

تغییرات القایی سطح پلوئیدی بر تولید لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها در کشت کالوس گیاه دارویی کتان سفید (*Linum album* Boiss.)

سیده زینب رضوی کشمیری^۱، ندا جوادیان^۲، محسن شریفی^{۳*} و قاسم کریم‌زاده^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- دانش‌آموخته دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، پست‌الکترونیک: msharifi@modares.ac.ir

۴- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۵

چکیده

اتوپلی‌پلوئیدی القایی به عنوان روشی مؤثر در افزایش تولید برخی متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی در نظر گرفته می‌شود. کتان سفید یک گیاه دارویی ارزشمند و سرشار از برخی ترکیبات لیگنان با خاصیت ضدویروسی و ضدسرطانی مانند بودوفیلوتوکسین است. در این تحقیق، اثر القاء اتوتتراپلوئیدی بر تولید برخی لیگنان‌ها، فنولیک اسیدها و فلاونوئیدهای مشتق شده از مسیر فنیل-پروپانویید، در کشت کالوس کتان سفید بررسی شد. کالوس‌های تتراپلوئید از برگ کتان سفید اتوتتراپلوئید القایی به‌دست آمد و پایداری پلوئیدی آن بعد از چندین بار زیرکشت به وسیله فلوسایتومتری تأیید شد. دو برابر شدن کروموزومی یا تتراپلوئیدی باعث افزایش معنی‌دار تولید لیگنان (پینورسینول)، فولیک اسیدها (کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید) و فلاونوئیدها (میریستین، نارینجین و کاتچین) اندازه‌گیری شده در کشت کالوس شد، در حالی که روی تولید سایر لیگنان‌ها (لاریسی‌رسینول و بودوفیلوتوکسین) اثر قابل توجهی نداشت. این نتایج نشان داد که دو برابر شدن سطح پلوئیدی می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانوی در کالوس کتان سفید استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بودوفیلوتوکسین، ترکیبات فنولی، سطح پلوئیدی، فلوسایتومتری، کتان سفید

مقدمه

فنیل‌پروپانوییدها ترکیبات فنلی کوچکی هستند که از مسیر بیوسنتزی پیچیده و بزرگ فنیل‌پروپانویید، مشتق می‌شوند. این ترکیبات نه تنها در طعم، رنگ، عطر، پایداری اکسیداتیو و تلخی قسمت‌های مختلف گیاه سهیم هستند، بلکه نقش مهمی در دفاع شیمیایی گیاه ایفا می‌کنند. مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوییدی نیز یک مسیر متابولیسمی مهم است و در بیوسنتز طیف وسیعی از متابولیت‌های

ثانویه گیاه از جمله فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها و لیگنان‌ها نقش دارد (Singh et al., 2021). فلاونوئیدها گروه بزرگی از تولیدات طبیعی است که در همه گیاهان عالی یافت می‌شوند. این ترکیبات فنلی دارای بسیاری از فعالیت‌های زیستی هستند و در تغذیه و کاربردهای دارویی استفاده می‌شوند. همچنین بسیاری از گیاهان، فنولیک اسیدها را تولید می‌کنند که اثرهای مختلفی مانند ضدالتهاب، ضداکسیداتیو و ضدویروس دارند (Wawrosch &

شود که در نتیجه منجر به تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی برتر نسبت به دیپلوئید آنها می‌شود (Osborn et al., 2003). در گیاهان دارویی، اتوپلی‌پلوئیدی مصنوعی معمولاً با ارزش است، زیرا افزایش زیست‌توده و غلظت ترکیبات مؤثر را ایجاد می‌کند (Dhooghe et al., 2011; Hosseini & Javanbakht, 2016). در اثر القا اتوتتراپلوئیدی در گیاهان دارویی برخی متابولیت‌های ثانوی با خاصیت دارویی مانند تری‌ترینوئیدهای ۵ حلقه‌ای، تیموکینون، تیمول، آرتیمیزینین و کاروتنوئید به‌ترتیب در گیاهان *Thymus*، *Trachyspermum ammi*، *Nigella sativa*، *persicus*، *Artemisia annua* و *Plantago arenaria* افزایش یافتند (Tavan et al., 2015; Dixit et al., 2015; Sadat Noori et al., 2018; Sabzehzari et al., 2019). در تحقیقی، گیاه اتوتتراپلوئید القایی کتان سفید به وسیله تیمار درون شیشه‌ای جوانه جانبی ساقه با کلشی‌سین تولید شد و مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Javadian et al., 2017). در این تحقیق، کالوس تتراپلوئید از برگ گیاه اتوتتراپلوئید کتان سفید با هدف افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در کشت کالوس این گیاه القاء شد. مقادیر برخی لیگنان‌های تولید شده در مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین (پینورسینول و لاریسی‌رسینول) و مقادیر برخی متابولیت‌های ثانوی که مسیر بیوسنتزی مشترکی با لیگنان‌ها دارند (انواع فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک)، بررسی شدند تا تأثیر دو برابر شدن دُز ژنی روی تولید متابولیت‌های ثانوی مطالعه‌شده، مشخص شود.

مواد و روش‌ها

القای تولید کالوس

گیاه تتراپلوئید القایی و دیپلوئید کتان سفید از مواد گیاهی حاصل از تحقیق Javadian و همکاران (۲۰۱۷) به دست آمد. برای القای کالوس، از برگ‌های گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید کشت‌شده در شرایط درون شیشه استفاده شد، زیرا مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ‌ها بیشتر از ساقه‌هاست. کالوس‌ها در

(Zotchev, 2021). براساس مطالعات، لیگنان‌ها در طیف وسیعی از گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیبات، تنوع وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند ضدسرطان، ضدویروس، ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان را دارند (Cui et al., 2020). پودوفیلوتوکسین از جمله مهمترین ترکیبات لیگنانی است که امروزه به عنوان ماده اولیه برای تولید برخی داروهای ضدسرطانی مانند Etopophos، Etoposide و Teniposide استفاده می‌شود (Shah et al., 2021).

کتان سفید (*Linum album* Boiss.) گیاهی از تیره کتان (Linaceae)، دیپلوئید ($2n=2x=26$)، چندساله، علفی، ساقه در قاعده سفید رنگ و در بالا سبز مات، برگ‌های متناوب به شکل قاشقی تا سرنیزه‌ای و دارای گل‌های سفید رنگ می‌باشد. این گیاه انحصاری ایران است و پراکندگی آن در شمال‌غرب، غرب و مرکز می‌باشد (Hemmati, 2007; Javadian et al., 2017; Lu et al., 2021).

در حال حاضر، پودوفیلوتوکسین از دو گونه سرده *Podophyllum*، *P. hexandrum* Royle و *P. peltatum* که در معرض انقراض هستند به‌دست می‌آید. با توجه به اینکه سنتز شیمیایی پودوفیلوتوکسین مقرون به صرفه نیست، تولید آن از طریق کشت سلول و اندام گونه‌های سرده *Linum* راه جایگزین و سودمندی است. در بین گونه‌های *Linum*، دو گونه *L. album* و *L. persicum* Boiss. مقدار بیشتری پودوفیلوتوکسین تولید می‌کنند (Mikac et al., 2021). سایر گونه‌های این سرده عمدتاً لیگنان‌هایی مانند جاستیسیدین B، ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین، متایرسینول و β -پلتاتین تولید می‌نمایند (Lalaleo et al., 2018). برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید از راهکارهای مختلف از جمله بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت، اعمال ایستتورها و پیش‌ماده‌ها استفاده شده است (Smolny et al., 1998; Van Fürden et al., 2005; Yousefzadi et al., 2012; Tahsili et al., 2014).

دو برابر شدن کروموزوم‌های میتوزی می‌تواند منجر به افزایش تحمل خشکی، آپومیکسی (تولید دانه غیرجنسی)، مقاومت به آفات، زمان گلدهی، اندازه اندام و زیست‌توده

محیط کشت القاء کالوس منتقل شد. سلول‌ها پس از چهار هفته رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی برداشت و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. میزان رشد سلولی براساس وزن تر سلول‌ها برحسب گرم تعیین شد.

استخراج و سنجش لیگنان‌ها

برای استخراج لیگنان‌ها، ابتدا ۲ گرم از بافت تر کالوس در ۴ میلی‌گرم بر لیتر متانول ۸۰ درصد به طور کامل ساییده شد و به مدت ۱ ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ۴ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و کاملاً مخلوط گردید و سانتریفوژ (سرعت ۷۵۰۰ (g)، به مدت ۲۰ دقیقه) شد. بخش زیرین حاوی لیگنان‌ها در دی‌کلرومتان، جمع‌آوری و کاملاً خشک گردید. رسوب خشک‌شده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. سپس نمونه‌ها برای سنجش میزان لیگنان‌ها به دستگاه HPLC تزریق گردید. بخش متحرک دستگاه شامل استونیتریل و آب بود و از سیستم شیب غلظت طبق روش Yousefzadi و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. حضور هر یک از لیگنان‌ها عبارت است از: پینورسینول، لاریسی-رسینول و پودوفیلوتوکسین به کمک کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی قبلاً تأیید شدند (Ahmadian Chashmi et al., 2013). مقدار لیگنان‌ها براساس سطح زیر منحنی حاصل از کروماتوگراف HPLC با استفاده از منحنی استاندارد هر یک از آنها محاسبه شد.

تعیین مقدار فلاونوئیدها

برای استخراج فلاونوئیدها، ابتدا حلالی حاوی ۴۰ درصد متانول و ۰/۵ درصد استیک اسید تهیه شد. به ۱ گرم بافت تر کالوس، ۴ میلی‌لیتر از حلال مذکور اضافه و خوب ساییده شد تا به صورت همگن درآید. مخلوط حاصل به مدت یک شب در شیکر با چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و بعد سانتریفوژ (سرعت ۱۳۵۰۰ (g)، به مدت ۱۰ دقیقه) گردید. محلول رویی حاوی فلاونوئیدها جدا شده و دوباره سانتریفوژ گردید و برای سنجش میزان فلاونوئیدها به

محیط کشت (MS) Murashige و Skoog (۱۹۶۲) پایه، حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید، ۰/۴ میلی-گرم در لیتر کینتین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱ درصد آگار (وزنی/حجمی) (Yousefzadi et al., 2010)، بعد از سه تا چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی القاء شدند. کالوس‌های القایی در محیط جامد مذکور برای رسیدن به رشد مناسب، تا چندین ماه هر چهار هفته یکبار بازکشت شدند.

تأیید سطح پلوئیدی

سطوح پلوئیدی کالوس تتراپلوئید و دیپلوئید کتان سفید به وسیله فلوسایتومتری با استفاده از روش Loureiro و همکاران (۲۰۰۷) تأیید شدند. ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج هسته سلول Woody Buffer Plant (WBP) به ۰/۵ گرم کالوس کتان سفید و ۱ سانتی‌متر مربع از برگ گیاه گوجه-فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، با مقدار ژنومی پیکوگرم $2C DNA = 1/96$ به عنوان گیاه مرجع استاندارد اضافه شد و به وسیله یک تیغ تیز نمونه‌ها خرد گردیدند. سوسپانسیون هسته‌های آزاد شده از فیلتر نایلونی ۳۰ میکرومتر عبور داده شدند. به سوسپانسیون هسته‌ها ۵۰ میکرولیتر RNase با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای حذف RNA و بعد حجم مساوی از پروپیدوم یدید با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای رنگ‌آمیزی اضافه شد. نمونه آماده شده به وسیله دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCanto TM) تحلیل و نتایج به دست آمده با نرم‌افزار FloMax تجزیه و تحلیل شد. پیک‌ها دارای ضریب تغییرات کمتر از ۵ درصد بودند. مقدار $2C DNA$ هسته کتان سفید با توجه به فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Sample } 2C DNA (\text{pg}) = (\text{Sample G1 peak mean} / \text{Standard G1 peak mean}) \times \text{Standard } 2C DNA (\text{pg})$$

مقدار $C DNA =$ مقدار DNA در هسته سلول هاپلوئید (Doležel & Bartoš, 2005; Zare Teymoori et al., 2021)

اندازه‌گیری رشد سلولی

یک گرم از کالوس‌های دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید به

زیرین جمع‌آوری و توسط هوادهی خشک شد. به رسوب خشک‌شده حاصل ۵۰۰ میکرولیتر متانول مخصوص HPLC اضافه و سانتریفوژ (سرعت ۱۳۵۰۰ g)، به مدت ۱۰ دقیقه) شد. محلول بدست آمده برای سنجش فنولیک اسیدها به دستگاه HPLC تزریق شد. بخش متحرک دستگاه شامل متانول، آب اسیدی (حاوی ۲ درصد استیک اسید) بود و از سیستم شیب غلظت طبق روش Owen و همکاران (۲۰۰۳) استفاده گردید. مقدار هر یک از فنولیک اسیدها عبارت است از: کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید براساس سطح زیر منحنی حاصل از کروماتوگراف HPLC با استفاده از منحنی استاندارد هر یک از آنها محاسبه گردید.

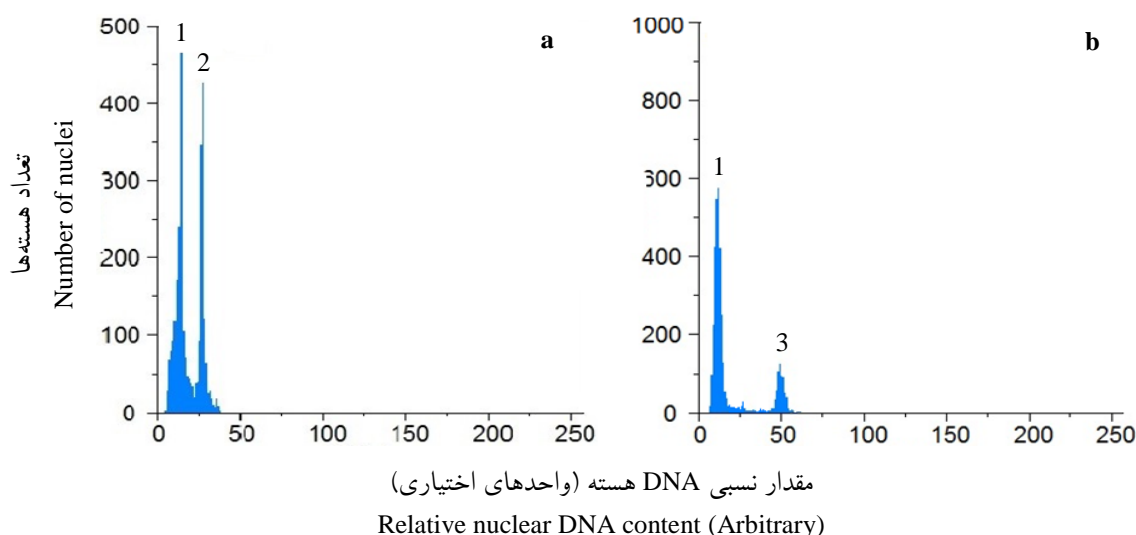
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل انجام شد. تحلیل داده‌ها براساس Student's *t*-test در دو سطح معنی‌دار ۵ و ۱ درصد به وسیله نرم‌افزار Minitab 16 انجام شد.

دستگاه HPLC تزریق شد. بخش متحرک دستگاه شامل استونیتریل، آب و ارتوفسفریک اسید (۰/۰۱ درصد) بود و از سیستم شیب غلظت طبق روش Tomczyk و Gudej (۲۰۰۴) استفاده گردید. مقدار هر یک از فلاونوئیدها عبارت است از: نارینجین، کاتچین و میریستین براساس سطح زیر منحنی حاصل از کروماتوگراف HPLC با استفاده از منحنی استاندارد هر یک از آنها محاسبه شد.

تعیین مقدار فنولیک اسیدها

برای سنجش فنولیک اسیدها، ابتدا ۱ گرم بافت تر کالوس با ۴ میلی‌لیتر متانول به طور کامل ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. پس از آن، به مدت ۳ ساعت در شیکر قرار داده شد. سپس محلول رویی از کاغذ صافی عبور داده شد و خشک گردید. به رسوب خشک‌شده، ۴ میلی‌لیتر استونیتریل و ۳ میلی‌لیتر *n*-هگزان افزوده و به خوبی مخلوط شدند. فاز



شکل ۱- آنالیز فلوسایتومتری اندازه ژنوم از هسته سلول‌های کالوس دیپلوئید (a) و تتراپلوئید (b) کتان سفید پیک شماره ۱: هسته‌های G₁ استاندارد (گوجه‌فرنگی)، پیک شماره ۲: هسته‌های G₁ کالوس دیپلوئید کتان سفید، پیک شماره ۳: هسته‌های G₁ کالوس تتراپلوئید کتان سفید

Figure 1- Flow cytometric analysis of callus cell nuclei of diploid (a) and tetraploid (b) *Linum album*. The peaks refer to 1: G₁ nuclei of the internal standard (*Solanum lycopersicum*), 2: G₁ nuclei of the diploid callus (*L. album*), and 3: G₁ nuclei of tetraploid callus (*L. album*)

نتایج

تأیید پایداری پلوئیدی به وسیله فلوسایتومتری

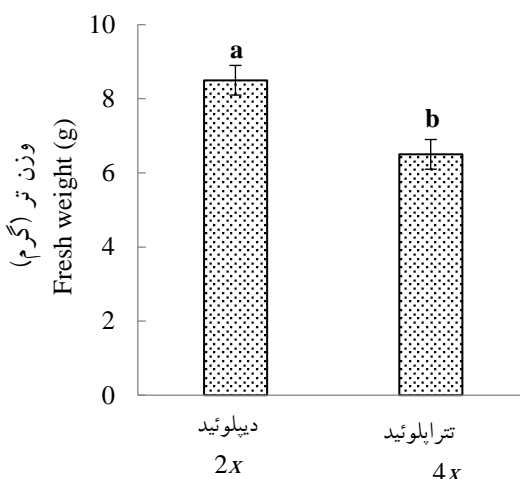
در نمودارهای حاصل از فلوسایتومتری کالوس‌های دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید به ترتیب یک‌هایی در اطراف کانال‌های ۲۵ و ۵۰ در محور شدت نسبی فلورسانس مشاهده شد، همچنین پیک گیاه استاندارد پیرامون کانال ۱۳ مشاهده گردید (شکل ۱).

هیستوگرام‌های مربوط به این تحلیل نشان داد که نسبت موقعیت پیک G_1 کالوس تتراپلوئید به پیک G_1 نمونه استاندارد (گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) تقریباً دو برابر نسبت موقعیت پیک G_1 کالوس دیپلوئید به پیک G_1 نمونه استاندارد است که نشان‌دهنده دو برابر بودن تعداد کروموزوم‌ها در کالوس تتراپلوئید نسبت به

دیپلوئید می‌باشد. مقدار DNA ۲C برای کالوس کتان سفید دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب برابر با ۳/۷۵ و ۷/۷۵ پیکوگرم محاسبه شد. این نتایج تأییدکننده پایداری سطح پلوئیدی کالوس‌ها بعد از چندین زیرکشت است.

اثر تتراپلوئیدی بر روی رشد سلولی

نتایج بررسی میزان رشد کالوس‌های دیپلوئید و تتراپلوئید (تأیید شده پس از فلوسایتومتری) در محیط کشت کالوس پس از چهار هفته در شکل ۲ نشان داده شده است. وزن کالوس در دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب ۸/۵ و ۶/۵ گرم بود، این اختلاف وزن کالوس‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.



شکل ۲- اثر سطح پلوئیدی بر تولید وزن تر کالوس‌های کتان سفید

حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است.

Figure 2- Effect of ploidy level on calli fresh weight production in *Linum album*. The different letters indicate significant differences at 0.05 probability level

دیپلوئید نشان ندادند (شکل ۳).

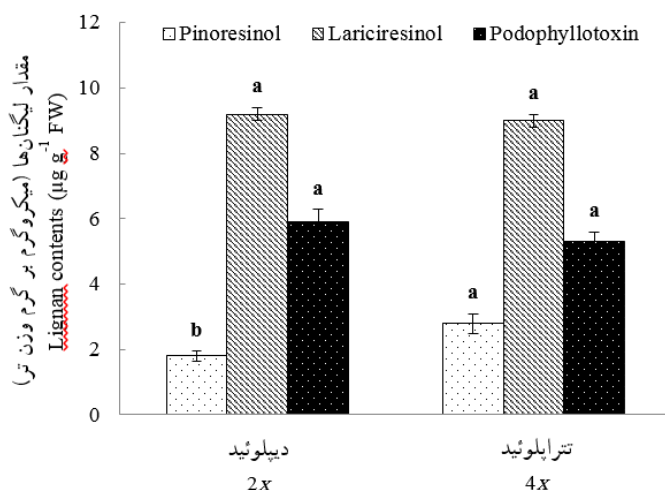
اثر تتراپلوئیدی بر مقدار لیگنان‌ها

بررسی مقدار برخی لیگنان‌های مورد بررسی در کالوس دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید نشان داد که مقدار پینورسینول ۱/۵ برابر در تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید بیشتر بود و این افزایش در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. در حالی که مقدار لاریسی‌رسینول و پودوفیلوتوکسین در کالوس تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری را نسبت به کالوس

اثر تتراپلوئیدی بر مقدار فنولیک اسیدها

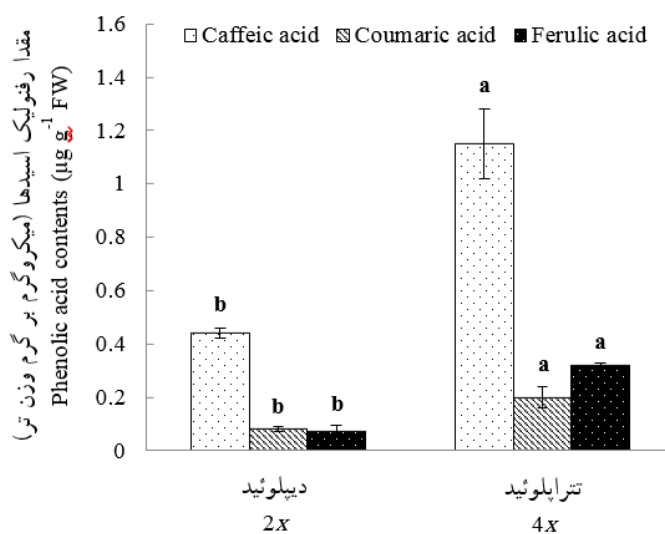
مقادیر برخی فنولیک اسیدها در کالوس‌های دیپلوئید و تتراپلوئید بررسی شدند. نتایج نشان داد که مقدار کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید بین دو سطح پلوئیدی کالوس‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

داشتند. مقدار کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید در کالوس تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به ترتیب افزایش



شکل ۳- اثر سطح پلوئیدی بر مقدار لیگنان‌ها (پینورسینول، لاریسی‌رسینول و پودوفیلوتوکسین) در کالوس‌های کتان سفید حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است.

Figure 3- Effect of ploidy level on lignan contents (pinoresinol, lariciresinol and podophyllotoxin) in *Linum album* calli. The different letters indicate significant differences at 0.05 probability level



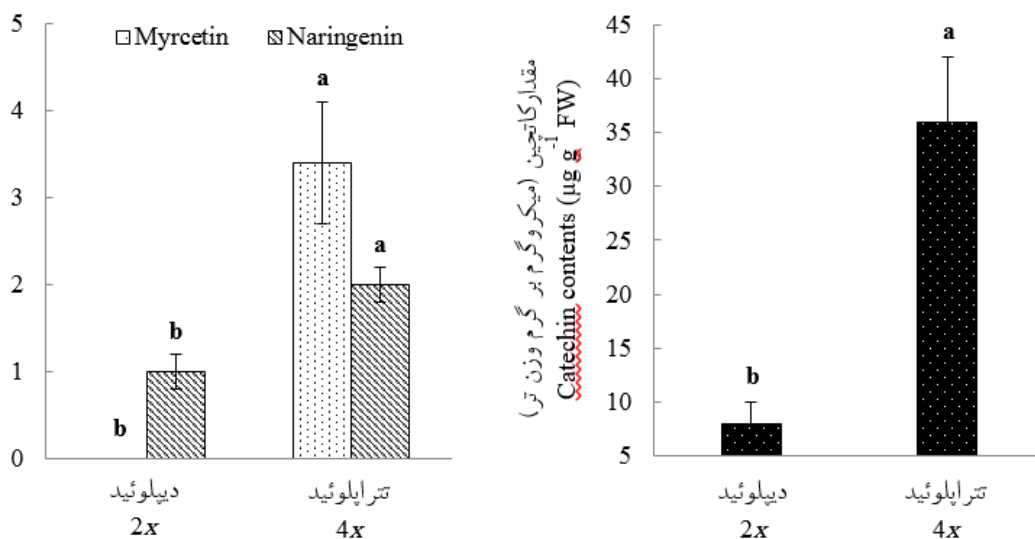
شکل ۴- اثر سطح پلوئیدی بر مقدار فنولیک اسیدها (کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید) در کالوس‌های کتان سفید حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است.

Figure 4- Effect of ploidy level on phenolic acid contents (caffeic acid, coumaric acid and ferulic acid) in *Linum album* calli. The different letters indicate significant differences at 0.05 probability level

سطح پلوئیدی به طور معنی داری بیشتر بود. مقدار میریستین، نارینجین و کاتچین در کالوس تتراپلوئید به ترتیب ۲، ۳/۴ و ۴/۵ برابر نسبت به کالوس دیپلوئید افزایش معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد داشتند (شکل ۵).

اثر تتراپلوئیدی بر مقدار فلاونوئیدها

نتایج بررسی مقدار برخی فلاونوئیدها در کالوس‌های دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید نشان داد که تولید کاتچین نسبت به میریستین و نارینجین در کالوس‌ها، صرف نظر از



شکل ۵- اثر سطح پلوئیدی بر مقدار فلاونوئیدها در کالوس‌های کتان سفید
حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ است.

Figure 5- Effect of ploidy level on flavonoid contents in *Linum album* calli. The different letters indicate significant differences at 0.05 probability level

نتایج بررسی تغییر مقدار برخی متابولیت‌های ثانوی در مسیر لیگناتی در اثر دو برابر شدن کروموزومی در کالوس-های کتان سفید نشان داد که مقدار پینورسینول در تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید افزایش معنی داری داشت، در حالی که تولید لاریسی‌رسینول و پودوفیلوتوکسین بین دو نوع کالوس با سطح پلوئیدی متفاوت، تغییرات معنی داری نداشت. همچنین در این تحقیق برخی ترکیبات مشتق شده از مسیر فنیل پروپانوئیدی نیز بررسی شدند. مقدار همه فولیک اسیدهای (کافئیک اسید، کوماریک اسید و فرولیک اسید) و فلاونوئیدها (میریستین، نارینجین و کاتچین) بررسی شده در کالوس تتراپلوئید به طور معنی داری بیشتر از کالوس دیپلوئید بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که دو برابر شدن دُز ژنی تأثیرات متفاوتی بر مقدار تولید متابولیت‌های ثانوی مشتق شده از مسیر فنیل پروپانوئید دارد. چندین تحقیق نشان داده

بحث

در این تحقیق، اثر القای اتوتتراپلوئیدی یا دو برابر شدن سطح پلوئیدی بر مقدار رشد سلولی کالوس کتان سفید نشان داد که رشد کالوس تتراپلوئید کمتر از کالوس دیپلوئید بود که می‌تواند در نتیجه کاهش سرعت تقسیم سلول‌های کالوس باشد. اتوتتراپلوئیدی معمولاً با افزایش اندازه اندام‌ها و سلول‌ها و کاهش تعداد سلول در گیاهان همراه است. هرچند این تغییرات وابسته به پلوئیدی یک رابطه خطی یا ثابتی در همه گونه‌های گیاهی نشان نمی‌دهد (Harun et al., 2021; Glazier, 2021). به‌طور کلی پلی‌پلوئیدها رشد آهسته‌تری در مقایسه با دیپلوئیدها دارند، زیرا کمی کردن مقادیر بیشتر DNA هسته در سلول بزرگتر به چرخه سلولی طولانی‌تری نیاز دارد و در نهایت نمو ارگانسیم کندتر است (Drunen & Husband, 2018).

است که القای تتراپلوئیدی بر تولید برخی متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی تأثیرات مختلفی دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Tsai و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که مقدار کافئیک اسید و کلروژنیک اسید به‌طور معنی‌داری در گیاه تتراپلوئید *Salvia officinalis* افزایش یافت، در حالی که از مقدار رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید A در گیاهان تتراپلوئید کاسته شد. در مطالعه دیگری، القای تتراپلوئیدی در گیاه *Satureja khuzistanica* باعث کاهش معنی‌دار مقدار کارواکرول و تیمول و افزایش معنی‌دار گاما-تریپنین شد. همچنین تأثیر غیرمعنی‌داری بر مقدار لینالول و جرمارکن D داشت (Shariat et al., 2021).

Chen و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که اختلاف معنی‌داری در مقدار سالویانولیک اسید B بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید *Salvia miltiorrhiza* وجود نداشت، اما غلظت دی‌هیدروتانشینون و کل تانشینون در گیاه تتراپلوئید بیشتر از گیاه دیپلوئید بود. نتایج مطالعه Xu و همکاران، (۲۰۱۴) روی تأثیر سطح پلوئیدی بر تولید متابولیت‌های ثانوی بارزش در گیاه *Echinacea purpurea* نشان داد که رقم تتراپلوئید محتویات بالاتری از مشتقات کافئیک اسید و آلکامید نسبت به گیاه دیپلوئید تولید کرد. همچنین آنالیز پروفایل آلکالوئیدها در گیاه اتوتتراپلوئید القایی *Papaver somniferum L* افزایش معنی‌دار مقدار مورفین را نشان داد (Mishra et al., 2010). البته دو برابر شدن کروموزومی، فعالیت آنزیمی را در هر واحد پروتئین افزایش می‌دهد، اما این لزوماً به معنای این نیست که این فعالیت دو برابر می‌شود، به‌نحوی که گاهی اوقات برخی از آنزیم‌ها به هیچ وجه تحت تأثیر این تغییر قرار نمی‌گیرند یا حتی سطح بیان کمتری دارند (Iannicelli et al., 2020). مطالعات مجموعه اتوپلی‌پلوئید مصنوعی از $1x$ تا $4x$ در سیب‌زمینی (*Solanum phureja*) نشان داد که اندازه سلول و ضخامت اندام با سطح پلوئیدی رابطه مثبت دارد اما فقط بیان در حدود ۱۰٪ از ژن‌های رابطه خطی با تغییرات پلوئیدی داشت (Lavania et al., 2012). همچنین تحلیل ترانسکریپتوم دو گیاه دارویی اتوتتراپلوئید مصنوعی *Isatis*

تغییرات القایی سطح پلوئیدی بر ...
 فقط *Artemisia annua* و *tinctoria* نشان داد که به‌ترتیب فقط ۲/۶۵ و ۸/۸۵ درصد از ژن‌ها، بیان متمایزی در تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید داشتند (Zhou et al., 2015; Xia et al., 2018). اگرچه سازوکارهای مولکولی تفاوت بیان ژن‌ها در اتوپلی‌پلوئیدها هنوز به خوبی شناسایی نشده است، اما این تغییرات ممکن است به دلیل دُز آلی، تغییرات در شبکه‌های تنظیمی، بازآرایی کروموزومی، تغییرات سریع اپی‌ژنتیکی و از بین رفتن ژن‌های دوبرابر شده باشد (Osborn et al., 2003; Iannicelli et al., 2020) که در نتیجه بر رونویسی و متابولیسم تأثیر می‌گذارد و در نهایت منجر به تغییرات فنوتیپی جدید می‌شود (Tsai et al., 2021).

در این مطالعه با وجود کاهش وزن کل کالوس کتان سفید تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید تولید شده، مقدار همه متابولیت‌های ثانوی اندازه‌گیری شده به غیر از لاریسی-رسینول و پودوفیلوتوکسین در کالوس تتراپلوئید بیشتر از کالوس دیپلوئید بود. به‌طور کلی نتایج این تحقیق تأیید می‌کند که اتوتتراپلوئیدی القایی می‌تواند یک روش عملی برای افزایش برخی از متابولیت‌های ثانوی در مسیر فنیل پروپانویدها در کالوس کتان سفید باشد. در تحقیقات بعدی، تأثیر ایسیتورها و پیش‌ماده‌ها، به عنوان روش‌های افزایش متابولیت ثانوی در گیاه، بر کالوس تتراپلوئید کتان سفید ممکن است باعث افزایش بیشتر متابولیت‌های ثانوی در مسیر فنیل پروپانویدها شود.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشگاه تربیت مدرس بدلیل حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Rezadoost, H., Cardillo, A. and Palazon, J., 2013. Analysis of 6-methoxy podophyllotoxin and podophyllotoxin in hairy root cultures of *Linum album* Kotschy ex Boiss. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2): 745-752.
- Cui, Q., Du, R., Liu, M. and Rong, L., 2020. Lignans

- biotechnological systems of *Linum album*. Journal of Plant Physiology, 228: 197–207.
- Lavania, U.C., Srivastava, S., Lavania, S., Basu, S., Misra, N.K. and Mukai, Y., 2012. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. The Plant Journal, 71(4): 539-549.
 - Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J. and Santos, C., 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. Annals of Botany, 100(4): 875-888.
 - Lu, Z., Hou, M., Xu, R. and Zhang, X., 2021. Advances in research on metabolic pathways of podophyllotoxin in plants of Berberaceae. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 657(1): 012044.
 - Mikac, S., Markulin, L., Drouet, S., Corbin, C., Tungmunnithum, D., Kiani, R., Kabra, A., Abbasi, B.H., Renouard, S., Bhambra, A. and Lainé, E., 2021. Bioproduction of anticancer podophyllotoxin and related aryltetralin-lignans in hairy root cultures of *Linum flavum* L. In: Ramawat KG, Ekiert HM, Goyal S (eds) Plant cell and tissue differentiation and secondary metabolites: fundamentals and applications. Springer Nature Switzerland, pp 503-540.
 - Mishra, B. K., Pathak, S., Sharma, A., Trivedi, P. K. and Shukla, S., 2010. Modulated gene expression in newly synthesized autotetraploid of *Papaver somniferum* L. South African Journal of Botany, 76(3): 447-452.
 - Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
 - Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V. and Martienssen, R. A., 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics, 19(3): 141-147.
 - Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B. and Bartsch, H., 2003. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chemical Toxicology, 41(5): 703-717.
 - Sabzehzari, M., Hoveidamaneh, S., Modarresi, M. and Mohammadi, V., 2019. Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 139(1): 131-137.
 - Sadat Noori, S.A., Norouzi, M., Karimzadeh, G., and their derivatives from plants as antivirals. Molecules, 25(1): 1–17.
 - Chen, E. G., Tsai, K. L., Chung, H. H. and Chen, J. T., 2018. Chromosome doubling-enhanced biomass and dihydrotanshinone I production in *Salvia miltiorrhiza*, a traditional Chinese medicinal plant. Molecules, 23(12): 3106.
 - Dixit, V., Verma, S. and Chaudhary, B. R., 2015. Changes in ploidy and its effect on thymoquinone concentrations in *Nigella sativa* L. Seeds. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 90(5): 537-542.
 - Doležel, J. and Bratoš, J., 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of botany, 95(1): 99-110.
 - Glazier, D. S., 2021. Genome Size Covaries More Positively with Propagule Size than Adult Size : New Insights into an Old Problem. Biology, 10(4): 270.
 - Gudej, J. and Tomczyk, M., 2004. Determination of Flavonoids, Tannins and Ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. Archives of Pharmacal Research, 27(11): 1114-1119.
 - Harun, A., Cai, B., Yang, Z., Yang, Q., Ge, X. and Li, Z., 2021. Scientia Horticulturae Asymmetrical effects of autopolyploidization on organ size and gene expression in *Brassica rapa* and *B. oleracea*. Scientia Horticulturae, 282: 109991.
 - Hemmati, S., 2007. Biosynthesis of lignans in plant species of the section *Linum*: pinoresinol-lariciresinol reductase and justicidin B 7-hydroxylase. Ph.D. Dissertation, Faculty of Mathematics and Natural Sciences ,University of Heinrich-Heine, Düsseldorf, 135 p.
 - Hosseini, B. and Javanbakht, S., 2017. Effects of in vitro polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of *Salvia leiriifolia* Benth. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 25(1): 24-42 (In Persian).
 - Iannicelli, J., Guariniello, J., Tossi, V. E., Regalado, J. J., Di Ciaccio, L., Van Baren, C. M., Álvarez, S. P. and Escandón, A. S., 2020. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae, 260: 108854.
 - 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, 245(6): 1165–1178.
 - Lalaleo, L., Alcazar, R., Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R. M. and Bonfill, M., 2018. Comparing aryltetralin lignan accumulation patterns in four

- 105(10): 1–13.
- Van Fürden, 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 Reports*, 24(5): 312-317.
 - Wawrosch, C. and Zotchev, S. B., 2021. Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18): 6649–6668.
 - Xia, J., Ma, Y. J., Wang, Y. and Wang, J. W., 2018. Deciphering transcriptome profiles of tetraploid *Artemisia annua* plants with high artemisinin content. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130: 112–126.
 - Xu, C.G., Tang, T.X., Chen, R., Liang, C.H., Liu, X.Y., Wu, C.L., Yang, Y.S., Yang, D.P. and Wu, H., 2014. A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116(3): 323-332.
 - Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Ghasempour, A., Moyano, E. and Palazon, J., 2012. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56: 41–46.
 - Yousefzadi, M., Sharifi, M., Chashmi, N. A., Behmanesh, M. and Ghasempour, A., 2010. Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures. *Pharmaceutical Biology*, 48(12): 1421–1425.
 - Zare Teymoori, S., Karimzadeh, G. and Shariat, A., 2021. Chromosomal and genome size diversity in savory (*Satureja* spp.) medicinal plant. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 29(2): 236- 250. (In Persian).
 - Zhou, Y., Kang, L., Liao, S., Pan, Q., Ge, X. and Li, Z., 2015. Transcriptomic analysis reveals differential gene expressions for cell growth and functional secondary metabolites in induced autotetraploid of Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.). *PLoS One*, 10(3): e0116392.
 - Shirkoool, 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*, 130(3): 543-551.
 - Shah, Z., Gohar, U.F., Jamsheed, I., Mushtaq, A., Mukhtar, H., Zia-UI-Haq, M., Toma, S.I., Manea, R., Moga, M. and Popovici, B., 2021. Podophyllotoxin : history , recent advances and future prospects. *Biomolecules*, 11(3): 603.
 - Shariat, A. and Sefidkon, F., 2021. Tetraploid induction in savory (*Satureja khuzistanica*): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 146(1): 137-148.
 - Singh, S., Kaur, I. and Kariyat, R., 2021. The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3): 1–19.
 - Smollny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shahsavari, A., Petersen, M. and Alfermann, A.W., 1998. Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry*, 48(6): 975-979.
 - Tahsili, J., Sharifi, M., Safaie, N., Esmaeilzadeh-Bahabadi, S. and Behmanesh, M., 2014. Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Interactions*, 9(1): 412–417.
 - Tavan, M., Mirjalili, M. H. and Karimzadeh, G., 2015. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3): 573–583.
 - Tsai, Y. T., Chen, P. Y. and To, K. Y., 2021. Induction of polyploidy and metabolic profiling in the medicinal herb *Wedelia chinensis*. *Plants*, 10(6): 1232.
 - Van Drunen, W. E. and Husband, B. C., 2018. Whole genome duplication decreases clonal stolon production and genet size in the wild strawberry *Fragaria vesca*. *American Journal of Botany*,

Ploidy level-induced changes in production of lignans, flavonoids, and phenolic acids in callus culture of *Linum album* Boiss.

Z. A. Razavi Keshmiri¹, N. Javadian², M. Sharifi^{3*}, G. Karimzadeh⁴

1- M.Sc. graduated, Dept. Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

2- Ph.D. graduated, Dept. Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

3*- Corresponding author, Prof., Dept. Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran, Email: msharifi@modares.ac.ir

4- Prof., Dept. Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

Received: 15.04.2022

Accepted: 06.07.2022

Abstract

Induced autopolyploidy is noticed as an effective method for increasing the production of some secondary metabolites in medicinal plants. *Linum album* is a valuable medicinal plant which is rich in some lignan compounds with antiviral and anticancer properties such as, podophyllotoxin. In this study, the effect of autotetraploid induction on the production of some lignans, phenolic acids, and flavonoids derived from the phenylpropanoid pathway was investigated through *L. album* callus culture. Tetraploid calli were obtained from the leaves of the induced autotetraploid *L. album*, and its ploidy stability was confirmed using flow cytometry after several subcultures. Chromosome doubling or tetraploidy caused a significant increase in the production of lignan (pinoresinol), folic acids (caffeic acid, coumaric acid, and ferulic acid) and flavonoids (myricetin, naringenin, and catechin) measured in the callus culture, while it had no significant effect on the production of other lignans (larisiresinol and podophyllotoxin). It was concluded that autotetraploid induction could be an effective method to increasing the production of some secondary metabolites in *L. album* callus.

Keywords: Podophyllotoxin, phenolic compounds, ploidy level, flow cytometry, *Linum album*