(مقاله کوتاه علمی)

بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در تولید متابولیت‌های ثانویه بافت کالوس گیاه دارویی *Linum usitatissimum* L.

راحله خادمیان[1]، فاطمه کریم‌زاده[2]*، بهنام صداقتی[3]

[1]استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

[2]کارشناس‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین، ایران

[3]دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۲۵

چکیده

در این مطالعه که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید، تأثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ میلی‌گرم در لیتر) در بازه‌های زمانی متفاوت (۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت)روی میزان تولید فنول و لیگنان در بافت کالوس گیاه دارویی (*Linum usitatissimum* L.) مورد بررسی قرار گرفت. جهت کالوس‌زایی، ریزنمونه‌های کوتیلیدون در محیط کشت جامد MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتربنزیل آمینوپورین (BAP) و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کشت شدند. میزان ترکیبات فنولی (با معرف فولین- سیوکالتیو)و لیگنانی کل براساس روش اسپکتروفتومتریو به‌ترتیب بر حسب منحنی‌های استاندارد گالیک اسید و سزامین در طول موج‌های ٧٦٥ و ٢٨٨ نانومتر اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار وزن تر(۹/۸ گرم در زمان ٢٤ ساعت) و وزن خشک کالوس (۰/۲۵ گرم) در همه بازه‌های زمانی مربوط به تیمار ٤٥ میلی‌گرم در لیتر کلشی سین بود. حداکثر و حداقل مقدارلیگنان در این بازه‌های زمانی به‌ترتیب ازتیمارهای ۱۵ میلی‌گرم در لیتر (به‌طور میانگین۲۸/٤ میلی‌گرم سزامین بر گرم وزن خشک) و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر (به‌طور میانگین۱۹/۷۵ میلی‌گرم سزامین بر گرم وزن خشک) کلشی‌سین بدست آمد.نتایج نشان داد که بیشترین (١٦٤میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و کمترین (١٤٥/٦گالیک اسید بر گرم عصاره) مقادیر فنل درکالوس‌ها به‌ترتیب متعلق به غلظت ٦٠ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین بود. مطابق نتایج حاصله، میزان تولید متابولیت‌های ثانویه مهم گیاه کتان مانند فنل و لیگنان تحت تیمارهایی از کلشی‌سین افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنولی، کتان، کشت کالوس، کلشی‌سین، لیگنان

*نویسنده مسئول: karimzadeh91@yahoo.com

مقدمه

کتان با نام علمی *Linum usitatissimum* L. از خانواده Linaceae و یکی از قدیمی‌ترین گیاهانی است که برای استفاده از فیبر و مصارف دارویی کشت می‌گردد. این گیاه اغلب در طب سنتی برای درمان اسهال و عفونت‌های دستگاه گوارشاستفاده می‌شود. کتان حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات بیولوژیکی مهم و موادی مانند امگا ۳، اسیدهای چرب، توکوفرول و... بوده و همچنین غنی‌ترین منبع لیگنان‌های گیاهی است. یکی از اصلی‌ترین لیگنان‌ها در این گیاه سکوئیزولاریسیرسینول دیگلوکوسید (SDG) است که خواص داروئی مفیدی همچون اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضد سرطانی دارد. این ماده برای درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت ونکروز کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hu et al., 2007).

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که به وسیله قارچ‌ها، باکتری‌ها یا گیاهان تولید شده و برای رشد و نمو وتولید مثل گیاه ضروری نمی‌باشند بلکه، اصولا در مکانیسم‌های دفاعی و فرآیندهای سیگنال‌دهی گیاه تحت شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی نقش ایفاء می‌کنند (Kabera et al., 2014). اخیرا روش‌های تجربی مختلفیمانند اصلاح نژاد، بهبود شرایط محیطی، استفاده از محرک‌ها، القای پلی پلوئیدی و مهندسی متابولیت برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده شدهاست. القای پلی پلوئیدی طبیعی در همه گیاهان وجود ندارد، بنابراین در دهه‌های گذشته در برخی گیاهان به صورت مصنوعی ایجاد شده است (Dhooghe et al., 2011). القای پلی‌پلوئیدی ممکن است غلظت برخی متابولیت‌های ثانویه گیاهی را افزایش دهد که عمدتا ناشی از افزایش رشد و اندازه اندام‌های تولید کننده این ترکیبات است (Jones et al., 2008). دست ورزی در سطح پلوئیدی گیاهان ابزار باارزشی است که مدتهای بسیار طولانی در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته است. کلشی‌سین از جمله موادی است که در القای پلی‌پلوئیدی کاربرد وسیعی دارد. این ماده با ممانعت از پلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها موجب اختلال در روند پیشرفت رشته‌های دوک و فرآیند میتوز می‌گردد و تقسیم کروموزوم‌ها در سلول‌های مربوطه در مرحله متافاز میتوز متوقف شده و چرخه بعدی میتوز با تعداد مضاعف کروموزوم‌ها آغاز می‌گردد که منجر به افزایش سطح پلوئیدی می‌شود (Kumar Yadav et al., 2013). کلشی سین و اوریزالیناز رایج‌ترین مواد شیمیایی القا کننده پلی‌پلوئیدی هستند که در گونه‌های مختلف گیاهی استفاده شده‌اند (Dhooghe et al., 2011). کلشی‌سین علاوه‌بر القای پلی‌پلوئیدی موجب افزایش بالقوه تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردد و مدت‌های طولانی است که از این ماده برای تولید ترکیبات باارزش گیاهی استفاده می‌گردد (Sadat Noori et al., 2017). افزایش سطح پلوئیدی موجب بالا رفتن میزان متابولیسم گیاهان و همچنین تظاهر صفات جدیدی می‌گردد (که در گیاهان دیپلوئید وجود ندارد). از جمله این موارد می‌توان به بهبود کمی و کیفی بسیاری از متابولیت‌های ثانویه مانند ترپنها، فنل، فلاونوئید، کاروتنوئیدها و آنتی‌اکسیدانتها در گونه‌های مختلف گیاهی اشاره نمود (Caruso et al., 2013). در آزمایشی که برنارد و همکاران (Bernard et al., 2012) روی گیاه شیرین بیان انجام دادند گزارش نمودند که تیمار کلشی‌سین موجب افزایش تولید آنتوسیانین و گلیکریزیک اسید در این گیاه گردید. همچنین آن‌ها اعلام نمودند که رابطه مثبتی بین القای پلی پلوئیدی و تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. جوادیان و همکاران (Javadian et al., 2017) در یک مطالعه روی گیاه *Linum album* افزایش تولید پدوفیلوتوکسین و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتز آن را در

گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید گزارش دادند. لینو همکاران (Lin et al., 2011) در مطالعه‌ای روی گیاه *Artemisia annua*، افزایش محتوای آرتمیزینین در گیاهان تتراپلوئید و همچنین افزایش بیان ژن‌ها در مسیر بیوسنتز آرتمیزین را گزارش کردند. در تحقیقی دیگر، دهقان و همکاران (Dehghan et al., 2012) تولید آلکالوئید تروپان در در کشت ریشه موئین گیاه *Hyoscyamus muticus* را بررسی کردند. آن‌ها مشاهده نمودند مقدار سنتز متابولیت ثانویه با دستکاری سطح پلوئیدی و شرایط کشت به طور موفقیت آمیز افزایش یافت.

با توجه به نیاز روز افزون به بسیاری از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در صنایع دارویی و غذایی و عدم وجود مقادیر کافی از آن‌ها بصورت طبیعی، یکی از راهکارهای اصلی تولید این ترکیبات به صورت مصنوعی و یا القای آن‌ها در سیستم‌های گیاهی می‌باشد. لذا، این تحقیق برای مطالعه و بررسی اثرغلظت‌های مختلف کلشی‌سین در القای تولیدچند متابولیت ثانویه مهم و با ارزش در بافت کالوس گیاه کتان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی و القاء کالوس: این تحقیق در سال ۹۵-۱۳۹٤ در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفیاجرا گردید. بذر کتان (*Linum usitatissimum* L.) رقم شهدادکرمان از شرکت پاکان بذر اصفهان، ایران خریداری شد. برای القای کالوس از روش Salaj و همکاران با اندکی تغییرات استفاده شد(salaj et al., 2005). ابتدا بذور گیاه کتان با آب شهری شستشو داده شدند. سپس بذور با اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلرید سدیم ۳٪ به‌مدت ۵ دقیقه استریل شدند و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شستسشو شدند. به‌منظور جوانه‌زنی، بذرها در محیط MS حاوی ٦/٥ میلی‌گرم در لیتر آگار و ۳۰ میلی‌گرم در لیترساکارز کشت داده شدند. pH محیط کشت با استفاده از سدیم هیدروکسید (۱/۰ نرمال) و اسید هیدروکلریک (۱/۰ نرمال) قبل از اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۰ دقیقه) بر روی ۰/۰۲ ± ۵/۸۰ تنظیم شد. نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ١٦ ساعت روشنایی (شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های حاصل به‌عنوان منبع ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.جهت کالوس‌زایی، قسمت‌هایی از کوتیلیدون گیاهچه‌های ۷ تا ۱۰ روزه جدا شده ودر پتری دیش در محیط کشت MS حاوی ٦/٥ میلی‌گرم در لیتر آگار، ۳۰ میلی‌گرم در لیترساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتربنزیل آمینوپورین (BAP) و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کشت گردید. کشت‌ها در اتاقک رشد در دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها یک هفته بعد از کشت شروع به کالوس‌زایی کردند.

اعمال تیمار کلشی‌شین: به‌منظور بررسی اثر کلشی‌سین روی تولید متابولیت‌های ثانویه کالوس، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل پنج غلظت کلشی‌سین (۰، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ میلی‌گرم در لیتر) و ٤ بازه زمانی (۰، ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت) بود. بدین‌ترتیب، کالوس‌های تولید شده بعد از سه هفته به ابعاد ۰/۵ سانتی‌متری برش داده شده و به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع و غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ میلی گرم در لیتر) انتقال داده شدند (برای هر غلظت کلشی‌سین سه ارلن اختصاص یافت). ارلن‌ها در داخل انکوباتور شیکردار

با دور ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط تاریکی قرار داده شدند. نمونه‌برداری از کالوس‌ها درسه بازه زمانی ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت (بعد از اعمال تیمار کلشی‌سین) انجام شد. بعد از نمونه‌برداری در زمان‌های ذکر شده، کالوس‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شده و مجددا در محیط کشت MS با همان ترکیب هورمونی امافاقد کلشی‌سین کشت شدند و در همان شرایط محیطی نگهداری شدند. دو هفته پس از کشت کالوس، بازکشت انجام شد. چهار هفته پس از اعمال تیمار کلشی‌سین، کالوس‌ها از محیط کشت جدا و با ترازو توزین گردیدند و جهت اندازه‌گیری متابولیت ثانویه در داخل فویل آلومینیوم در آون در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. پس از خشک شدن، وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

تهیه عصاره متانولی: نیم گرم کالوس با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ خیسانده شد و به‌مدت ۳ ساعت در بن ماری با دمای ٦٠-٥٥ درجه درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در خاتمه، محلول رویی با کاغذ واتمن شماره یک صاف شده و به حجم رسانده شد. عصاره تهیه شده برای مدت زمان یک ماه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قابل نگهداری است.

تعیین مقدار فنول کل: اندازه‌گیری محتوای فنولی از طریق روش رنگ سنجی فولین سیوکالتیو انجامشد.ترکیبات واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی بود.پس از ۳ دقیقه توقف، ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۱۷ درصد به آن افزوده شده و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از دوساعت وقفه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نوری محلول حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ٧٦٥ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت برای تعیین میزان فنول از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید (Akkol et al., 2008).

تعیین مقدار لیگنان کل: اندازه‌گیری محتوای لیگنان کل طبق روش Bhatnagar و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Bhatnagar et al., 2015). مخلوط هگزان و کلروفرم (۳/۷ حجمی/حجمی) برای استخراج ترکیبات لیگنانی از عصاره متانولی استفاده شد و جذب نمونه‌ها در ۲۸۸ نانومتر انجام شد. در این آزمایش از سزامین به عنوان ترکیب استاندارد استفاده شد. مقدار لیگنان کل به صورت مقدار سزامین بر حسب میلی‌گرم در هر گرم از وزن خشک (mg SE/g DW) تعیین شد.

نتایج

وزن تر و خشک کالوس: نتایج حاصل از بررسی وزن تر کالوس نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف کلشی سین در سطح احتمال ۱ درصد بر این صفت معنی دار است. به طوری که بالاترین مقدار وزن تردر غلظت‌های ۱۵، ۳۰ و ٤٥ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین و در مدت زمان ٢٤ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد. همچنین، مشاهده گردید که غلظت ٤٥ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین در همه بازه‌های زمانی دارای بیشترین میزانوزن تر کالوس بود.میزان این صفت در زمان ٤٨ ساعت بعد از تیمار در همه غلظت‌های کلشی‌سین کاهش نشان داده است (شکل ۱). اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف کلشی‌سین برای صفت وزن خشک کالوس معنی‌دار نبود در حالی که غلظت‌های مختلف کلشی‌سین اختلاف معنی‌داری در این صفت در سطح احتمال ۵ درصد ایجاد نمودند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شد

بیشترین میزان وزن خشک کالوس (۰/۲۵ گرم) مربوط به غلظت ٤٥ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین بود.

محتوای لیگنان کل: با توجه به شکل ۳ مقدار لیگنان بدست آمده از کالوس‌های تیمار شده با کلشی‌سین در بازه‌های زمانی ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت متفاوت بود. در همه بازه‌های زمانی مورد آزمایش، بیشترین و کمترین مقدارلیگنان به‌ترتیب در غلظت ۱۵ (۲۸/٤ میلی‌گرم سزامین بر گرم وزن خشک) و ۳۰ (۱۹/۷۵ میلی‌گرم سزامین بر گرم وزن خشک) میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین بدست آمد.

محتوای فنول کل: اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر محتوای فنول کل در شکل ٤ نشان داده شد. بیشترین مقادیر فنول کل (١٦٤-١٦٢ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) از کالوس‌ها در غلظت ٦٠ میلی‌گرم در لیتر و نمونه شاهد و کمترین میزان آن ١٤٥ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین بدست آمد. بررسی محتوای فنول در زمان‌های مختلف نشان داد که این مقدار از زمان شروع اعمال تیمار تا ٢٤ ساعت بعد روند افزایشی داشته و پس از آن، تا زمان ٤٨ ساعت بعد از تیمار کاهش یافته است. اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف کلشی سین بر محتوای فنول معنی‌دار نبود.

بحث

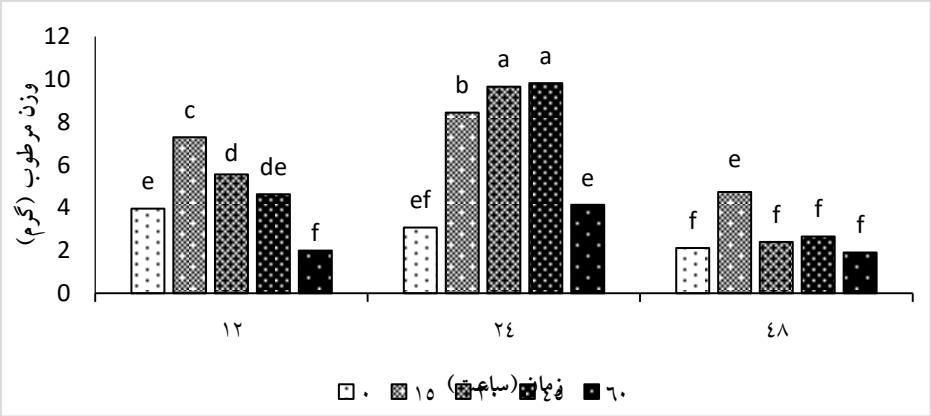
نتایج این تحقیق نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در زمان‌های متفاوت بر میزان وزن مرطوب و وزن خشک در کالوس‌های گیاه کتان متغیر است. کلشی‌سین به عنوان یک ماده موثر به‌طور گسترده برای القاء پلی پلوئیدی در گیاهان استفاده می شود (Amiri et al., 2010; Vijayalakshmi and Anju, 2011). در این تحقیق، تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های ۱۵، ۳۰ و ٤٥ میلی‌گرم در لیتر و در مدت زمان ٢٤ ساعت بالاترین شاخص رشدی را نسبت به نمونه‌های شاهد ایجاد نمود. افزایش شاخص رشد صفت مطلوبی برای حصول مقادیر بالاتری از متابولیت‌های موجود در کالوس است که در این آزمایش بدست آمد. همچنین، وزن تر و خشک کالوس‌به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری سرعت رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند که مطابق نتایج مطالعه حاضر بالاترین نرخ رشد کالوس مربوط به غلظت ٤٥ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین و مدت زمان ٢٤ ساعت بوده است. مارتینز و همکاران (Martínez et al., 2018) گزارش دادندکه محرک‌های رشد موجب افزایش سرعت و میزان رشد کالوس و در نتیجه افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. کلشی‌سین با اتصال به توبولین‌ها باعث جلوگیری از تشکیل میکروتوبول‌ها و حرکت کروموزوم‌ها به دو طرف سلول در طی تقسیم میتوزمی گردد و بدین طریق افزایش سطح پلوئیدی و افزایش میزان رشد اتفاق می‌افتد (Atichart, 2013). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، استفاده از کلشی‌سین باعث عوارض جانبی مانندرشد و مورفولوژی غیرطبیعی، تلفات کروموزوم و یا تغییرات و جهش در ژن‌هانیز می‌شود (Abdoli et al., 2013). افزایش سطوح پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین در گیاه *Chrysanthemum cinerariifolium* گزارش شده است (Liu and Gao, 2007).

از جمله نتایجی که در این تحقیق بدست آمد افزایش میزان دو متابولیت مهم فنول و لیگنان در کالوس‌های گیاه کتان بود. نتیجه آزمایشات Ayyobi و همکاران (Ayyobi et al., 2017) که از غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد کلشی سین روی زرین گیاه استفاده کردند نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین مقادیر تولید فنل کل نیز افزایش یافت به‌طوری‌که میزان آن ۱/٤٥ برابر میزان تولید این ماده در گیاهان شاهد بوده است. افزایش تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه مانند پروتئین کل،

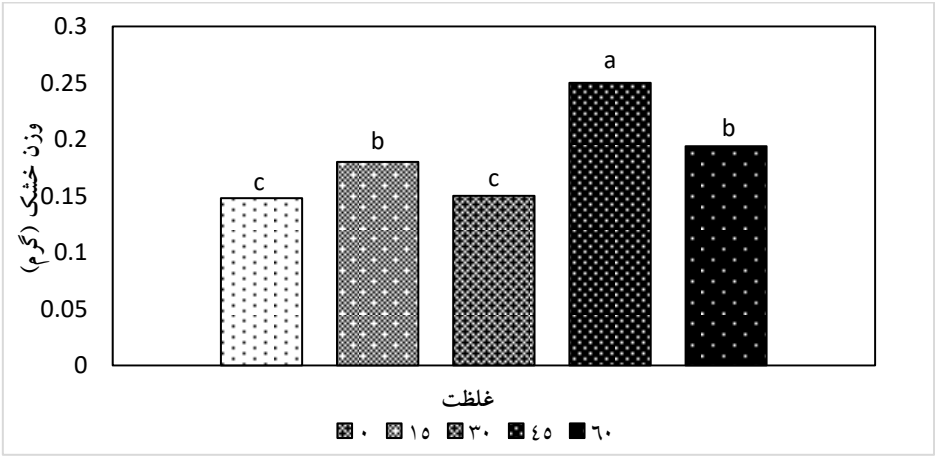
فلاونوئید کل و نشاسته در گیاهان تتراپلوئید شاهدانه در مقایسه با مقادیر این ترکیبات در گیاهان دیپلوئید گزارش گردید (Bagheri and Mansouri, 2015). آن-ها همچنین در مطالعه خود اعلام نمودند که محتوی تتراهیدروکربونیل گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش یافته است. این محققان بیان کردند که مطابق نتایج آزمایش آنها القای پلی‌پلوئیدی می-تواند موجب افزایش برخی متابولیت‌ها گردد. تغییر پروفایل ترپن و افزایش ۹ درصدی میزان کانابیدیول در گیاهان پلی‌پلوئید شاهدانه نسبت به گیاهان دیپلوئید گزارش گردید (Parsons et al., 2019). مطالعه خارد و همکاران (Kharde et al., 2017) روی گیاه نازباتلاقی که افزایش ۷۲ درصدی متابولیت ثانویه باکوسید تحت تیمار ۱ درصد کلشی‌سین به مدت ۲ ساعت را نشان داد که چهار برابر میزان تولید شده این متابولیت در گیاهان شاهد (بدون تیمار کلشی‌سین) بوده است. بالعباسیو همکاران (Belabbassi et al., 2016) اظهار داشتند که گاهی اوقات، القاء متابولیسم ثانویه ممکن است سبب کاهش وزن سلول و افزایش تولید متابولیت شودو این می‌تواند علت کاهش محتوای فنول و لیگنان در بعضی از غلظت‌های کلشی‌سین در مطالعه حاضر باشد.نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج Nashar و همکاران (El-Nashar and Ammar, 2016) روی گیاه *Calendula officinalis* و نتایج Tsuro و همکاران (Tsuro et al., 2016)روی تولید متابولیت ثانویه در گیاه بابونه نیز مطابقت دارد. کاروسو و همکاران (Caruso et al., 2011) افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را در تتراپلوئیدهای حاصل از گونه وحشی گیاه *Solanum commersonii* مشاهده کردند.کاینسکشیری و همکاران (Kaensaksiri et al., 2011) نشان دادند که محتوای آسیاتیکوزید در گیاهان تتراپلوئید ۱/۳۷ برابر بیشتر از مقدار آن در گیاهان دیپلوئیدبود. افزایش مقدار لیگنان و فنول کل در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین می‌تواند در اثر افزایش سطح پلوئیدی و در نتیجه افزایش اندازه ژنوم آن‌ها باشد به دلیل این که دوز ژنی آن‌ها افزایش یافته است. ممکن است این افزایش ژنوم مقدار رونویسی از ژن‌ها و در نتیجه فعالیت متابولیکی را افزایش داده باشد (Byrne et al., 1981; Randall et al., 1977). فرضیه تعادل ژنی بیان می‌کند که ژن‌های کد کننده ترکیبات پروتئینی و مسیرهای بیوشیمیایی نسبت به دوز ژن حساس هستند. برای مثال، مقادیر کمی هر یک از این ترکیبات اولیه یا ثانویه ژنی بر اساس تعداد کپی ژن‌های تولیدکننده آن‌هاست (Buggs et al., 2012). بنابراین، می‌توان بیان کرد که افزایش سطح پلوئیدی به صورت مصنوعی با اعمال تیمارهایی مانند کلشی‌سین که با افزایش دوز ژن همراه است می‌تواند یکی از روش‌های القای تولید متابولیت‌های با ارزش گیاهی به ویژه گیاهان دارویی باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

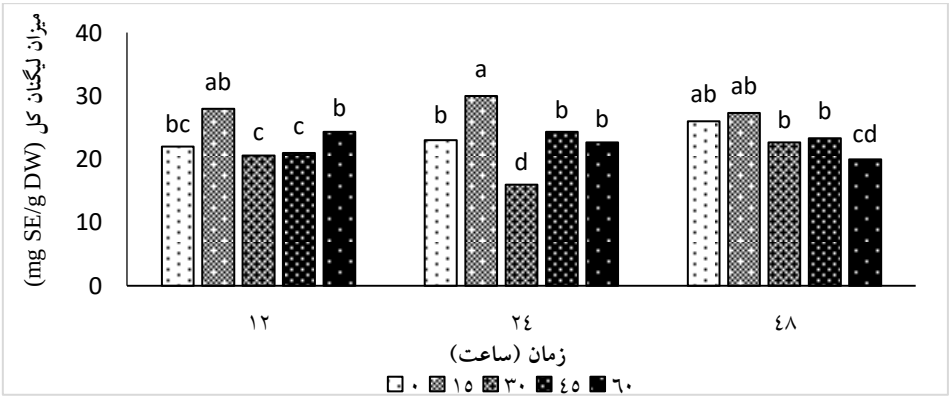
متابولیت‌های ثانویه گیاهی ترکیبات با ارزشی هستند که به طور گستردهدر صنایع غذایی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند.با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های گیاهی و افزایش تقاضا، محققین به‌دنبال روش‌هایی به منظور تولید هر چه بیشتر این ترکیبات هستند.در این مطالعه با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر کلشی‌سین بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه بافت کالوس گیاه کتان می‌توان گفت که تیمار با کلشی‌سین باعث افزایش میزان فنول و لیگنان می‌شود. از این روش می‌توان برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه درکشت‌های سلولی گیاهان دارویی استفاده نمود.



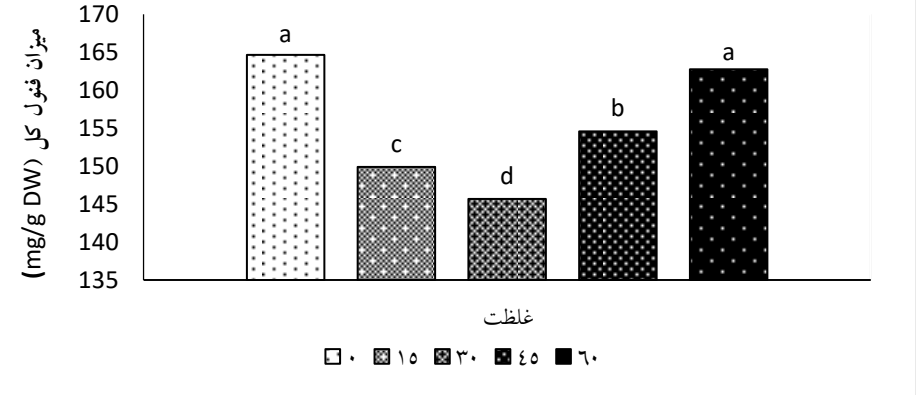
شکل ۱: اثرمتقابل زمان و غلظت‌های مختلف کلشی-سین بر روی وزن مرطوب کالوس‌ها (معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد)



شکل ۲: بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلشی سین بر روی وزن خشک کالوس‌های گیاه کتان (معنی‌دار در سطح اختمال ۵ درصد)

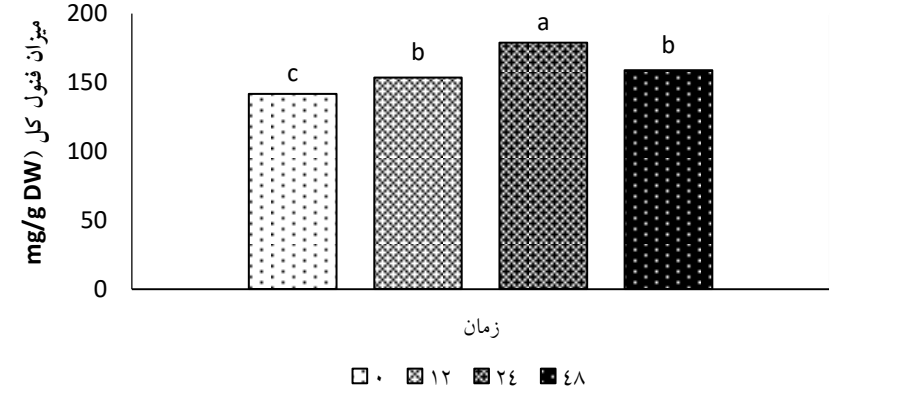


شکل ۳: تغییرات محتوای لیگنان کل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین در زمان‌های مختلف (معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد)



شکل ٤: تغییر محتوای فنول کل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین

(معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد)



شکل ٥: تغییر محتوای فنول کل در زمان‌های مختلف

(معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد)

References

1. Abdoli, M., Moieni, A. and Naghdi Badi, H. 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 35: 2075-2083.
2. Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M. and Başer, K.H.C. 2008. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry, 108: 942-949.
3. Amiri, S., Kazemitabaar, S., Ranjbar, G. and Azadbakht, M. 2010. The effect of trifluralin and colchicine treatments on morphological characteristics of jimsonweed (*Datura Stramonium* L.). Trakia Journal of Sciences, 8: 47-61.
4. Atichart, P. 2013. Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. Thai Journal of Agricultural Science, 46: 59-63.
5. Ayyobi, N., Hosseini, B. and Fattahi, M. 2017. Induction Effects of Colchicine and Chitosan on Rosmarinic Acid Production in Hairy Root Cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss). Journal of cellular and molecular researchers (Iranian journal of biology), 30(1): 1-13.
6. Bagheri, M. and Mansouri, H. 2015. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. Applied biochemistry and biotechnology, 175: 2366-2375.
7. Belabbassi, O., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., Benyammi, R., Khalfallah, N., Malik, S., Makhzoum, A. and Khelifi, L. 2016. Synergistic effects of polyploidization and elicitation on biomass and

hyoscyamine content in hairy roots of *Datura stramonium*. Biotechnol. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 20(3): 408-416.
8. Bernard, F., Moghbel, N. and Hassannejad, S. 2012. Treatment of licorice seeds with colchicine: changes in seedling DNA levels and anthocyanin and glycyrrhizic acid contents of derived callus cultures. Natural product communications, 7(11): 1457-1460.
9. Bhatnagar, A.S., Hemavathy, J. and Gopala Krishna, A.G. 2015. Development of a rapid method for determination of lignans content in sesame oil. Journal of Food Science and Technology, 52: 521-527.
10. Buggs, R.J., Chamala, S., Wu, W., Tate, J.A., Schnable, P.S., Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Barbazuk, W.B. 2012. Rapid, repeated, and clustered loss of duplicate genes in allopolyploid plant populations of independent origin. Current Biology, 22: 248-252.
11. Byrne, M.C., Nelson, C.J. and Randall, D.D. 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68: 891-893.
12. Caruso, I., Lepore, L., De Tommasi, N., Dal Piaz, F., Frusciante, L., Aversano, R., Garramone, R. and Carputo, D. 2011. Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. Chemistry & biodiversity, 8: 2226-2237.
13. Caruso , I., Dal Piaz, F., Malafronte, N., De Tommasi, N., Aversano, R., WulffZottele, C., Scarno, MT. and Carputo, D. 2013. Impact of Ploidy Change on Secondary Metabolites and Photochemical Efficiency in *Solanum bulbocastanum*. Natural prduct communications, 8 (10): 1387-1392.
14. Dehghan, E., Häkkinen, S.T., Oksman-Caldentey, K.-M. and Ahmadi, F.S. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 110: 35-44.
15. Dermen, H. 1940. Colchicine polyploidy and technique. The botanical review, 6: 599-635.
16. Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 104: 359-373.
17. El-Nashar, Y.I. and Ammar, M. 2016. Mutagenic influences of colchicine on phenological and molecular diversity of *Calendula officinalis* L. Genetics and molecular research: 15(2): 1-15.
18. Hu, C., Yuan, Y.V. and Kitts, D.D. 2007. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. Food and chemical toxicology, 45: 2219-2227.
19. Javadian, N., Karimzadeh, G., Sharifi, M., Moieni, A. and Behmanesh, M. 2017. In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae). Planta, 24: 1165-1178.
20. Jones, J.R., Ranney, T.G. and Eaker, T.A. 2008. A novel method for inducing polyploidy in Rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society, 62: 130-135.
21. Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. and He, X. 2014. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. Journal of Pharmacy and Pharmacolology, 2: 377-392.
22. Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N. and Prathanturarug, S. 2011. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107 (2): 187-194.
23. Kharde, A., Chavan, N., Chandre, M., Autade, R. and Khetmalas, M. 2017. In vitro enhancement of bacoside in brahmi (*Bacopa monnieri*) using colchicine. Journal of plant biochemistry and physiology, 5: 1-6.

24. Kumar Yadav, A., Singh, S., Yadav, S,C., Dhyani, D., Bhardwaj, G., Sharma, A. and Singh B. 2013. Induction and morpho-chemical characterization of *Stevia rebaudiana* colchiploids. Indian Journal of Agricultural Sciences, 83 (2): 159-165.
25. Lin, X., Zhou, Y., Zhang, J., Lu, X., Zhang, F., Shen, Q., Wu, S., Chen, Y ,. Wang, T. and Tang, K. 2011. Enhancement of artemisinin content in tetraploid *Artemisia annua* plants by modulating the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. Biotechnology and applied biochemistry, 58: 50-57.
26. Liu, Z. and Gao, S. 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 43: 404-408.
27. Martínez, M.E., Poirrier, P., Prüfer, D., Schulze, C., Jorquera, L., Ferrer, P., Díaz, K. and Chamy, R. 2018. Kinetics and modeling of cell growth for potential anthocyanin induction in cultures of *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers (Dandelion) in vitro. Electronic Journal of Biotechnology, 36: 15-23.
28. Parsons, J.L., Martin, S.L., James, T., Golenia, G., Boudko, E.A. and Hepworth, S.R. 2019. Polyploidization for the genetic improvement of *Cannabis sativa*. Frontiers in Plant Science, 10(476): 1-12.
29. Randall, D.D., Nelson, C.J. and Asay, K.H. 1977. Ribulose bisphosphate carboxylase: altered genetic expression intall fescue. Plant Physiology, 59: 38-41.
30. Sadat Noori, S.A., Norouzi, M., Karimzadeh, G., Shirkool, K. and Niazian, M. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 130: 543-551.
31. Salaj, J., Petrovská, B., Obert, B. and Pret'ová, A. 2005. Histological study of embryo-like structures initiated from hypocotyl segments of flax (*Linum usitatissimum* L.). Plant cell reports, 24: 590-595.
32. Tsuro, M., Kondo, N., Noda, M., Ota, K., Nakao, Y. and Asada, S. 2016. In vitro induction of autotetraploid of Roman chamomile (*Chamaemelum nobile* L.) by colchicine treatment and essential oil productivity of its capitulum. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52: 479-483.
33. Vijayalakshmi, A. and Anju, S. 2011. Effect of colchicine on cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.]. Asian Journal of Environmental Science, 6: 171-174.

(Short Paper)

Study on the effect of different concentrations of colchicine on the secondary metabolites production in *Linum usitatissimum*calli (Flax)

Khademian, R.[1], Karimzadeh, F.[2*], Sedaghati, B.[3]

[1]Assistant Professor, Department of Genetic and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

[2]M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

[3]Ph.D. student., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Received: 2019-5-15 ; Accepted: 2019-7-16

Abstract

In this factorial study in a completely randomized design, the effect of different concentrations of colchicine (0, 15, 30, 45 and 60 mg/L) and different time intervals (12, 24 and 48 hours) on the amount of phenol and lignan production was investigated in the callus tissue of *Linum usitatissimum* L. For callus induction, cotyledon explants were cultured on solid MS medium supplemented with 2 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP) and 1 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid (NAA).The total phenolic and lignan contents were measured by spectrophotometric method based on the standard curves of gallic acid and sesamin at 765 and 288 nm, respectively. The highest amount of fresh and dry weight of callus was related to 45 mg/l colchicine treatment. Maximum and minimum levels of lignin in experimental periods were obtained from 15 mg/l (in average 28.4 mg SE/ g DW) and 30 mg/l (in average 19.75 mg SE/ g DW) colchicine, respectively. According to the results, the highest (164 mg GA/g) and lowest (145.6 mg GA/g) levels of total phenol content were observed in 60 and 30 mg/l colchicine treatments, respectively. The results indicated that the production of valuable secondary metabolites such as phenol and lignan in flax callus were increased under some colchicine treatments.

Keywords: Callus culture, Colchicine, Flax, Lignan, Phenolic compounds

*Correspond author; karimzadeh91@yahoo.com