

## تأثیر کیتوزان بر میزان ترکیبات فنلی، اسیدرزمارینیک و بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتز اسید رزمارینیک در کشت تعلیقی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

افسانه مهدویان فرد M.Sc، مریم دهجی پور حیدرآبادی Ph.D\*، خلیل ملک‌زاده Ph.D، سیدرسول صحافی Ph.D

- دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، دانشکده کشاورزی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، رفسنجان، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.dahaji@vru.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۵

### چکیده

**هدف:** هدف از این پژوهش بررسی تأثیر کیتوزان بر تولید ترکیبات فنلی، اسید رزمارینیک و بیان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز این ترکیبات در کشت تعلیقی بادرنجبویه بود.

**مواد و روش‌ها:** جهت تهیه کالوس از ترکیب نفتالن استیک اسید (۱ میلی‌گرم بر لیتر)، توفوردی (۱ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و ریزنمونه ساقه استفاده شد. پس از راه‌اندازی کشت تعلیقی، تیمار کیتوزان با سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت یک، سه و پنج روز در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، میزان پروتئین محلول، میزان ترکیبات فنلی و میزان اسیدرزمارینیک اندازه‌گیری شد. هم‌چنین بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز با روش Real-time PCR بررسی شد.

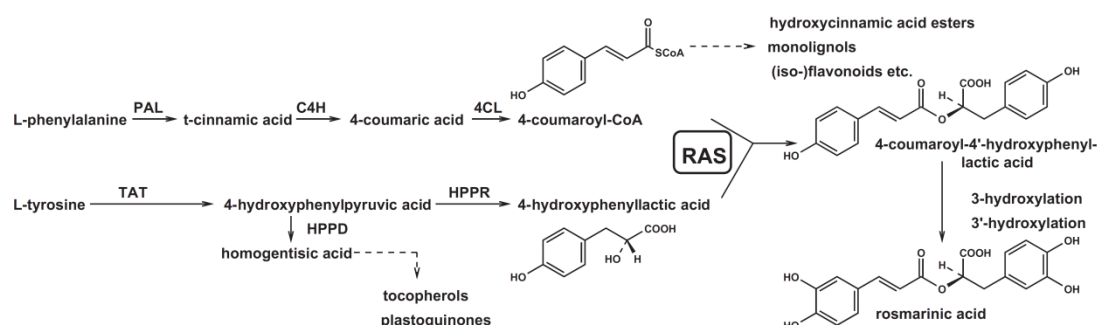
**نتایج:** فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان پس از گذشت سه روز از شروع تیمار بیش‌ترین افزایش را نشان داد که با افزایش میزان ترکیبات فنلی همراه بود. بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در زمان سه روز پس از اعمال تیمار نسبت به شاهد ۲/۵ برابر افزایش نشان داد. این افزایش بیان ژن، افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز را به دنبال داشت. بیش‌ترین افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان پنج روز پس از اعمال تیمار مشاهده شد که به افزایش میزان اسیدرزمارینیک منجر شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست آمده تیمار کیتوزان به‌مدت پنج روز جهت افزایش میزان اسید رزمارینیک در کشت سلولی بادرنجبویه توصیه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** بادرنجبویه، رزمارینیک اسید سینتاز، کشت تعلیقی، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، کیتوزان

## مقدمه

بادرنجیویه (*Melissa officinalis* L.) از خانواده نعناعیان، به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و کاربرد این ترکیبات در زمینه‌های پزشکی، صنایع آرایشی-بهداشتی و صنایع غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱). اسیدرزمارینیک (استر اسیدکافئیک و ۳، ۴ دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید) ترکیب فنلی فعال غالب (۰/۵ تا ۶/۸ درصد از وزن خشک گیاه) در گیاه بادرنجیویه علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، دارای خواص ضدسرطانی، ضدافسردگی، ضدآرتروز، ضدآلرژی و ضدباکتریایی نیز می‌باشد (۲). اسید رزمارینیک از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی با استفاده از پیش‌ماده فنیل‌آلانین با دخالت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL: EC 4.3.1.5) ساخته می‌شود. آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز (RAS: EC 2.3.1.140)، در انتهای مسیر بیوسنتزی، تشکیل اسید رزمارینیک را کاتالیز می‌کند (شکل ۱).



شکل ۱: مسیر بیوسنتزی اسیدرزمارینیک در بادرنجیویه (۳)

استفاده از راه کارهای زیست‌فن‌آوری جهت بهبود کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان دارویی امری ضروری است. پیشرفت در روش‌های زیست‌شناسی به‌ویژه کشت بافت گیاهی، ابزار جدیدی را جهت فرآوری تجاری گیاهان دارویی و مواد موثره آن‌ها فراهم کرده است. افزودن محرک‌ها به کشت بافت گیاهی، موثرترین تکنیک برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در این سیستم‌ها می‌باشد، به‌گونه‌ای که طی پاسخ به محرک‌ها، سیستم دفاعی گیاه فعال و در نتیجه بیان ژن‌های دفاعی و راه‌اندازی مسیرهای بیوسنتزی مربوط، متابولیت‌های ثانویه تجمع می‌یابند (۴). محرک‌های زیستی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت درون شیشه (*in vitro*) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (۵). مطالعات نشان داده است که محرک‌های زیستی با القای تنش اکسیداتیو، ترکیبات فنلی را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آن‌ها افزایش می‌دهد (۶). استفاده از کیتوزان به‌عنوان محرک، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای در تولید فیتوالکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه در زیست‌فن‌آوری ایجاد کرده است (۷). کیتوزان پلی‌ساکاریدی پلی‌کاتیونی و مشتق از کیتین است. به دلیل غیرسمی بودن، خاصیت جذب بالا، امکان تجزیه در طبیعت و سازگاری با محیط زیست بسیار مورد توجه قرار گرفته است. فعالیت زیستی کیتوزان از باندشدن به گیرنده‌های غشایی ناشی می‌شود که نقش آن در القای متابولیسم ثانویه در کشت سلول گیاهی، به وزن ملکولی و درجه استیلاسیون آن بستگی دارد (۸).

تأثیر مثبت کیتوزان بر تولید متابولیت‌های ثانویه در پژوهش‌های زیادی به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال، نتایج استفاده از کیتوزان در کشت سلولی گیاه ریحان، افزایش مقدار کل ترکیبات فنلی به‌ویژه اسیدرزمارینیک را نشان داده است (۹). هم-چنین تیمار کیتوزان در کشت ریشه‌های مویین گیاهان مختلف افزایش قابل توجهی در میزان متابولیت‌های ثانویه را موجب

شده است (۱۰-۱۴). نتایج کمالی پور آزاد و همکاران (۱۵) نشان داد که کیتوزان با تأثیر بر بیان ژن آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شده است. در گیاهان تولید کننده اسیدرزمارینیک، ارتباط سنتز اسیدرزمارینیک با بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن از جمله ژن‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و رزماری نیک اسید سینتاز تایید شده است. براساس بررسی DNA ژنومی و بررسی‌های ساترن بلات مشخص شد که ژن فنیل آلانین آمونیا لیا ز جداسازی شده از گیاه بادرنجبویه، شامل یک اینترون می‌باشد و پروتئینی مشتمل بر ۸۳۶ اسید آمینه را به رمز درمی‌آورد. همچنین تنها یک نسخه از ژن رزماری نیک اسید سینتاز در بادرنجبویه حضور دارد که فاقد اینترون است و پروتئینی مشتمل بر ۴۲۷ اسید آمینه را کد می‌کند (۳). براساس شواهد تولید اسیدرزمارینیک در کشت سلولی بسیار بیش‌تر از تولید آن در گیاهان طبیعی است (۲). از آنجایی‌که بادرنجبویه یک گیاه مدل دارویی مناسب جهت مطالعه در زمینه تنظیم بیوسنتز اسیدرزمارینیک است، در این پژوهش تأثیر کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی بر بیوسنتز ترکیبات فنلی، اسید رزماری نیک و فعالیت آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیا لیا ز مرتبط با بیوسنتز آن‌ها، در کشت تعلیقی آن مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی‌که ژن‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و رزماری نیک اسید سینتاز به‌عنوان ژن‌های مهم در ارتباط با مسیر بیوسنتزی اسید رزماری نیک در گیاه بادرنجبویه شناسایی شده‌اند، بررسی بیان این ژن‌ها تحت تأثیر کیتوزان از اهداف دیگر این پژوهش بود.

## مواد و روش‌ها

**تهیه ریزنمونه و القای کالوس از گیاه‌چه‌های استریل:** بذرهای گیاه بادرنجبویه با درصد جوانه‌زنی ۹۶/۲ درصد از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بعد از ضدعفونی کردن سطحی بذرها، با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد و سپس محلول اتانول ۷۰ درصد سه بار آبکشی با آب مقطر استریل انجام شد. بذرهای ضدعفونی‌شده به شیشه‌های حاوی محیط کشت MS (۵۰ درصد) بدون هورمون با اسیدیته ۵/۷، منتقل و جهت رشد به اتاق رشد با دوره نوری شانزده ساعت نور و هشت ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز از رشد گیاهچه‌ها به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. برای القای کالوس، ریزنمونه ساقه و محیط MS شامل ۰/۸ درصد آگار و ۳ درصد سوکروز همراه با ترکیبات هورمونی نفتالناستیک اسید (NAA)، توفوردی و کینتین به‌ترتیب با غلظت ۱، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد (۱۶). سپس محیط‌های کشت در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. بعد از گذشت ۷ تا ۱۰ روز القای کالوس در ریزنمونه‌ها شروع شد. واکشت کالوس‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام شد.

**راه‌اندازی کشت سلولی تعلیقی:** به‌منظور راه‌اندازی کشت سلولی تعلیقی، مقدار دو گرم کالوس ترد و هم‌سن درون ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS با ترکیبات هورمونی ذکر شده منتقل و با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی روی لرزاننده (شیکر) نگهداری شدند. به‌منظور تکثیر، همگن‌سازی و سازگاری سلول‌ها به محیط کشت تعلیقی واکشت سلول‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام (۵ مرحله) و در هر مرحله سلول‌ها بر روی نایلون مش توسط قیف بوختر با مکش جمع‌آوری و به محیط جدید منتقل شد.

**تعیین منحنی رشد سلولی:** قبل از اعمال تیمار، به‌منظور تعیین منحنی رشد سلول‌ها یک گرم کالوس همگن به‌ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع جدید MS با ترکیب هورمونی قبلی منتقل و از روز اول تا روز ۲۰ پس از واکشت، به‌فاصله زمانی دو روز یک‌بار نمونه‌برداری انجام و براساس وزن تر توده سلولی منحنی رشد ترسیم شد.

**تیمار سلول‌ها با کیتوزان:** به منظور اعمال تیمارها، کشت تعلیقی جدید تهیه شد. یک گرم سلول با استفاده از قیف بوختر و در شرایط مکش برداشت و به‌ارن حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع منتقل شد. محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و در محیط تاریک روی لرزاننده (شیکر) نگهداری شدند. با توجه به منحنی رشد سلول‌ها، که در آزمایشی جداگانه بررسی شد، در روز هفتم از دوره رشد سلولی محلول کیتوزان با غلظت های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت سلولی اضافه شد. سپس سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ ساعت، سه روز و پنج روز بعد از اضافه نمودن کیتوزان به محیط کشت برای بررسی‌های بیوشیمیایی و ملکولی برداشت، در نیتروژن مایع منجمد و به‌فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. جهت تهیه محلول کیتوزان از روش خان و همکاران (۱۷) استفاده شد.

**سنجش میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز:** ۰/۲ گرم نمونه منجمد با استفاده از هاون در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتواتانول دو میلی‌مولار ساییده و سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی برای سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز مورد استفاده قرار گرفت. سنجش پروتئین تام بر اساس روش برادفورد (۱۸) انجام گرفت. یک میلی‌لیتر معرف برادفورد به ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه اضافه و بعد از مخلوط شدن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Analytik Jena ساخت کشور آلمان قرائت شد. آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز به‌عنوان آنزیمی کلیدی در متابولیسم ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، یک میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸، ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (ماکزیمم فعالیت آنزیم) نگهداری و واکنش آنزیمی با افزودن اسید کلریدریک شش مولار متوقف شد. اسید سینامیک (فرآورده آنزیم PAL) موجود، سه بار با اتیل استات استخراج و توسط جریانی از هوای تصفیه شده خشک شد. میزان اسید سینامیک پس از حل نمودن در NaOH ۰/۰۵ مولار، در طول موج ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب میزان اسید سینامیک به‌ازای میلی‌گرم پروتئین در مدت یک ساعت بیان شد. محلول اسید سینامیک با غلظت ۰ تا ۳۵ میکرومولار برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

**استخراج و سنجش میزان فنل کل:** ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ سنجی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (۲۰). ابتدا مقدار ۰/۲ گرم نمونه منجمد شده کالوس در سه میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و روشناور حاصل برای سنجش فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. به ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از پنج دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر مدل Analytik Jena ساخت کشور آلمان خوانده شد و مقدار فنل کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد. غلظت‌های ۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدگالیک به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

**استخراج و سنجش اسید رزمارینیک:** عصاره‌گیری ۰/۱ گرم نمونه‌های خشک با استفاده از اتانول ۳۰ درصد (۷/۷) و سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت انجام شد. برای سنجش میزان اسیدرزمارینیک مخلوط آزمایش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده، سه میلی‌لیتر اتانول و زیرکونیوم اکسی کلراید  $ZrOCl_2$  در غلظت نهایی ۰/۵ مولار بود.

مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۲ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت اسید رزمارینیک در هر نمونه، با استفاده از استاندارد اسید رزمارینیک برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (۲۱).

**بررسی بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیلایز و رزمارینیک اسید سینتاز:** استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت Column RNA isolation kit براساس دستورالعمل شرکت سازنده (دنا زیست آسیا) انجام و پس از حذف DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase I محصول شرکت Thermo Scientific، کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز تایید شد. ساخت رشته اول cDNA از ۰/۵ میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit شرکت Thermo Scientific انجام و بعد از رقیق‌سازی به‌عنوان الگو در واکنش‌های Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

برای بررسی کمی بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیلایز و رزمارینیک اسید سینتاز، از آغازگرهای اختصاصی با طول قطعه تکثیر شونده ۱۳۲ جفت باز برای هر ژن استفاده شد (جدول ۱). ساخت آغازگرها توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی به سفارش شرکت دنا زیست آسیا صورت گرفت.

جدول ۱: فهرست آغازگرهای اختصاصی برای واکنش‌های RT-PCR (۲۲)

ژن	توالی آغازگرها
MoPAL	رفت: 5 GCCGAAGTCATGAACGGAAAGC 3
	برگشت: 5 CGCAGCCTTAACATAACCGCTC 3
MoRAS	رفت: 5 ACGCCCCGACCTCAACCTTATC 3
	برگشت: 5 AAGTGGTGCTCGTTTGCCACG 3
MoEF1 $\alpha$	رفت: 5 TTGCTGCTGCAACAAGATGGAC 3
	برگشت: 5 GGGACGAATGCGATTTTGTCGG 3

مخلوط واکنش شامل ۴ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۰/۲۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (RealQ Plus Master Mix Green) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. دستگاه Real-time PCR مدل 9600 plus شرکت Bioer، برای بررسی بیان ژن‌ها به روش Relative Quantitative PCR مورد استفاده قرار گرفت. مراحل واکنش شامل سه مرحله به ترتیب مرحله اول، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم، ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و مرحله سوم، منحنی ذوب از ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با فاصله‌های افزایشی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۵ ثانیه بود. در بررسی کمی بیان ژن‌های مورد نظر از EF1 $\alpha$  به‌عنوان شاهد داخلی استفاده شد. با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  تعداد نسخه‌های تکثیر شده برای هر ژن محاسبه شد. مقدار نسخه‌های هر ژن در هر نمونه نسبت به مقدار نسخه‌های تکثیر شده ژن کنترل داخلی در همان نمونه نرمالیزه و سپس داده‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به شاهد کالبره شد.

**طرح آزمایش و بررسی‌های آماری:** طرح آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. کلیه بررسی‌های بیوشیمیایی و ملکولی نیز در سه تکرار مستقل، هریک با سه تکرار تکنیکی انجام شد. از نرم افزار SAS نسخه ۹ برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده شد. با مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس (ANOVA)، مقایسه میانگین‌ها در

سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن صورت گرفت. برای تعیین میانگین، انحراف معیار و رسم نمودارها از بسته نرم‌افزاری Excel استفاده شد.

### نتایج

بررسی‌های اولیه نشان داد که در گیاه بادرنجبویه ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ، میزان کالوس بیش‌تری تولید کرده است (شکل ۲). کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه ترد و شیری رنگ بوده لذا از آن‌ها جهت بررسی‌های بعدی استفاده شد.



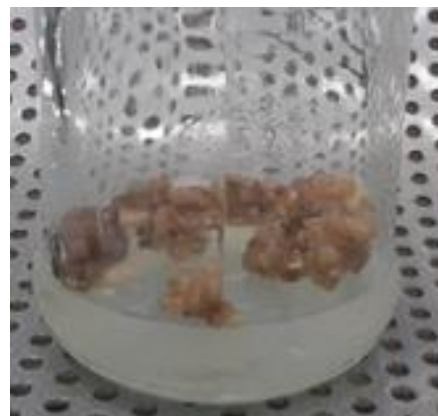
(ب)



(الف)



(د)



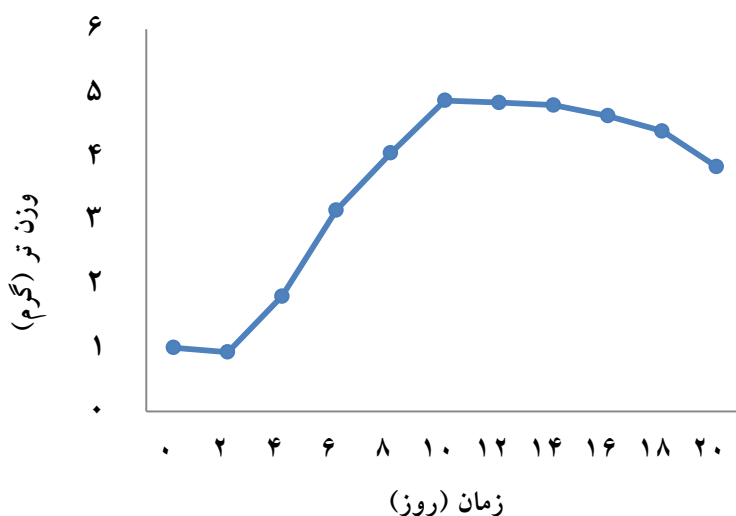
(ج)

شکل ۲: الف) گیاهچه‌های استریل بادرنجبویه پس از گذشت ۳۰ روز از زمان کاشت بذر ب) تشکیل کالوس اولیه از ریزنمونه ساقه بعد از گذشت ۷ روز ج) تشکیل کالوس‌های ترد پس از واگشت چهارم از ریزنمونه ساقه د) کشت تعلیقی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه بعد از واگشت پنجم

### تعیین منحنی رشد سلول

پیش از اعمال تیمار، میزان رشد سلول‌ها در بازه زمانی ۲۰ روزه در کشت تعلیقی بررسی شد. نتایج نشان داد که در دو روز اول پس از کشت، میزان رشد سلول‌ها کم بود به عبارتی سلول‌ها در مرحله تاخیری رشد بودند. سپس رشد سلول‌ها از روز چهارم افزایش یافته و این روند افزایشی تا روز دهم ادامه (مرحله لگاریتمی) داشت و پس از این زمان تغییری در وزن سلول‌ها مشاهده نشد. به عبارتی از روز یازدهم به مدت پنج روز میزان رشد ثابت ماند. پس از مرحله سکون از میزان رشد سلول‌ها

به تدریج کاسته شد. با توجه به منحنی رشد در روز هفتم سلول‌ها در مرحله لگاریتمی رشد بوده و به شدت در حال تقسیم بودند (شکل ۳). بنابراین روز هفتم بعد از واگشت به عنوان زمان مناسب برای افزودن کیتوزان انتخاب شد.



شکل ۳: منحنی رشد سلولی در کشت تعلیقی بادرنجبویه در طی ۲۰ روز کشت در محیط کشت MS

### فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز، میزان ترکیبات فنلی، پروتئین کل و اسید رزمارینیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز، میزان ترکیبات فنلی کل و میزان اسید رزمارینیک تحت تاثیر اثرات اصلی کیتوزان، زمان پس از اعمال تیمار و اثر متقابل کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمارها قرار گرفت (جدول ۲)، در حالی که میزان پروتئین کل تحت تاثیر اثرات اصلی کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمارها قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس اثرات کیتوزان و زمان بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز، ترکیبات فنلی، پروتئین کل و اسیدرزمارینیک در کشت تعلیقی بادرنجبویه

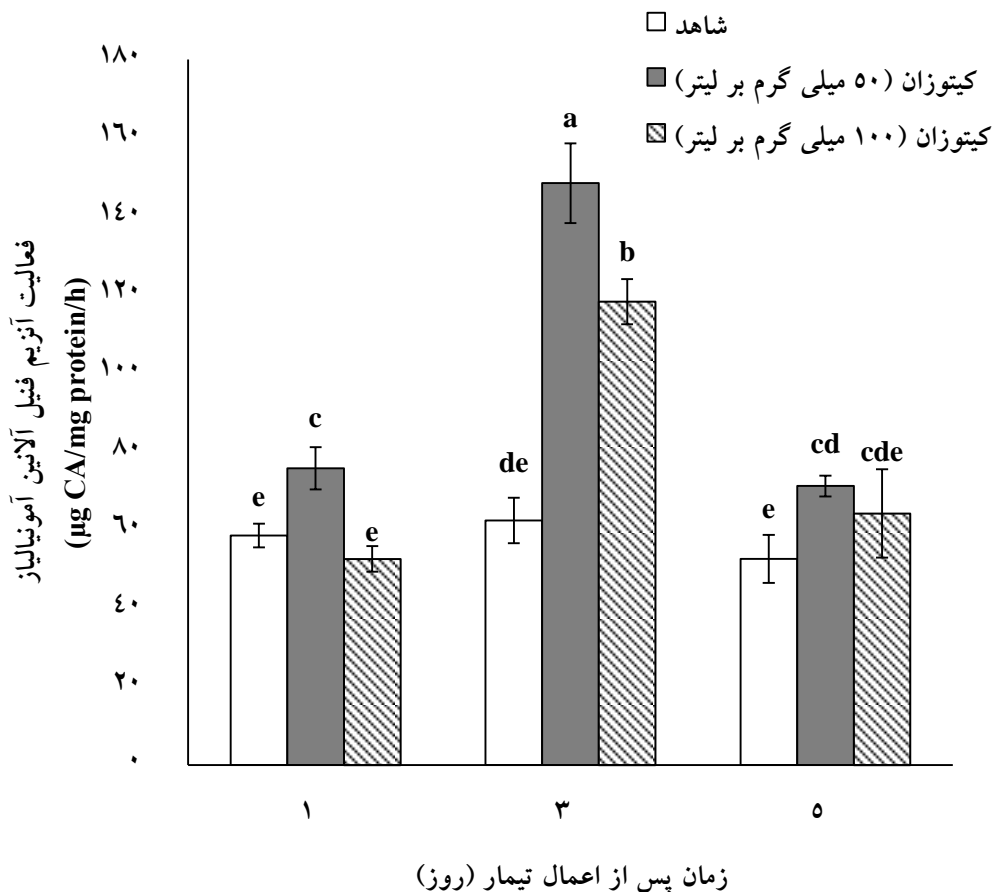
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز	ترکیبات فنلی	پروتئین کل
کیتوزان	۲	۳۶۷۶/۸۳ **	۰/۰۵۶۶ **	۶۸۱۳۲۹/۴۳ **
زمان	۲	۶۶۶۴/۲۴ **	۰/۱۶۴۵ **	۴۳۱۳۵۴/۷۲ **
کیتوزان*زمان	۴	۱۳۶۱/۶۲ **	۰/۰۴۶۸ **	۹۴۵۲/۶۵ <sup>ns</sup>
اشتباه	۱۸	۴۳/۳۶	۰/۰۰۲۴	۳۸۳۳۵/۷۳
درصد ضریب تغییرات		۸/۴۱	۹/۰۲	۹/۰۳

\*\* در سطح ۱ درصد معنی دار، \* در سطح ۵ درصد معنی دار، <sup>ns</sup> عدم تفاوت معنی دار

### فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز

چنانچه در شکل ۴ نشان داده شده است استفاده از کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر در زمان یک، سه و پنج روز پس از اعمال تیمارها، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز را نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش داد. اما با افزایش غلظت کیتوزان به ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تنها در زمان سه روز پس از اعمال تیمار افزایش معنی دار فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳). بیشترین افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در زمان سه روز پس از اعمال

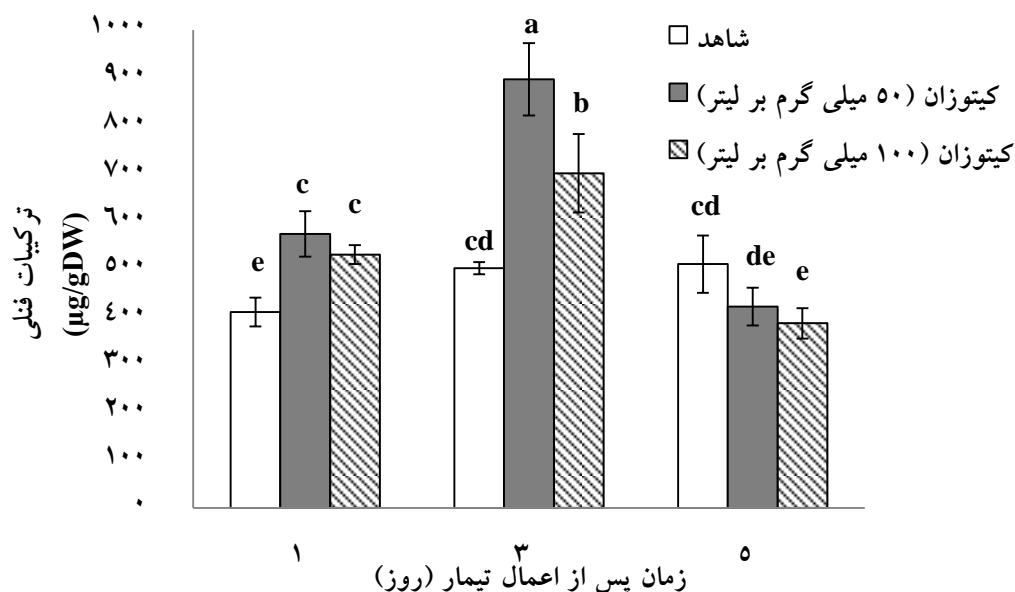
تیمار کیتوزان بود، به گونه‌ای که کیتوزان با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم را نسبت به شاهد به ترتیب به میزان ۲/۴ و ۱/۹ برابر افزایش داد. تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان اگرچه فعالیت آنزیم را در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار نسبت به شاهد افزایش داد اما این افزایش از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴).



شکل ۴: اثر کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمار بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز در کشت تعلیقی بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی‌داری ندارند.

### میزان ترکیبات فنلی

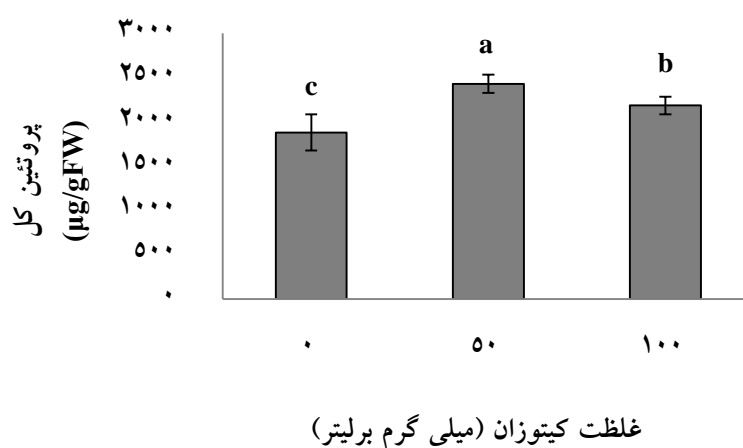
میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از کیتوزان در کشت تعلیقی بادرنجبویه افزایش نشان داد (شکل ۵). تیمار کیتوزان با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در زمان‌های یک و سه روز پس از اعمال تیمار افزایش میزان فنل کل را به همراه داشت. در زمان یک روز پس از اعمال تیمار، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به ترتیب ۱/۴ و ۱/۳ برابر نسبت به شاهد، ترکیبات فنلی را در کشت سلولی بادرنجبویه افزایش داد. تفاوت معنی‌داری بین افزایش میزان ترکیبات فنلی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کیتوزان، در زمان یک روز پس از اعمال تیمار در کشت تعلیقی بادرنجبویه مشاهده نشد (شکل ۵)، ولی با گذشت سه روز از اعمال تیمار، کیتوزان با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور معنی‌داری میزان ترکیبات فنلی را به ترتیب به میزان ۱/۸ و ۱/۴ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. با گذشت زمان به‌مدت پنج روز پس از اعمال تیمارها تفاوت معنی‌داری در میزان ترکیبات فنلی کل مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۵: اثر کیتوزان و زمان بر میزان ترکیبات فنلی در کشت تعلیقی بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی‌داری ندارند.

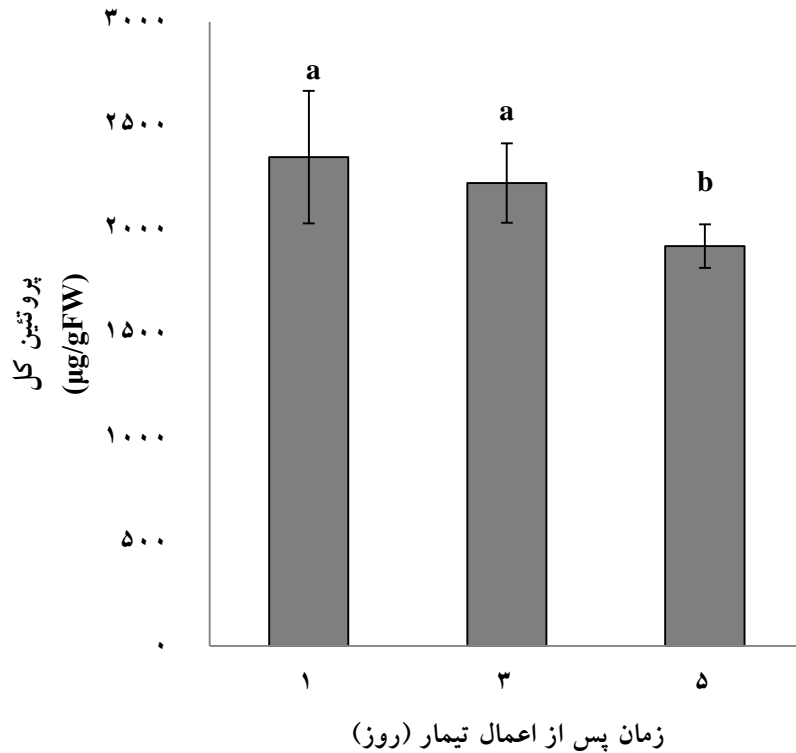
### میزان پروتئین کل

میزان پروتئین کل تحت تاثیر اثرات اصلی کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمارها در سطح احتمال یک درصد ( $p \leq 0.01$ ) قرار گرفت (جدول ۲). غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کیتوزان به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) میزان پروتئین کل را نسبت به شاهد در کشت تعلیقی بادرنجبویه افزایش داد (شکل ۶). با افزایش غلظت کیتوزان به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش کمتری در میزان پروتئین کل نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آن مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶: اثر غلظت کیتوزان بر میزان پروتئین کل در کشت تعلیقی بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی‌داری ندارند.

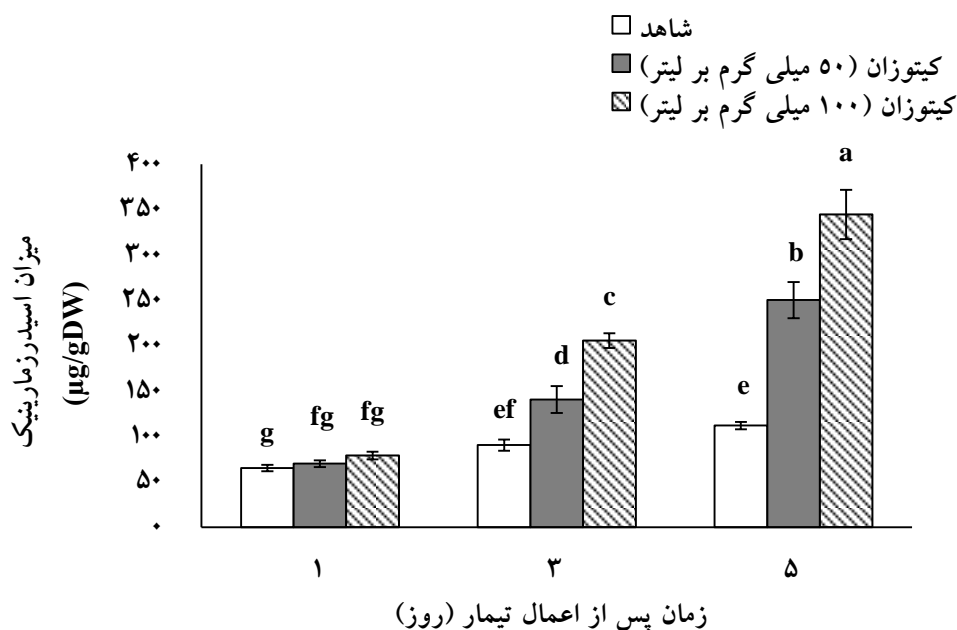
همان طور که در شکل ۷ مشاهده می شود میزان پروتئین کل در طی یک و سه روز پس از اعمال تیمارها تفاوت معنی داری را از لحاظ آماری نشان نداد. در حالی که با افزایش زمان اعمال تیمار کیتوزان به پنج روز میزان پروتئین کل کاهش یافت (شکل ۷).



شکل ۷: اثر زمان پس از اعمال تیمار کیتوزان بر میزان پروتئین کل در کشت تعلیقی بادنجبویه. میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی داری ندارند.

### میزان اسید رزمارینیک

غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی بادنجبویه میزان اسیدرزمارینیک را در زمان سه و پنج روز پس از اعمال تیمار به میزان ۱/۵ تا ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۸). بیشترین میزان اسید رزمارینیک در تیمار کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در زمان پنج روز مشاهده شد (شکل ۸). اگرچه افزایش اسید رزمارینیک یک روز پس از اعمال تیمار کیتوزان نیز مشاهده شد ولی این افزایش از لحاظ آماری ( $p \leq 0.05$ ) معنی دار نبود (شکل ۸).



شکل ۸: اثر کیتوزان و زمان بر میزان اسیدرزمارینیک در کشت تعلیقی بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی‌داری ندارند.

### بررسی بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و رزمارینیک اسید سینتاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) و رزمارینیک اسید سینتاز (RAS) تحت تاثیر اثرات اصلی کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمار و اثرات متقابل کیتوزان و زمان پس از اعمال تیمار قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: تجزیه واریانس اثرات کیتوزان و زمان پس از تیمار بر بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) و رزمارینیک اسید سینتاز (RAS) در کشت تعلیقی بادرنجبویه

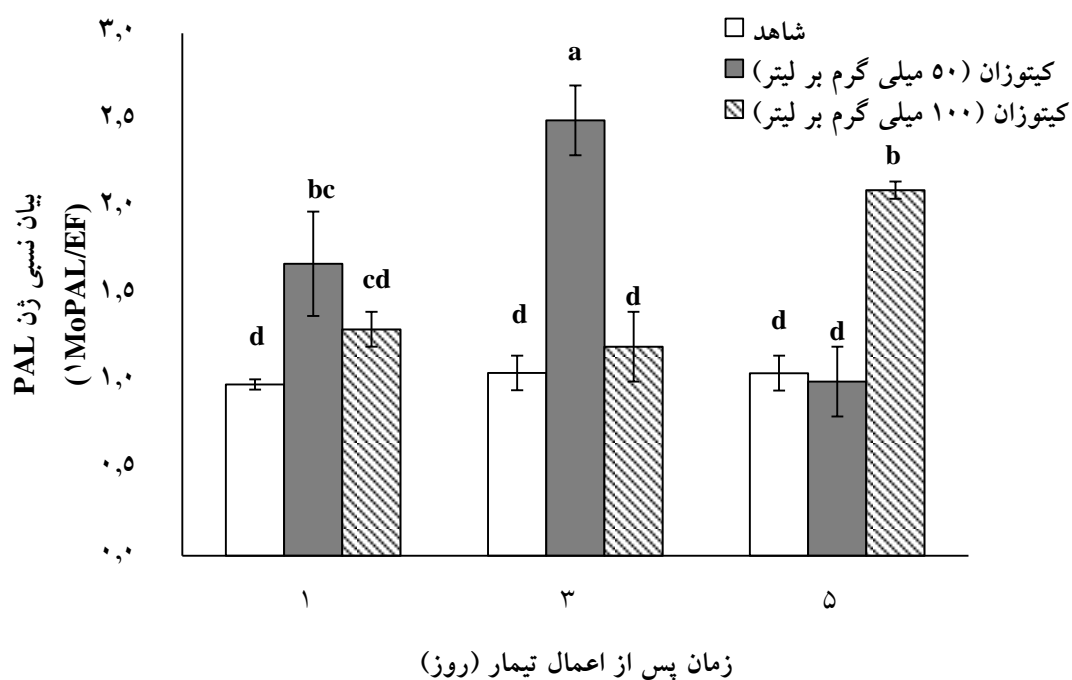
منابع تغییر	درجه آزادی	بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز	بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز
کیتوزان	۲	۱/۴۱۱ **	۰/۹۵۲ **
زمان	۲	۰/۱۵۲ **	۱/۱۰۵ **
کیتوزان × زمان	۴	۱/۱۲۵ **	۰/۲۹۷ **
اشتباه	۱۸	۰/۰۶۰	۰/۰۲۳
درصد ضریب تغییرات		۲۷/۱۸۶	۱۱/۵۹۵

\*\* در سطح ۱ درصد معنی‌دار، \* در سطح ۵ درصد معنی‌دار، ns عدم تفاوت معنی‌دار

### بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز

به‌طور کلی تیمار با کیتوزان باعث افزایش بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در کشت سلولی بادرنجبویه شد (شکل ۹). با اعمال تیمار کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌مدت یک و سه روز، بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز افزایش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان داد. اما با افزایش زمان اعمال تیمار، افزایش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۹). غلظت

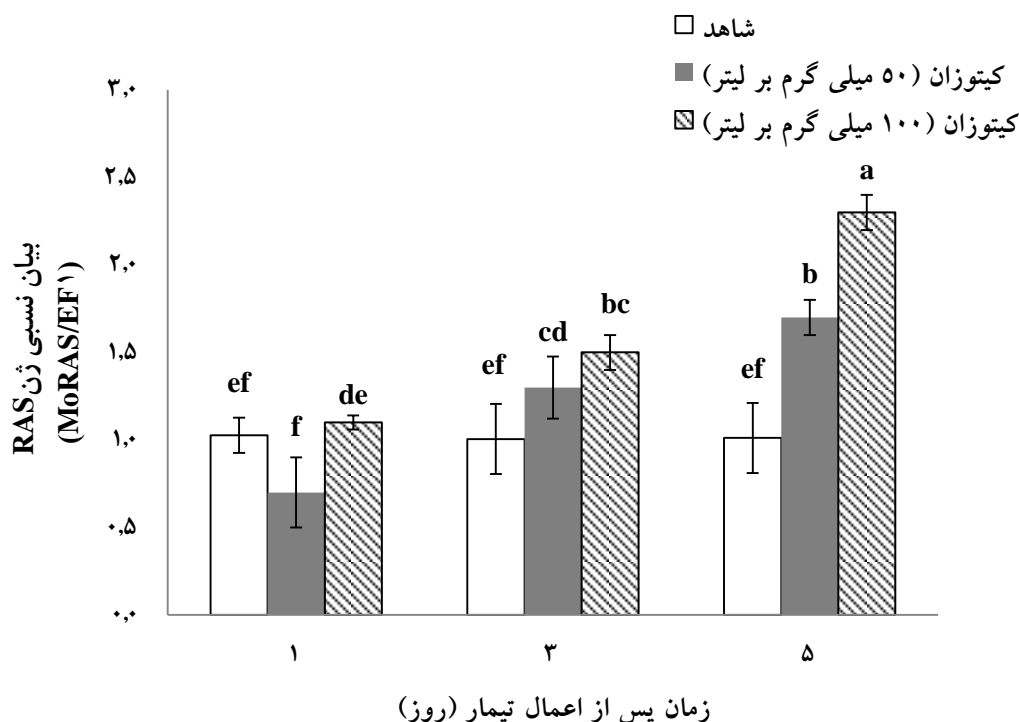
۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز را پنج روز پس از اعمال تیمار به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۹).



شکل ۹: اثر کیتوزان و زمان بر میزان بیان نسبی ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی داری ندارند.

### بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز

با گذشت یک روز از اعمال تیمار کیتوزان، تغییرات مشاهده شده در بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز نسبت به شاهد از لحاظ آماری معنی دار نبود (شکل ۱۰). بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز با افزایش زمان اعمال تیمار کیتوزان در مقایسه با شاهد به طور معنی دار ( $p \leq 0.05$ ) افزایش یافت. هم‌چنین با افزایش غلظت کیتوزان، افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز نسبت به شاهد مشاهده شد. به گونه‌ای که کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار، بیش‌ترین افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز را موجب شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: اثر کیتوزان و زمان بر میزان بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  اختلاف معنی‌داری ندارند.

### بحث

روش‌های زیست‌فن‌آوری با ارایه شواهد در رابطه با چگونگی مسیر بیوسنتزی و تنظیم متابولیت‌های ثانویه، برای محققان امکان دستوری هدفمند ژن‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیبات را جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با سرعت و هزینه کمتر فراهم نموده است. در سال‌های اخیر، افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان دارویی به‌وسیله محرک‌ها مورد توجه قرار گرفته است. براساس شواهد تولید اسید رزمارینیک در کشت سلولی بسیار بیش‌تر از تولید آن در گیاهان طبیعی می‌باشد (۲). بادرنجبویه یک گیاه مدل دارویی مناسب، جهت مطالعه در زمینه تنظیم بیوسنتز اسید رزمارینیک است. لذا، در این پژوهش تأثیر کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی بر مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک در کشت تعلیقی آن مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های اولیه نشان داد که در گیاه بادرنجبویه ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ، میزان کالوس بیش‌تری تولید کرد (شکل ۲). بنابراین، در بررسی‌های بعدی از کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه ساقه استفاده شد. این نتیجه توسط نتایج پژوهش‌های دیگر مورد تایید قرار گرفت (۲۳). با توجه به نتایج به‌دست آمده فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز تحت تأثیر کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در کشت تعلیقی بادرنجبویه، افزایش فعالیت این آنزیم را موجب شده است. درحالی‌که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در زمان سه روز بعد از اعمال تیمار افزایش نشان داده است (شکل ۴). در اکثر موارد به منظور درک تأثیر محرک‌ها بر دفاع گیاهی و متابولیسم ثانویه در کشت سلولی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز اندازه‌گیری شده است (۲۴). آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، یکی از آنزیم‌های کلیدی در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدی است که جریان متابولیت‌های اولیه را به کانال متابولیسم ثانویه هدایت و کنترل می‌کند. به‌عبارتی این مرحله، نقطه تنظیمی مهمی بین متابولیسم اولیه و ثانویه است (۲۵). این آنزیم با دامیناسیون فنیل‌آلانین و سنتز اسید سینامیک، پیش ماده مشترک برای

بیوسنتز ترکیبات پلی فنلی مانند لیگنین، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها، سینامات و فیتوالکسین‌ها را فراهم می‌کند (۲۶). نتایج تحقیقات متعددی افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز را تحت تیمار با محرک‌ها نشان داده است (۱۵، ۲۷ و ۲۸). استفاده از کیتوزان در کشت سلولی گیاه نارگیل فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز را در شروع تیمار به‌طور معنی‌داری افزایش داد. اگرچه این افزایش فعالیت تا روز سوم پس از افزودن کیتوزان ادامه داشت ولی فعالیت آن پس از گذشت پنج روز از آغاز تیمار کاهش نشان داد (۲۹). هم‌چنین افزایش فعالیت فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز، چهار روز پس از اعمال تیمار کیتوزان در کشت سلولی انگور مشاهده شد (۳۰). نتایج تأثیر کیتوزان بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز نشان داد که فعالیت این آنزیم در شروع تیمار کیتوزان به‌عنوان یک سیستم محافظتی در مقابل محرک افزایش و با گذشت زمان به‌صورت خودتنظیمی از فعالیت آن کاسته شده است.

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز، به‌عنوان آنزیمی کلیدی در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدی، نقش مهمی در سنتز ترکیبات فنلی به‌عهده دارد (۲۵). نتایج تحقیقات مختلف یک ارتباط مثبت بین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز و تجمع ترکیبات فنلی کل را نشان داده است. به‌عبارتی قرار گرفتن در معرض محرک به افزایش تجمع ترکیبات فنلی از طریق تحریک فعالیت این آنزیم منجر می‌شود (۲۷). براساس نتایج این پژوهش افزایش در میزان ترکیبات فنلی در گیاه بادرنجبویه هماهنگ با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز بود. به‌گونه‌ای که در زمان سه روز پس از اعمال تیمار کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز بیش‌ترین افزایش در میزان ترکیبات فنلی مشاهده شد (شکل ۵). استفاده از کیتوزان در کشت تعلیقی سیب طی سه روز پس از تیمار تولید ترکیبات فنلی را  $1/5$  تا  $2$  برابر در مقایسه با شاهد افزایش داد (۳۱). تحریک تجمع ترکیبات فنلی به‌وسیله محرک‌ها در کشت درون شیشه گونه‌های دیگر گیاهی مانند نارگیل با استفاده از کیتوزان (۲۹)، مریم‌گلی با استفاده از عصاره مخمر (۳۲) نیز گزارش شده است. نتایج پژوهش اسماعیل زاده و همکاران (۳۳) در کشت تعلیقی کتان سفید افزایش ترکیبات فنلی را با تیمار کیتوزان نشان داد. استفاده از تیمار کیتوزان در گیاه گل میمونی سازویی نیز افزایش ترکیبات فنلی را موجب شد (۱۵).

کیتوزان به‌عنوان محرک زیستی خارج سلولی آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۹ و ۳۴). تحقیقات بسیاری نشان داده است که کاربرد کیتوزان به‌عنوان محرک سلولی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان گوناگون افزایش داده است (۹، ۳۵-۳۸). بررسی‌ها نشان داده است که غلظت محرک، برحسب گونه گیاهی نقش مهمی در تحریک و شدت پاسخ گیاه به محرک دارد (۳۹). چنان‌چه در نتایج این پژوهش نشان داده شده است استفاده از کیتوزان به‌مدت سه و پنج روز در کشت تعلیقی بادرنجبویه میزان اسید رزمارینیک را نسبت به شاهد افزایش داده است. در این راستا نتایج اسماعیل‌زاده بهابادی و همکاران (۳۳) نشان داد که بیش‌ترین میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه پودوفیلوتوکسین و لاریسی‌رینول در کشت سلولی کتان سفید، تحت تأثیر تیمار کیتوزان با غلظت  $100$  میلی‌گرم بر لیتر، در روز پنجم پس از اعمال تیمار به‌دست آمد. استفاده از کیتوزان میزان تولید گلیکوزید فنیل اتانویید در کشت سلولی گیاه سیستان‌چه (۴۰)، سورولین در کشت سلولی باکوچی (۴۱)، تان‌ها در کشت سلولی فیلانتوس (۴۲) و آرتمیزین را در کشت ریشه مویین آرتمزیا (۱۲) افزایش داد.

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار کیتوزان افزایش میزان پروتئین کل را نسبت به شاهد موجب شده است. افزایش میزان پروتئین در حضور محرک‌ها، با افزایش سنتز پروتئین‌هایی مانند دهیدرین‌ها، پروتئین‌های شوک حرارتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نسبت داده شده است (۴۳). هم‌چنین کاهش میزان پروتئین کل در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار کیتوزان با تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها و کاهش میزان آن‌ها با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش حساسیت آن‌ها را در

مقابل پروتئولیزکننده داخل سلولی مانند پروتئازها و پپتیدازها مرتبط است. به عبارتی افزایش مدت زمان تیمار می‌تواند با مرگ سلولی و تخریب پروتئین‌ها کاهش میزان پروتئین‌ها را موجب شود (۴۴).

اثر محرک‌ها بر ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک به‌ویژه فنیل‌آلانین آمونیلایز و رزمارینیک اسید سینتاز در گیاهان مختلف نشان داده شده است (۴۵). بررسی‌های بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز نشان داد که ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز در زمان‌های اولیه بعد از تیمار با کیتوزان افزایش بیان داشته است. به عبارتی افزایش بیان ژن و فعالیت این آنزیم به‌عنوان اولین واکنش گیاه در برابر محرک‌ها عمل می‌کند. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز تاحدی از طریق تغییرات پس‌ترجمه‌ای تنظیم می‌شود؛ به‌گونه‌ای که فسفریلاسیون، موجب غیرفعال شدن آن می‌شود (۴۶). با افزایش زمان قرار گرفتن سلول‌ها در معرض محرک کیتوزان، به دلیل افزایش فرآورده آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (اسید سینامیک)، کاهش فعالیت آنزیم از طریق افزایش فسفریلاسیون مشاهده شد. کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار کیتوزان، القای سریع بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز را موجب شده است. مطالعات فری و همکاران (۲۰۰۹) تغییر بیان ژن تعدادی از آنزیم‌های اساسی درگیر در مسیر فنیل‌پروپانوییدی و پروفایل بیان پروتئین کل را بعد از تیمار با کیتوزان نشان داد. افزایش بیان ژن و پروتئین فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL)، افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در تیمار با کیتوزان را نشان داد (۲۷). با توجه به مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک در گیاه بادرنجبویه، آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز آخرین مراحل را در این مسیر متابولیسمی کاتالیز می‌کند. پژوهش‌های اولیه تجمع اسید رزمارینیک را با بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در کشت سلولی بادرنجبویه مرتبط نشان دادند (۳). براساس بررسی DNA ژنومی و بررسی‌های ساترن بلات مشخص شد که تنها یک نسخه از ژن رزمارینیک اسید سینتاز که فاقد اینترون است در بادرنجبویه حضور دارد. بنابراین بادرنجبویه یک گیاه مدل دارویی مناسب جهت تحقیقات در زمینه تنظیم بیوسنتز اسیدرزمارینیک است (۳). نتایج بررسی بیان ژن آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز نشان داد بیان آن در زمان پنج روز پس از تیمار کیتوزان نسبت به شاهد حدود سه برابر افزایش یافته است. به عبارتی براساس ارتباط بین بیان ژن آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز و تجمع اسید رزمارینیک، با افزایش زمان تیمار کیتوزان، میزان تولید اسیدرزمارینیک نیز افزایش نشان داده است. به عبارتی دیگر سنتز متابولیت ثانویه اسیدرزمارینیک پس از سنتز پیش‌ماده‌های لازم برای این ترکیب توسط آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز صورت می‌گیرد. در این راستا افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز به تجمع اسید رزمارینیک در گیاه آویشن منجر شد (۴۷). هم‌چنین استفاده از اسیدآبسیزیک به‌عنوان یک محرک در کشت شاخه بادرنجبویه، با افزایش بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز و رزمارینیک اسید سینتاز افزایش اسید رزمارینیک را موجب شده است (۴۸).

### نتیجه‌گیری

اهمیت اقتصادی متابولیت‌های ثانویه به‌دست آمده از گیاهان، تحقیقات را به استفاده از روش‌های زیست‌فن‌آوری جهت افزایش تولید این ترکیبات سوق داده است. کشت بافت و سلول گیاهی یکی از روش‌هایی است که امروزه در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه خاصی قرار گرفته است. علاوه بر آن استفاده از محرک‌ها یکی از موثرترین روش‌ها برای بهبود سنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان دارویی است. کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی از طریق تحریک سیستم دفاعی گیاه و بیان برخی ژن‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان دارویی موجب شده است. کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز آنزیم کلیدی دخیل در بیوسنتز ترکیبات فنلی، افزایش ترکیبات فنلی را در زمان سه روز پس از اعمال تیمار موجب شد. در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز به کاهش میزان ترکیبات فنلی منجر شد. بررسی‌های بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز در زمان‌های یک و سه روز بعد از تیمار با کیتوزان با

فعالیت آنزیم مربوطه هماهنگ بود. کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در زمان پنج روز پس از اعمال تیمار کیتوزان افزایش بیان نسبی ژن فنیل آلانین آمونیلیاز را موجب شد. افزایش بیان ژن آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز، تجمع اسید رزمارینیک را با افزایش زمان تیمار کیتوزان نشان داد. با توجه به مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک این نتیجه به دست می آید که سنتز اسیدرزمارینیک پس از آماده سازی پیش ماده های لازم برای این متابولیت ثانویه توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز صورت می گیرد. در نهایت، با توجه به نتایج این پژوهش، تیمار کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به مدت پنج روز با افزایش فعالیت و بیان ژن های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسیدرزمارینیک می تواند افزایش این ماده دارویی ارزشمند را موجب شود. بنابراین، استفاده از کیتوزان جهت افزایش متابولیت های ثانویه به عنوان چشم اندازی امیدوارکننده، در مطالعات زیست فناوری تایید می شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه ولی عصر (عج) برای حمایت های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق اعلام می دارند.

### منابع

1. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, et al. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *J Med Plant Res.* 2010; 4(25): 2753-2759.
2. Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry.* 2003; 62(2): 121-125.
3. Weitzel C, Petersen M. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry.* 2011; 72(7): 572-578.
4. Naderi S, Fakheri B, Esmailzadeh BS, Kamaladini H. Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. *Mod Genet J.* 2014; 9(3): 259-266.
5. Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M. Increasing the production of plant secondary metabolites, using biotic elicitors. *J Cell and Tissue.* 2013; 4(2): 119-128.
6. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.* 2019; 19(12): 880-895.
7. Orlita A, Sidwa-Gorycka M, Paszkiewicz M, Malinski E, et al. Stepnowski P. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotechnol Appl Biochem.* 2008; 51(2): 91-96.
8. Kauss H, Jeblick W, Domard A. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta.* 1989; 178: 385-392.
9. Kim H-J, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem.* 2005; 53(9): 3696-3701.
10. Flocco CG, Giulietti AM. Effect of chitosan on peroxidase activity and isoenzyme profile in hairy root cultures of *Armoracia lapathifolia*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2003; 110(3): 175-183.
11. Pitta-Alvarez SI, Giulietti AM. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* Effect of medium pH and growth phase. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 1999; 59(1): 31-38.

12. 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 Lett.* 2007; 29(7): 1143-1146.
13. Hasanloo T, Eskandari S, Najafi F. The role of chitosan on elevation of flavonolignans production in *Silybum marianum* hairy root culture. *J Cell and Tissue.* 2015; 6: 257-267.
14. Ayyobi N, Hosseini B, Fattahi M. Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of zarrin-giah (*Dracocephalum kotschy* Boiss). *J Mol Cell Res.* 2017; 30(1): 1-13.
15. Kamalipourazad M, Sharifi M, Zare Maivan H, Behmanesh M, et al. Increasing of P-coumarate 3-hydroxylase gene expression and phenylpropanoid compounds of *Scrophularia striata* by chitosan. *J Plant Process Funct.* 2017; 6: 81-90.
16. Shams Ardekani M, Amanzadeh Y, Jahanshir F, Jamshidi A. Pharmacognosical and plant tissue culture studies of *Melissa officinalis* L. *J Med Plants.* 2005; 4(13): 68-71.
17. Khan W, Prithviraj B, Smith DL. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J Plant Physiol.* 2003; 160(8): 859-863.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.* 1976; 72(1-2): 248-254.
19. Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide.* 2006; 15(4): 351-358.
20. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 1999; 299: 152-178.
21. Öztürk M, Duru ME, İnce B, Harmandar M, et al. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chem.* 2010; 123(4): 1352-1356.
22. Döring AS, Pellegrini E, Della Batola M, Nali C, et al. How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? *J plant physiol.* 2014; 171(5): 35-41.
23. Meftahizade H, Lotfi M, Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9(28): 4314-4321.
24. Zhao JL, Zhou LG, Wu JY. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87(1): 137-144.
25. Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, et al. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol.* 2010; 153(4): 1526-1538.

26. Sahu R, Gangopadhyay M, Dewanjee S. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. *Acta Physiol Plant*. 2013; 35: 1473-1481.
27. Nag S, Kumaria S. In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. *Phytochemistry*. 2018; 156: 176-183.
28. Yu XZ, Fan WJ, Lin YJ, Zhang FF, et al. Differential expression of the PAL gene family in rice seedlings exposed to chromium by microarray analysis. *Ecotoxicology*. 2018; 27(3): 325-335.
29. Chakraborty M, Karun A, Mitra A. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J Plant Physiol*. 2009; 166(1): 63-71.
30. Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M, Righetti L, et al. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*. 2009; 9(3): 610-624.
31. Cai Z, Kastell A, Smetanska I. Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus domestica* Borkh. *J Hortic Sci Biotechnol*. 2014; 89(1): 93-99.
32. Chen H, Chen F. Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*. 2000; 19: 710-717.
33. Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Behmanesh M. Increased the genes expression of phenylpropanoid biosynthesis pathway and production of podophyllotoxin by chitosan in cell cultures of *Linum album*. *Modares J Biotechnol*. 2013; 4: 57-64.
34. Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, et al. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2010; 103: 333-342.
35. Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Steenkamp PA, et al. Phenylpropanoid defences in *Nicotiana tabacum* cells: Overlapping metabolomes indicate common aspects to priming responses induced by lipopolysaccharides, chitosan and flagellin-22. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0151350.
36. Cai Z, Kastell A, Mewis I, Knorr D, et al. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2012; 108(3): 401-409.
37. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol Lett*. 2011; 33(2): 369-374.
38. Wiktorowska E, Długosz M, Janiszowska W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme Microb Technol*. 2010; 46(1): 14-20.
39. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci*. 2007; 172(5): 861-875.

40. Cheng XY, Zhou HY, Cui X, Ni W, et al. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *J biotechnol.* 2006; 121: 253-260.
41. Ahmed SA, Baig MMV. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi J Biol Sci.* 2014; 21(5): 499-504.
42. Malayaman V, Sisubalan N, Senthilkumar R, Ranjithkumar R. Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. *Int J Biol Macromol.* 2017; 104(Pt B): 1656-1663.
43. Landi S, Capasso G, Ben Azaiez FE, Jallouli S, et al. Different roles of heat shock proteins (70 kDa) during abiotic stresses in barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Plants.* 2019; 8(8): 248-267.
44. Jaleel CA, Gopi R, Kishorekumar A, Manivannan P, et al. Interactive effects of triadimefon and salt stress on antioxidative status and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus*. *Acta Physiol Plant.* 2008; 30(3): 287-292.
45. Trócsányi E, György Z, Zámboriné-Németh É. New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies. *Curr. Plant Biol.* 2020; 3: 100162.
46. Bolwell GP. A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of french bean. *Phytochemistry* 1992; 31(12): 4081-4086.
47. Trócsányi E, György Z, Inotai K, Szabó K, et al. Enhanced rosmarinic acid accumulation and rosmarinic acid synthase gene expression under drought stress in thyme (*Thymus vulgaris*). *Planta Med.* 2015; 81(16): PM\_246.
48. Mousavi S, Shabani L. Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA. *Biol Plant.* 2019; 63: 418-424.

## The effect of chitosan on phenolic compounds, rosmarinic acid and expression of key genes involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell suspension culture of *Melissa officinalis* L.

Mahdavianfard A M.Sc., Dahajipour Heidarabadi M\* Ph.D., Malekzadeh KH Ph.D., Sahhafi SR Ph.D.

Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

\* Email corresponding author: m.dahaji@vru.ac.ir

Received: 16 Oct. 2020

Accepted: 3 Feb. 2021

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was the investigation of the effect of chitosan on phenolic compounds, rosmarinic acid content, and key genes expression involved in the biosynthesis of these compounds in *Melissa officinalis* L. cell suspension culture.

**Material and Methods:** A combination of NAA ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), 2, 4-D ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), and kinetin ( $0.5\text{ mg L}^{-1}$ ) and stem explants were used for callus induction. After initiation of cell suspension culture, chitosan treatment ( $0, 50, \text{ and } 100\text{ mg L}^{-1}$ ) was performed for one, three, and five days in a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, soluble protein, phenolic compound, and rosmarinic acid content were measured. Also, the expression of phenylalanine ammonia-lyase and rosmarinic acid synthase (RAS) genes was evaluated by real-time PCR.

**Results:** PAL activity at  $50\text{ mg L}^{-1}$  chitosan showed the highest increase after three days of treatment, which was accompanied by an increase in phenolic compounds. The relative expression of the PAL gene at  $50\text{ mg L}^{-1}$  chitosan increased 2.5 fold at three days after treatment compared to control. This increase in the expression of the PAL gene resulted in an increase in enzyme activity. However, the highest increase in expression of the RAS gene was observed at  $100\text{ mg L}^{-1}$  chitosan in five days after treatment, which led to an increase in rosmarinic acid content.

**Conclusion:** According to the results, chitosan treatment is recommended to increase of rosmarinic acid content in lemon balm cell culture for five days.

**Keywords:** Cell suspension culture, Chitosan, Lemon balm, Phenylalanine ammonia-lyase, Rosmarinic acid synthase