بررسی مقایسه ای اثر عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *Piriformospora indica* بر تولید ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین کتان سفید(*Linum album*)

حنانه تشکری میانرودی[۱]، محسن شریفی[۱*]، نجمه احمدیان چاشمی[۲]، ناصر صفایی[۳] و مهرداد بهمنش[۴]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[۲] بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌های گیاهی

[۴] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۳

ONLINE FIRST

چکیده

لیگنان‌ها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی باارزش می‌باشند که در بسیاری از گیاهان از جمله خانواده کتان (Linaceae) وجود دارند. در تحقیق حاضر، اثر نسبت‌های مختلف عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *Piriformospora indica* بر تولید ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین کتان سفید (*Linum album*) مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار لیگنان‌های لاریسی‌رسینول، پینورسینول، پودوفیلوتوکسین و ۶–متوکسی پودوفیلوتوکسین در ریشه‌های موئین به وسیله HPLC اندازه‌گیری شد. همچنین، در راستای درک سازوکار تازن‌های قارچی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین و ۶–متوکسی پودوفیلوتوکسین تحت تاثیر نسبت ۱ درصد محیط کشت قارچی به ترتیب ۲۴۸/۹ میکروگرم و ۵۹/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و لاریسی‌رسینول و پینورسینول در نسبت‌های ۱ و ۰/۵ درصد عصاره سلولی به ترتیب به میزان ۱۴۴/۶۸ و ۷۲/۶۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان فنل کل، فلاوونوئیدها و لیگنین تحت تاثیر نسبت ۵ درصد و فلاونول در نسبت ۱ درصد محیط کشت فارچی اندازه‌گیری شد که به ترتیب ۴/۳،۶/۳، ۱/۶ و ۲/۱ برابر نسبت به ریشه‌های شاهد افزایش یافتند. علاوه بر آن، فعالیت آنزیم PAL با افزایش عصاره سلولی و محیط کشت قارچی در ریشه‌های مویین افزایش یافت و بالاترین فعالیت آن در ریشه‌های موئین تیمار شده با عصاره سلولی و محیط کشت قارچی به ترتیب در نسبت‌های ۱ و ۵ درصد (v/v) مشاهده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده، محیط کشت قارچی تاثیر بیشتری بر تولید ترکیبات فنلی بخصوص لیگنان‌ها داشته است.

واژه های کلیدی: ریشه موئین، کتان سفید، لیگنان،محیط کشت قارچ، *Piriformospora indica*

* نویسنده مسئول، تلفن:۸۲۸۸۴۴۷۹ ، پست الکترونیکی: msharifi@modares.ac.ir

مقدمه

لیگنان‌ها شامل گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانوی گیاهی هستند که از دو واحد فنیل پروپانوئیدی مشتق شده‌اند و به علت داشتن خاصیت ضد میکروبی و ضد ویروسی در درمان بسیاری از بیماری‌ها اهمیت دارند (۹). پودوفیلوتوکسین و مشتقات آن، یکی از مهم ترین انواع لیگنان‌ها می‌باشند که به عنوان ماده اولیه برای تولید برخی از داروهای ضد سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه در حال حاضر ترکیبات لیگنانی از گونه‌های جنس در حال انقراض *Podophyllum* استخراج می‌شوند، اما در سال‌های اخیر کتان سفید (*Linum album*) به عنوان گونه

Archive of SID

www.SID.ir

بومی ایران، به منبع جایگزینی برای این ترکیبات تبدیل شده است (۱۲ و ۳۱). مسیر بیوسنتزی این ترکیبات از مسیر فنیل پروپانوئیدی مشتق می شود. مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدی یک مسیر متابولیسمی مهم است و در بیوسنتز طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانوی گیاهی از جمله آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، لیگنین‌ها و لیگنان‌ها نقش دارد (۲۶). القاء مسیر فنیل پروپانوئیدی از ویژگی‌های عمومی پاسخ‌های دفاعی گیاهان به تنش‌های پاتوژنی محسوب می‌شود (۶). با توجه به این که سنتز شیمیایی پودوفیلوتوکسین مقرون به صرفه نیست، تولید آن با کشت سلول و اندام و همچنین استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی راه جایگزین و سودمندی است (۲۳). از آنجایی که کشت‌های تعلیقی از نظر ژنتیکی پایدار نیستند، روش‌های جدیدی برای بهبود تولید لیگنان‌ها دنبال می‌شود. کشت ریشه‌های موئین با استفاده از تراریخته کردن ژنتیکی بافت گیاهی با *Agrobacterium rhizogenes* به دست می‌آید و مزایای فراوانی از جمله رشد سریع بدون استفاده از هورمون‌های گیاهی، پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی و تولید زیادی از متابولیت‌ها را دارد (۱۳). از طرف دیگر سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانوی درگیاهان پاسخی عمومی به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشد، بنابراین، ترکیبات تازن با منشأ زیستی و یا غیرزیستی می‌تواند یکی از راهکارهای موثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی از طریق القای سیستم دفاعی در کشت‌های درون شیشه باشد (۲۴). در بین تازن‌های زیستی، تازن‌های قارچی منجر به افزایش چشمگیر تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی در کشت بافت گیاه می‌شوند (۲۱). در مطالعات گذشته ما، تاثیر القایی عصاره سلولی و محیط کشت فیلتر شده *Fusarium graminearum* بر تولید و تجمع لیگنان‌ها در کشت سلول کتان سفید نشان داده شد (۱۰، ۱۱و ۲۷). در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلفی از عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *Piriformospora indica* بر تولید برخی از لیگنان‌های مهم بررسی می‌شود و پس از آن، میزان ترکیباتی که مسیر بیوسنتزی مشترکی با لیگنان‌ها دارند از جمله لیگنین و سایر ترکیبات فنلی مطالعه می‌شود. همچنین تأثیر این تازن‌ها بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز (PAL) به عنوان اولین آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها در ریشه‌های موئین کتان سفید سنجش می‌شود.

مواد و روشها

القای تولید ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم: بذر-های کتان سفید از منطقه سوهانک با مختصات جغرافیایی N ۱۹ ً ۴۸ َ ۳۵° ، E ۲۲ ً ۳۲ َ ۵۱° جمع آوری شد. دانه‌ها پس از شستشوی سطحی ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، سپس ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳ درصد و در مرحلهٔ آخر یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. پس از آن با آب مقطر سترون آبکشی شدند و در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962)کشت داده شدند (۲۰). بذرها به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و از قطعات برگی گیاهچه‌های حاصل برای ایجاد ریشه‌های موئین استفاده شد (۱). ریشه‌های موئین با استفاده از *Agrobactrium rhizogenes* سویه LBA9402 تولید و تائید مولکولی آن‌ها توسط بررسی بیان ژن‌های دخیل در ایجاد ریشه موئین انجام شد (۱). ریشه‌ها به وزن ۲ گرم، به منظور اعمال تیمار، در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط پایه MS کشت و در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند (۱).

تهیه تیمارهای قارچی: به منظور تهیه تیمارهای عصاره سلولی و محیط کشت قارچی *P. indica* ابتدا این قارچ در محیط سترون شده PDB (Potato Dextrose Broth) (۱۹) کشت داده شد. سپس محیط کشت و زی توده قارچی در انتهای فاز لگاریتمی (روز هفتم پس از کشت) جمع آوری

Archive of SID

www.SID.ir

شد. ذی توده قارچی با عبور از کاغذ صافی جدا و جهت تهیه عصاره سلولی مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت آن با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه برای حذف ذرات اضافی سانتریفوژ و با استفاده از فیلترهای میلی پور ۰/۲ میکرونی، سترون شد.

عصاره سلولی نیز با استفاده از زی توده قارچی، بر اساس روش Baldi و همکاران (۲۰۰۹) آماده شد (۵). به طور خلاصه، ۱۲/۵ میلی گرم از میسیلیوم ها با آب مقطر سترون شسته و با استفاده از نیتروژن مایع ساییده شدند. سپس در آب مقطر حل و محلولی با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. محلول حاصل به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، محلول رویی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد و به عنوان تازن عصاره قارچی مورد استفاده قرار گرفت.

اعمال تیمارهای مورد نظر به کشت ریشه های موئین: مقدار ۲ گرم از ریشه‌های موئین به ارلن‌های ۱۰۰ میلی-لیتری محتوای ۳۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع منتقل شدند و در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. سپس در روز دهم از کشت ریشه‌ها (ابتدای فاز لگاریتمی رشد آن‌ها) عصاره سلولی و محیط کشت قارچی به طور جداگانه، در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)، به محیط کشت ها اضافه شدند و اثر آنها پس از گذشت ۵ روز از اعمال تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه گیری رشد ریشه‌های موئین: رشد ریشه‌ها با اندازه-گیری وزن خشک آنان تعیین گردید. ریشه‌ها توسط نایلون مش (۴۲ میکرومتری) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش از محیط کشت جدا شدند.ریشه‌ها بلافاصله پس از جداسازی از محیط کشت وزن (وزن تر) و در ادامه به منظور تعیین وزن خشک، لیوفیلیز شدند.

استخراج و سنجش لیگنان‌ها: ۵۰ میلی گرم ریشه خشک شده با چهار میلی لیتر متانول ۸۰ درصد کاملا ساییده و همگن شدند. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولترا سونیک قرار گرفت و در ادامه حجم مساوی از آب و اتیل استات به آن افزوده شد و سانتریفوژ گردید. سپس فاز اتیل استات به تیوب جدید منتقل گردید و تبخیر شد. در انتها، رسوب خشک شده در یک میلی لیتر متانول حل و به مدت ۱۰ دقیقه در۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای بررسی محتوای لیگنان‌ها از دستگاه HPLC (Agilent Technologies 1260 infinity, USA) استفاده شد. برای بخش متحرک دستگاه که شامل استونیتریل و آب بود، از سیستم گرادیان مطابق جدول ۱ استفاده شد. ستون مورد استفاده C18-ODS3 دارای طول ۲۵۰ میلی متر و قطر ۴/۶ میلی متر بود. جذب این ترکیبات با استفاده از دتکتور UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. حضور هر یک از لیگنان‌های پودوفیلوتوکسین، لاریسی‌رسینول، پینورسینول و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین به کمک کروماتوگرافی مایع و طیف سنجی جرمی (LC/MS) قبلاً تأیید شد (۱و ۱۱). مقدار لیگنان‌ها بر اساس سطح زیر منحنی موجود از استاندارد هر یک از آنها محاسبه شد.

جدول۱- مشخصات برنامه جریان و گرادیان دوره متحرک مورد استفاده در HPLC برای سنجش مقادیر لیگنان‌ها

آب	استونیتریل (٪)	جریان (میلی لیتر در دقیقه)	زمان (دقیقه)
۶۰	۴۰	۰/۸	۰
۳۳	۶۷	۰/۸	۱۰
۶۰	۴۰	۰/۸	۱۷
۶۰	۴۰	۰/۸	۲۱

تعیین محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فلاوونول کل: جهت تهیه عصاره متانولی، ۰/۵ گرم از ریشه‌های منجمد شده در هشت میلی لیتر متانول۸۰ درصد همگن و به مدت سه ساعت در حمام آب گرم، دمای۷۰ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شدند. همگنای حاصل با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شد. از عصاره متانولی

Archive of SID

www.SID.ir

بدست آمده جهت سنجش فنل کل، فلاوونوئید کل و فلاوونول کل استفاده گردید.

سنجش فنل کل به روش فولین دنیس انجام شد (۷). برای سنجش فنل سه میلی لیتر از عصاره متانولی موجود خشک، و رسوب حاصل در یک میلی لیتر آب بدون یون، حل شد. سپس به عصاره آبی، دو میلی لیتر معرف فولین دنیس اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از پنج دقیقه دو میلی لیتر محلول سدیم کربنات هفت درصد اضافه شد. حجم نهایی با آب بدون یون، به ۱۲/۵ میلی لیتر رسانده و جذب بعد از ۱۰دقیقه در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. منحنی جذب غلظت های مختلف گالیک اسید نیز به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور سنجش محتوای فلاونول، به یک میلی لیتر از عصاره متانولی یک میلی لیتر از محلول کلریدآلومینیوم دو درصد و سه میلی لیتر از محلول استات سدیم ا پنج درصد اضافه گردید. محتوای فلاوونول کل براساس منحنی استاندارد روتین و در طول موج ۴۴۵ نانومتر اندازه گیری شد (۲).

سنجش فلاونوئید کل نیز براساس منحنی استاندارد روتین در طول موج ۴۱۵ نانومتر سنجیده شد. به این منظور، به یک میلی لیتر از عصاره متانولی، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (۲).

در تمام موارد، مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل و فلاوونول کل برا اساس میلی گرم بر گرم وزن خشک محاسبه گردید.

سنجش و اندازه گیری لیگنین: محتوای لیگنین با استفاده از معرف استیل بروماید (Iiyama and Wallis, 1988) تعیین گردید (۱۵). به طور خلاصه ۰/۵ گرم از سلول‌های فریز شده در ۱۲ میلی لیتر آب مقطر ساییده شد. بعد از سانتریفوژ به رسوب حاصل به نسبت چهار برابر نمونه، اتانول مطلق اضافه گردید بعد از سانتریفوژ به رسوب اتانول اضافه شد و دوباره سانتریفوژ گردید. سپس به مدت یک شب نمونه‌ها درمخلوط متانول و کلروفروم قرار داده شدند و سپس به آنها استون اضافه گردید و در نهایت پودر خشک دیواره به دست آمد. پودرهای خشک شده به وسیله الک ۲۵۰ میکرونی صاف شدند. به شش میلی گرم پودر خشک دیواره سلولی، ۲/۵ میلی لیتر استیل بروماید ۲۵ درصد اضافه و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از آن از حمام آب یخ به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس نمونه‌ها به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. در ادامه ، به بخش مایع، پنج میلی لیتر هیدروکسید سدیم دو نرمال و شش میلی لیتر اسید استیک گلایسیال اضافه گردید و در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. مقدار لیگنین موجود بر اساس درصد آن در وزن خشک دیواره محاسبه شد.

تعیین فعالیت فنیل آلانین آمونیا-لیاز (PAL): به منظور استخراج عصاره پروتئینی، یک گرم از ریشه موئین کتان سفید در دو میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH ۸ =)، دارای یک گرم پلی وینیل پیرولیدون کاملا سائیده شد تا به حالت همگن در آمد. غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد (۸). برای سنجش فعالیت PAL، به ۱۵۰میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۰/۱ مولار در بافر پتاسیم فسفات (pH = ۸) و ۶۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات بافر ۰/۱ مولار (pH = ۸) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl (۶ مولار) برای غیر فعال کردن آنزیم، به مخلوط اضافه شد. شستشوی نمونه با پنج میلی لیتر از استات اتیل انجام شد. محلول استات اتیل در معرض جریان هوا تبخیر شد. رسوب حاصل در یک میلی لیتر از هیدروکسید سدیم (۰/۰۵ مولار) حل و جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد.. فعالیت آنزیم PAL به

Archive of SID

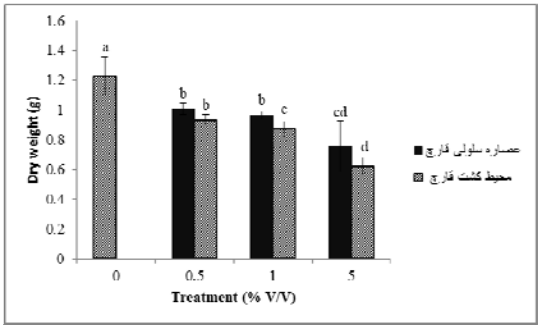
www.SID.ir

کمک استاندارد سینامیک اسید، بر حسب واحد آنزیمی میکرومول سینامیک اسید بر گرم پروتئین بر دقیقه تعیین شد (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه آزمایشها با حداقل سه تکرار مستقل انجام گرفت. آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۱) و آزمون دانکن جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت ها در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

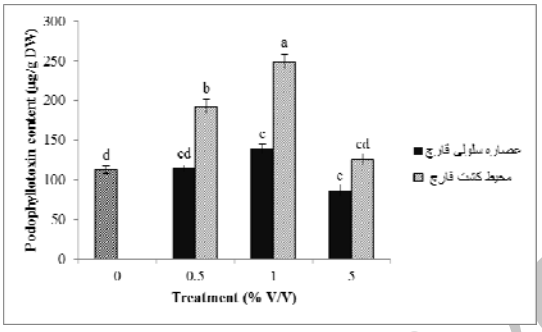
نتایج

اثر تازن‌های قارچی بر رشد ریشه‌های موئین: اثر نسبت-های مختلف عصاره سلولی و محیط کشت قارچ بر رشد ریشه‌های موئین با اندازه‌گیری وزن خشک پس از گذشت ۵ روز بررسی شد (شکل ۱). نتایج نشان داد رشد ریشه‌ها تحت تاثیر غلظت-های بیشتر هر دو تازن عصاره سلولی و محیط کشت قارچی به طور معنی داری کاهش یافت. و این کاهش در ریشه‌های تحت تیمار با محیط کشت قارچی بیشتر بوده است.

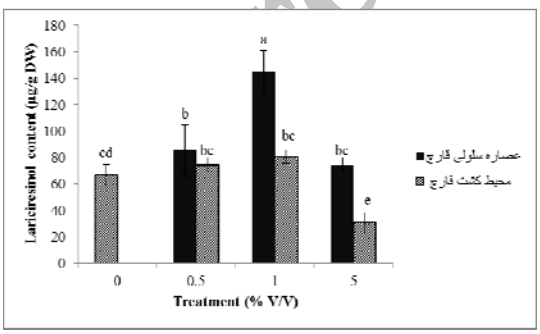


شکل ۱- وزن خشک ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده‌ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵) است.

اثر تازن‌های قارچی بر میزان لیگنان‌ها: نتایج بررسی لیگنان‌ها در سطوح مختلف تیمارها نشان داد که بیشترین مقدار تولید پودوفیلوتوکسین، لاریسی رسینول، و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین در نسبت ۱ درصد هر دو تازن بدست آمد (شکل ۲،۳ و ۵) و بیشترین مقدار پینورسینول در نسبت ۰/۵ درصد عصاره قارچی و نسبت ۱ درصد محیط کشت قارچی اندازه گیری شد (شکل۴). در بین تازن‌های قارچی مورد بررسی، بیشترین مقدار تولید پودوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین مربوط به ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۱ درصد محیط کشت قارچی، به ترتیب به میزان ۲/۲ و ۱/۷ برابر نسبت به نمونه-های شاهد بود در حالیکه عصاره سلولی باعث القا بیشترین میزان لاریسی رزینول و پینورزینول به ترتیب به میزان ۲/۱ و ۱/۷ برابر نمونه‌های شاهد شد.



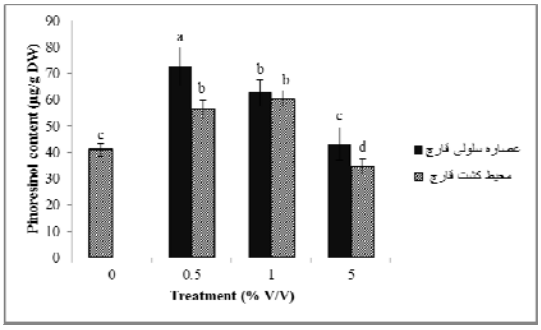
شکل ۲- محتوای پودوفیلوتوکسین در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵) است.



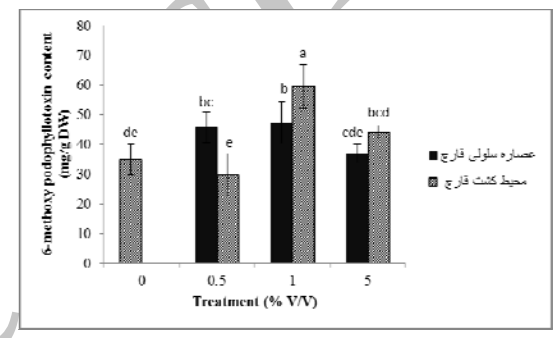
شکل ۳- محتوای لاریسی رسینول در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵) است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- محتوای پینورزینول در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq$ ۰/۰۵) است.



شکل ۵- محتوای ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل ۳ تکرار، میله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq$۰/۰۵) است.

اثر تازن‌های قارچی بر محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فلاوونول کل: نتایج آنالیز واریانس میزان فنل کل نشان داد که رابطه مستقیمی بین تولید ترکیبات فنلی با افزایش نسبت تازن‌ها در محیط کشت ریشه وجود دارد به طوری که با افزایش نسبت تازن‌های قارچی، محتوای فنل کل در ریشه های موئین افزایش یافت (جدول ۲و ۳). بیشترین مقدار فنل کل در ریشه‌های تیمار شده با محیط کشت قارچی، حدود ۱/۰۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد که ۳/۳ برابرمقدار اندازه گیری شده در نمونه‌های شاهد بود (جدول۳). مقدار فلاوونول کل نیز در ریشه‌های تیمار شده در هر دو تازن با افزایش غلظت، نسبت به شاهد افزایش معنی داری را نشان داد (جدول ۲ و۳) و در ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۵ درصد عصاره سلولی قارچ بیشترین میزان فلاونول، در حدود۰/۰۱۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد (جدول۲). در حالیکه در ریشه-های تیمار شده با محیط کشت قارچی بشترین میزان فلاوونول‌ها به میزان ۰/۰۱۶۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک در نسبت ۱ درصد اندازه گیری شد که در بین مقادیر فلاوونول کل دو تیمار قارچی، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد (جدول ۳).

جدول۲- محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فلاونول کل و لیگنین در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی قارچ *P. indica* در نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵ ، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq$۰/۰۵) است.

متابولیت / نسبت عصاره سلولی قارچ	فنل کل (mg/g DW)	فلاونوئید کل (mg/g DW)	فلاونول کل (mg/g DW)	لیگنین (% cell wall DW)
۰	۰/۳۲ ±۰/۰۱۴ c	۰/۰۰۶۸ ±۰/۰۰۰۲۵ c	۰/۰۰۷۹ ± ۰/۰۰۰۵ bc	۱۱/۷۳ ±۰/۳ d
۰/۵	۰/۳۳ ±۰/۰۰۸ bc	۰/۰۰۷ ±۰/۰۰۰۲ c	۰/۰۰۹۶ ± ۰/۰۰۰۲۷ b	۱۳/۸ ±۰/۳۶ c
۱	۰/۳۶ ±۰/۰۲۳ b	۰/۰۱۶ ±۰/۰۰۱۷ a	۰/۰۱۲ ± ۰/۰۰۱۸ a	۱۴/۶۳ ±۰/۴ b
۵	۰/۷۳ ±۰/۰۴۸ a	۰/۰۰۹ ±۰/۰۰۱۳ b	۰/۰۱۳ ± ۰/۰۰۱ a	۱۶/۶۳ ±۰/۵ a

Archive of SID

www.SID.ir

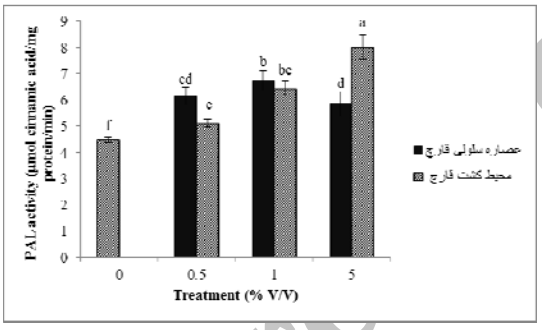
جدول۳- محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فلاونول کل و لیگنین در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با محیط کشت قارچ *P. indica* در نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵ ، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده‌ها حاصل ۳ تکرار، میله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵) است.

متابولیت / نسبت محیط کشت قارچ	فنل کل (mg/g DW)	فلاونوئید کل (mg/g DW)	فلاونول کل (mg/g DW)	لیگنین (% cell wall DW)
۰	۰/۳۲ ±۰/۰۱۴ cd	۰/۰۰۶۸ ±۰/۰۰۰۲ cd	۰/۰۰۷۹ ± ۰/۰۰۰۵ c	۱۱/۷۳ ±۰/۳ d
۰/۵	۰/۴۳ ±۰/۰۴۹ c	۰/۰۰۷۴ ±۰/۰۰۰۵ c	۰/۰۰۸۱ ± ۰/۰۰۱۱ c	۱۴/۲۶ ±۰/۳۵ c
۱	۰/۸۴ ±۰/۰۵۱ ab	۰/۰۱۱۴ ±۰/۰۰۲۶ b	۰/۰۱۶۷ ± ۰/۰۰۳۳ a	۱۶/۴۳ ±۰/۴۵ b
۵	۱/۰۷ ±۰/۱۸۵ a	۰/۰۳۱۸ ±۰/۰۰۳۸ a	۰/۰۱۲۴ ± ۰/۰۰۰۷ b	۱۹/۴۳ ±۰/۳۵ a

آنالیز واریانس محتوای فلاونوئید کل نشان داد که مقدار این ترکیبات نیز در ریشه‌های تیمار شده با هر دو تازن قارچی همانند ترکیبات فنلی دیگر افزایش معنی داری نسبت به شاهد یافت. اگرچه بیشترین مقدار فلاونوئید کل در ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۵ درصد محیط کشت سلولی، حدود ۰/۰۳۱۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد (جدول۳)، اما نسبت ۱ درصد عصاره سلولی نیز افزایش معنی داری در مقدار این ترکیب در ریشه‌ها در حدود ۰/۰۱۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک نشان داد (جدول۲). با توجه به نتایج بدست آمده، بنظر میرسد تازن محیط کشت قارچی تاثیر بیشتری را بر مقادیر ترکیبات فنلی نسبت به محیط کشت سلولی قارچ داشته است.

اثر تازن‌های قارچی بر میزان لیگنین: نتایج بررسی میزان لیگنین در ریشه‌های کتان سفید نشان داد که پس از گذشت ۵ روز از اعمال تازن‌های قارچی محتوای لیگنین کل در هر دو تیمار به طور معنی داری با افزایش غلظت تازن‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت، به طوری که میزان لیگنین کل در ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۵ درصد دو تیمار عصاره سلولی و محیط کشت قارچی به ترتیب به مقدار ۱۶/۶۳ و ۱۹/۴۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد (جدول ۲و ۳).

اثر تازن‌های قارچی بر فعالیت آنزیم PAL: بررسی نتایج فعالیت آنزیم PAL نشان داد تازن‌های قارچی در سطوح مختلف باعث افزایش معنی داری در فعالیت این آنزیم در ریشه‌های موئین شدند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۱ درصد عصاره سلولی و و نسبت ۵ درصد محیط کشت قارچی به ترتیب ۱/۵ و ۱/۸ برابر بیشتر از ریشه‌های شاهد اندازه‌گیری شد نتایج مشخص کرد که میزان فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر محیط کشت قارچی بیشترین تغییرات را داشته است (شکل ۶).



شکل ۶- فعالیت آنزیم فنیل آمونیالیاز (PAL) در ریشه‌های موئین کتان سفید، ۵ روز پس از تیمار با عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P. indica* با نسبت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۵ درصد (v/v)). داده ها حاصل ۳ تکرار، میله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵) است.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، اثر عصاره سلولی و محیط کشت قارچ *P.indica* بر رشد و تولید ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین کتان سفید بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره سلولی و محیط کشت قارچ در سطوح بیشتر ، منجر به

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش رشد ریشه‌های موئین می‌شود. مطالعات متعدد نشان می‌دهد تازن‌های قارچی باعث مهار رشد سلول‌های گیاهی می‌شوند (۴ و ۱۸). کاهش رشد سلول تحت تاثیر تازن‌های قارچی به‌دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم ثانوی می باشد (۲۹). در کتان زراعی (*L. usitatissimum*) نیز تحت تازن‌های قارچی بعد از ۵ روز زنده مانی به میزان ۵۰- ۳۰ درصد نسبت به سلول‌های شاهد کاهش نشان داده است (۱۴). مطالعات گذشته نشان داده است که سطح تازن اهمیت زیادی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری بر شدت پاسخ است (۲۱). به طور مثال گزارش‌ها نشان می دهد که غلظت زیاد تازن قارچی *Rhizopus stolinofer* (۵۰ میلی گرم در لیتر) در کشت سلول *Tobacco baccata* منجر به بیشترین میزان مرگ سلول ها و کمترین مقدار تاکسول شد، در حالی که غلظت کم آن (۲۵ میلی گرم در لیتر) منجر به تولید بیشترین مقدار تاکسول و کمترین میزان مرگ و میر سلول‌ها شده است (۱۷). در این تحقیق نسبت ۱ درصد (v/v) عصاره سلولی و محیط کشت قارچی بیشترین تاثیر افزایشی را بر مقدار پودوفیلوتوکسین و لاریسی رسینول و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین در ریشه-های موئین نشان داد و این در صورتی است که در این غلظت میزان رشد ریشه‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری داشته است. همچنین محیط کشت قارچی در نسبت ۱ درصد (v/v) نسبت به عصاره سلولی قارچ تاثیر بیشتری بر افزایش تولید لیگنان‌ها نشان داد. در سال‌های اخیر نیز گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکه نسبت ۱ درصد عصاره قارچی و محیط کشت قارچ *F. graminearum* بیشترین تاثیر افزایشی را بر میزان پودوفیلوتوکسین در سلول‌های کتان سفید داشته است (۱۱ و ۲۷). Hano و همکاران نیز گزارش کردند نسبت ۳ درصد (v/v) عصاره سلولی قارچ‌های *Botrytis cinerea*، *Phoma exigua* و *F. oxysporum* به طور متمایزی باعث القای تولید ترکیبات مونولیگنولی در سلول‌های کتان زراعی می‌شوند (۱۴). همچنین Baldi و همکاران (۲۰۱۰) و Kumar و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه جدا، تاثیر غلظت-های مختلف محیط کشت فیلتر شده قارچ *P. indica* بر سلول‌های ترانسفورم شده کتان سفید بررسی کردند و نشان دادند که به ترتیب نسبت‌های ۱ و ۳ درصد محیط کشت بیشترین تاثیر را بر تولید لیگنان‌ها دارد (۴ و ۱۸). مقداری از تازن قارچی که ریشه‌ها در معرض آن قرار می‌گیرند می تواند نقش مهمی در تولید بیشتر لیگنان‌ها داشته باشد. کاهش لیگنان‌ها در ریشه‌های تیمار شده با نسبت ۵ درصد عصاره سلولی و محیط کشت قارچی بعد از گذشت ۵ روز در مقایسه با ریشه‌های شاهد، ممکن است به دلیل تبدیل این ترکیبات به ترکیبات فنلی دیگر از جمله فنولیک اسید-ها و لیگنین‌ها باشد (۲۸). تازن‌های حاصل از ترکیبات قارچی بسیار پیچیده هستند و شامل پروتئین‌ها، اولیگو ساکاریدها، گلیکو پروتئین‌ها، پپتید ها، کیتین و کیتوزان می‌باشد (۲۵). به نظر می‌رسد این ترکیبات نقش القا کننده-ایی درتولید و تجمع متابولیت‌های ثانوی داشته باشند. اثرات خاص تازن‌های قارچی در ارتباط با بر همکنش ویژه قارچ با سلول گیاهی و همچنین مسیر ترارسانی علامت مربوطه و به دنبال آن پاسخ‌های دفاعی سلول گیاهی متناسب با هر قارچ متفاوت می‌باشد (۱۶). شناسایی ترکیبات فعال عصاره سلولی و محیط کشت قارچی به درک مکانیسم برهمکنش تازن‌های قارچی با سلول های گیاهی و به دنبال آن پاسخ‌های دفاعی گیاه کمک خواهد کرد.

ترکیباتی فنلی دیگری نیز از مسیر فنیل پروپانوئیدها در پاسخ به تازن‌های زیستی تولید می‌شوند (۳). در این مطالعه میزان فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها تحت تاثیر نسبت‌های مختلف عصاره سلولی و محیط کشت قارچی در مقایسه با شاهد روندی افزایشی داشت. این افزایش تایید کننده پاسخ‌های دفاعی ریشه‌های کتان سفید نسبت به حضور تازن می باشد. لیگنین یکی دیگر از ترکیباتی است که نقش دفاعی دارد و گیاه در پاسخ به استرس‌های محیطی میزان آن را افزایش می‌دهد (۲۵). افزایش لیگنین و سایر

Archive of SID

www.SID.ir

ترکیبات فنلی تحت تاثیر تازن‌های قارچی در کشت سلول کتان زراعی و محیط کشت فیلتر شده قارچ بر گیاه کتان سفید نیز گزارش شده است (۴ و ۱۴). نتایج بررسی ما نیز نشان داد که مقدار لیگنین در پاسخ به تازن‌های قارچی افزایش یافت.

به منظور درک رابطه بین تازن‌های قارچی و افزایش ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم PAL به عنوان اولین آنزیم تنظیم کننده کلیدی مسیر فنیل پروپانوئیدی بررسی شد. آنزیم PAL که آغاز کننده نخستین مرحله از مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها می باشد، پل ارتباطی بین متابولیت‌های اولیه و برخی از متابولیت‌های ثانوی می‌باشد. افزایش فعالیت PAL و دیگر آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی که منجر به افزایش ترکیبات فنلی می‌شود، از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش و در پاسخ به تازن‌های قارچی می‌باشد (۳۰). در مطالعه حاضر نیز افزایش میزان فعالیت این آنزیم تحت تاثیر تازن‌های قارچی مشاهده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده، به‌نظر می‌رسد نسبت ۱ درصد هر یک از تازن‌های قارچی را می‌توان به عنوان غلظت منتخب جهت افزایش تولید لیگنان‌ها به‌خصوص پودوفیلوتوکسین، لاریسی رزینول و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین انتخاب نمود.

بطور کلی نتایج نشان داد که محیط کشت قارچی نسبت به عصاره سلولی قارچی تاثیر بیشتری بر مقدار تولید ترکیبات مسیر فنیل پروپانوئیدی بخوص لیگنان‌ها داشته است و این تاثیر القایی ممکن است به دلیل حضور برخی از متابولیت-های آزاد شده و خارج سلولی در محیط کشت قارچی در طی دوره رشدی آن باشد (۴ و ۱۸). احتمال می‌رود تنوع در پاسخ ریشه‌های موئین کتان سفید نسبت به تازن‌های مختلف زیستی بدلیل نوع برهمکنش آنها در اطراف جایگاه پاسخ با اجزا مختلف تازن باشد (۴). بنابراین مطالعات بیشتری برای درک بهتری از مکانیسم عمل تازن و ارتباط میان مسیرهای متابولیسمی گیاه، بخصوص بررسی فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز ترکیبات لیگنانی و فنلی مورد نیاز است.

منابع

1- Ahmadian, C.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. Med Chem Res, 22: 745-752.

2- Akkol, E.K., Göge,r F., Kosar, M. and Baser, H.C., 2008, Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophile* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chem, 108: 942-949.

3- 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 Plant Sci, 9: 26-32.

4- Baldi, A., Farkya, S., Jain, A., Gupta, N., Mehra, R., Datta, V., Srivastava, A.K. and Bisaria, V.S., 2010, Enhanced production of podophyllotoxins by co-culture of transformed *Linum album* cells with plant growth-promoting fungi. Pure Appl Chem, 82(1): 227-241.

5- Baldi, A., Srivastava, K. and Bisari, V.S., 2009, Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures. Soil Biol, 18: 373-380.

6- Barz, W. and Mackenbrock, U., 1994, Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpans in chickpea (*Cicer arientinum*) cell-suspension cultures. Plant Cell Tissue Org Cult, 38: 199-211.

7- Boonyuen, C., Wangkarn, S., Suntornwat, O. and Chaisuksant, R., 2009, Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract**.** Kasetsart Journal: Natural Science, 43: 21-27.

8- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.

9- Canel, C., Moraes, R.M., Dayan, F.E. and Ferreira, D., 2000, Molecules of interest: podophyllotoxin. Phytochemistry, 54: 115-20.

10- Esmaeilzadeh, S., Sharifi, M., Ahmadian, C.N., Murata, J. and Satake, H., 2014, Significant

Archive of SID

www.SID.ir

enhancement of lignan accumulation in hairy root cultures of *Linum album* using biotic elicitors. Acta Physiol Plant, 36: 3325-3331.

11- Esmaeilzadeh, S., Sharifi, M., Safaei, N., Murata, J., Araki, R., Yamagaki, T. and Satake, H., 2011, Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnol Rep, 5:367-373.

12- Fuss, E., 2003, Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. Phytochem Rev, 2: 307-320.

13- Georgiev, M.I., Pavlov, A.T. and Bley, T., 2007, Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl Microbiol Biotechnol, 74: 1175-85.

14- 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.

15- Iiyama, K. and Wallis, A., 1988, An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. Wood Sci Technol, 22: 271-280.

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

17- Khosroshahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, M. Naghdibadi , H., Dadpour, M.R. and Omidi, Y., 2005, Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International, 30: 262-269.

18- Kumar, V., Rajauria, G., Sahai, V. and Bisaria, V.S., 2012, Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. Process Biochem, 47: 901-907.

19- Lichtenzveig, J., Anderson, J., Thomas, G., Oliver, R., and Singh, K., 2006, Inoculation and growth with soil borne pathogenic fungi. M. truncatula handbook. 1-10.

20- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. Physiol Plant, 15:473-497.

21- Namdeo, A., Patil, S. and Fulzele, D.P., 2002, Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Prog, 18: 159-62.

22- 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.

23- Sahu, R., Gangopadhyay, M. and Dewanjee, S., 2013, Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. Acta Physiol Plant, 35(5): 1473-1481.

24- Savitha, B.C., Thimmaraju, R. and Bhagyalakshmi, N., 2006, Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production inhairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biochemistry, 41: 50–60.

25- Schmitt, O., 2006, Wood and tree fungi: Biology damage protection and use. Springer-Verlag,Berlin, 2-52

26- Sreelakshmi, Y. and Sharma, R., 2008, Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. Plant Physiol Biochem, 46:444-451.

27- 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*. J Plant Interact, 9(1): 412-417.

28- Tokunaga, N., Sakakibara, N., Umezawa, T., Ito, Y., Fukud, H. and Sato, Y., 2005, Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. Plant and Cell Physiology, 46: 224-232.

29- Wang, C.G. and Wu, J.Y., 2001, Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 404–410.

30- 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.

31- 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 Physiol Biochem, 56: 41-46

Archive of SID

www.SID.ir

Comparative investigation on the effect of *Piriformospora indica* mycelium extract and culture medium on phenolic compounds in *Linum album* hairy roots

Tashackori Mianroudi H.[1], Sharifi M.[1], Ahmadian Chashmi N.[2], Safaie N.[3] and Behmanesh M.[4]

[1] **Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran**

[3] **Plant Pathology Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[4] **Genetic Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Lignans are a large group of important phenolic compounds and synthesized by many plants such as *Linaceae* family. In this research, the effects of different concentrations of mycelium extract and culture medium of *Piriformospora indica* on the levels of phenolic compounds in *L. album* hairy roots were investigated. The amount of lariciresinol, pinoresinol, podophyllotoxin and 6-methoxy podophyllotoxin were also analyzed by HPLC. To study the fungal elicitors' mechanism of action, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity was investigated. Results showed that maximum amounts of podophyllotoxin and 6-methoxy podophyllotoxin were at 1 % (v/v) of fungal medium, 248.9 µg/g and 59.59 mg/g DW, respectively and the highest amounts of lariciresinol and pinoresinol respectively were seen at 1 and 0.5 % (v/v) of mycelium extract, 144.68 and 72.68 µg/g DW. Maximum amounts of total phenol, flavonoid and lignin were analyzed at 5 % (v/v) and flavonol at 1 % (v/v) fungal culture treatments which were 3.3, 4.6, 1.6 and 2.1 -fold greater than those of control. The activity of PAL enzyme was induced by mycelium extract and fungal medium, reaching a peak at 1 % and 5 % (v/v), respectively. Consider to these results, fungal culture medium was more effective than mycelium extract for stimulation of phenolic compound production.

Key words: fungal culture, hairy root, lignan, *Linum album*, *Piriformospora indica*

Archive of SID

www.SID.ir