زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره یازدهم، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۱۳-۲۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۳/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۷/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۲۳

افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و فنیل پروپانوییدی تحت تأثیر کیتین و کیتوزان در کشت سلول کتان سفید (*Linum album*)

صدیقه اسمعیل‌زاده بهابادی [۱و۲]، مظفر شریفی [۲*]، ناصر صفایی [۳] و مهرداد بهمنش [۴]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران
[۲] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳] گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۴] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

پودوفیلوتوکسین ترکیبی لیگنانی است که در گونه‌های گیاهی معدودی حضور داشته، به علت خواص ضد سرطانی اهمیّت دارویی بسیاری دارد. کتان سفید (*Linum album*) یکی از گونه‌های بومی ایران است که دارای پودوفیلوتوکسین و دیگر ترکیبات لیگنانی است. کیتین و کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی هستند، به عنوان الیسیتورهای زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی استفاده می‌شود. در این پژوهش، ابتدا اثر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر رشد سلول و میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در کشت سلول کتان سفید بررسی شد. سپس در غلظت بهینه کیتوزان، میزان لیگنان‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونول، فلاونوئید و لیگنین در زمان‌های مختلف بررسی گردید. تیمار سلول‌های کتان سفید با کیتوزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول به میزان دو برابر شاهد شد. میزان فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها تا انتهای دوره رشد، تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافت. میزان لیگنین نیز در پاسخ به کیتوزان به میزان دو برابر نمونه‌های شاهد افزایش یافت. در راستای درک سازوکار کیتوزان، فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و سینامیل آلکل دهیدروژناز (CAD) نیز بررسی شد. فعالیت PAL و CAD که در مراحل ابتدایی مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین قرار دارند، پس از افزودن کیتوزان افزایش یافت، اوج فعالیت آنها پس از گذشت ۳ روز مشاهده گردید. کیتوزان با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین باعث افزایش میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول شده، علاوه بر آن، بر بخش فنیل پروپانوئیدی مسیر بیوسنتزی پودوفیوتوکسین نیز تأثیر می‌گذارد.

واژه‌های کلیدی: پودوفیلوتوکسین، کتان سفید، کیتوزان و لیگنان

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: msharifi@modares.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۴۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لیگنان‌ها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در بسیاری از گیاهان ساخته می‌شوند. این ترکیبات معمولاً از دو واحد فنیل پروپانوئید تشکیل شده، در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر علفخوران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند و فعالیت زیستی متنوعی از خود نشان می‌دهند (Heldt, 2005; Suzuki and Umezawa, 2007). گیاه کتان سفید (*Linum album*) که از گونه‌های بومی فلور ایران است، در اندام‌های مختلف خود ترکیبات لیگنانی مانند پودوفیلوتوکسین را دارد. پودوفیلوتوکسین از جمله مهمترین ترکیبات لیگنانی است که امروزه به عنوان ماده اولیه برای برخی از داروهای ضد سرطانی اهمیّت دارویی بسیاری پیدا کرده است. پودوفیلوتوکسین به علت سمّیت سلولی بسیار بالایی که از خود نشان می‌دهد، به طور مستقیم قابل استفاده نیست. از این ترکیب برای ساخت سه داروی ضد سرطان etopside، etophose و teniposide استفاده می‌شود که برای مقابله با سرطان‌های ریه، تخمدان و تومورهای مغزی به کار می‌رود (Farkya *et al*., 2004). مسیر بیوسنتزی آن از آمینواسید فنیل‌آلانین شروع شده (مسیر فنیل پروپانوئیدی) تا پیش‌ماده کونیفر الکل حاصل شود، سپس اتصال دو مولکول از این ماده، ترکیب پینورزینول را پدید می‌آورد. پس از این مرحله، مسیر بیوسنتزی انواع ترکیبات لیگنانی آغاز می‌شود. ترکیبات لاریسی رزینول و پودوفیلوتوکسین از جمله این ترکیبات هستند. از آنزیم‌های مهم این مسیر می‌توان به فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، سیناموییل CoA ردوکتاز (CCR)، سیناموییل الکل دهیدروژناز (CAD) و پینورزینول- لاریسی رزینول ردوکتاز (PLR) اشاره نمود. در حال حاضر، پودوفیلوتوکسین را می‌توان از گونه‌های مختلف *Podophyllum* که در معرض انقراض هستند به دست آورد. با توجه به این که سنتز شیمیایی پودوفیلوتوکسین مقرون به صرفه نیست، تولید آن از طریق کشت سلول و اندام گونه‌های سرده *Linum* راه جایگزین و سودمندی است. روش‌های متعددی برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلول وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al*., 2005). کیتین و کیتوزان (کیتین فاقد گروه استیل) از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی هستد. کیتوزان، یک پلی‌ساکارید پلی‌کاتیونی، به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد، برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت‌سلولی بسیاری از گیاهان دارویی تأیید شده است (Cheng *et al*., 2006). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از الیسیتورها به منظور انباشت پودوفیلوتوکسین در کشت *in vitro* وجود دارد. کیتو اولیگوساکاریدها به افزایش ۱۵ برابری انباشت پودوفیلوتوکسین در کشت‌سلول *Juniperus chinesis* منجر می‌شود (Muranaka *et al*., 1998). پس از افزودن متیل ژاسمونیک، سالیسیلیک‌اسید و الیسیتورهای قارچی، میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی کتان سفید افزایش یافت (Furden *et al*., 2005; Yousefzadi *et al*., 2010; Esmaeilzadeh *et al*., 2011). مطالعات اخیر نشان داد که فعالیت و بیان آنزیم PAL و CAD تحت تأثیر الیسیتورها افزایش یافت، ولی بیان ژن PLR

Archive of SID

www.SID.ir

تغییری نکرد (Yousefzadi *et al.*, 2010). با توجه به اینکه غلظت الیسیتور و مدت زمانی که محیط در معرض الیستور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید لیگنان‌ها تأثیر می‌گذارد، بدین منظور، ابتدا غلظت بهینه الیسیتورها تعیین شد؛ سپس در زمان‌های مختلف تحت تأثیر غلظت بهینه میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول (از ترکیبات لیگنانی حدواسط مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین) بررسی شد. پس از آن، میزان ترکیباتی که مسیر بیوسنتزی مشترکی با لیگنان‌ها دارند مانند لیگنین و سایر ترکیبات فنلی بررسی شد تا ارتباط مسیرهای متابولیسمی گیاه مشخص شود. برای درک بهتر سازوکار تأثیر کیتوزان، فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین بررسی شد. از آنجایی که آنزیم‌های PAL و CAD تنظیم‌کننده ابتدای مسیر بیوسنتز پودوفیلوتوکسین و لیگنان‌های مرتبط با آن هستند، فعالیت آنزیم‌های یاد شده بررسی گردید تا ارتباط فعالیت آنزیمی با تغییرات میزان لیگنان‌ها مشخص شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت بذرها

بذرهای *L. album* از منطقه سوهانک تهران (N ۴۸´۱۹ °۳۵، E ۳۲´۲۲ °۵۱) جمع‌آوری شد. بذرها پس از شستشوی سطحی، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفته، سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند. سپس ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳ درصد قرار داده شدند و مجدداً سه بار با آب سترون شستشو شدند. در مرحلهٔ آخر، یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفته، با آب مقطر سترون آبکشی شدند. بذرهای سترون به مدت یک ساعت در محلول ۰/۵ گرم در لیتر جیبرلین سترون شده، قرار گرفتند و سپس در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. بذرها به مدت دو هفته، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از گیاهچه‌های حاصل برای ایجاد قطعات جداکشت و کشت بافت استفاده شد.

القای تولید کالوس و راه‌اندازی کشت سلولی

به منظور القای کالوس قطعاتی از گیاهچه به طول ۱-۲ سانتی‌متر برش داده شده، سپس قسمت‌های ساقه-برگ به محیط کشت MS پایه، حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین منتقل شدند. پس از گذشت ۲ هفته القای کالوس شروع شد. برای تهیه کشت تعلیقی ۲ گرم کالوس نرم، سفید و هم‌سن که پس از ۲ ماه ۸ بار واکشت شده بود، به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی یاد شده در بالا بدون آگار اضافه شد و روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شد و هر هفته یک بار واکشت گردید.

تیمار سلول‌ها با کیتین و کیتوزان

برای انجام این مرحله از تحقیق، ابتدا به منظور ایجاد یک کشت همگن و یکنواخت، کشت سلولی تهیه شده در مرحله قبل، ۶ بار واکشت شد. در هر مرحله سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش جمع‌آوری شدند و به محیط تازه منتقل گردیدند. قبل از اعمال تیمارها، دوره رشد برای سلول‌ها تعیین گردید. بدین منظور پس از انتقال یاخته‌ها به محیط جدید از روز اول تا ۱۵ روز پس از انتقال، به فاصله زمانی دو روز، نمونه‌برداری انجام و بر اساس وزن خشک سلول‌ها،

Archive of SID

www.SID.ir

منحنی رشد تعیین گردید. به منظور اعمال تیمارها، ۵۰۰ میلی‌گرم سلول (وزن تر) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش برداشت و به پلیت حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط‌کشت مایع منتقل گردید. برای تهیه محلول کیتوزان (C3646، شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) و کیتین (C7170، شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) از روش Khan و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد؛ برای این منظور ابتدا محلول استیک اسید یک درصد تهیه، سپس محلول کیتوزان و کیتین در اسید یاد شده تهیه گردید. پس از حل شدن کامل (۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد)، اسیدیته محلول با NaOH به ۵/۷ رسید. سپس محلول کیتوزان و کیتین به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو شد. با توجه به منحنی رشد به دست آمده، در روز هفتم سلول‌ها به طور جداگانه با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتین و کیتوزان تیمار شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۵ روز به منظور بررسی رشد سلولی، میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول برداشت شدند. سپس بهترین غلظت کیتوزان که کمترین تأثیر را بر کاهش رشد سلولی (وزن خشک) و بیشترین تأثیر را بر افزایش میزان لیگنان‌ها داشت، انتخاب و مجدداً کشت تعلیقی تکرار گردید. در نهایت سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار کیتوزان به منظور مطالعات بعدی، برداشت شدند.

اندازه‌گیری رشد سلولی

رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها تعیین شد. سلول‌ها توسط نایلون مش (۴۲ میکرومتری) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش از محیط‌کشت جدا و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. سپس سلول‌ها لیوفیلیز شده، وزن خشک تعیین گردید.

استخراج و سنجش لیگنان‌ها

به ۵۰ میلی‌گرم وزن خشک سلول، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد، سپس کاملاً ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولترا سونیک قرار گرفته و سانتریفیوژ گردید. محلول حاصل به تیوب جدید منتقل و فاز متانولی تبخیر شد. در ادامه به عصاره آبی باقیمانده، یک میلی‌لیتر آب و یک میلی‌لیتر اتیل استات افزوده شد و سانتریفیوژ گردید. سپس فاز اتیل استات به تیوب جدید منتقل گردید و تبخیر شد. در انتها، رسوب خشک شده در یک میلی‌لیتر متانول حل شد. مقدار لیگنان‌ها با استفاده از HPLC (Shimadzu, Japan) در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. برای تأیید وجود پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در نمونه‌های مورد بررسی، از تکنیک LC-MS استفاده گردید. برای تعیین جرم مولکولی اجزای نمونه از روش Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI/MS) به همراه سیستم LC-20AD (Shimadzu, Japan) استفاده شد.

تعیین میزان فنل کل

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین–سیوکالتیو (Singleton and Rossi 1965) و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم از یاخته‌های لیوفیلیز شده در ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت ۳ ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با سرعت ۹۰۰۰ (g) به مدت ۱۵دقیقه (دو بار)

Archive of SID

www.SID.ir

سانتریفیوژ و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰دقیقه در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. در نهایت، مقدار فنل کل بر حسب mg/g وزن خشک محاسبه گردید.

تعیین میزان فلاونول کل

به یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی یک میلی‌لیتر از محلول کلریدآلومینیوم ۲ درصد و ۳ میلی‌لیتر از محلول سدیم استات ۵ درصد اضافه گردید. میزان فلاونول کل بر اساس منحنی استاندارد روتین (Rutin) و در طول موج ۴۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Akkol *et al.*, 2008).

تعیین میزان فلاونوئید کل

سنجش فلاونوئید کل نیز بر اساس منحنی استاندارد روتین (Rutin) سنجیده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (Akkol *et al.*, 2008).

سنجش و اندازه‌گیری لیگنین

میزن لیگنین با استفاده از معرف استیل بروماید (Iiyama and Wallis., 1998) تعیین گردید. بدین ترتیب که به ۶ میلی‌گرم پودر خشک ۲/۵ میلی‌لیتر استیل بروماید ۲۵ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب یخ قرار گرفت. نمونه‌ها به وسیله کاغذ صافی Whatman شماره یک صاف گردیدند. به بخش مایع ۵ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲ نرمال و ۶ میلی‌لیتر استیک اسید گلایسیال اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD)

روش استخراج پروتئین

یک گرم از یاخته کتان سفید در ۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸، همراه با یک گرم پلی وینیل پیرولیدون و ۵۰ میکرولیتر دیتیوتریتول کاملاً ساییده شد. مخلوط حاصل در ۲۰۰۰۰ (g) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت جدا و برای سنجش غلظت پروتئین و نیز فعالیت آنزیم استفاده شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین گردید.

روش سنجش فعالیت PAL

برای سنجش فعالیت PAL، به ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۰/۱ مولار در بافر پتاسیم فسفات با اسیدیته ۸ و ۶۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات بافر ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl (۶ مولار) برای غیر فعال کردن PAL به مخلوط اضافه شد. شستشوی نمونه با ۵ میلی‌لیتر از اتیل استات انجام شد. سپس نمونه در معرض جریان هوا تبخیر و به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید (۰/۰۵ مولار) اضافه شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید تعیین شد. یک واحد از فعالیت PAL برابر با یک میکرو گرم از سینامیک

Archive of SID

www.SID.ir

اسید تولید شده در ساعت است (Ochoa-Alejo and Gomez-Peralta, 1993).

روش سنجش فعالیت CAD

به منظور سنجیدن فعالیت آنزیمی از روش Garden (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات استفاده گردید: برای سنجش فعالیت CAD، به ۲۵ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۹۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۸، و ۵۰ میکرولیتر $NADP^+$ دو میلی‌مولار اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس به مخلوط حاصل ۲۵ میکرولیتر کونیفریل الکل ۲ میلی‌مولار اضافه و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

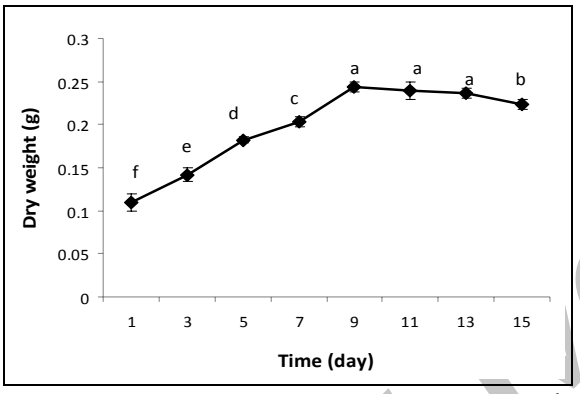
نتایج

تعیین منحنی رشد سلول

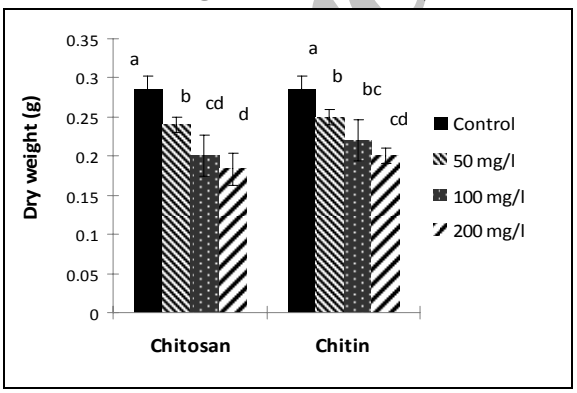
پیش از اعمال تیمارهای مورد نظر، میزان رشد سلول‌ها در مدت ۱۵ روز در کشت تعلیقی بررسی شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که پس از کشت، میزان سلول‌ها افزایش یافته که این روند تا روز نهم ادامه دارد. پس از این زمان وزن کاهش می‌یابد. شیب رشد یاخته‌ای در روز هفتم افزایشی بود که در این زمان یاخته‌ها در اواسط دوره لگاریتمی رشد بوده، به شدت در حال تقسیم هستند. در این زمان حجم توده یاخته‌ای به میزان مناسبی رسیده، بنابراین روز هفتم به عنوان زمان افزودن تیمار انتخاب گردید.

اثر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر رشد سلولی

تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و کتین بر رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن خشک پس از گذشت ۵ روز بررسی شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان به طور معنی‌داری رشد سلولی را کاهش داده، با افزایش غلظت، رشد کاهش بیشتری نشان می‌دهد، به طوری که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان رشد را به میزان ۴۰ درصد کاهش داد.



شکل ۱- منحنی رشد یاخته‌ای در کشت تعلیقی کتان سفید در محیط کشت MS. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر رشد سلولی در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتین و کیتوزان در روز هفتم از دوره رشد به محیط کشت اضافه گردید و نمونه‌ها ۵ روز بعد برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

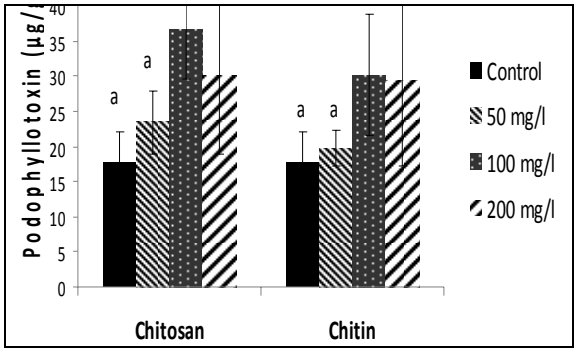
Archive of SID

www.SID.ir

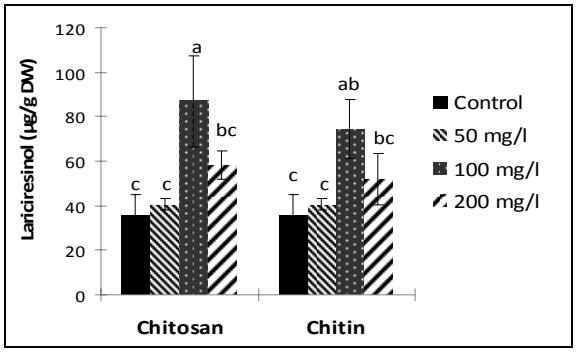
اثر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول

نتایج بررسی لیگنان‌ها نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به سایر غلظت‌ها میزان پودوفیلوتوکسین را به طور معنی‌داری به میزان ۲ برابر، ۳۶/۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک، نمونه‌های شاهد افزایش داد (شکل ۳).

در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان تفاوت معنی‌داری در میزان پودوفیلوتوکسین مشاهده نشد. میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت‌های مختلف کیتین تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان نداد. بیشترین میزان لاریسی رزینول در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و کیتین مشاهده شد که به ترتیب باعث افزایش لاریسی رزینول به میزان ۲/۵ و ۲ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد شد (شکل ۴). بر اساس نتایج حاصل، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در بازه زمانی کوتاه‌تر (۱، ۲، ۳ و ۵ روز) برای مطالعات بعدی استفاده گردید.



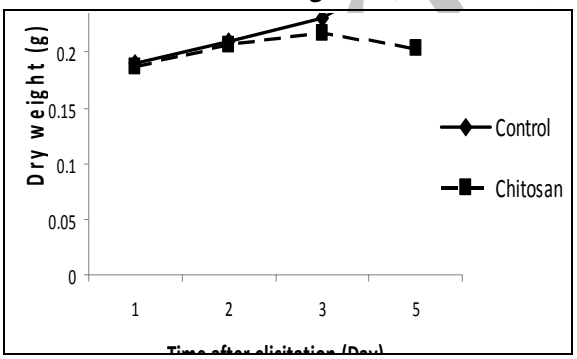
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتین و کیتوزان در روز هفتم از دوره رشد به محیط‌کشت اضافه گردید و نمونه‌ها ۵ روز بعد برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف کیتین و کیتوزان بر میزان لاریسی رزینول در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتین و کیتوزان در روز هفتم از دوره رشد به محیط‌کشت اضافه گردید و نمونه‌ها ۵ روز بعد برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

تأثیر غلظت بهینه کیتوزان بر رشد سلولی در طول زمان

نتایج تأثیر کیتوزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد سلولی نشان داد که تا روز سوم تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد مشاهده نشد، از روز ۴ به بعد میزان رشد کاهش یافت به طوری که بیشترین میزان کاهش پس از گذشت ۵ روز به میران ۳۰ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد بود (شکل ۵).



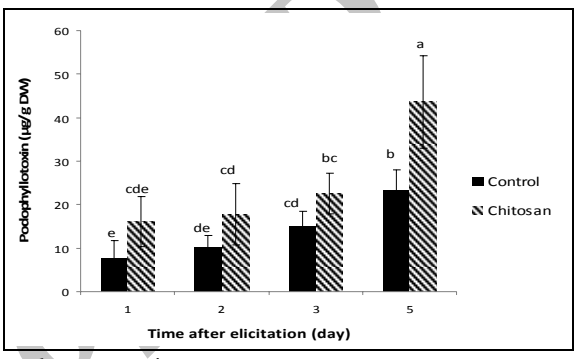
شکل ۵- منحنی رشد سلولی تحت تأثیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط‌کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

Archive of SID

www.SID.ir

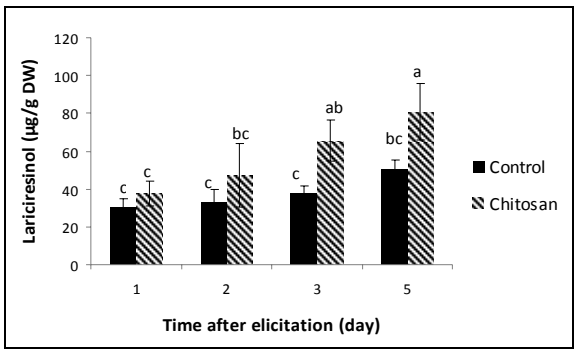
تأثیر غلظت بهینه کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول

نتایج نشان داد که میزان پودوفیلوتوکسین در سلول‌های بدون تیمار به آرامی افزایش می‌یابد و در انتهای دوره رشد سرعت افزایش آن بیشتر می‌شود. افزودن کیتوزان در روز هفتم پس از گذشت یک روز باعث افزایش معنی‌داری در میزان پودوفیلوتوکسین نسبت به نمونه‌های شاهد شد، این افزایش پس از گذشت ۵ روز نیز دیده شد که حدود دو برابر نمونه‌های شاهد بود (شکل ۶).



شکل ۶- تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین تحت تأثیر ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

کیتوزان دو روز پس از افزوده شدن به محیط باعث افزایش لاریسی رزینول شد. این روند افزایشی ادامه پیدا کرد، به طوری که بیشترین میزان آن پس از گذشت ۵ روز در حدود دو برابر نمونه‌های شاهد بود (شکل ۷).



شکل ۷- تغییرات میزان لاریسی رزینول تحت تأثیر ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

تأثیر کیتوزان بر فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها

بررسی میزان فنل کل در یاخته‌های شاهد نشان داد که در کشت تعلیقی کتان سفید میزان ترکیبات فنلی با شیب ملایمی رو به افزایش است. کیتوزان با افزایش زمان کشت باعث افزایش فنل کل شد، به طوری که بیشترین میزان فنل کل، ۳۱/۶ میلی گرم بر لیتر، پس از گذشت ۵ روز از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۸a). میزان فلاونول‌ها نیز بررسی شد. مقدار فلاونول‌ها پس از گذشت دو روز از افزوده شدن کیتوزان در کشت تعلیقی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. در سلول‌های شاهد، میزان فلاونول‌ها تا پایان آزمایش به آرامی رو به افزایش است (شکل ۸b).

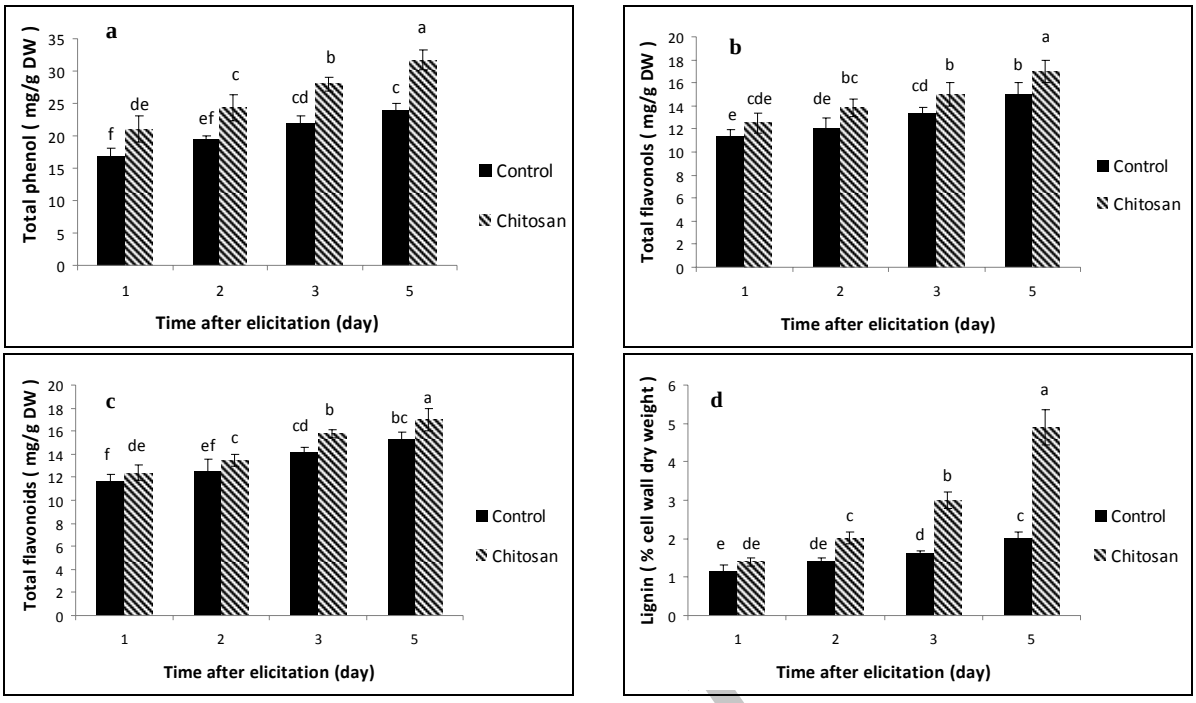
تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فلاونوئیدها نشان داد که میزان فلاونوئیدها یک روز پس از افزودن کیتوزان افزایش معنی‌داری داشته، این روند تا انتهای دوره آزمایش ادامه پیدا نمود، به طوری که بیشترین میزان آن ۵ روز پس از افزوده شدن کیتوزان بود (شکل ۸c).

تأثیر کیتوزان بر میزان لیگنین

نتایج بررسی میزان لیگنین در کشت تعلیقی کتان سفید نشان داد که پس از گذشت ۲ روز از آغاز تیمار، میزان لیگنین به طور معنی‌داری افزایش یافت و در روز پنجم بیشترین میزان لیگنین به میزان دو برابر نمونه شاهد رسید (شکل ۸d).

Archive of SID

www.SID.ir

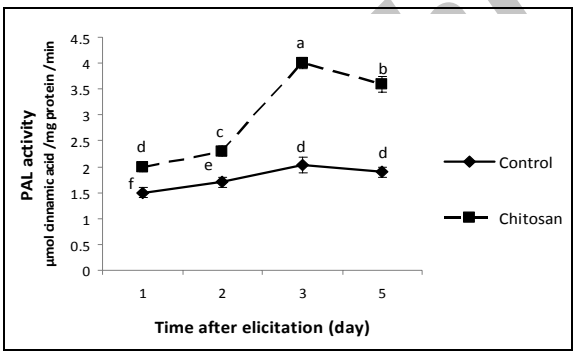


شکل ۸- تأثیر کیتوزان بر فنل کل (a)، فلاونول (b)، فلاونوئید (b) و لیگنین (d). میزان فنل کل بر اساس استاندارد گالیک اسید و میزان فلاونول و فلاونوئیدها نیز بر اساس استاندارد روتین (Rutin) اندازه‌گیری شدند. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

تأثیر کیتوزان بر فعالیت PAL و CAD

با افزودن کیتوزان در روز هفتم از دوره رشد، فعالیت آنزیم PAL، پس از یک روز به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۹) و حداکثر فعالیت آن ۳ روز پس از افزودن کیتوزان مشاهده شد، ۴ میکرومول سینامیک اسید بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه. سپس فعالیت آن پس از گذشت ۵ روز از آغاز تیمار کاهش یافت که همچنان بیشتر از نمونه‌های شاهد بود.

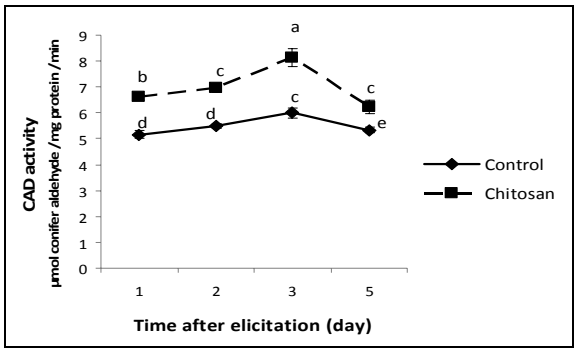
نتایج بررسی آنزیم CAD نشان داد که همانند آنزیم PAL، فعالیت CAD نیز پس از یک روز به طور معنی‌داری افزایش یافت و پس از گذشت سه روز به اوج فعالیت خود (حدود ۷ میکرومول کونیفرآلدئید بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) رسید و فعالیت آن ۵ روز پس از افزوده شدن تیمار کاهش یافت (شکل ۱۰).



شکل ۹- فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان. میزان فعالیت بر حسب سینامیک اسید تولید شده محاسبه گردید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱۰- فعالیت آنزیم CAD تحت تأثیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط‌کشت اضافه گردید. سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار برداشت شدند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

بحث

مطالعات کمی در مورد تأثیر الیسیتورها بر میزان لیگنان‌ها در کشت تعلیقی کتان سفید صورت گرفته است (Furden *et al*., 2005; Shams Ardakani *et al*., 2005). مطالعه حاضر نخستین گزارش تأثیر کیتوزان بر مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کیتین و کیتوزان، باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kang *et al*., 2004; Pu *et al*., 2009).

در تحقیق حاضر، اثر کیتین و کیتوزان بر مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها بررسی شد. به منظور به دست آوردن بیشترین میزان لیگنان‌ها بهینه‌سازی دقیق غلظت کیتین و کیتوزان ضروری است. مطالعات نشان داده است که غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرآیند تحریک داشته، عامل مؤثری بر شدت پاسخ است (Vasconsuelo and Boland, 2007). غلظت مؤثر الیسیتور بر حسب گونه گیاهی متفاوت است، به طوری که ممکن است غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، در گیاه دیگر اثر نداشته باشد. غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث القای بیشترین میزان تولید آنتراکوئینون (Antraquinone) در کشت سلول *Rubia akane* شد (Jin *et al*., 1999)، در حالی که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، غلظت بهینه برای تولید منتانول در کشت سلول *Mentha piperita* بود (Chang *et al*., 1998). تأثیر الیسیتور کیتوزان بر میزان فنیل اتانوئید گلیکوزید در کشت سلول *Cistanche deserticola* نیز بررسی شد. بیشترین میزان فنیل اتانوئید گلیکوزید در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد (Cheng *et al*., 2006). بیشترین میزان تولید دکرسین (Decursin) و دکرسینول آنجلات (Decursinol angelate) در کشت ریشه *Angelica gigas* تحت تأثیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتین مشاهده شد (Rhee *et al*., 2010). در تحقیق حاضر، بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت‌های مختلف کیتین تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان نداد، در حالی که بیشترین میزان لاریسی رزینول در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و کیتین مشاهده شد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کیتوزان یک روز پس از افزوده شدن به محیط‌کشت باعث افزایش در میزان پودوفیلوتوکسین می‌شود و تا پایان دوره رشد این روند ادامه پیدا می‌کند، به طوری که بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین ۵ روز پس از اعمال تیمار به میزان ۲ برابر نمونه‌های شاهد مشاهده شد. کیتوزان پس از گذشت ۵ روز باعث افزایش بیشترین

Archive of SID

www.SID.ir

میزان لاریسی رزینول شد. در این تحقیق ترکیبات مشتق شده از مسیر فنیل پروپانوئیدی نیز بررسی شدند. ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند (Kovacik *et al.*, 2009). گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام‌رسان آزاد می‌سازند که نقش دفاعی مهمی دارند (Bais *et al.*, 2004). فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنلی توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل پروپانوئیدی در کشت تعلیقی نارگیل شد (Chakraborty *et al.*, 2009). در این تحقیق نیز میزان فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها تا انتهای دوره رشد تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافت. لیگنین یکی دیگر از ترکیباتی است که نقش دفاعی دارد و گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی میزان آن را افزایش می‌دهد (Schmitt, 2006). در پاسخ به الیسیتورهای قارچی در کشت‌های تعلیقی صنوبر (De Alwis *et al.*, 2009) و کتان (Hano *et al.*, 2006) میزان لیگنین به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که میزان لیگنین در پاسخ به کیتوزان به میزان ۲ برابر نمونه‌های شاهد افزایش می‌یابد. به منظور درک رابطه بین القای متابولیت‌های ثانویه و تیمار کیتوزان، فعالیت آنزیم PAL به عنوان آنزیم تنظیم‌کننده کلیدی مسیر فنیل پروپانوئیدی و آنزیم CAD به عنوان آنزیم تأمین‌کننده سوبسترای لیگنین و لیگنان بررسی شد. آنزیم PAL که آغاز کننده نخستین مرحله از مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها است، پل ارتباطی بین متابولیت‌های اولیه و برخی از متابولیت‌های ثانویه است (Yu *et al.*, 2006). فعالیت این آنزیم تحت تأثیر عوامل زیستی (باکتری، ویروس و قارچ) و غیرزیستی (کاهش یا افزایش دما، زخم و اشعه ماورای بنفش) القا می‌شود (Cheng *et al.*, 2006). افزایش فعالیت PAL و دیگر آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی که به افزایش ترکیبات فنلی منجر می‌شود، از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش است (Wen *et al.*, 2008). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر کیتوزان نیز افزایش می‌یابد (Chakraborty *et al.*, 2009). افزایش فنیل اتانوئید گلیکوزید در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر کیتوزان بود (Cheng *et al.*, 2006). در این مطالعه نیز تحت تأثیر کیتوزان میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته که حداکثر فعالیت پس از گذشت ۳ روز مشاهده گردید. در این حالت میزان فعالیت در مقایسه با شاهد ۲ برابر افزایش یافته است. در این تحقیق آنزیم دیگری که به بررسی فعالیت آن پرداخته شد، CAD بود. این آنزیم در انتهای مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها وارد عمل شده، تأمین‌کننده سوبسترای لیگنین و لیگنان است. تحت تأثیر کیتوزان میزان فعالیت این آنزیم در ریشه‌های بادنجان افزایش یافته، حداکثر فعالیت آن پس از گذشت ۵ روز بود (Mandal, 2010). در نتایج حاصل از این تحقیق نیز فعالیت این آنزیم تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافته، حداکثر فعالیت آن پس از گذشت ۳ روز مشاهده گردید. نتایج نشان می‌دهد که کیتوزان از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی و با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین باعث افزایش میزان

Archive of SID

www.SID.ir

پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در کشت تعلیقی کتان سفید می‌شود. البته کیتوزان بر بخش فنیل پروپانوئیدی مسیر بیوسنتزی پودوفیوتوکسین نیز تأثیر می‌گذارد.

منابع

Akkol, E. K., Goger, F., Kosar, M. and Baser, K. H. (2008) Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry 108: 942-949.

Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. Trends in Plant Science 9: 26-32.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chakraborty, M., Karun, A. and Mitra, A. (2009) Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. Journal of Plant Physiology 166: 63-71.

Chang, J. H., Shin, I. S. and Chung, H. J. (1998) Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. Biotechnology Letter 20: 1097-1099.

Cheng, X., Zhou U. and Cui, X. (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Biotechnology Journal 121: 253-260.

De Alwis, R., Fujita, K. and Ashitani, T. (2009) Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. Plant Biotechnology Reports 3: 57-65.

Esmaeilzadeh, S., Sharifi, M., Safaei, N., Murata, J., Yamagaki, T. and Satake, H. (2011) Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnology Report 5: 367-73.

Farkya, S., Bisaria, V. S. and Sirvastava, A. K. (2004) Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Applied Microbiology Biotechnology 65: 504-519.

Furden, B. V., Humburg, A. and Fuss, E. (2005) Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotox in accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 24: 312-317.

Garden, H. (2003) Biotechnological production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures. Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine University, Düsseldorf.

Hano, C., Addi, M., Bensaddek, D., Cronier, S. and Laine, E. (2006) Differential accumulation of monolignol-drived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. Planta 223: 975-989.

Heldt, H. W. (2005) Plant Biochemisty. Elsevier Academic Press, California.

Iiyama, K. and Wallis, A. (1988) An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. Wood Science Technology 22: 271-280.

Jin, H., Shin, J., Kim, J. and Chung, S. (1999) Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinones colorants in Madder (*Rubia akane Nakai*) cell culture. Biotechnology Bioprocess 4: 300-304.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K. and Choi, M. S. (2004) 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 Science 166: 745-751.

Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith D. L. (2003) Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyaseand tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. Journal of Plant Physiology 160: 859-63.

Archive of SID

www.SID.ir

Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report 28: 135-143.

Mandal, S. (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. African Journal of Biotechnology 9:8038-8047.

Muranaka, T., Miyata, M., Ito, K. and Tachibana, S. (1998) Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. Phytochemistry 49: 491-496.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Ochoa-Alejo, N. and Gomez-Peralta, J. E. (1993) Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Plant Physiology 141: 147-152.

Pu, G. B., Dong-Ming, M., Chen, J. L., Ma, L. Q., Wang, H. and Li, G. F. (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Report 28: 1127-1135.

Rhee, S., Hwa-Young, C. and Sung-Yong, H. (2010) Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas Nakai* following elicitation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 101: 295-302.

Schmitt, O. (2006) Wood and tree fungi: Biology damage protection and use. Springer-Verlag, Berlin.

Shams Ardakani, M., Hemati, S. and Mohagheghzadeh, A. (2005) Effect of elicitors on the enhancement of podophyllotoxin biosynthesis in suspension culture of *Linum album*. Daru 13: 56-60.

Singleton, V. L. and Rossi, J. R. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Suzuki, S. and Umezawa, T. (2007) Biosynthesis of lignans and norilignans. Journal of Wood Science 53: 273-284.

Vasconsuelo, A. and Boland, R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science 172: 861-875.

Wen, P. F., Chen, J. Y., Wan, S. B., Kong, W. F., Zhang, P. and Wang, W. (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. Journal of Plant Growth Regultor 55: 1-10.

Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E. and Palazon, J. (2010) Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. Biotechnology Letters 32: 1739-1743.

Yu, Z., Fu, C. X., Li, Y. and Zhao, D. X. (2006) Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnology Letter 8: 1027-1031.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

Archive of SID

www.SID.ir

Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture

Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi [1,2], Mozafar Sharifi [2]*, Naser Safaie [3] and Mehrdad Behmanesh [4]

[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.
[3] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4] Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Podophyllotoxin (PTOX) is a lignan compound which occurs in a few plant species and has pharmacological significance for its anticancer activities. *Linum album,* one of endemic species in Iran, has PTOX and other lignans. Chitin and Chitosan are the main compounds of fungal species and as biotic elicitors could be used to improve secondary metabolites. In this study, we investigated the different concentration effects of chitin and chitosan on cell growth, PTOX and lariciresinol production in *l. album* cell culture. Next, we evaluated the effecr of optimal concentration of chitosan on lignan, phenol, flavonoid, flavonol and lignin content at different times. Treatment of *L. album* cell cultures with the 100 mg/L chitosan increased the production of PTOX and lariciresinol about two times higher than contol. In addition, Chitosan increased phenol, flavonoid and flavonol. Lignin was increased 2-fold higher than the control in response to chitosan. To study mechanism of chitosan action, phenylalanine ammonio-lyase (PAL) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) activity were investigated. The activity of PAL and CAD enzymes involved in the first steps of the PTOX biosynthesis was activated by chitosan, reaching a peak within three days after treatment. Chitosan regulated the production of PTOX, lariciresinol and phenylpropanoid compounds by effecting on enzymes activity through PTOX biosynthesis pathway.

Key words: Chitosan, Lignan, *Linum album*, Podophyllotoxin

* Corresponding Author: msharifi@modares.ac.ir

www.SID.ir