مقاله مروری

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره۲، تابستان ۱۳۹۲، ۱۲۸-۱۱۹

افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی

صدیقه اسمعیل زاده بهابادی .Ph.D [۱*]، مظفر شریفی .Ph.D [۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: shirin_esm@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۱

چکیده

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به‌نام متابولیت‌های ثانوی را تولید می‌کنند که توسط انسان به‌عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌هاست، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است. با توجه به اینکه بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانوی مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا متابولیت‌های ثانوی گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولا پیچیده و پرهزینه می‌باشد. بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست فناوری از جمله کشت سلولی گیاه، راه جایگزین سودمندی است. دست ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از الیسیتورهای زیستی یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانوی و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. الیسیتورهای زیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی و پاسخ های فوق حساسیتی می‌شوند. تشخیص مولکولی و برهمکنش بین الیسیتور و گیرنده‌های گیاه فرایند پیچیده ای است که برای انتقال پیام الیسیتور ضروری است. به‌دنبال درک الیسیتور پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول گیاهی نظیر افزایش جریانات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر (ROS)، فعال سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و سنتز فیتوآلکسینها اتفاق می‌افتد. در این مطالعه جنبه های مختلف امکان افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان با استفاده از الیسیتورهای زیستی مورد بررسی قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: الیسیتور زیستی، کشت سلول، متابولیت ثانوی

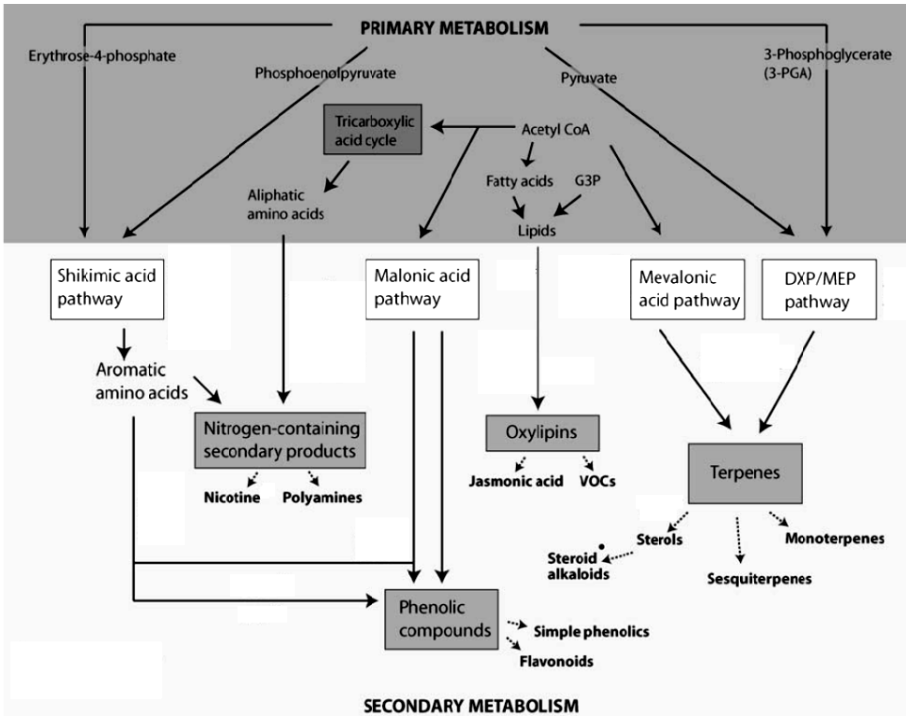
مقدمه

گیاهان منبع بسیاری از مواد شیمیایی هستند که به‌عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانوی گیاهی جز گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی می‌باشند. شناخت گیاهان دارویی و استفاده از آن‌ها از قدیم مورد توجه محققین کشور ما قرار گرفته است. شناسایی و بررسی ترکیبات شیمیایی آن‌ها، نه تنها به درمان آسان تر و ارزان تر بیماری‌ها کمک می نماید، بلکه از خارج شدن بخشی از ثروت کشور نیز برای وارد ساختن این گونه کالاها یا فرآورده‌های آن‌ها، جلوگیری به عمل می‌آید.

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانوی را تولید می‌کنند که پراکنش محدودی در سلسله گیاهان دارند و میزان آن‌ها اغلب کم (کمتر از یک درصد وزن خشک) می‌باشد. این ترکیبات معمولا دارای وزن مولکولی پایینی (کمتر از ۱۵۰ کیلودالتون) هستند و تاکنون بیش از ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانوی شناسایی شده‌اند و هنوز هم تعداد بیشتری در حال اضافه شدن و بررسی هستند (۱). متابولیت‌های ثانوی منحصر به گونه یا حتی نژاد و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانوی دارای عمل‌کردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان هستند. این دسته از ترکیبات، در حفاظت گیاهان مقابل گیاهخواران و عوامل بیماریزای میکروبی، به عنوان جذب گرده افشان‌ها و جانوران منتشر کننده بذر، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش دارند (۲). متابولیت‌های ثانوی به عنوان دارو، علف کش‌های زیستی، عوامل طعم دهنده، رنگ‌های طبیعی، سم‌ها، مواد توهم زا (مانند کوکائین، هروئین، مورفین) و عطرها، آن‌ها را برای استفاده در زیست فناوری مورد توجه ساخته است (۳). یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است (۴). محققین با استفاده از این روش سعی می‌کنند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به‌دست آورند و با این روش‌ها توانسته‌اند تولید متابولیت های ثانوی با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش سازها، بهینه سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (۵). استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی است. الیسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوآلکسین (phytoalexin) را القا کنند (۶). الیسیتورهای زیستی به طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان دارویی زیادی به کار رفته‌اند. در این مقاله افزایش تولید برخی متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

پیش ماده‌های ساختاری متابولیت های ثانوی: پیش ماده‌های ساختاری متابولیت‌های ثانوی از متابولیت‌های اولیه حاصل می‌شوند. مسیرهای اصلی متابولیت‌های ثانوی در گیاه و ارتباط آن‌ها با متابولیسم اولیه به صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است (۲). به استثنای فرایندهای اولیه بیوسنتز قند و آمینواسید، سه مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی شامل مسیرهای استات – مالونات، استات – موالونات و اسید شیکمیک می‌باشد (۷). متابولیت‌های ثانوی گیاهان معمولا بر اساس مسیر متابولیسمی آن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (۸). معمولا متابولیت‌های ثانوی در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات نیتروژن دار، ترپن‌ها و فنول‌ها در نظر گرفته می‌شوند (۹). گروه‌های مختلف متابولیت‌های ثانوی، منابع و فعالیت‌های زیستی این ترکیبات در جدول ۱ نشان داده شده است. در ساختمان بسیاری از متابولیت‌های ثانوی گیاهان، ازت وجود دارد. ترکیباتی که در این گروه قرار دارند ترکیبات دفاعی ضد گیاهخواران هستند که آلکالوئید ها و گلیکوزیدهای سیانوژنی در این دسته از این ترکیبات قرار می‌گیرند. این ترکیبات به علت ایجاد مسمومیت در انسان و خواص دارویی به شدت مورد توجه قرار گرفته اند. بیشتر متابولیت‌های ثانوی نیتروژن دار از آمینو اسیدهای مشترکی ساخته می‌شوند (۱۰). آلکالوئیدها یک گروه متنوع از ترکیبات نیتروژن‌دار با وزن مولکولی کم هستند. تعداد آلکالوئیدهای شناخته شده حدود ۱۵۰۰۰ ذکر شده است و به طور تقریبی در ۲۰ درصد از گیاهان آوندی یافت می‌شوند (۱۱). آلکالوئیدها را بر اساس منبع، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و پیش ماده‌های بیوسنتزی (از آمینو اسید مشتق شده باشند و یا حلقه هتروسایکلیک و یا هر دو) نام‌گذاری می کنند که شامل ۱- آلکالوئیدهای بدون حلقه هتروسایکلیک و ۲- آلکالوئیدهای دارای حلقه هتروسایکلیک می‌باشند. آلکالوئیدهای دارای حلقه

هتروسایکلیک به عنوان متابولیت ثانوی نقش دفاعی در حفاظت گیاه در برابر علفخواران و عوامل بیماری زا بـه عهـده دارنـد کـه خود این گروه بر اساس نوع حلقه به زیر گروه‌های مختلف تقسیم می شود. به نظر می‌آید که بیشـتر آلکالوئیـدها عـلاوه بـر نقـش زیستی، نقش داروئی، تحریک کننده و سمی دارند (۱۲).



شکل ۱: مسیرهای اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی و ارتباط آن‌ها با متابولیسم اولیه (Wink, 2010).

G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; VOC: Volatile Organic Compounds; 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway (MEP/DOXP pathway).

جدول ۱: گروه‌های مختلف متابولیت‌های ثانوی، منابع و عملکردهای زیستی آن‌ها (برگرفته از Saufi, 2007)

گروه	واحد ساختمانی	منابع گیاهی	فعالیت زیستی
آلکالوئیدها	استات آمینواسید ترپنوئید کلسترول	گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها	منبع نیتروژن، سمیت‌زدا، بازدارنده، آللوشیمی
ترپنوئیدها	ایزوپرن	گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌های روده‌ای	ضد میکروبی
فلاونوئیدها	مالونیل COA سینامیل COA فنیل‌پروپانوئید	بازدانگان، نهاندانگان، خزه‌ها، باکتری‌ها، سرخس‌ها، جلبک‌ها	آنتی بیوتیک، رنگیزه جذب کننده نور
لیگنین	فنیل پروپانوئیدها	بازدانگان، نهاندانگان، سرخس‌ها	حفاظت ساختاری سد دفاعی
لیگنان ها	فنیل پروپانوئیدها	بازدانگان، نهاندانگان، سرخس‌ها	فیتوآلکسین، ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد ویروسی

گروه دیگر یعنی ترپن‌ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت ثانوی را در گیاهان شامل می شوند. ترکیبات متنوع این گروه معمولا در آب غیرمحلول بوده و کلیه ترپن‌ها از واحد های ۵ کربنی ایزوپرن (۲ و ۵ بوتا دی ان)، مشتق می شوند (۱۳). ترپن‌ها بر اساس تعداد واحدهای ۵ کربنه‌ای که دارند طبقه بندی می‌شوند. ترپن‌های ده کربنی که شامل دو واحد ایزوپرن هستند، مونوترپن نامیده می‌شوند که از مشتقات مونوترپنی می‌توان لیمونن، کامفور، لینالول و ژرانیول را نام برد. ترپن‌های ۱۵ کربنی، سزکوئی‌ترپن‌ها و ترپن‌های ۲۰ کربنه، دی‌ترپن نامیده می‌شوند. ترپن‌های طویل‌تر شامل تری‌ترپن‌ها، تتراترپن‌ها و پلی‌ترپنوئیدها می‌باشند (۱۰). بیوسنتز ترپن‌ها، از استیل کوآنزیم A و از طریق مسیر موالونیک اسید صورت می‌گیرد. بیشتر ترپن‌ها اعمال مشخصی در رشد و نمو گیاه به عهده دارند. به عنوان مثال پیش‌ماده آبسیزیک اسید، یک سزکوئی‌ترپن است. استروئیدها، مشتقات تری‌ترپن‌ها بوده و از اجزای ضروری غشای پلاسمایی به حساب می‌آیند. بنابراین بعضی از ترپن‌ها نقش‌های اولیه مهمی در گیاه به عهده دارند، هر چند که قسمت عمده ترپن‌های گیاهی، جز متابولیت ثانوی بوده و در سیستم دفاعی گیاه دخیل هستند. برخی از گیاهان دارای مخلوطی از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌های فرار می‌باشند که روغن‌های فرار یا اسانس نامیده می‌شود (۱۰ و ۱۳). گروه آخر فنیل‌پروپانوئیدها، مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل‌پروپانوئیدی سنتر می‌شوند (۱۴)، عامل طعم، بو و مزه در اسانس هستند و نقش‌های متفاوتی را در گیاهان بازی می‌کنند. بسیاری از آن‌ها در دفاع بر علیه گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند و یا در حفاظت مکانیکی، در جذب عوامل گرده افشان و پراکنده کردن میوه یا در کاهش رشد گیاهان رقیب دخالت دارند (۱۰). این ترکیبات در شرایط تنش در گیاه تولید می‌شوند. عوامل تنش‌زایی که محرک تولید فنیل‌پروپانوئیدها هستند شامل کمبود آهن، نیترات و فسفات خاک، دمای پایین، عومل بیماری‌زا، زخمی شدن گیاه و اشعه فرابنفش می‌باشند (۱۵). همچنین فاکتورهای رونویسی مانند R2R3-MYB در افزایش تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی دخالت دارند (۱۶). مسیر بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز لیگنین، لیگنان‌ها، فلاوونوئیدها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشند. مسیر اصلی بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها، از مسیر شیکمیک اسید (مسیر بیوسنتزی آمینواسیدهای حلقوی مانند فنیل آلانین و تیروزین) و مسیر مالونیک اسید شروع می‌شود. در ساخت بیشتر ترکیبات فنلی در گیاه مسیر شیکمیک اهمیت دارد. این در حالی است که مسیر مالونیک‌اسید در ساخت محصولات فنلی در باکتری‌ها و قارچ‌ها اهمیت دارد (۱۱). فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) آنزیم حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانوی در گیاهان است. آنزیم PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها است و عمل اصلی آن دآمینه کردن غیراکسیداتیو آمینواسید L-فنیل آلانین و تبدیل آن به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید می‌باشد. سینامیک اسید به عنوان ماده اولیه، در مسیرهای بیوسنتزی متفاوتی مصرف می‌شود. در ادامه مسیر با فعالیت آنزیم‌های سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C4H)، ۴-کومارات-کوآ لیگاز (4CL) و سینامول کوآ ردوکتاز (CCR)، متابولیت‌های دیگری از جمله p-کومارآلدئید، کونیفرآلدهید و سیناپالدئید تولید می‌شود که این ترکیبات توسط سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) به فرم الکلی خود تبدیل می‌شوند. این ترکیبات زیر واحدهای سازنده انواع فلاونوئیدها و لیگنان‌ها و لیگنین هستند (۱۷ و ۱۸).

کشت بافت و استفاده آن در بررسی متابولیت‌های گیاهی:

در زیست فناوری همواره بر بررسی مسیرهای جایگزین برای تولید ترکیبات طبیعی توجه می‌شود. یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است. ازلحاظ تاریخی، اگرچه " کشت بافت " برای اولین بار، در سال‌های ۱۹۴۰-۱۹۳۹ در مورد گیاهان به‌کار گرفته شد، ولی در سال ۱۹۵۶ بود که یک شرکت دارویی در کشور آمریکا (Pfizer Inc) اولین اختراع ثبت شده را در مورد تولید متابولیت‌ها با استفاده از کشت توده‌ای سلول‌ها منتشر کرد. در سال‌های ۱۹۶۷-۱۹۶۸ نیز دانشمندان توانستند مقادیر بیشتری از ترکیبات ویسناجین (visnagin) و دیوسجنین (diosgenin) را با استفاده از کشت بافت نسبت به حالت طبیعی (استخراج از گیاه کامل) به‌دست آورند. کشت سلول گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش می‌باشد. یکی از مزیت‌های روش کشت سلول مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال با سرعت بالای رشد می‌باشد. در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود نداشته باشند. محققین با استفاده

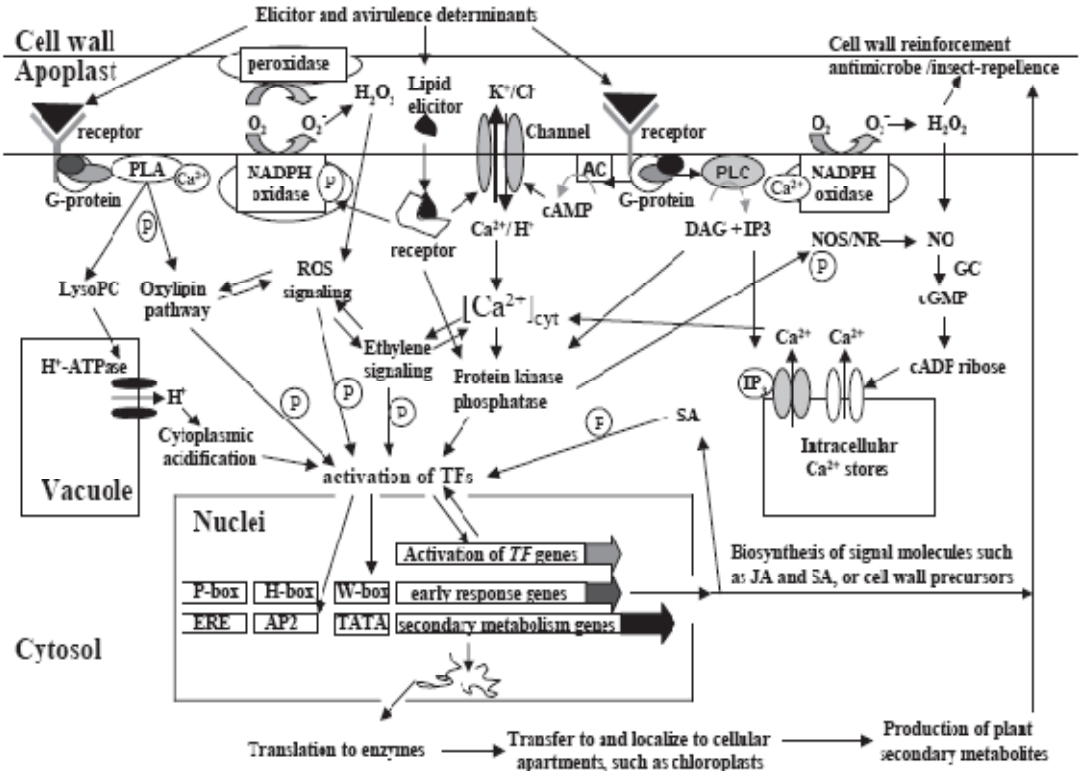
از این روش سعی می‌کنند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز آن‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به‌دست آورند و با این روش‌ها توانسته‌اند تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش در گیاهان را افزایش دهند (۱۹). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیتهای ثانوی و نیز محدود بودن گونه های گیاهی در رویشگاهای طبیعی آن‌ها، روش کشت سلول راه مناسبی برای تولید ترکیبات شیمیایی ارزشمند می‌باشد (۲۰). پیشرفت در زمینه زیست فناوری گیاهی امکان تولید متابولیت‌های ثانوی مهم مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، لیگنان‌ها را فراهم کرده است. تولید متابولیت‌های گیاهی با ارزش، در ابتدا از طریق کشت سلول، بافت و اندام گیاهی و همچنین کشت ریشه‌های موئین، ازنظر تجاری موفقیت آمیز نبود اما امروزه محققین با بکار بردن روش هایی که به نوعی موجب تحریک مسیر بیوسنتزی این ترکیبات می‌شوند به موفقیت های قابل توجهی دست یافته‌اند. یکی از این روش‌ها که به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت درون شیشه (in vitro) به کار می‌رود، استفاده از الیسیتورهای زیستی می‌باشد.

الیسیتورهای زیستی: الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (۶). الیسیتورهای زیستی شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم ها (کیتین و گلوکان) می باشد (۲۱). الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص باشند مانند کیتین و کیتوزان و یا مانند همگنای قارچ و عصاره مخمر مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند.

به طور کلی استفاده از الیسیتورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت‌های گیاهی دو هدف اصلی را دنبال می کند: ۱- به دست آوردن اطلاعاتی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانوی می‌شود. ۲- افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی برای کاربرد تجاری (۲۲). در این میان، الیسیتورهای قارچی به طور گسترده به منظور تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان به کار گرفته می‌شوند و در تحریک تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانوی مانند ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها موثر می‌باشند (۲۳ و ۲۴). کیتین و کیتوزان (ترکیبی مشابه کیتین بدون بنیان‌های استیل) از ترکیبات اصلی دیواره سلول بسیاری از گونه های قارچی می‌باشند. کیتوزان، یک پلی‌ساکارید پلی‌کاتیونی، به عنوان یکی از الیسیتورهای زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن تولید متابولیتهای ثانوی در کشت سلول گیاهان دارویی زیادی تایید شده است (۲۵). الیسیتورهای غیر زیستی یا عوامل تنشی مانند اشعه ماورا بنفش، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی با مکانیسم‌های عمل متفاوت (مانند: جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، نیترات و..) نیز به منظور افزایش تولید این ترکیبات درکشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بیوسنتز بسیاری از متابولیت های ثانوی از جمله اندول آلکالوئیدها، سزکوئی ترپن‌ها و فنل‌ها را تحریک می‌کند (۲۶ و ۲۷). الیسیتورها بر اساس برهم‌کنش الیسیتور-گیاه به دو گروه الیسیتورهای عمومی و الیسیتورهای ویژه نژادی تقسیم بندی می‌شوند. الیسیتورهای عمومی باعث القای پاسخ های دفاعی در هر دو گیاهان میزبان و غیر میزبان می شوند در حالی‌که الیسیتورهای ویژه نژادی پاسخ‌های دفاعی مقاومت به بیماری را تنها در میزبان های ویژه بسته به حضور هم‌زمان ژن‌های غیر بیماری‌زا (*avr*)(avirulence) در پاتوژن و ژنهای مقاومت (*R*)(Resistance) در گیاه القا می کنند (۲۸). در طبیعت گیاهان به حمله پاتوژن‌ها، حشرات، علفخواران و دیگر تنش‌های زیستی و غیر زیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی شامل القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی نظیر فیتوالکسین‌ها، پاسخ های فوق حساسیتی و سدهای دفاعی ساختاری مانند رسوب لیگنین در دیواره سلول پاسخ می‌دهند (۲۱). الیسیتورها ممکن است ژن های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانوی شوند (۲۸ و ۲۹). شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از ترارسانی علامت (signal transduction) را القا می‌کند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. از مهم‌ترین ترکیباتی که باعث القا تعداد زیادی از ژن های وابسته به دفاع می‌شود تنظیم کننده‌های جاسمونات، اتیلن و سالسیلیک اسید می‌باشند (۳۰).

اثرات الیسیتورهای زیستی در سلول‌های گیاهی: مکانیسم اثر الیسیتورهای زیستی بر تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاه به خوبی شناخته نشده است. مکانیسم اثر الیسیتورهای زیستی در گیاه بر اساس برهم‌کنش الیسیتور-گیرنده خلاصه می‌شود.

هنگامی که گیاه یا کشت سلول تحت تاثیر الیسیتور قرار می‌گیرند پاسخ‌های بیوشیمیایی سریع به شرح زیر اتفاق می‌افتد (شکل۲) (۳۱).



شکل۲: مسیر ترارسانی علامت در پاسخ های دفاعی گیاه (برگرفته از Zhao et al., 2005).

AC: AMP cyclase; DAG, diacylglycerol; GC: GMP cyclase; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphate; JA: jasmonic acid; NOS: nitric oxide synthase; NR: Nitrate reductase; PLA: phospholipase A; PLC: phospholipase C; PLD, phospholipase D; ROS, reactive oxygen species; SA: salicylic acid.

- اتصال الیسیتور به پذیرنده غشا پلاسمایی
- القای جریان خروجی Cl^- و K^+
- تغییرات سریع در الگوی فسفریلاسیون پروتئین، فعال شدن پروتئین کیناز، پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن (MAPK) و G- پروتئین
- سنتز فسفولیپازهای A، C و D (PLA، PLC و PLD) و تولید پیام برهای ثانوی مانند اینوزیتول-۱،۴،۵ تریس فسفات (IP3) و دی اسیل-گلیسرول (DAG) که تنظیم کننده مسیر ترارسانی علامت Ca^{2+} داخل سلول و نیتریک اکساید می باشد.
- اسیدی شدن سیتوپلاسم در اثر غیر فعال شدن H^+-ATPase، کاهش قطبیت غشا و افزایش pH خارج سلول
- فعال شدن NADPH اکسیداز مسئول تولید اکسیژن واکنش‌گر
- سازمان دهی مجدد اسکلت سلول
- تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن
- تولید پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن (PR) (pathogenesis-related) مانند کیتیناز، گلوکوناز به منظور آزاد کردن پلی‌ساکاریدها از دیواره سلول (الیسیتورهای داخلی)، گلیکو پروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین و مهار کننده‌های پروتئیناز
- مرگ سلول در محل آلودگی (پاسخ فوق حساسیت)
- تغییرات ساختاری در دیواره سلول (لیگنینی شدن دیواره سلول)
- تولید جاسمونات و سالیسیلیک اسید به عنوان پیام بر های ثانوی

- فعال شدن ژن‌های دفاعی مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز (phenylalanine ammonia-lyase)(PAL)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST)(glutathione S-transferase) و چالکون سنتاز (CHS)(chalcone synthases)
- تولید مولکولهای دفاعی مانند تانن و فیتو آلکسین ها
- مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)(systemic acquired resistance)

به هر حال مطالعه ترتیب این وقایع و برهم‌کنش بین آن‌ها پیچیده و هنوز در حال بررسی است.

استفاده از الیسیتورهای زیستی در تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی: در بین الیسیتورهای زیستی، الیسیتورهای قارچی و ترکیبات اصلی دیواره سلول بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کیتین و کیتوزان به طور گسترده به منظور تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان به کار می روند (۳۲ و ۳۳). عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض الیستور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی تاثیر می گذارد (۲۱). غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و عامل موثری بر شدت پاسخ است. غلظت موثر الیسیتور بر حسب گونه گیاهی فرق می کند، به طوری که غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است در گیاه دیگر اثر نداشته باشد. به‌عنوان مثال، غلظت بالای الیسیتور قارچی *Rhizopus stolonifer* (۵۰ میلی گرم در لیتر) در کشت سلول سرخدار (*Taxus baccata*) منجر به بیشترین میزان مرگ سلول‌ها و کم‌ترین میزان تاکسول (taxol) شده است، در حالی‌که غلظت پایین آن (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منجر به تولید بیشترین میزان تاکسول و کمترین میزان مرگ و میر سلول‌ها شده است (۳۴). غلظت ۱ درصد (v/v) الیسیتور های قارچی در کشت سلول کتان سفید (*Linum album*) بیشترین تاثیر افزایشی بر میزان لیگنان‌های پودوفیلوتوکسین (podophyllotoxin) و لاریسی رزینول (lariciresinol) داشت (۳۵). همچنین بیشترین میزان لیگنان‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و کیتین مشاهده شد (۳۶). مدت زمانی که سلول‌ها در معرض الیسیتور قرار می‌گیرند نیز نقش مهمی در میزان تولید متابولیت‌های ثانوی دارد. در کشت سلولی *L. album* حضور الیسیتورهای قارچی در زمان‌های مختلف اثر متفاوتی بر میزان لیگنان دارد، به گونه‌ای که بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در سلول های *L. album* تیمار شده با الیسیتورهای قارچی *Fusarium graminearum*، *Rhizoctonia solani*، *Rhizopus stolonifer* و *Trichoderma viride* در روز پنجم بعد از تیمار و عصاره قارچ *Sclerontinia sclerotiorum* در روز سوم بعد از تیمار مشاهده شد (۳۷). بیشترین میزان آلکالوئید اجمالیسین (ajmalicine) در کشت سلول و ریشه موئین گیاه *Catharanthus roseus* تحت تاثیر الیسیتورهای قارچی بعد از گذشت یک روز از اعمال تیمار مشاهده شد و با گذشت زمان میزان آن کاهش می‌یابد (۳۸). الیسیتورهای قارچی مختلف اثرات منحصر به فردی نیز در تولید لیگنان‌ها دارند، به‌طوری‌که در بین الیسیتورهای قارچی، بیشترین میزان تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های تیمار شده با *F. graminearum* می‌باشد که میزان شش برابر نمونه‌های شاهد می‌رسد. در حالی‌که *R. stolonifer* بیشترین اثر القایی را روی لیگنان دیگر به نام لاریسی رزینول دارد که به‌میزان هفت برابر موجب افزایش تولید آن در کشت سلولی *L. album* شده است. الیسیتورهای قارچی *Botrytis cinerea*، *Phoma exigua* و *F. oxysporum* به طور متمایزی باعث القای تولید ترکیبات مونولیگنولی در سلول‌های کتان زراعی (*L. usitatissimum*) شدند (۳۹). کاربرد الیسیتورهای قارچی در القای تولید آلکالوئیدها نیز در کشت سلول گزارش شده است (۴۰). به عنوان مثال قارچهایی مانند *Penicillium citrium* و *P. spimulorum* باعث افزایش تولید اجمالیسین در کشت سلول *C.roseus* شده اند و عصاره قارچ *Absidia cristata* باعث افزایش تولید سرپنتین (serpentine) می‌شود (۴۱).

قارچهایی مانند *Aspergillus niger* و *Ustilaginodia vernes* باعث افزایش تولید کاتارانتین (catarantine) می‌شوند. علاوه‌براین، عصاره قارچ *Pythium* بیشترین تاثیر را در افزایش هر سه نوع آلکالوئید داشت در حالی‌که عصاره قارچ *Mucor* تاثیر ضعیفی دارد. در دیواره سلول‌های قارچها ترکیبات الیسیتوری متعددی وجود دارند. پروتئین‌ها، اولیگو ساکاریدها، گلیکوپروتئین ها، پپتیدها، کیتین و کیتوزان از جمله این ترکیبات به حساب می آیند (۴۲). به نظر می رسد این ترکیبات در القای متابولیت‌های ثانوی نقش داشته باشند. اثرات خاص و متنوع الیسیتور های قارچی در ارتباط با بر هم‌کنش ویژه هر قارچ با سلول گیاهی و مسیر ترارسانی علامت مربوطه و بنابراین پاسخ‌های دفاعی سلول گیاهی متناسب با هر قارچ می‌باشد

(۴۳). شناسایی ترکیبات فعال عصاره‌های قارچی در درک مکانیسم برهم‌کنش سلول‌های گیاهی-الیسیتورهای قارچی و پاسخ‌های دفاعی کمک خواهد کرد. مطالعات کمی نیز در زمینه استفاده از باکتری‌ها به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی انجام شده است. افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی مانند اندول گلیکوزیلات‌ها در کشت سلول گیاهی تحت تاثیر باکتری *Erwinia carotovora* گزارش شده است (۴۴). قطعات جدا شده از دیواره سلول‌های گیاهی نیز به عنوان الیسیتور زیستی در کشت سلول به منظور تولید متابولیت‌های ثانوی کاربرد دارند (۴۵). پلی ساکارید های دیواره سلول‌های گیاهی باعث افزایش تولید شیکونین‌ها (shikonin) در کشت سلول *Onosma paniculatum* (۴۶) و *Lithospermum erythrorhizon* (۴۷) گردید. افزایش تولید ساپونین‌ها (saponin) در کشت سلول *Panax notoginseng* (۴۸) و ریشه‌های موئین *P. japonicus* (۴۹) و *P. ginseng* (۵۰) تحت تاثیر اولیگوساکاریدهای جدا شده از دیواره سلول‌های گیاهی گزارش شده است.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های گیاهی و افزایش تقاضا، محققین به‌دنبال روش‌هایی به منظور تولید هر چه بیشتر این ترکیبات هستند. با استفاده از روش کشت بافت شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی و نیز مکانیسم تنظیمی آن بدست می آید و با استفاده از روش‌های زیست فناوری تولید متابولیت‌های با ارزش در گیاهان را می‌توان افزایش داد. استفاده از الیسیتورهای زیستی روش مناسبی به منظور تولید هر چه بیشتر متابولیت های ثانوی در شرایط کشت درون شیشه (*in vitro*) می باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات فعال الیسیتورهای زیستی نقش موثری در القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی دارند.

منابع

1. Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends Plant Sci. 2004; 9(9): 433-440.

2. Wink M. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. second edition. Inc. New Delhi, India. 2010: 20-30.

3. Mazid M, Khan T, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biol Medicine. 2011; 3 (2): 232-249.

4. Zhou*a* LG, Wu JU. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. Nat Prod Rep. 2006; 23: 789–810.

5. Raoa SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotech Adv. 2002; 20: 101–153.

6. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2005; 23(4): 283–333.

7. Dewick PM. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Second Edition, Wiley. 2002; 7: 121-140.

8. Christen P. Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine: Studies in natural products. Chemistry. 2000; 22: 717-749.

9. Bourgaud F, Gravot A, Miles S. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 2001; 161(5): 839–851.

10. Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology, 4th Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 2006; 260-287.

11. Saufi A. Lignans in *Phaleria macrocarpa* and in *Linum flavum* var. *compactum L.* Doctoral Thesis. Heinrich-Heine-Dusseldorf University, Germany. 2007; 300-316.

12. Facchini PJ, St-Pierre B. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Curr Opin in Plant Biol. 2005; 8: 657-666.

13. Sangwan NS, Farooqi AH, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants, Plant Growth Regul. 2001; 34: 21-34.

14. Dixon RA, Sumner LW. Legume natural products. Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. Plant Physiol. 2003; 131(3): 878-885.

15. Dixon RA, Paiva NL. Stress-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell. 1995; 7(7): 1085-1097.

16. Vom Endt D, Kijne J, Memelink J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? Phytochem. 2002; 61(2): 107–114.

17. Anterola AM, Jeon JH, Davin LB, et al. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. J Biol Chem. 2002; 277(21): 18272-18280.

18. Humphreys JM, Chapple C. Re writing the lignin roadmap. Curr Opin in Plant Biol. 2002; 5: 224-229.

19. Kartal M, Konuklugil B, IndrayantoG, Alfermann AW. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. Pharmaco Biomed. 2004; 35: 441-447.

20. Farkya S, Bisaria V, Sirvastava A. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 65(5): 504–519.

21. Vasconsuelo A, Boland, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci. 2007; 172: 861-875.

22. Roberts SC, Shuler ML. Large-scale plant cell culture. Curr Opin Biotechnol. 1997; 8: 154–159.

23. Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Phcog Rev. 2007; 1: 320-345.

24. Ionkova I. Biotechnological Approaches for the Production of Lignans. Phcog Rev. 2007; 1: 427-443.

25. Cheng X, Zhou U, Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Biotechnol J. 2006; 121: 253–260.

26. Yu Z, Fu CX, Han YC, Li YX, et al. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnol Lett. 2006; 8:1027–1031.

27. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants A review. Biotech. Adv. 2008; 26: 548–560.

28. Zhang Y, Mian MR, Bouton J. H. Recent Molecular and Genomic Studies on Stress Tolerance of Forage and Turf Grasses. Crop Sci. 2006; 46:497–511.

29. Howlett B. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic Fungi.Curr Opin in Plant Biol. 2006; 9:371–375.

30. Furden BV, Humburg A, Fuss E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 2005; 24: 312–317.

31. Shilpa K, Varun K, Lakshmi B. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. J plant sci. 2010; 5: 222-247.

32. Kang SM, Jung HY, Kang YM, Yu DJ, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of *PMT* and *H6H* in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Sci. 2004; 166: 745-751.

33. Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma LQ, et al. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Rep. 2009; 28(7): 1127–1135.

34. Khosroushahi A, Valizadeh M, Ghasempour M. Naghdibadi H, et al. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biol International. 2005; 30: 262-269.

35. Esmaeilzadeh S, Sharifi M, Safaei N, Murata J, et al. Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnol Rep**.** 2011; 5:367–73.

36. Esmaeilzadeh S, Sharifi M, Safaei N, Behmanesh M. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan and chitin in *Linum album* cell culture. Iranian J Plant Biol. 2012; 4 (11):13-26.

37. Esmaeilzadeh S, Sharifi M, Behmanesh M, Safaei N, et al. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album.* J Plant Physiol. 2011; 169(5):487-91.

38. Namdeo A. Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Prog. 2002 ; 18: 159-162.

39. Hano C, Addi M, Bensaddek L, Baltora-Rosset S, et al. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. Planta. 2006; 223(4): 975–989.

40. Zhao J, Zhu, W, Hu Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. Enzyme and Microbiol Technol. 2001; 28(7-8): 666–672.

41. Tang Z, Rao R, Peng G, et al. Effects of endophytic fungus and its elicitors on cell status and alkaloid synthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. J Med Plants Res. 2011; 5(11): 2192-2200.

42. Scheel D, Parker JE. Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. Zeitschrift für Naturforschung C. 1990; 45(6): 569-75.

43. Imre E, Somssich IE, Hahlbrok K. Pathogen defence in plant-a paradigm of biological complexity. Trends Plant Sci. 1998; 3:86–90.

44. Liu Y, Cui Y, Mukherjee A. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* spp.

Carotovora that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. Mol Microbiol. 1998; 29(1): 219-34.

45. Creelman RA, Mullet JE. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: non traditional regulators of plant growth, development, and gene expression. Plant Cell. 2009; 9: 1211_/1223.

46. Zhou LG, Zheng GZ, Wang SL. Effects of polysaccharides on cultures cells of *Onosma paniculatum*. Cell Res. 1991; 2: 83-88.

47. Fukui H, Tani M, Tabata M. Induction of shikonin biosynthesis by endogenous

polysaccharides in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant cell Rep. 1990; 9: 73-76.

48. Zhou L, Zheng G, Wang S, Gan F. Effects of oligosaccharins on callus growth and saponin content of *Panax notoginseng*. Cell Res. 1992; 2:83–87.

49. Zhou L, Yang C, Li J, Wang S. Heptasaccharide and octasaccharide isolated from *Paris polyphylla var. yunnanensis* and their plant growth-regulatory activity. Plant Sci. 2003; 165: 571–575.

50. Zhou L, Cao X, Zhang R, et al. Stimulation of saponin production in *Panax ginseng* hairy roots by two oligosaccharides from *Paris polyphylla var. yunnanensis*. Biotechnol Lett. 2007; 29: 631–634

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2013; 4(2): 119-128

Review Article

Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors

Esmaeilzadeh Bahabadi S. Ph.D.[1*], Sharifi M. Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Department of Plant Science, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: shirin_esm@yahoo.com

Received: 24 Sep. 2012 Accepted: 11 Dec. 2012

Abstract

Plants produce a big group of secondary metabolites which are used as medicinal compounds. According to recent estimates, global market value of herbal medicines, including medicinal plants and their products, significantly has been increasing. Considering to the fact that most of the world market for medicinal plants, production and supply of secondary metabolites derived from these plants are concerned and the plant secondary metabolites are of high economic value. Chemical synthesis of these metabolites is an expensive process. So production of metabolites by different biotechnological methods such as cell culture is a useful alternative. Molecular recognition and elicitor-plant receptors interaction is a complex process requiring for signal transduction. Biotic elicitors induce secondary metabolites and hypersensitive responses by activation of defense mechanisms. Manipulation of cell culture media by elicitors is an important strategy for inducing secondary metabolism and production of valuable metabolites. Molecular recognition and elicitor-plant receptors interaction is a complex process requiring for signal transduction. Following perception of elicitor signals, rapid defense responses can be organized as follows: increase of ionic currents across the plasma membrane, reactive oxygen species (ROS) production, activation of defense gene expression, structural changes in the cell wall and phytoalexin production. In this study, different aspects of increasing the production of secondary metabolites in cell culture of plants by biotic elicitors is investigated.

Keywords: Biotic elicitor, Cell culture, Secondary metabolite