همایش ملی محیط زیست و تولیدات گیاهی
واحد دامغان
۱۵و۱۶مهر ۱۳۹۱

تشدید اثر سالیسیلیک اسید توسط فنیل آلانین روی تولید تاکسول در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.)

آیت اله رضایی*[۱]، فائزه قناتی[۲]، معصومه صفری[۲]، جعفر مسعود سینکی[۳]، ارمغان عابدزاده نیشابوری[۳]

۱- دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
arezaei@shahed.ac.ir

چکیده

اثر فنیل آلانین به عنوان پیش ماده تاکسول و سالیسیلیک اسید به عنوان الیسیتور و مولکول سیگنال، در کشت سلولی فندق مورد بررسی قرار گرفت. سالیسیلیک اسید با غلظت های ۲۵ و ۵۰ mg/l و فنیل آلانین با غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ mM مورد استفاده قرار گرفت. سلولها با سالیسیلیک اسید و فنیل آلانین در روز هشتم بعد از واکشت تیمار و در روز چهاردهم برداشت شدند. صفات مورد اندازه گیری عبارت بود از: تولید ذیتوده، درصد زنده مانی سلولی، تجمع ترکیبات فنلی، مقدار تاکسول، عملکرد ویژه و رهش تاکسول به داخل محیط کشت. نتایج نشان داد که رشد و درصد زنده مانی سلول ها توسط هر دو تیمار نسبت به کشت های شاهد کاهش یافت و اثر سالیسیلیک اسید تا حدی توسط فنیل آلانین روی این پارامترها تقویت شد. تجمع ترکیبات فنلی با افزایش غلظت هر دو تیمار افزایش یافت. فنیل آلانین با غلظت ۱ mM و سالیسیلیک اسید با غلظت ۵۰ mg/l بیشترین تاثیر را روی القای تولید تاکسول در کشت های سلولی داشتند. کاربرد توام سالیسیلیک اسید با غلظت ۵۰ mg/l و فنیل آلانین با غلظت ۱ mM منجر به تولید تاکسول به مقدار ۵۸ µg/g وزن خشک گردید که به ترتیب ۳۲، ۳/۲ و ۱/۸ برابر شاهد، تیمار سالیسیلیک اسید (۵۰ mg/l) و فنیل آلانین (۱ mM) بود. در مقایسه بین دو تیمار، بیشترین رهش تاکسول در غلظت ۵۰ mg/l سالیسیلیک اسید با مقدار ۴۳ درصد به دست آمد. نتایج، اثر بخشی بکارگیری توام الیسیتور و پیش ماده را در تجمع تاکسول در کشت سلولی فندق نشان داد.

کلمات کلیدی: کشت سلولی، تاکسول، فندق، فنیل آلانین، سالیسیلیک اسید، الیسیتور

مقدمه

پژوهشهای قابل توجهی در سالهای اخیر برای درک فاکتورهای محدود کننده تولید متابولیتهای ثانویه در گیاهان صورت گرفته و راههای افزایش تولید آنها را در کشت سلولی مشخص نموده است. این استراتژیها شامل انتخاب

لاین سلولی، بهینه سازی محیط کشت، بهینه سازی فرایند کشت و تکنیکهای ویژه نظیر الیسیتور و کشت دو فازی میباشد. نشان داده شده است که تیمار گیاهان با الیسیتورها و یا حمله پاتوژنها به گیاهان، سبب مجموعه ای از واکنش های دفاعی، از جمله تجمع طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه دفاعی مانند فیتوآلکسینها در گیاهان و یا در کشت سلولی میگردد. مطالعات متعددی نشان میدهند که مسیرهای انتقال پیام متعددی در القای تجمع متابولیتهای ثانویه در اثر الیسیتورها دخالت دارند و در میان آنها اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک به عنوان سیگنالهای حدواسط مشخص شده اند (Zhao et al. 2005). اسید سالیسیلیک به عنوان مولکول پیام رسان مقاومت گیاه را در برابر پاتوژنها و علف خواران تحریک کرده و مسیرهای متابولیتهای ثانویه را القاء مینماید. علاوه بر این الیسیتورها از جمله اسید سالیسیلیک تولید متابولیتهای ثانویه را در کشتهای سلولی گیاهی القاء نموده و افزایش داد (Rezaei et al. 2011).

افزودن پیش سازها و مواد افزودنی نیز روی رشد و تولید متابولیتها در کشت سلول گیاهی موثر است. تیمار محیط کشت سلولهای سرخدار با $AgNO_3$، VSO_4، $CoCl_2$، سوکروز، فنیل آلانین و آمونیوم سیترات منجر به تولید ماده ضد سرطان تاکسول به مقدار ۵/٦ برابر (۱۳/۷۵ میلی گرم در لیتر) در مقایسه با گروه شاهد (۲/۵ میلی گرم در لیتر) گردید (Khosroushahi et al. 2006). با توجه به اینکه دانش مربوط به دست ورزی کشتهای سلولی فندق و القای تولید تاکسول به روش بیوتکنولوژیک در کشت سلولی آن با بکارگیری روشها و استراتژیهای مختلف و بررسی مکانیسمهای مربوطه خیلی ناچیز است و اطلاعات زیادی در مورد آن در دسترس نیست در این تحقیق هدف اساسی این است که با بکارگیری الیسیتور اسید سالیسیلیک و یکی از پیش سازهای مولکول تاکسول یعنی فنیل آلانین در محیط کشت، ضمن اندازه گیری رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک، عملکرد سلولها از نظر تولید تاکسول نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی

بذرهای فندق رقم گرد اشکور برای القا و تولید کالوس مطابق روش رضایی و همکاران (۲۰۱۱) مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از گذشت حدوداً ۱۰ روز کالوسها ظاهر شدند و هر ۲ هفته واکشت گردیدند. برای تهیه کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی ٤،۲- دی کلروفنوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت های ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر و بدون آگار اضافه شد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شده و هر ۲ هفته واکشت گردید.

تیمار سلولها با اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین

سالیسیلیک اسید (مرک، آلمان) با غلظت های ۲۵ و ۵۰ mg/l و فنیل آلانین (مرک، آلمان) با غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ mM مورد استفاده قرار گرفت. سلولها با سالیسیلیک اسید و فنیل آلانین در روز هشتم بعد از واکشت تیمار شده و در روز چهاردهم برداشت شدند. سالیسیلیک اسید در اتانول ۷۰٪ جهت تهیه محلول اصلی حل گردید و فنیل آلانین نیز در آب حل شد و هر دو محلول توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شدند و سپس با حجم مشخص در روز هشتم پس از واکشت به محیط کشت تعلیقی اضافه شدند طوریکه غلظت های نهایی فوق الذکر از آنها بدست آمد. کشت های شاهد توسط حجم مشابهی از اتانول ۷۰٪ یا آب تیمار شدند. دما در طول تیمار ۲۵ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. واکنش سلولها در ارتباط با تولید تاکسول و دیگر پارامترهای فیزیولوژیک روز چهاردهم مورد ارزیابی قرار گرفت.

اندازه گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول ها

رشد سلولی با اندازه گیری افزایش در وزن تر سلولها تعیین شد. بدین منظور سلولها توسط نایلون مش (٤٢μM) از محیط کشت جدا شدند و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. برای تعیین توان زیستی از محلول اوانز بلو مطابق روش اسمیت و همکاران (۱۹۸٤) استفاده شد.

اندازه گیری ترکیبات فنلی و تاکسول

مقدار تولید ترکیبات فنلی مطابق روش رضایی و همکاران (۲۰۱۱) در سلولها صورت گرفت. برای استخرج تاکسول از سلولها و محیط کشت در روز چهاردهم نمونه برداری صورت گرفت (رضایی و همکاران ۲۰۱۱). برای شناسایی و تعیین مقدار تاکسول از HPLC (Knauer, Germany) استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm x 4.6 mm I.D., 5 µm)، فاز متحرک متانول و آب (٤٥/٥٥ v/v) هر یک حاوی ۰/۱ ٪ اسید استیک به صورت گرادیان با فلوی ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر بود. شناسایی و اندازه گیری تاکسول به کمک مقایسه Retention time نمونه ها با استاندارد تاکسول (سیگما) صورت گرفت.

نتایج

رشد و زنده مانی سلولی

اثر تیمارهای اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین به صورت انفرادی و ترکیبی روی رشد و زنده مانی سلولهای فندق در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه میشود با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک این دو پارامتر به صورت معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافتند. اما در خصوص فنیل آلانین با افزایش غلظت آن رشد سلولی

به صورت معنی داری افزایش یافت ولی اختلاف معنی داری در ارتباط با زنده مانی بین غلظتهای آن مشاهده نگردید. در حالت کاربرد توام اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین، با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در حضور فنیل آلانین رشد سلولی کاهش معنی دار نشان داد اما تفاوت معنی داری بین اثر غلظتهای اسید سالیسیلیک تحت این شرایط مشاهده نگردید.

جدول ۱- اثر اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین روی میزان رشد، زنده مانی، تولید ترکیبات فنلی، تولید تاکسول و رهش آن به محیط کشت در کشت سلولی فندق. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار میباشد.

		شاخص های مورد بررسی				
تیمار	غلظت	رشد (g/L)	زنده مانی (٪)	ترکیبات فنلی(µg/ml)	تولید تاکسول (mg/Kg DW)	رهش تاکسول (٪)
شاهد	۰	۵۰۱/٤a	۹۵/۲۲a	۳۵/٦d	۱/۸f	۱۱/۸b
اسید سالیسیلیک (mg/l)	۲۵	٤۱۵/۵b	۷۷/٦٦b	٤۲/۷c	۱۱/۵d	۱۵/۲b
	۵۰	۲۸۱/۵de	٦۲/۵٤c	۵۱/۲b	۱۸/۲c	٤۳a
فنیل آلانین (mM)	۰/۲۵	۳۹۸/٤c	۷۵/٤۳b	۳۷/٤d	۵/٦e	۸c
	۰/۵	٤۰۸e	۷٦/۸۷b	٤۱/۸c	۷/۹e	۸/٤c
	۱	٤۳۰/۳b	۷۹/٦۸b	٤۵/۱c	۳۲/٤b	۳/٦d
Phe (1mM)	SA (25 mg/l)	۳۰۷d	٦٦/٦۷c	۵۲/۵b	۱۹/۵c	۷/۹c
	SA (50 mg/l)	۲۵٤/۵e	۵۹/٤۳c	۵۸/٦a	۵۸/۳a	۲/٤d

مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵٪ وحروف مشابه در بین ردیفها نشانگر معنی دار نبودن آنهاست.

تولید ترکیبات فنلی و تاکسول

مقدار تولید متابولیت های ثانویه شامل ترکیبات فنلی و تاکسول نیز تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت (جدول ۱). کلیه تیمارها باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی و تاکسول نسبت به شاهد گردیدند. اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین هر دو به صورت انفرادی با افزایش غلظت، مقدار ترکیبات فنلی و تاکسول را نسبت به شاهد به صورت معنی داری افزایش دادند. در حالت تیمار ترکیبی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و تاکسول تحت اثر تیمار همزمان اسید سالیسیلیک با غلظت ۵۰ میلیگرم در لیتر و فنیل آلانین ۱ میلی مولار بدست آمد که اختلاف مشاهده شده هم نسبت به تیمارهای انفرادی و هم نسبت به شاهد معنی دار بود و در واقع میتوان گفت در این غلظتها، دو تیمار همدیگر را تقویت کرده اند. کاربرد توام سالیسیلیک اسید با غلظت ۵۰ mg/l و فنیل آلانین با غلظت ۱ mM منجر به تولید تاکسول به مقدار ۵۸ µg/g وزن خشک گردید که به ترتیب ۳۲، ۳/۲ و ۱/۸ برابر شاهد، تیمار سالیسیلیک اسید (۵۰ mg/l) و فنیل آلانین (۱ mM) بود. میزان رهش یا آزاد سازی تاکسول به محیط کشت نیز تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت. با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک میزان رهش تاکسول افزایش معنی داری نشان داد ولی با افزایش غلظت فنیل آلانین از مقدار آن کاسته شد. در حالت کاربرد توام سالیسیلیک اسید با فنیل آلانین، بیشترین مقدار رهش

تاکسول در غلظتهای ۲۵ mg/l سالیسیلیک اسید و فنیل آلانین ۱ mM اندازه گیری شد. در کل بیشترین میزان رهش تاکسول در غلظت ۵۰ mg/l سالیسیلیک اسید با مقدار ۴۳ درصد به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری

رشد و زنده مانی سلولهای فندق به طور واضحی تحت تاثیر اسید سالیسیلیک قرار گرفت و با افزایش غلظت آن رشد سلولی و زنده مانی کاهش معنی داری نشان داد. محققین متعددی استراتژی هایی را برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت های سلول گیاهی گزارش کرده اند. در میان آنها القای متابولیسم ثانویه توسط الیسیتورها غالباً به چشم می خورد. نشان داده شده است که اسید سالیسیلیک، یکی از هورمونهای گیاهی، نقش سیگنالینگ مهمی در فعال سازی انواع پاسخ های دفاعی گیاهی ایفا کرده و متابولیسم ثانویه را شدیداً در گیاهان القا می نماید (Bulgakov et al. 2002). در مقابل امکان تاثیر گذاری الیسیتورها روی متابولیسم اولیه و رشد سلولها و گیاهان وجود دارد چرا که تقویت متابولیسم ثانویه مستلزم بکارگیری پیش سازهای مختلف و صرف انرژی سلول بوده که طبیعتاً کلیه جنبه های مختلف فیزیولوژی سلول از جمله رشد و تولید ذیتوده را تحت تاثیر قرا میدهد.

اما با افزایش غلظت فنیل آلانین رشد سلولی افزایش یافت ولی اختلاف معنی داری در ارتباط با زنده مانی بین غلظتهای آن مشاهده نگردید. در این ارتباط وجود گلوتامین (۲ میلی مولار) برای رشد سلولها در کشتهای تعلیقی ضروری ذکر شده و رشد کالوس سرخدار زمانی که محیط کشت با ۱ میلی مولار فنیل آلانین تیمار شد افزایش یافت (Cusido et al. 1999).

در این تحقیق همچنین مشاهده گردید که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین، مقدار تولید ترکیبات فنلی و تاکسول در سلولها به صورت معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت. اسید سالیسیلیک یک مولکول سیگنال درونزاد گیاهی است که در بسیاری از پاسخ های رشد دخالت دارد، اما اثرات آن بر رشد در کشتهای سلولی هنوز بخوبی درک نشده است. نشان داده شده است که اسید سالیسیلیک بیوسنتز گروههای مختلفی از متابولیتهای ثانویه را در گیاه کامل، کشتهای سلولی و ریشه های مویی نظیر القاء نمود (Bulgakov et al. 2002; Avancini et al. 2003). همچنین در ارتباط با تاثیر فنیل آلانین روی تولید متابولیتهای ثانویه، نشان داده شده است که تولید ترکیبات فنلی و تاکسول در کشتهای سلولی فندق با افزایش غلظت آن افزایش نشان داد (Bemani et al. 2012). همچنین مشاهده گردید که بکارگیری همزمان اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین بیشترین تاثیر را روی عملکرد سلولها در خصوص تولید تاکسول داشته و با توجه به اینکه تهیه و بکارگیری این تکنیک در دست ورزیهای بیوتکنولوژیک تولید تاکسول بسیار راحت و ارزان است امکان استفاده از آن در صنعت کمک شایانی می تواند به بالا بردن کارایی تولید تاکسول نماید که یکی از موانع بغرنج در مسیر تولید این متابولیت ضد سرطان بی نظیر است.

منابع

Avancini, G.; Abreu, I. N.; Saldana, M. D.; Mohamed, R. S.; Mazzafera, P. *Phytochemistry*, **2003,** 63, 171.
Bemani, E.; Ghanati, F.; Rezaei, A.; Jamshidi, M. *J. Nat. Med.* **2012**, DOI: 10.1007/s11418-012-0696-1.
Bulgakov, V. P.; Tchernoded, G. K.; Mischenko, N. P.; Khodakovskaya, M. V.; Glazunov, V. P.; Radchenko, S. V. *J. Biotechnol.* **2002**, 97, 213.
Cusido, R. M.; Palazon, J.; Navia-Osorio, A.; Mallol, A.; Bonfill, M.; Morales, C. l. *Plant Sci.* **1999**, 146, 101.
Khosroushahi, A. Y.; Valizadeh, M.; Ghasempour, A.; Khosrowshahli, M.; Naghdibadi, H.; Dadpour, M. R. *Cell Biol. Int.* **2006**, 30, 262.
Rezaei, A.; Ghanati, F.; Behmanesh, M.; Mokhtari-Dizaji, M. *Ultrasound Med. Biol.* **2011**, 37, 1938.
Smith, M. A. L.; Palta, J. P.; McCown, B. H. *Plant Sci. Lett.* , **1984**, 33, 249.
Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R. *Biotechnol. Adv.* **2005**, 23, 283.

همایش ملی محیط زیست و تولیدات گیاهی
واحد دامغان
۱۵و۱۶ مهر ۱۳۹۱

Phenylalanine potentiated salicylic acid effect on taxol production in cell culture of hazelnut (*Corylus avellana* L.)

Ayatollah Rezaei[1*], Faezeh Ghanati[2], Masoud Jafar Sinaki[3], Armaghan Abedzadeh Neyshabouri[3]

[1]*Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran*
[2]*Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[3]*Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran*

arezaei@shahed.ac.ir

Abstract

The effect of phenylalanine (Phe) as a precursor for taxol and salicylic acid (SA) as an elicitor and signal molecule, on cell cultures of hazelnut was evaluated. SA concentrations were 25 and 50 mg/L and those of the Phe were 0.25, 0.5 and 1 mM. The cells were treated with SA and Phe on day 8 of subculture and were harvested on day 14. The measured parameters were biomass production, cell viability, phenolics accumulation, and taxol content, specific yield and its release to the medium. The results showed that growth and viability of cells were decreased by both treatments compared to control cultures and SA effect was somewhat exaggerated by Phe on the parameters when used as combined. Phenolic compounds accumulation was increased by increasing of both treatments concentrations. Phenylalanine at 1 mM and SA at 50 mg/l concentration were found to be the most efficient to induce taxol level in cell cultures. In case of combined use of SA and Phe, interaction of 50 mg/l of SA and 1mM of Phe on cell led to 58 µg/g dry weight taxol accumulation, which was 32, 3.2 and 1.8 fold higher than those of the control, SA and Phe-treated cultures, respectively. In comparison between the two treatments, the highest taxol release was achieved by 50 mg/l of SA, which was 43%. The results indicated the effectiveness of combined elicitation and precursor feeding on taxol accumulation in cell cultures of *C. avellana*.

Keywords: Cell culture, Taxol, Hazelnut, Phenylalanine, Salicylic acid, Elicitor