

نقش کیتوزان در افزایش تولید فلاونوئیدها در کشت ریشه‌های مویین خار مریم (*Silybum marianum*)طاهره حسنلو<sup>۱</sup> Ph.D.، سحر اسکندری<sup>۲</sup> M.Sc.، فرزانه نجفی<sup>۱</sup> Ph.D.

- سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، بخش فیزیولوژی مولکولی، کرج، ایران
- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: thasanloo@abrii.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۷

## چکیده

**هدف:** اثرات غلظت‌های مختلف کیتوزان (با وزن مولکولی کم) به‌عنوان ایسیستور، بر رشد و تولید سیلی‌مارین و شاخص‌های بیوشیمیایی در ریشه‌های مویین گیاه خار مریم بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) به محیط کشت ریشه‌های مویین خار مریم (۳۰ روزه) اضافه شد و نمونه برداری ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار انجام شد. مقدار سیلی‌مارین، فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و میزان  $H_2O_2$  در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** بیشترین وزن خشک ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از اعمال ۱۰ میلی‌گرم کیتوزان در محیط کشت مشاهده شد. تجمع سیلی‌مارین نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای از ۰/۳۷ در نمونه‌های شاهد، به  $1/19 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  در نمونه‌های تیمار شده رسید، که ۱/۴ برابر بیشتر از نمونه‌های کنترل بود. گایاکول پراکسیداز به‌وسیله کیتوزان فعال شد و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار به بیشترین میزان خود رسید ( $21/86 \text{ ODg}^{-1} \text{ FW min}^{-1}$ )، که ۲/۲ برابر بیشتر از کنترل بود. روند افزایشی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا ۹۶ ساعت پس از اعمال ادامه پیدا کرد ( $5/14 \text{ ODg}^{-1} \text{ FW}$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که این ایسیستور، باعث افزایش تجمع سیلی‌مارین می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌ها در نتیجه افزایش مهار رادیکال‌های آزاد اتفاق می‌افتد و مبین واکنش به تنش‌های اعمال شده توسط کیتوزان است.

**واژگان کلیدی:** ایسیستور، فلاونوئیدها، ریشه مویین

## مقدمه

یک گیاه تجمع می‌یابند، قادر به سنتز و تجمع در کشت ریشه‌های موپین نیز می‌باشند (۶).

الیستورها منابع مختلفی از عوامل زیستی یا شیمیایی هستند که می‌توانند سبب تغییرات فیزیولوژیکی در موجود زنده شوند. محرک‌ها در سلول گیاهی سبب ارسال پیام‌های شیمیایی می‌شوند که در نتیجه آن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی را در پی خواهد داشت. محرک‌ها به ترکیبات و دیواره سلولی حمله می‌کنند و در پی پاسخ به پیام محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود و برخی از عوامل نظیر کانال‌های یونی کلسیم، پروتئین‌های متصل شونده به GTP، اسیدی شدن سیتوپلاسم، قلیایی شدن خارج سلول، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال، سالیسیلیک اسید، اکسید نیتریک، تولید جاسمونیک اسید، تولید اتیلن و بیان ژن‌های دفاعی فعال می‌شوند که نتیجه آن تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۷، ۸، ۹ و ۱۰).

از جمله الیستورهای کاربردی می‌توان کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات و کیتوزان را نام برد. متیل جاسمونات موثرترین الیستور برای تولید تاکسول (Taxol) در *Taxus chinensis* و جینسنوئید (Ginsenoside) در *Panax ginseng* می‌باشد (۱۱).

کیتوزان (Chitosan) مشتق اصلی کیتین و فرم داستیل شده آن می‌باشد که در نتیجه داستیلاسیون آلکالین کیتین حاصل می‌شود. همچنین کیتوزان به‌طور طبیعی در برخی از قارچ‌ها تولید می‌گردد که میزان آن بسیار کمتر از میزان کیتین می‌باشد (۱۲ و ۱۳). Vasconsuelo و همکاران (۱۴) نشان دادند، استفاده از کیتوزان به‌عنوان محرک، باعث افزایش تولید آنتراکوئینون در گیاه *Rubia tinctorum* می‌شود. Abdul rahman و همکاران (۱۵)، گزارش کردند که استفاده از محرک کیتوزان سبب افزایش تجمع لیمون و لینالول در کشت سلول گیاه *Citrus Grandis* می‌شود. بر اساس تحقیقات انجام شده توسط Putalun و همکاران (۱۶)، نشان داده شد که کیتوزان باعث افزایش تولید آرتیمیزینین در گیاه *Artemisia annua* L. می‌شود. Falcon-Rodriguez و همکاران (۱۷)، نشان دادند که کیتوزان باعث افزایش فعالیت سه آنزیم دفاعی پراکسیداز، فنیل آلانین آمونوبلیاز و گلوکاناز، در برگ‌ها و ریشه گیاه *Nicotiana tabacum* می‌شود. اسماعیل زاده و همکاران (۱۸) افزایش تولید لیگنان و فنیل پروپانویید را

گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بومی مناطق مدیترانه‌ای است، اما به‌صورت وحشی در اکثر مناطق جهان رویش دارد (۱). این گیاه در بسیاری از مناطق شمالی و غربی ایران مشاهده می‌شود (۲). میوه‌های رسیده گیاه، بخش دارویی آن را تشکیل می‌دهد. گیاه خار مریم چندین قرن به‌عنوان گیاه دارویی در درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است. دانه‌های خشک حاوی ۱ الی ۴ درصد سیلی‌مارین هستند. سیلی‌مارین ترکیبی از سه فلاونولیگنان می‌باشد، که شامل سیلیبین، سیلی دیانین و سیلی کریستین و تاکسی فولین به‌عنوان پیش ساز می‌باشد (۳).

گیاهان دارویی مهم‌ترین منبع تولید دارو هستند. زیست فناوری، ابزار مهمی برای گزینش، ازدیاد و حفظ ژنوتیپ‌های گیاهان دارویی محسوب می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط آزمایشگاهی خصوصاً کشت سوسپانسیون سلولی در گیاهان دارویی زیادی گزارش شده است و بیوراکتورها نقش کلیدی در تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه در بیوتکنولوژی گیاهان دارویی ایفا می‌کنند. همچنین مهندسی متابولیت یک روش بسیار قدرتمند در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۴). کشت ریشه‌های موپین بر پایه آلوده سازی گیاه با *Agrobacterium rhizogenes* در دو دهه اخیر به‌عنوان روشی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه بسیار رایج شده است. متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط ریشه‌های موپین که نتیجه آلوده کردن گیاه توسط *A. rhizogenes* به‌دست می‌آیند، مشابه متابولیت‌های تولید شده در گیاه مادری می‌باشند و مقادیر آن‌ها برابر و یا بیشتر از گیاه مادری است. در طول مراحل آلوده کردن گیاه با *A. rhizogenes* بخشی از DNA تحت عنوان T-DNA که در پلاسمید القا کننده ریشه یا پلاسمید Ri واقع شده است، به سلول‌های گیاهی منتقل می‌کند و در نتیجه ژن‌های در بردارنده این بخش مشابه ژن‌های اندوژن سلول‌های گیاهی تکثیر پیدا می‌کنند (۵).

بزرگ‌ترین مزیت ریشه‌های موپین، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با گیاهان مادری است. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش که در شرایط طبیعی در ریشه سنتز می‌شوند، اغلب در ارتباط با تمایز ریشه هستند و حتی در مواردی متابولیت‌های ثانویه‌ای که فقط در قسمت‌های هوایی

هاون ریخته شد و توسط ازت مایع خرد شد. سپس کیتوزان به‌وسیله ۸۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد در بن ماری و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌خوبی حل شد. کیتوزان پس از هیدرولیز، به‌وسیله یک کیف و پشم شیشه صنعتی، در ارلن حاوی ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد (۴ درجه سانتی‌گراد)، فیلتر شد. در تمام مدت فیلتراسیون، ارلن باید در ظرف حاوی یخ و روی هم زن مغناطیسی قرار گیرد. محلول به‌دست آمده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری شد. بعد از ۲۴ ساعت، محلول را با کاغذ صافی و پمپ خلا فیلتر شد. لایه‌های نقش بسته روی فیلتر، کلئیدهای کیتوزان می‌باشند (۱۳). این رسوب‌ها توسط تیغ اسکالپل جمع‌آوری شده و در درون ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط MS فاقد هورمون ریخته شده و سپس اتوکلاو می‌شود. غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم کیتوزان به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت دارای ریشه‌های موبین ۳۰ روزه اضافه شد. به‌منظور تعیین بهترین غلظت از کیتوزان نمونه برداری ۹۶ ساعت پس از تیمار انجام شد. به جهت تعیین اثر زمان کشت آزمایش با به‌کارگیری بهترین غلظت از کیتوزان تکرار شد و نمونه برداری در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار انجام شد.

#### استخراج و مطالعه کمی و کیفی فلاونولیگنان‌ها از

**ریشه‌های موبین گیاه خارمریم:** ریشه‌های برداشت شده در زمان‌های مورد نظر به‌وسیله کاغذ خشک کن، خشک شدند، در فویل قرار داده شده و در دستگاه فریز درایر در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد (۲۴). چربی زدایی نمونه‌ها توسط پترولیوم بنزن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد، نمونه‌ها در دستگاه فریز درایر خشک شده و جهت عصاره‌گیری از آن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر متانول استفاده گردید و نمونه‌ها به‌مدت ۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری قرار گرفتند. سپس محلول‌های متانولی جهت تغلیظ به دستگاه فریز درایر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، انتقال داده شدند. پودر زرد رنگ حاصله در نتیجه تغلیظ در متانول حل شد و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از رساندن به حجم مورد نظر نمونه‌ها فیلتر شده و جهت بررسی دقیق کمی ترکیبات، به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق شدند (۲۵). اندازه‌گیری سیلی‌مارین توسط دستگاه HPLC (Knauer) شامل پمپ K 1001، دکتور UV (۲۸۰) ۲۸۰

در کشت سوسپانسیون سلولی *Linum album* تیمار شده با کیتوزان و کیتین گزارش نمودند.

یکی از مسیرهای پاسخ دفاعی سلول گیاهی در برابر پاتوژن یا

محرك، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال است. در برخی از کشت‌های سلول گیاهی نشان داده شده است که، ROS موجب تجمع متابولیت‌های ثانویه شده و در برخی دیگر تاثیری ندارد. در برخی از گیاهان پس از تیمار، الیسیتور با میانجی‌گری  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود. ROS شامل یون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل است و به‌وسیله اکسید کردن رنگدانه‌های فتوسنتزی، چربی‌های غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باعث خسارت‌های اکسید کننده می‌شود. بنابراین گیاه نیاز به یک سیستم دفاعی ضد اکسید کننده دارد (۹، ۱۰، ۱۹ و ۲۰).

نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که کشت ریشه‌های موبین گیاه خار مریم قادر به تولید فلاونولیگنان‌ها یا سیلی‌مارین می‌باشد. همچنین مشخص شد که به‌کارگیری الیسیتورهای مختلف موجب افزایش تولید سیلی‌مارین می‌شود (۲۱ و ۲۲). تعیین بهترین الیسیتور به‌عنوان محرك افزایش تولید متابولیت‌ها در شرایط *In vitro* و همچنین ساز و کار اثر آن الیسیتور، دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. لذا این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف کیتوزان (با وزن مولکولی کم) به‌عنوان الیسیتور، بر رشد و تولید سیلی‌مارین در ریشه‌های موبین گیاه خار مریم و نیز فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی مورد استفاده:** ریشه‌های موبین گیاه خارمریم از تحقیق در حال انجام در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد (۲۱).

**کشت ریشه‌های موبین:** به‌منظور کشت ریشه‌های موبین از ریشه‌های ۲۸ روزه، شش قطعه یک سانتی‌متری تهیه شد و در ظروف ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط موراشیچ و اسکوگ (MS) کشت شد (۵ و ۲۳).

**تهیه محلول مادر کیتوزان:** گام اول در آماده‌سازی کیتوزان، هیدرولیز این ماده زیستی می‌باشد. برای همین منظور، مقدار ۲ گرم کیتوزان با وزن مولکولی کم، به‌صورت جداگانه، در داخل

۱۰ میلی لیتر رسانده شد، آب دوبار تقطیر استریل شده به میزان ۴۶۶ میکرولیتر) ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی در یک کووت شیشه‌ای ۱ میلی لیتری ریخته شده و با قرار گرفتن در دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

**سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX):** فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و اسدا (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. فعالیت این آنزیم بر اساس میزان تجزیه شدن  $H_2O_2$  در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی  $cm^{-1}$   $2/8 \text{ mM}^{-1}$  تعیین شد (۲۹). ۸۵۰ میکرولیتر از آسکوربات  $0/5$  میلی مولار به همراه ۱۵۰ میکرولیتر از  $H_2O_2$ ، ۲ میلی مولار را درون کووت ریخته و از آن به عنوان بلنک دستگاه در طول موج ۲۹۰ نانومتر استفاده می‌شود. ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنشی فوق اضافه و فعالیت آنزیم APX در مدت ۱۸۰ ثانیه قرائت شده و منحنی فعالیت آنزیم در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب Abs/min ترسیم شد.

**آنالیز آماری:** داده‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از تست Duncan استفاده شد. آنالیز آماری توسط نرم افزار SAS نسخه ۹٫۱ انجام شد.

## نتایج

### بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان بیوماس ریشه و سیلی‌مارین

شکل ۱، تغییرات وزن خشک و تجمع سیلی‌مارین را ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان (با وزن مولکولی کم)، نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شد، در مقایسه با کشت تیمار نشده (۰/۲۲ گرم)، بیشترین میزان وزن خشک، ۹۶ ساعت پس از تیمار (۰/۴۱ گرم) در کشت‌های تیمار شده با ۱۰ میلی گرم کیتوزان، ثبت شد که ۳/۱۵ برابر شاهد بود. در حالی که مقدار وزن خشک در تیمارهای با غلظت‌های ۵، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب، ۰/۳۸، ۰/۳۹ و ۰/۲۵ گرم، گزارش شد. افزودن کیتوزان با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر، ۹۶ ساعت پس از تیمار، منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان انباشتگی سیلی‌مارین از ۰/۳۷ در نمونه‌های شاهد به ۱/۱۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک در ریشه‌های مویین شد. به طوری که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان

نانومتر)، ستون C18، حلال‌های آب و استونیتریل (۵۰:۵۰)، نرم افزار ChromGate انجام شد. حداقل ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده که به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با جریان یک میلی لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C18 به قطر ذرات ۵ میکرومتر و ابعاد  $4/6 \times 150$  میل متر عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و شناسایی شدند. کل زمان هر تجزیه ۱۰ دقیقه بود. زمان خروج منحنی‌های مربوط به ترکیبات فلاونولیگنان‌ها با سیلی‌مارین استاندارد (سیگما) مقایسه شده و مقادیر هر یک بر اساس منحنی استاندارد سیلی‌بین، محاسبه شد (۲۶ و ۲۷).

### سنجش میزان $H_2O_2$ در ریشه‌های مویین گیاه خسارمریم:

میزان ۰/۰۵ گرم بافت گیاهی خشک شده توسط خشک کن در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد و در خلا وزن شد. نمونه‌ها در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و پودر شد. دو میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار ( $pH = 6/5$ ) به ویال‌های حاوی نمونه پودر شده، اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همگن شد. ویال‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه با دور  $g$  ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی لیتر از فاز رویی برداشته شده و به آن ۳۳۰ میکرولیتر محلول ۲۰ درصد حجمی اسید سولفوریک حاوی ۰/۱ درصد تراکلرید تیتانیوم افزوده شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دور  $g$  ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز رویی جدا شد. میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت شد. با استفاده از فرمول  $A = bc$  غلظت  $H_2O_2$  هر نمونه، محاسبه و بر حسب وزن خشک گزارش شد (۹ و ۱۰).

$$A = \text{جذب خوانده شده توسط دستگاه، (ضریب جذب)} \\ = 1/28 \cdot \mu\text{mol-l-cm}^{-1} \cdot c, H_2O_2, \text{ غلظت, } b \text{ (طول کووت)} = 1 \text{ cm}$$

### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD):

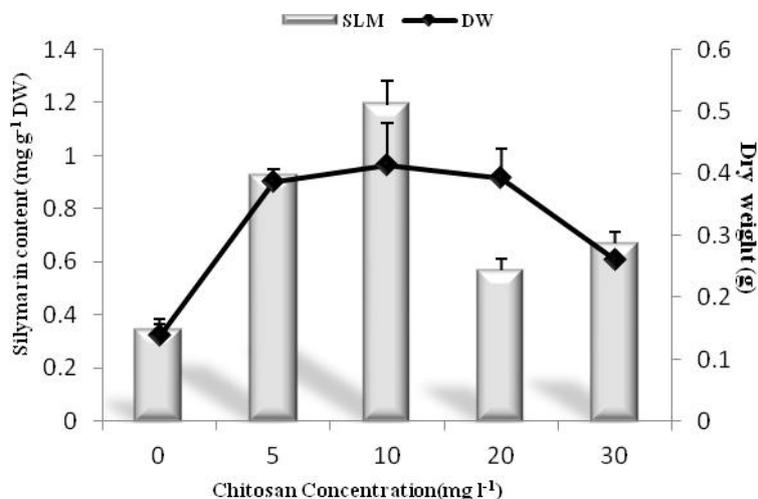
سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش چانس و مهلی (۲۸) اندازه‌گیری شد. به مخلوط واکنشی (بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار  $pH = 7$ ) به میزان ۲۵۰ میکرولیتر، گائیکول (Guaiacol) ۱۰ میلی مولار محلول در آب دوبار تقطیر به میزان ۲۵۰ میکرولیتر (۵۶) میکرولیتر گونیکول به وسیله آب دوبار تقطیر به حجم ۵۰ میلی-لیتر رسانده شد،  $H_2O_2$  ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار ( $pH = 7$ ) به میزان ۳۴ میکرولیتر (۶۰) میکرولیتر به وسیله بافر ۱۰۰ میلی مولار فسفات پتاسیم به حجم

کریستین، سیلی دیانین و تاکسی فولین در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، ۹۶ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۰/۱، ۰/۰۹۲، ۰/۴۸، ۰/۳۴ و ۰/۴۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، مشاهده شدند، که به ترتیب ۵/۵۵، ۴/۶، ۳/۱۱، ۲/۶۱ و ۹/۳۱ برابر شاهد بودند (جدول ۲). هرچند، اثر تحریکی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۹۶ ساعت به تاکسی فولین، سیلیبین و ایزوسیلیبین نسبت داده می‌شوند که به ترتیب ۹/۳، ۵/۵ و ۴/۶ برابر بیشتر از کنترل افزایش نمودند و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد نشان دادند (جدول ۱).

دادند (شکل ۱ و جدول ۱). این در حالی است که میزان سیلی‌مارین در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۵، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، ۹۶ ساعت پس از تیمار، به ترتیب ۰/۹۲، ۰/۵۶ و ۰/۶۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، مشاهده شد.

### تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان

مطالعه بیوسنتز فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان، میزان سیلیبین، ایزوسیلیبین، سیلی



شکل ۱: تغییرات وزن خشک و میزان سیلی‌مارین در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار (SE ±)

جدول ۱: خلاصه جدول تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف تیمار کیتوزان با وزن مولکولی کم (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر برخی صفات در کشت ریشه‌های موپین خارمریم.

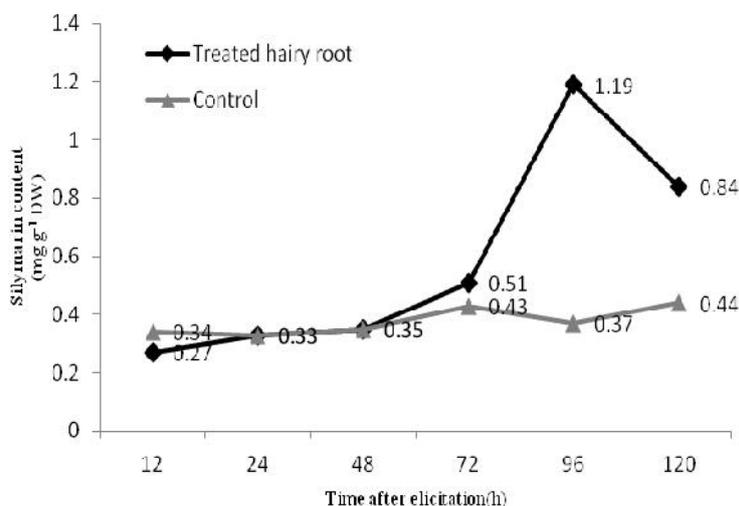
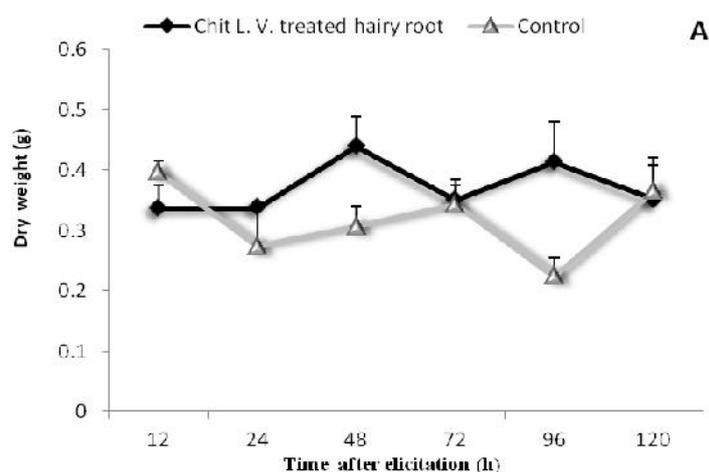
صفات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F	ضریب تغییرات (CV)
وزن خشک	۲۹	۰/۳۱۷۲	۰/۰۱۰۹	۵/۲۶ <sup>ns</sup>	۱۳/۲۱
تاکسی فولین	۲۹	۰/۶۹۹۹	۰/۰۲۴۱	۱/۶۴*	۱۶۵/۶۷
سیلی کریستین	۲۹	۰/۶۶۵۲	۰/۰۲۲۹	۱۲/۰۳**	۲۱/۴۶
سیلی دیانین	۲۹	۰/۳۸۴۵	۰/۰۱۳۲	۱۴/۹۷**	۱۹/۵۵
سیلی بین	۲۹	۰/۰۳۰۴	۰/۰۰۱۰	۱۱/۰۲**	۳۰/۶۴
ایزوسیلی بین	۲۹	۰/۰۲۴۱	۰/۰۰۰۸	۹/۲۳**	۴۱/۵۸
سیلی‌مارین	۲۹	۴/۱۷۵۶	۰/۱۴۳۹	۶۴/۲۳**	۱۰/۲۲
پراکسید هیدروژن	۲۹	۱۲۰/۲۹	۴/۱۴۸۱	۹۱۶/۱۹**	۱/۴۴
آنزیم پراکسیداز	۲۹	۷۱۹/۰۶	۲۴/۷۹۵۴	۵۷۷۵/۶۳**	۰/۵۶۴۲
آنزیم آسکوربات پراکسیداز	۲۹	۷۱/۱۷۱۶	۲/۴۵۴۱	۵۴۲/۰۴**	۱/۷۵۲۵

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار، \* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

تغییرات بیوسنتز سیلی‌مارین در ریشه‌های شاهد و تیمار شده در زمان‌های مختلف در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم، در شکل ۲B نشان داده شده است. تولید سیلی‌مارین پس از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۳۳ و ۰/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. میزان سیلی‌مارین در ریشه‌های مویین، ۷۲ ساعت پس از تیمار با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، ۰/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد که ۱/۱۹ برابر میزان نمونه‌های شاهد در همان زمان بود. میزان تجمع سیلی‌مارین پس از گذشت ۹۶ ساعت به ۱/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد که ۳/۱ برابر نمونه شاهد در همان زمان بود (۰/۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار کاهش پیدا کرد (۰/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۱/۹ برابر نمونه‌های شاهد گزارش شد (۰/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک).

### تاثیر کیتوزان (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر وزن خشک و بیوسنتز سیلی‌مارین در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم در زمان‌های مختلف

اثر زمان‌های مختلف استفاده از کیتوزان بر رشد ریشه و محتوای سیلی‌مارین در شکل ۲ نشان داده شده است. وزن خشک ریشه‌های مویین تیمار شده با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۱۲ ساعت (۰/۳۳ گرم) نزدیک به کنترل (۰/۳۹ گرم)، کمی کاهش نشان داد. میزان وزن خشک پس از گذشت ۲۴ ساعت تغییر چندانی نکرد (۰/۳۳ گرم). وزن خشک با افزایش تا ۰/۳۸ گرم پس از ۴۸ ساعت دنبال شد، که بیشتر از وزن خشک کنترل (۰/۳ گرم) در همان زمان بود. وزن خشک پس از گذشت ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت (۰/۳۵ گرم)، اما پس از گذشت ۹۶ ساعت مجدداً افزایش پیدا کرد و به ۰/۴۱ گرم رسید (شکل ۲A).



شکل ۲: تغییرات وزن خشک (A) و تولید سیلی‌مارین (B) در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان با وزن مولکولی کم و شاهد در زمان‌های مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم ( $\pm SE$ )

در لیتر کیتوزان و ۹۶ ساعت پس از تیمار حاصل آمد که به ترتیب ۳/۹۵، ۳/۵۸، ۳/۰۲، ۷/۱۱ و ۷/۱۳ برابر بیشتر از ریشه‌های تیمار نشده بودند.

**تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های موبین گیاه خارمریم شاهد و تیمار شده با کیتوزان در زمان‌های مختلف**  
بیشترین میزان تاکسی فولین، سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین و ایزوسیلیبین در محیط تیمار شده با ۱۰ میلی گرم

جدول ۲: تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های موبین گیاه خارمریم تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان با وزن مولکولی کم (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار (Mean  $\pm$  SE)

فلاونولیگنان (mg g <sup>-1</sup> DW)					غلظت کیتوزان
ایزوسیلی بین	سیلی بین	سیلی دیانین	سیلی کریستین	تاکسی فولین	(mg/ 50ml culture)
۰/۰۲۰±۰/۰۰۷	۰/۰۱۸±۰/۰۰۴	۰/۱۳±۰/۰۱	۰/۱۵۴±۰/۰۰۶	۰/۰۴۴±۰/۰۰۲	۰
۰/۰۳۲±۰/۰۰۲	۰/۰۵۳±۰/۰۰۴	۰/۳۰±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۰۹	۰/۱۵±۰/۰۰۳	۵
۰/۰۹۲±۰/۰۰۴	۰/۱±۰/۰۰۷	۰/۳۴±۰/۰۰۲	۰/۴۸±۰/۰۰۵	۰/۴۱±۰/۰۰۴	۱۰
۰/۰۲۱±۰/۰۰۶	۰/۰۳۱±۰/۰۰۶	۰/۱۳±۰/۰۰۳	۰/۲۷±۰/۰۰۶	۰/۰۷۷±۰/۰۰۱	۲۰
۰/۰۲۷±۰/۰۰۵	۰/۰۴۱±۰/۰۰۷	۰/۱۸±۰/۰۰۵	۰/۲۶±۰/۰۰۵	۰/۰۷۲±۰/۰۰۸	۳۰

تحریک می‌نماید. بیشینه  $OD\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$  ۰/۷۱۵۴، ۹۶ ساعت پس از تحریک برای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ثبت شد که ۲/۸۶ برابر آن در ریشه‌های تیمار نشده بود ( $OD\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$  ۲/۶۳) (شکل ۴).

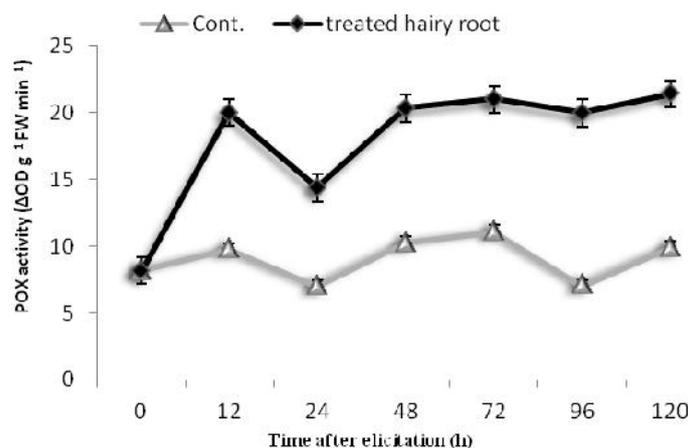
شکل ۵ تغییرات محتوای پراکسید هیدروژن را در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از تیمارهای زمانی مختلف را نشان می‌دهد. میزان پراکسید هیدروژن ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار  $9/8\ \mu mol\ g^{-1}\ DW$  گزارش شد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار میزان پراکسید هیدروژن کاهش پیدا کرده و پس از آن مجدداً افزایش پیدا کرد و ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار به  $10/81\ \mu mol\ g^{-1}\ DW$  رسید و پس از آن مجدداً کاهش پیدا کرد ( $9/12\ \mu mol\ g^{-1}\ DW$ ) (شکل ۵).

**اثر کیتوزان (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و میزان پراکسید هیدروژن**

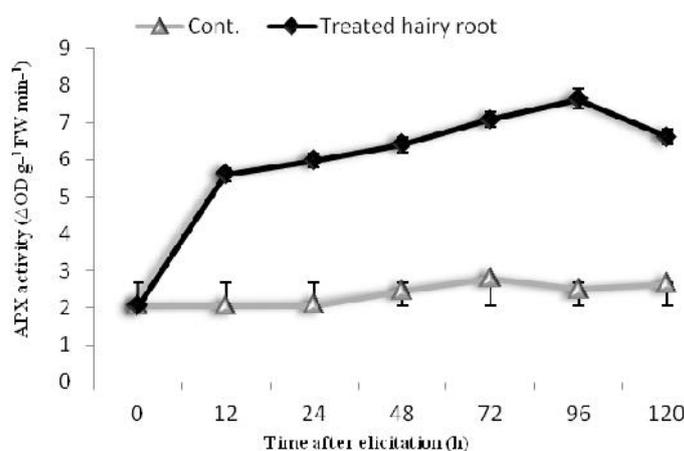
میزان تخریب اکسیداتیو القا شونده توسط کیتوزان به وسیله اندازه‌گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و پراکسید هیدروژن، بررسی شد. گایاکول پراکسیداز به وسیله کیتوزان فعال شد و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار به بیشترین میزان خود رسید ( $OD\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$  ۲۱/۸۶) که ۲/۲ برابر بیشتر از کنترل ( $OD\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$  ۹/۸۶) بود (شکل ۳).

روند افزایشی آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شکل ۴ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم پس از گذشت ۱۲ ساعت به  $OD\ g^{-1}$  ۳/۵۲ FW رسید و این روند افزایشی تا ۹۶ ساعت پس از اعمال ادامه پیدا کرد ( $OD\ g^{-1}\ FW$  ۵/۱۴) و ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار مجدداً کاهش پیدا کرد ( $OD\ g^{-1}\ FW$  ۳/۹۷).

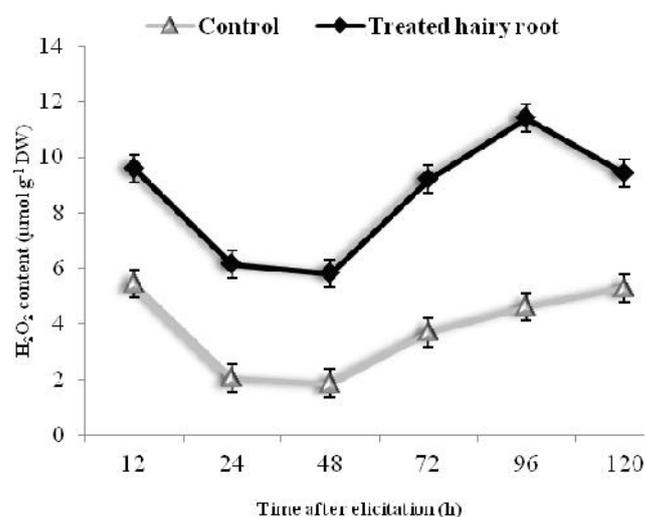
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۹۶ ساعت پس از افزودن ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، اندازه‌گیری شد، تا تعیین شود چگونه کیتوزان انباشتگی سیلی‌مارین را در کشت ریشه‌های موبین،



شکل ۳: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان با وزن مولکولی کم در ریشه‌های شاهد و تیمار شده در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار (± SE)



شکل ۴: تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان (وزن مولکولی کم) در ریشه‌های شاهد و تیمار شده در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار (± SE)



شکل ۵: تغییرات میزان پراکسید هیدروژن در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان (وزن مولکولی کم) در ریشه‌های شاهد و تیمار شده در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار (± SE)

## بحث

ساعت پس از اعمال تیمار به بالاترین مقدار رسید که مشابه با نتایج *Flcon-Rodriguez* و همکاران (۱۷) در مطالعه روی گیاه *Nicotiana tabacum* تیمار شده با کیتوزان بود. همچنین *Flocco* و همکاران (۳۱)، نشان دادند که کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های مویین گیاه *Armoracia lapathifolia* می‌شود.

درک مسیرهای پیام‌رسانی یکی از قدم‌های لازم در جهت توجیه اثرات الیسیتورها می‌باشد. الیسیتورها ابتدا توسط گیرنده‌های گیاهی فعال می‌شوند و سپس خود سبب فعال‌سازی فاکتورهای مربوطه می‌شوند. مانند کانال‌های یونی، پروتئین‌های متصل شونده به *GTP* و پروتئین‌های کینازها. فعال شدن فاکتورهای مربوطه باعث فرستادن پیام محرک به داخل سلول و به راه افتادن واکنش‌های فرودست می‌شود. مانند فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون برگشت پذیر پروتئین‌های غشای سلولی و پروتئین‌های سیتوزولی، افزایش کلسیم درون سلولی، دپلاریزه شدن غشای سلولی، خروج یون‌های پتاسیم و کلر و ورود یون‌های هیدروژن، قلیایی شدن محیط خارج سلول و اسیدی شدن سیتوپلاسم، فعال شدن پروتئین‌های *MAP* کیناز، *NADPH* اکسیداز و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (*ROS*)، بیان اولیه ژن‌های دفاعی، تولید اتیلن و جاسمونات، بیان نهایی ژن‌های دفاعی و در پایان تولید متابولیت‌های ثانویه. مسیر پیام‌رسانی محرک‌ها، شبکه‌ای پیچیده با واکنش‌های متوالی جهت به راه اندازی سیستم دفاعی موثر و کارآمد می‌باشد.

*Sanchez- Sampedro* و همکاران (۳۲)، با مطالعه روی کشت سلولی و تولید سیلی‌مارین دریافتند که حذف یون کلسیم از محیط کشت می‌تواند به افزایش تولید سیلی‌مارین در سوسپانسیون سلولی کمک کند.

## نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده مبین این مسئله است که استفاده از کیتوزان با وزن مولکولی کم باعث افزایش تجمع و تولید سیلی‌مارین می‌شود که از نقطه نظر صنعتی قابل توجه است. نتایج نشان داد که در حضور کیتوزان با وزن مولکولی کم میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی افزایش یافت. با توجه به اینکه شناسایی حد واسط‌های بین الیسیتور و تولید متابولیت‌های ثانویه و وقایع درون سلولی در این مرحله از تحریک و کاربرد نتایج در مطالعات مهندسی متابولیت به منظور افزایش تولید متابولیت‌های

کیتوزان فرم داستیله کیتین است که از دیواره سلولی قارچ، اسکلت خارجی سخت پوستان، کوتیکول حشرات و برخی جلبک‌ها به دست می‌آید. این ترکیب زیستی قابل تجزیه بوده و کاملاً غیر سمی است. گزارش شده است که کیتوزان و مشتقات آن توانایی القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان را دارد. همچنین *Uthairatanakij* و همکاران (۳۰)، نشان دادند که کیتوزان باعث افزایش بازدهی محصول می‌شود. غلظت کیتوزان و درجه داستیلاسیون کیتوزان اثرات متغیری روی گیاه خواهد داشت.

در این تحقیق کیتوزان با وزن مولکولی کم باعث افزایش وزن خشک ریشه‌های مویین خار مریم شد. بررسی اثر کیتوزان با وزن مولکولی کم بر تولید سیلی‌مارین نشان داد که این ماده زیستی سبب افزایش تولید این متابولیت ثانویه در گیاه خار مریم شد، به طوری که میزان تجمع سیلی‌مارین پس از گذشت ۹۶ ساعت به ۱/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک رسید که ۳/۲ برابر نمونه شاهد بود.

*Vasconsuelo* و همکاران (۱۴) نشان دادند که ساز و کارهای سیگنالینگ اعمال شده توسط کیتوزان، سبب افزایش آنتراکوئینون‌ها در گیاه *Rubia tinctorum L.* شد. این محققان نشان دادند که اثر این الیسیتور ممکن است از طریق فعال‌سازی آبشار *PLC/PKC* باشد. گفته می‌شود علاوه بر *MAP* کینازها یا پروتئین‌های کینازهای فعال‌کننده میتوژن‌ها، *PKC* نیز در فعالیت ناشی از کیتوزان در سلول دخیل است.

همچنین *Putalum* و همکاران (۱۶)، نشان دادند که، کیتوزان باعث تولید آرمیزین در ریشه‌های مویین گیاه *Artemisia annua* می‌شود، به طوری که میزان تولید این متابولیت ثانویه، پس از گذشت ۶ روز و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، ۶ برابر افزایش پیدا کرد. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که کیتوزان باعث افزایش رشد ریشه‌های مویین تیمار شده توسط کیتوزان می‌شود که با یافته‌های ما کاملاً مطابقت دارد.

بررسی روند تغییرات  $H_2O_2$  در ریشه‌های تیمار شده با کیتوزان با وزن مولکولی کم افزایش ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار نشان داد. با تجمع افزایش  $H_2O_2$ ، میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده افزایش یافت به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم *POD*، ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار و فعالیت آنزیم *APX* نیز ۹۶

biosynthesis in *Cupressus iusitanica* cell culture. *J Exp Bot* 2003; 55(383): 647-656.

10. Zaho J, Sakai K. Peroxidase are involved in the biosynthesis and biodegradation of thujaplicin in fungal elicitor-treated *Cupressus lusitanica* suspension cultures. *New Phytol.* 2003; 159(3): 719-731.

11. Esmailzadeh bahabadi S, Sharifi M. Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites, Using Biotic Elicitors. *J Cell Tissue* . 2013; 4(2): 119-128.

12. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. Chitosan the Deacetylated Form of chitin is Necessary For cell wall Integrity in *Cryptococcus neotormans*. *Eukaryotic Cell.* 2007; 6(5): 855-867.

13. Dinesh K, Singh Alok R. Ray Biomedical Applications of Chitin, and their derivatives. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polym Rev.* 2000; 40(11): 69-83.

14. Vasconsuelo A, Giulietti AM, Boland R. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Sci.* 2004; 53: 405-413.

15. Abdul Rahman NN, Zakaria Z, Abdul Kadir MO. Influence of elicitor availability on Limonene and Linalool accumulation from *Citrus Grandis* cell cultures, *Malaysian J Pharm Sci.* 2003; 1: 39-49.

16. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Biotechnol Let.* 2007; 29: 1143-1146.

17. Falcon- Rodriguez AB, Cabrera JC, Ortega E, Martinez-Tellez MA. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defence responses in roots and leaves of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *American J Agricul Biol Sci.* 2009; 4(3): 192-200.

18. Esmailzadeh 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.

تانویه با ارزش گیاهان دارویی بسیار موثر می‌باشد، توصیه می‌شود با مطالعات دقیق تر عواملی حاضر در مسیر سیگنالی موثر در افزایش بیوسنتز این متابولیت‌ها شناسایی شوند.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران که حمایت مالی این طرح پژوهشی (شماره ۸۸۰۲۴-۰۵-۰۵-۱۲) را به‌عهده داشت، قدردانی می‌شود.

## منابع

1. Shokrpour M, Mohammadi SA, Moghaddam M, Ziai SA, et al. Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *J herbs Spices Med Plants.* 2007; 13(4): 55-69.
2. Radjabian T, Rezazadeh Sh, Fallah huseini H. Analyziz of Silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iranian J Sci Technol.* 2008; 32: 141-146.
3. Wynn SG, DVM. *Silybum marianum* milk thistle. *Altern Med Rev.* 1999; 4(4): 272-274.
4. Tripathi L, Nath Tripath J. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop J Pharm Res.* 2003; 2(2): 243-253.
5. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondry metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell culture, *J Med Plants Res.* 2009; 3(13): 1222-1239.
6. Khalili M, HasanlooT, Safdari Y. Hydrogen peroxide acts as a secondary messenger for production of silymarin in Ag+ elicited *Silybum marianum* hairy roots cultures. *J Med Plants By-products.* 2014;3(1): 35- 40.
7. Blume B, Nqrnberger T, Nass N, Scheel D. Receptor-mediated increases in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defence in parsley. *Plant cell.* 2000; 12(8): 1425-1440.
8. Ebel J, Mithoefer A. Early events in the elicitation of plant defense. *Planta.* 1998; 206: 335-348.
9. Zaho J, Sakai K. Multiple signaling pathways mediate fungal elicito-induced -thujaplicin

19. Rudrappa T, Neelwarne B, Lakshmanan V, Aswantharayanan SR, et al. Elicitation of peroxidase activity in genetically transformed root cultures of *Beta vulgaris* L., *Electronic J Biotechnol.* 2006; 9: 5-10.
20. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. General aspects., *J Biol Chem.* 1987; 262: 9895-9901.
21. Hasanloo T, Sepehrifar R, Rahnama H, Shams MR. Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in Milk thistle hairy root culture. *World J Microb Biot.* 2009; 25: 1901- 1909.
22. Khalili M, Hasanloo T, Kazemi Tabar SK, Rahnama H. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. *Cell Biol Int.* 2009; 33: 988-994.
23. Murashige T, Skoog F. A revised medium for for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 1962; 15: 473-497.
24. Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR, Sepehrifar R. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iranian J Biotech.* 2008; 6: 113-118.
25. Hasanloo T, Sepehri R. Evaluation of silymarin extraction from *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds by water Quat. *J Plant Sci Resc.* 2008; 2: 1-8.
26. Titel G, Wagner H. High-performance liquid chromatographic separation of silymarins and their determination in a raw extract of *Silybum marianum*. *J chromatogr.* 1997; 26: 499-501.
27. Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E, Ziai SA, et al. Determination of flavonolignan of dried fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. *J Med Plant.* 2005; 85: 25-32.
28. Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. In *Methods in enzymology.* Academy Press. 1995; 764–775.
29. Nakano Y, Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiol.* 1987; 28(1): 131.
30. Uthairatanakij A, Teixeira da Silva JA, Obsuwan K. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Sci Biotechnol.* 2007; 1: 1-3.
31. Flocco CG, Pitta-Alvarez S, Giulietti AM. Effect of chitosan and Acetic acid on the Peroxidase component of Hairy root cultures of *Armoracia lapathifolia*. *Appl Biochem and Biotechnol.* 2003; 110(3): 175-183.
32. Sanchez-Sampedro MA, Fernandez-Tarrago J, Corchete P. Enhanced silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* L. Gaertn, *Plant Physiol.* 2005; 162(10): 1177-1182.

## The Role of Chitosan (Low Molecular Weight) on Elevation of Flavonolignans Production in *Silybum marianum* Hairy Root Culture

Hasanloo T, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Eskandari S, M.Sc.<sup>2</sup>, Najafi F, Ph.D.<sup>2</sup>

1. Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran
2. Faculty of Science, Kharazmi University

\* Email corresponding author: thasanloo@abrii.ac.ir

Received: 28 Dec. 2014

Accepted: 26Apr. 2015

---

### Abstract

**Aim:** The effect of chitosan (low molecular weight) as elicitor was evaluated on silymarin production and biochemical factors in hairy root cultures of *Silybum marianum*.

**Material and methods:** Different concentrations of chitosan (0, 5, 10, 20 and 30 mg/50 ml of culture media) was added to hairy root cultures of *S. marianum* (30 days) and sampling were carried out after 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The silymarin level, activity of guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase as well as concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were determined in the samples.

**Results:** The results indicated that the highest dry weight was in cultures treated with 10 mg /50 ml culture chitosan after 48 and 96 h. Silymarin production was significantly increased from 0.37 in control to 1.19 mg g<sup>-1</sup> dry weight in the treated samples, at which the increased level was 1.4-fold higher than the control. Guaiacol peroxidase was activated by chitosan and reaching a pick after 120 h (21.86 OD g<sup>-1</sup>FW min<sup>-1</sup>) which was 2.2 fold higher than the control. The ascorbate peroxidase activity kept increasing until 96 h after elicitation (5.14 ODg<sup>-1</sup>FW).

**Conclusion:** The results showed that the silymarin production has been promoted by chitosan (low molecular weight). Increased of enzymes activity occurs as a result of free radical elimination and represents a reaction to chitosan as a stress factor.

**Keywords:** Elicitor, Flavonolignans, Hairy root