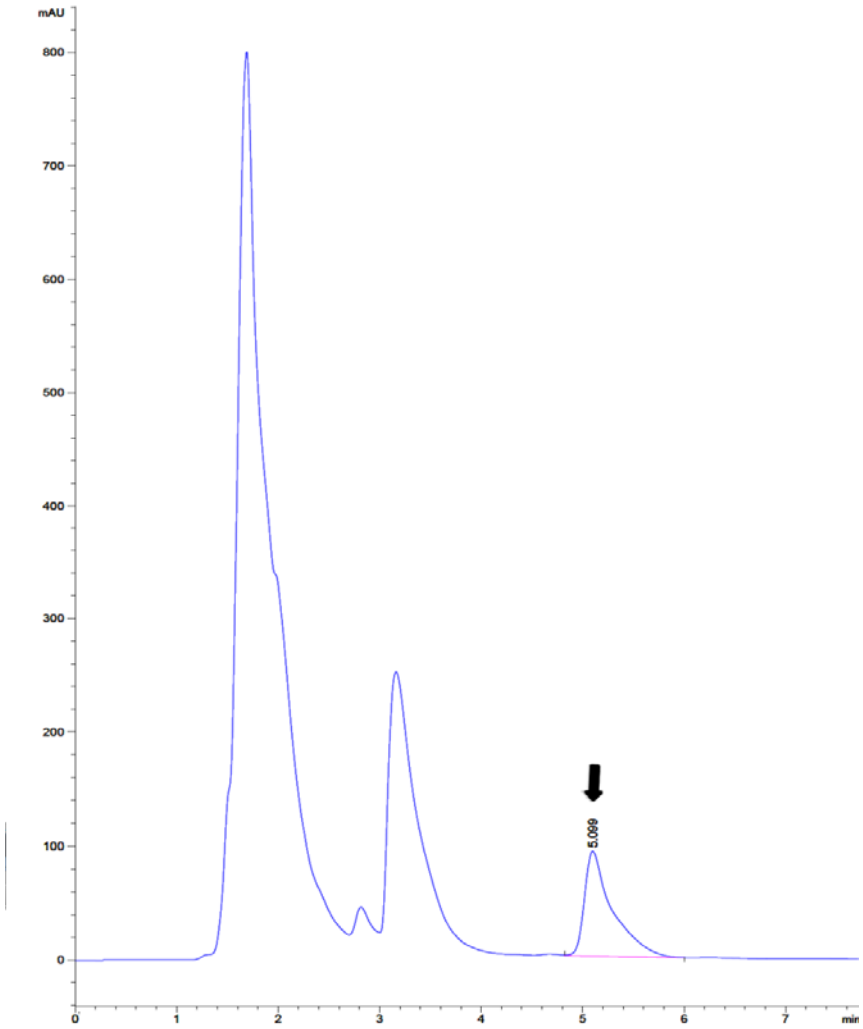


شکل شماره ۱- کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی، الف) تغییر رنگ محیط کشت در تیمارهای مختلف ال-تیروزین و محرک، ب) نمونه‌ای از ارلن‌های حاوی سوسپانسیون سلولی استقرار یافته خشخاش ایرانی

جدول شماره ۱- میانگین مربعات محتوای تبائین سلول‌ها و سایر صفات اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون خشخاش ایرانی

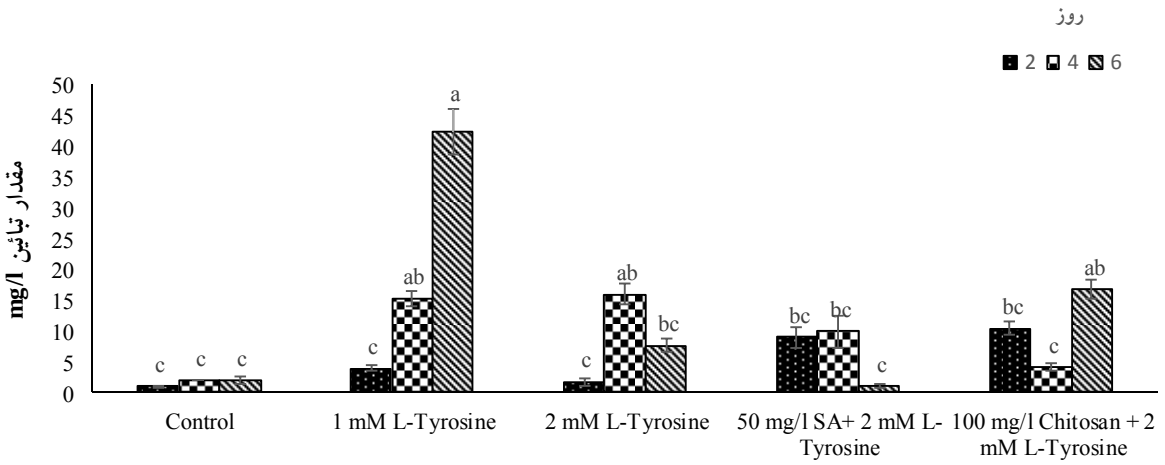
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		محتوای تبائین سلول‌ها	وزن سلول‌های فریزدرای شده	EC	pH
تیمار	۴	۲۹۰/۵۹۵*	۸۶/۵۹۱ns	۰/۲۹۸ns	۰/۹۳۸**
زمان پس از تحریک	۲	۱۹۱/۹۶۵ns	۶۱/۲۶۹ns	۰/۱۱۳ns	۰/۰۴۲ns
تیمار در زمان پس از تحریک	۸	۲۰۵/۳۹۱ns	۲۳۲/۲۱۲ns	۰/۴۹۸ns	۰/۱۴۶ns
خطا	۱۵	۸۴/۷۳۰	۱۶۸/۴۸۵	۰/۲۰۲	۰/۱۸۷
ضریب تغییرات (درصد)		۳۲/۵۲	۳۳/۴۱	۱۰/۰۷	۶/۹۷

ns: غیرمعنی‌دار، * معنی در سطح احتمال پنج درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

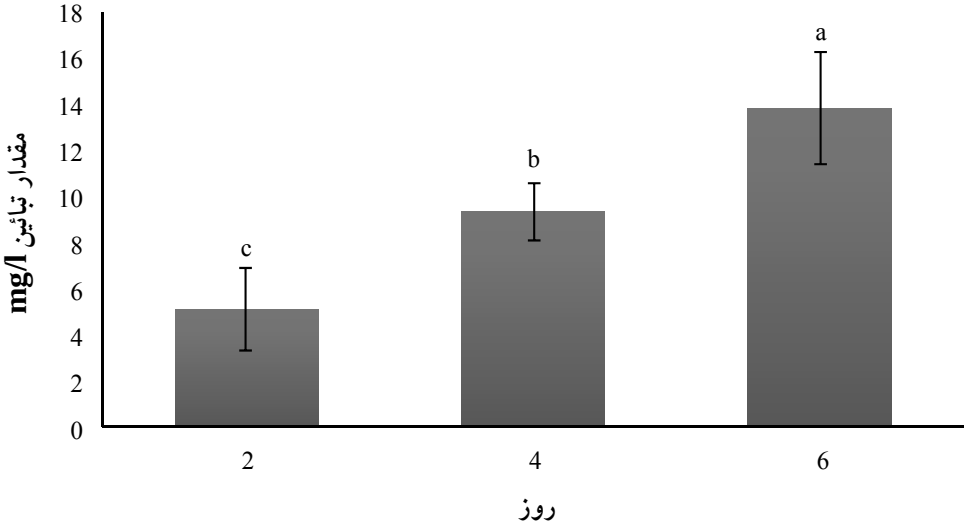


شکل شماره ۲- کروماتوگرام HPLC نمونه سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش ایرانی

همان‌طوری که در شکل‌های شماره ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، همبستگی مثبتی میان زمان‌های مختلف پس از تحریک و محتوای تبائین سلول‌ها وجود داشت. به طوری که در اغلب تیمارها، با افزایش روزهای پس از اعمال تحریک عملکرد تبائین نیز افزایش یافته و حداکثر مقدار آن در روز ششم بعد از اعمال تیمار به دست آمده است. علاوه بر این، در تیمارهای دارای تبائین زیاد، pH محیط کشت بالا و EC آن نیز پایین بود. اضافه نمودن دو میلی‌مولار ال- تیروزین به طور قابل توجهی باعث افزاش بیوماس سلول شده بود (۶۰/۹۴ گرم بر لیتر) ولی این افزایش از لحاظ آماری اختلافی با شاهد نداشت (جدول شماره ۲).



شکل شماره ۳- تأثیر ال- تیروزین به تنهایی و در ترکیب با محرک‌ها بر مقدار تولید تبائین در کشت سوسپانسیون خشخاش ایرانی



شکل شماره ۴- تأثیر روزهای پس از اعمال تیمار بر مقدار تولید تبائین در کشت سوسپانسیون خشخاش ایرانی

جدول شماره ۲- تأثیر تیمارهای مختلف روی pH و EC محیط کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی

تیمار	روز	وزن سلول‌های فریزدرای شده (گرم بر لیتر)	pH	EC (میلی زیمنس بر سانتی‌متر)
	۲	۴۳/۳۳ ± ۱۲/۹۱	۶/ ۰۰± ۰/۲۵	۴/۷۰ ± ۰/۱۸
شاهد	۴	۳۸/۳۳ ± ۴/۱۷	۵/۸۱ ± ۰/۲۰	۳/۸۴ ±۰ /۱۴
	۶	۳۰/۱۰ ± ۲/۱۸	۵/۸۲ ± ۰/۰۲	۴/۱۸ ± ۰/۳۱
	۲	۳۲/۹۱ ± ۱/۸۷	۵/۶۶ ± ۰/۰۲	۴/۳۷ ± ۰/۲۳
یک میلی مولار ال- تیروزین	۴	۵۳/۴۴ ± ۱۴/۶۸	۵/۹۸ ± ۰/۳۵	۵/۰۰ ± ۰/۰۲
	۶	۳۰/۶۲ ± ۰/۴۲	۶/۴۳ ± ۰/۰۶	۳/۵۳ ± ۰/۴۹
	۲	۶۰/۹۴ ± ۲۶/۳۵	۵/۷۲ ± ۰/۱۶	۴/۶۴ ± ۰/۲۱
دو میلی مولار ال- تیروزین	۴	۳۰/۹۴ ± ۴/۸۹	۵/۹۳ ± ۰/۳۰	۴/۱۱ ± ۰/۷۹
	۶	۴۳/۹۵ ± ۹/۷۹	۶/۱۰ ± ۰/۱۴	۴/۹۱ ± ۰/۰۳
	۲	۳۵/۱۰ ± ۰/۹۴	۶/۵۳ ± ۰/۱۲	۴/۵۳ ± ۰/۰۷
دو میلی مولار ال- تیروزین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک	۴	۳۰/۷۳ ± ۱/۹۸	۶/۵۱ ± ۰/۱۸	۴/۱۳ ± ۰/۲۰
	۶	۴۵/۵۲ ± ۴/۶۹	۶/۱۱ ± ۰/۹۹	۴/۶۸ ± ۰/۵۰
	۲	۳۵/۲۱ ± ۱/۲۵	۶/۹۸ ± ۰/۰۰۵	۴/۶۹ ± ۰/۰۸
دو میلی‌مولار ال- تیروزین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوسان	۴	۳۸/۶۴ ± ۲/۶۰	۶/۵۳ ± ۰/۰۵	۵/۱۱ ± ۰/۰۱
	۶	۳۲/۸۱ ± ۲/۳۹	۶/۹۲ ± ۰/۰۰۵	۴/۶۰ ± ۰/۲۸

بحث

ال- تیروزین پیش ماده اولیه در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها می‌باشد [۱۷] و به نظر می‌رسد که اضافه نمودن آن به محیط کشت باعث هدایت جریان تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها به سمت سنتز تبائین، که آلکالوئید اصلی خشخاش ایرانی است، و استفاده حداکثر از ظرفیت آنزیمی سلول‌ها شده است. اگرچه مقدار تبائین حاصل از ترکیب تیماری ال- تیروزین و اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد بویژه در روز چهارم پس از اعمال تیمار زیاد بود ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار به دست نیامد (شکل شماره ۳). اسید سالیسیلیک نقش مهمی را در رشد و نمو و واکنش گیاه در برابر حمله پاتوژن‌ها ایفا می‌کند [۱۸]. مطالعات نشان داده که اسید سالیسیلیک به طور موضعی در محل‌های آلودگی تجمع یافته و سپس به قسمت‌های مختلف گیاه انتقال می‌یابد [۱۹]. رضایی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر تولید تاکسول در کشت سلول *Taxus baccata* گزارش دادند که با اضافه کردن اسید سالیسیلیک به محیط کشت تولید تاکسول به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار آن

در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک به دست می‌آید که ۶/۶ برابر بیشتر از شاهد بود [۲۰]. مطالعات نشان داده که اسید سالیسیلیک تجمع ساپونین‌های تری‌ترپنیک (جنسینوئیدها) در کشت سوسپانسیون *Panax ginseng*، ترکیبات فنلی در کشت سلول *Salvia miltiorrhiza*، ساپونین تریترپن در برگ‌های *Quillaja brasiliensis* و والپوتریت‌ها در کشت سوسپانسیون گیاه کامل *Valeriana glechomifolia* تحریک می‌کند [۲۴-۲۱]. ولی به نظر می‌آید که غلظت۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک در این گیاه قادر به تحریک مؤثر چرخه بیوسنتز تولید متابولیت تبائین نبود (شکل شماره ۳).

گزارش‌های متناقضی در رابطه با تأثیر کیتوسان بر تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای وجود دارد. برای مثال در کشت سلول *Teucrium chamaedrys* کاربرد غلظت بالای کیتوسان در فاز سکون رشد سلول باعث قهوه‌ای شدن کشت و کاهش تولید تئوکریوسید می‌شود که ممکن است به دلیل اثرات سمی آن روی سلول‌ها باشد [۲۵]. ولی مطالعات دیگری نشان داده که کیتوسان باعث افزایش تولید ویتانولید A، ویتانولید B، ویتافرین A، ویتانوسید V و ویتانوسید IV در کشت ریشه *Withania somnifera* (L.) Dunal، ایزوفلاوونید در کشت ریشه موئین *Pueraria candollei* و پلومباگین در کشت ریشه موئین *Plumbago indica* می‌شود [۲۸ - ۲۶].

در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی با افزایش غلظت تبائین، pH محیط کشت افزایش و EC آن کاهش یافته است (جدول شماره ۱). تبائین دارای pK_{a1}=۶/۸ و pK_{a2}=۱۱/۳ است [۲۹] و در نتیجه تولید و ترشح آن به محیط توسط سلول باعث قلیایی شدن محیط کشت و افزایش pH آن می‌شود. از طرف دیگر، با توجه به اینکه متابولیسم اولیه و ثانویه سلول تحت تأثیر محرک‌ها و پیش‌ماده افزایش می‌یابد [۳۰، ۲۱]، سلول‌ها مواد غذایی بیشتری را از محیط کشت جذب نموده و در نتیجه تخلیه مواد معدنی (یون‌ها) از محیط کشت، EC آن کاهش می‌یابد [۳۱].

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری کلی اینکه، تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه *P. bracteatum* Lindl. توسط محرک‌ها و پیش‌ماده بستگی به نوع و غلظت آنها دارد و به منظور تولید این مواد با ارزش در شرایط درون شیشه‌ای دست‌یابی به ترکیب و غلظت بهینه مواد محرک ضروری است. به طوری که یک میلی‌مولار ال- تیروزین مقدار تبائین کشت‌های سلولی را در مقایسه با شاهد ۲۲/۲۶ برابر افزایش داد. بنابراین، می‌توان از افزودن پیش‌ماده به محیط کشت سلولی و همچنین از رهیافت‌های ترکیبی به منظور تقویت تولید تبائیین در کشت‌های سلولی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولان محترم بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور که در تهیه بذور مورد استفاده در این تحقیق نویسندگان را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Ramachandra-Rao S and Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*. 2002; 20: 101 - 53.

2. Gandi S, Rao K, Chodisetti B and Giri A. Elicitation of Andrographolide in the suspension cultures of *Andrographis paniculata*. *Appl. Biochem. Biotech*. 2012; 168: 1729 - 38.

3. Baque MdA, Shiragi MdHK, Lee EJ and Paek KY. Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Aust. J. Crop Sci*. 2012; 6: 1349 - 55.

4. Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC and Giulietti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb. Tech*. 2000; 26: 252 - 58.

5. Bhagwath SG and Hjorts MA. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine: a production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *J. Biotechnol*. 2000; 80: 159 - 67.

6. Shinde AN, Malpathak N and Fulzele DP. Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnol. Bioproc. E*. 2009; 14: 612 - 18.

7. Zhou LG and Wu JY. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Nat. Prod. Rep*. 2006; 23: 789 - 810.

8. Hu Y, Yu Y, Piao Ch, Liu J and Yu H. Methyl jasmonate and salicylic acid-induced D-chiro-inositol production in suspension cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Plant Cell Tiss. Org*. 2011; 106: 419 - 24.

9. Wu J and Lin L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Appl. Microbiol. Biot*. 2003; 62: 151 - 55.

10. Smetanska I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biot*. 2008; 111: 187 - 228.

11. Tumova L, Gallova K and Rimakova J. [*Silybum marianum* in vitro]. *Ceska Slov. Farm*. 2004; 53: 135 - 40.

12. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn. Rev*. 2007; 1: 69 - 79.

13. Rostampour S, Sohi HH, Jourabchi E and Ansari E. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzylisoquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): preliminary report. *World J. Microb. Biot*. 2009; 25: 1807 - 14.

14. Kamimura Sh, Akutsu M, Nishikawa M. Formation of thebaine in the suspension culture of *Papaver bracteatum*. *Agric. Biol. Chem*. 1976; 40: 913 - 19.

15. Farjamnezhad R, Zare N, Asghar-Zakaria R, Farjamnezhad M. Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production. *Turk. J. Biol*. 2013; 37: 689 - 97.

16. Tisserat B and Berhow M. Production of pharmaceuticals from *Papaver* cultivars in vitro. *Eng. Life. Sci*. 2009; 9: 190 - 96.

17. Ziegler J, Facchini PJ, Geissler R, Schmidt J, Ammer C, Kramell R, Voigtlander S, Gesell A, Pienkny A and Brand W. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochem*. 2009; 70: 1696 - 707.

18. Hayat S, Fariduddin Q, Ali B and Ahmad A. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta. Agron. Acad. Sci. Hung*. 2005; 53: 433 - 37.

19. Zhao J, Lawrence CD and Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*. 2005; 23: 283 - 333.

20. Rezaei A, Ghanati F and Dehaghi MA. Stimulation of taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in *Taxus baccata* cell culture. International Conference on Life Science and Technol. IACSIT Press, Singapore. 2011.

21. Ali M, Yu KW, Hahn EJ and Paek KY. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep*. 2006; 25: 613 - 20.

22. Dong J, Wan G and Liang Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activites of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *J. Biotechnol.* 2010; 148: 99 - 104.

23. De Costa F, Alaves Yendo AC, Fleck JD, Gosmann G and Fett-Neto AG. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and

biotic stresses. *Plant Physiol. Bioch.* 2013; 66: 56 - 62.

24. Russowski D, Maurmann N, Rech SB and Fett-Neto AG. Improved production of bioactive valepotriates in whole-plant liquid culture of *Valeriana glechomifolia*. *Ind. Crop Prod*. 2013; 46: 253 - 57.

25. Antognoni F, Iannello C, Mandrone M, Scognamiglio M, Fiorentino A, Giovannini PP and Poli F. Elicited *Teucrium chamaedrys* cell culture produce high amounts of teucrioside, but not the hepatotoxic neo-clerodane diterpenoids. *Phytochem*. 2012; 81: 50 - 9.

26. Sivanandhan G, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, Mariashibu TS, Manickavasagam M, Selvaraj N and Ganapathi A. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind. Crop. Prod*. 2012; 37: 124 - 29.

27. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol. Lett*. 2011; 33: 369 - 74.

28. Gangopadhyay M, Dewanjee S and Bhattacharya S. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root culture. *J. Biosci. Bioeng*. 2011; 111: 706 - 10.

29. Bernhard HO and Snieckus VA. β-phenethylamines and the isoquinoline alkaloids In: Saxton JE. *The alkaloids.* Royal Society of Chemistry. 1972, pp: 97 - 184.

30. Ngara R and Ndimba BK. Mapping and characterization of the sorghum cell suspension culture secretome. *Afr. J. Biotechnol*. 2011; 10: 253 - 66.

31. Ryu DDY, Lee SO and Romani. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. *Biotechnol. Bioeng.* 1990; 35: 305 - 11.