Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The effect of different concentrations of chitosan on the production of phenolic acids in cell culture of *Lactuca undulate* Ledeb.

Morteza Mofid Bojnoordi

Ph.D. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran. E-mail address: Mofid.morteza@gmail.com

Mahnaz Aghdasi

*Corresponding author. Associated Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran. E-mail address: Aghdasi1346@gmail.com

Mohammad Fatemi

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran. E-mail address: S.m.fatemi@gmail.com

Abstract

Objective

One of the most important methods for increasing the production of secondary metabolites is the use of elicitors in plant cell culture. A biopolymer made from D-glucosamine units, chitosan can be found in the cell walls of fungi and the exoskeletons of arthropods. Plants respond to chitosan treatment by generating defense responses, increasing antioxidant enzyme activity, accumulating phenolic compounds, and releasing flavonoids. In the current study, chitosan was used as an elicitor to induce the production of phenolic acids in *Lactuca undulata* cells suspended in a liquid medium.

Materials and methods

First, cell suspension culture was prepared from 45 day old callus derived from leaf explants of *Lactuca undulata* on ½ MS medium supplemented with 0.1 and 1 mg/L 2,4-D and Kin. The effect of different concentrations of chitosan (0, 50, 100, and 200 mg/L) on cell suspension was evaluated during 24, 48, and 72 hours. After harvesting samples, the percentage of cell viability,

total phenols and flavonoids, chicoric acid, chlorogenic acid, and caffeic acid contents, as well as phenylalanine-ammonia lyase (PAL) activity and lipid peroxidation were measured.

Results

In the present study, we found that the concentration and duration of chitosan treatment affect the production of phenolic compounds (including chicoric acid) in the *Lactuca undulata* cell suspension culture. After 24 hours of treatment with 50 mg/L chitosan, chicoric acid levels had increased 2.8-fold compared to the control. After 24 and 48 hours of treatment with 200 mg/L chitosan, the highest levels of chlorogenic and caffeic acids were observed. Furthermore, the present study found the chitosan treatment resulted in an increase in the amount of phenol and total flavonoids as well as an increase in PAL enzyme activity. Chitosan induces lipid peroxidation and reduces cell viability in high concentrations, indicating a negative effect.

Conclusions

The present study found that low concentrations of chitosan could induce chicoric acid production in *Lactuca undulata* cell suspension cultures, which can be utilized in the pharmaceutical industry as a new method in the production of chicoric acid and its derivatives.

Keywords: Cell suspension culture, Cichoric acid, *Lactuca undulata*, PAL, Total phenol.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mofid Bojnoordi M, Aghdasi M, Fatemi S.M (2022) The effect of different concentrations of chitosan on the production of phenolic acids in cell culture of *Lactuca undulate* Ledeb. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 1-20.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 1-20. DOI: 10.22103/jab.2022.18773.1369

Received: March 10, 2022. Received in revised form: May 07, 2022.

Accepted: May 08, 2022. Published online: August 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر تولید اسیدهای فنلی در کشت سلول کاهوی موجدار (*Lactuca undulate Ledeb*)

مرتضی مفید بجنوردی

دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: Mofid.morteza@gmail.com

مهناز اقدسی

* دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: aghdasi1346@gmail.com

محمد فاطمی

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: s.m.fatemi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸

چکیده

هدف: استفاده از الیسیتورها در کشت سلولی گیاهان یکی از مهم‌ترین روش‌ها جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. کیتوزان بیوپلیمری است که از واحدهای D–گلوکزآمین ساخته شده و در دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی بندپایان یافت می‌شود. القای پاسخ‌های دفاعی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مسیر فنیل‌پروپانوئیدها، تجمع ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدها از جمله پاسخ‌های گیاهان به تیمار کیتوزان می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر کیتوزان بعنوان یک الیسیتور در افزایش تولید اسیدهای فنلی در سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار (*Lactuca undulateLedeb*) است.

مواد و روش‌ها: ابتدا سوسپانسیون سلولی از کالوس‌های ۴۵ روزه حاصل از قطعه جداکشت برگ کاهوی موجدار در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin تولید شد. سپس اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سوسپانسیون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. بعد از برداشت نمونه‌ها، درصد زنده‌مانی، مقدار فنل و فلاوونوئید کل، شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: داده‌های حاضر نشان داد که غلظت کیتوزان و مدت زمان تیمار عوامل تعیین‌کننده در مقدار ترکیبات فنلی ازجمله شیکوریک اسید در سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار است. مقدار شیکوریک اسید در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۲۴ ساعت نسبت به تیمار شاهد ۲/۸ برابر افزایش نشان داد. بیشترین مقدار کلروژنیک اسید و کافئیک اسید پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان بدست آمد. بعلاوه نتایج حاضر بیانگر اثر تیمار کیتوزان بر افزایش فنل و فلاوونوئید کل همراه با افزایش فعالیت آنزیم PAL بوده است. افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های بالای کیتوزان نشان‌دهنده اثر منفی آن بر فعالیت سلول‌ها است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاضر نشان داد کیتوزان در غلظت‌های پایین سبب افزایش مقدار شیکوریک اسید در سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار شده که از آن می‌توان در صنایع داروسازی به عنوان روشی نوین در تولید شیکوریک اسید و مشتقات آن استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: سوسپانسیون سلولی، شیکوریک اسید، کاهوی موجدار، فنل کل، فنیل آلانین آمونیا لیاز

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مفیدبجنوردی مرتضی، اقدسی مهناز، فاطمی سید محمد (۱۴۰۱) اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر تولید اسیدهای فنلی در کشت سلول کاهوی موجدار (*Lactuca undulate Ledeb*). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۳)، ۱-۲۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی سبب بیوسنتز و انباشته‌شدن متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. از انواع الیسیتورهای زیستی می‌توان به پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین، کیتوزان و گلوکان) اشاره کرد (Vasconsuelo et al. 2006). کیتوزان ترکیبی است که از واحدهای D-گلوکزآمین ساخته شده و در اثر داستیله شدن کیتین بدست می‌آید. این ترکیب در دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی بندپایان یافت می‌شود (Iriti et al. 2010). مطالعات نشان می‌دهد کیتوزان باعث افزایش مقاومت گیاهان بخصوص محصولات کشاورزی در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌شود. به عنوان مثال کاربرد کیتوزان سبب القای پاسخ‌های دفاعی در گندم، فلفل، گوجه‌فرنگی، ریحان، خیار، رز و توت‌فرنگی شده است (Singh 2016). با اتصال مولکول‌های الیسیتور به گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی، مسیر انتقال پیام فعال شده که که منجر به تغییرات فیزیولوژیکی، تغییر بیان ژن‌ها و فعال شدن برخی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Singh 2014; Singh

2016). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مسیر فنیل‌پروپانوئیدها و تجمع ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدها و فیتوآلکسین‌ها از جمله پاسخ‌های گیاهان به تیمار کیتوزان است (Ferri & Tassoni 2011). در پژوهشی .Yin et al (2012) نشان دادند که مقدار پلی‌فنل‌ها در *Greek Oregano* (Yin et al. 2012) در پاسخ به تیمار کیتوزان افزایش می‌یابد. همچنین .Khan et al (2003) افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) و تیروزین‌آمونیالیاز را در برگ‌های سویا (Khan et al. 2003) در پاسخ به تیمار کیتوزان گزارش دادند.

امروزه از کشت سلولی به عنوان یک روش مفید و سودمند در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده می‌شود. کشت‌های سلولی نه تنها متابولیسم بالایی نسبت به بافت‌های تمایزیافته دارند، بلکه همچنین چرخه‌های متابولیکی در آن‌ها به دوره‌های کوتاه‌مدت فشرده شده است. همچنین دستکاری این کشت‌ها و اعمال تیمارهای مختلف در آنها راحت‌تر بوده و کنترل بیشتری بر روی آنها در مقایسه با گیاهان کامل می‌توان داشت (Chakrabortya et al. 2009). گزارش‌های منتشر شده نشان می‌دهد که کاربرد کیتوزان در کشت سلولی گیاهان مختلف منجر به افزایش تولید ترکیبات ارزشمند مانند ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاوونوئیدها می‌شود (Valletta et al. 2016).

کاهوی موجدار با نام علمی *Lactuca undulata* Ledeb. گیاهی از خانواده آفتابگردان است که در نقاط مختلف دنیا مانند اروپا ، ترکیه، ایران، قفقاز، آسیای مرکزی، روسیه، افغانستان، پاکستان، عراق و اردن گسترش دارد (Asadi et al. 2013). بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان داده که این گیاه منبع مناسبی از اسیدهای فنلی مانند شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید است (Ramezannezhad et al. 2019). شیکوریک اسید ترکیب مهمی است که از آن در تهیه مکمل‌های غذایی و داروهای تقویت-کننده سیستم ایمنی در مقابله با بیماری‌های ویروسی و عفونت استفاده می‌شود (Nuissier et al. 2010).

در رابطه با اثر الیسیتورهای قارچی بر افزایش تولید شیکوریک اسید در گیاهان گزارش‌های متعددی وجود دارد. به‌عنوان مثال .Hudec et al (2007) نشان دادند که کاربرد الیسیتورهای قارچی سبب افزایش مقدار شیکوریک اسید در گیاه سرخارگل ارغوانی می‌شود (Hudec et al. 2007). همچنین نتایج Złotek & Swieca (2016) نشان داد که اسپری‌کردن عصاره مخمر بر روی برگ کاهوی خوراکی سبب افزایش تولید شیکوریک اسید می‌شود (Zlotek & Swieca 2016). اما تاکنون گزارشی در ارتباط با اثر الیسیتورهای قارچی بر تولید شیکوریک اسید در گیاه کاهوی موجدار در شرایط کشت سلول منتشر نشده است. باتوجه به اهمیت شیکوریک اسید در صنایع دارویی و غذایی، در این پژوهش سعی شده است تا اثر تیمار غلظت‌های مختلف کیتوزان بر تولید این متابولیت با ارزش در کشت سلولی کاهوی موجدار مورد بررسی قرار گیرد. همچنین در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر متابولیت‌های ثانویه دیگر مانند فنل و فلاوونوئید کل، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و همچنین فرآیندهای فیزیولوژی ازجمله فعالیت آنزیم PAL مورد ارزریابی و بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: به‌منظور استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، از کالوس‌های ۴۵ روزه حاصل از قطعه جداکشت برگ کاهوی موجدار که در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin تولید شده بودند، استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم کالوس به ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin و ۳۰ گرم ساکارز با pH= ۵/۸ انتقال یافت. سوسپانسیون سلولی هر ۱۵ روز یکبار واکشت و به محیط کشت مایع MS ۱/۲ تازه منتقل شد. در طول آزمایش محیط کشت سوسپانسیون سلولی بر روی شیکر (با ۱۱۰ دور در دقیقه) و در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Hall 2000). سپس سلول‌های هموژن شده برای سنجش‌های بعدی استفاده شدند.

منحنی رشد سلولی: به منظور رسم منحنی رشد، تعداد سلول‌ها در محیط کشت در فواصل زمانی ۳ روزه و به مدت ۳۰ روز شمارش شدند. به‌این منظور ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و سپس با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش شدند. درنهایت با استفاده از معادلات زیر تعداد سلول‌ها محاسبه شد (Hall 2000).

تعداد سلول در ۱ میلی‌لیتر نمونه = (تعداد سلول‌های شمارش شده)×(حجم فاکتور رقیق کننده/ تعداد مربع‌های شمارش شده)× $۱۰^۴$

تعداد سلول در نمونه اصلی = تعداد سلول در ۱ میلی‌لیتر نمونه × حجم نمونه اصلی

آماده سازی الیسیتور: تعیین زمان مناسب برای اعمال تیمار با استفاده از منحنی رشد رسم شده در مرحله قبل صورت گرفت. در این آزمایش زمان مناسب برای اعمال تیمار کیتوزان (در غلظت‌های مختلف ۰، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر)، در پایان رشد سریع سلول‌ها تعیین شد. جهت تهیه محلول کیتوزان، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از این ماده با ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۰/۱٪ مخلوط و سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفت تا درنهایت استوک تغلیظ شده به دست آمد. پس از تنظیم pH بر روی ۵/۸، محلول حاصل اتوکلاو (۲۰ دقیقه، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) شد. تیمار الیسیتورها در روز شانزدهم کشت سلولی صورت گرفت (Kazi et al. 2019). سلول‌ها در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار، با استفاده از کاغذ صافی استریل از محیط کشت جدا شدند. بخشی از نمونه به دست آمده جهت سنجش فعالیت PAL و پراکسیداسیون لیپید سریعا در نیتروژن مایع فریز شده و به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بخش دیگری از نمونه‌های حاصل، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ روز خشک شدند تا جهت سنجش فنل و فلاوونوئید کل، شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید مورد استفاده قرار گیرند.

زنده‌مانی سلول: زنده‌مانی سلول به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد. به‌این منظور ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی با محلول آماده تریپان‌بلو (۰/۴ درصد، DNAbiotech, I.R.Iran) به مدت ۳ تا ۴ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سپس سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند (Fernández-Bautista et al. 2016).

سنجش فنل و فلاونوئید کل: مقدار فنل کل با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu Reagent) انجام شد (Meda et al. 2005). محتوی فلاوونوئید کل در عصاره‌های استخراج‌شده به کمک معرف آلومینیوم کلراید (AlCl3) و بر اساس روش Chang et al. (2002) انجام شد.

سنجش شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید: عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش Luo et al. (2003) با اندکی تغییرات انجام شد. به این منظور ۰/۱ گرم پودر خشک شده از نمونه در استونیتریل ۲۰ درصد (V/V) خیسانده شده و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و بر روی شیکر قرار گرفت. عصاره‌ی حاصل بعد از فیلترشدن توسط کاغذ صافی به مدت ۱۰ دقیقه در۴۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در نهایت، عصاره شفاف رویی به‌منظور سنجش شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیزهای HPLC: به‌منظور سنجش شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید از دستگاه HPLC (دارای ستونی با مشخصات C_{18} (4.6 mm×250 mm) با آشکارساز UV/VIS، ردیاب Diod Array، پمپ L- Merck Hitachi 7100) و نرم‌افزار EZchrome مدل Hitachi-Japan استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص (حلال A) و آب‌اسیدی شده با ۰/۱ درصد فسفریک اسید (حلال B) بود. سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول‌موج‌های انتخابی دستگاه شامل۳۳۰ نانومتر برای سنجش شیکوریک اسید و ۲۷۸ نانومتر برای سنجش کلروژنیک و کافئیک اسید بود. برای رسم نمودارهای استاندارد، غلظت‌های مختلف سه ترکیب استاندارد به ستون تزریق و پس از محاسبه سطح زیرپیک، نمودارها رسم شدند (Luo et al. 2003).

سنجش فعالیت آنزیم PAL: مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه کالوس با ۱ میلی‌لیتر محلول بافر تریس- هیدروکلریک اسید ۰/۰۵ مولار با pH: ۸ حاوی ۰/۸ میلی‌مولار مرکاپتواتانول و ۱٪ W/V پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVPP) در بوته چینی سرد هموژن و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. برای سنجش فعالیت PAL از فاز رویی استفاده شد. مخلوط واکنش آنزیمی عبارت بود از ۱ میلی‌لیتر محلول بافر تریس- هیدروکلریک‌اسید pH:۸ ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار که در نهایت حجم مخلوط با آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسید. بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر اسیدهیدروکلریک ۱ نرمال واکنش متوقف و مقدار جذب در ۲۹۰ نانومتر نسبت به شاهد (لوله آزمایش فاقد عصاره گیاه) اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه $A= \varepsilon LC$ محاسبه شد. در این فرمول A برابر میزان جذب، L طول کووت، C، غلظت محلول است. همچنین در این رابطه ضریب خاموشی (ε) اسید سینامیک برابر با $M^{-1}.Cm^{-1}$ ۹۰۰۰ ، است (Sykłowska-Baranek et al. 2012).

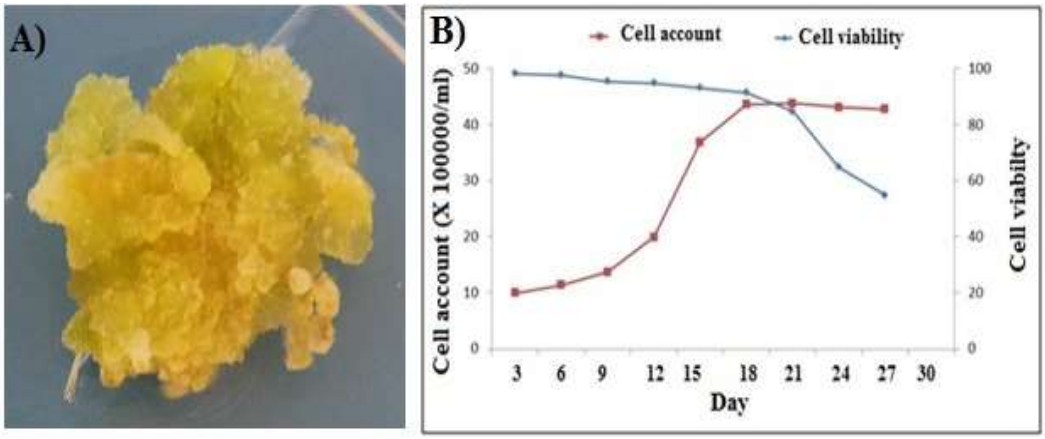
سنجش پراکسیداسیون لیپید: سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در عصاره حاصل از سوسپانسیون سلولی بر اساس مقدار مالون‌دی‌آلدهید تولیدی و به روش Prochazkova et al. (2001) انجام شد.

آنالیز آماری: آزمایش در قالب طرح تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. رسم جداول و نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

تولید کالوس: در این آزمایش کالوس از قطعه جدا کشت برگ در محیط کشت **MS** ۱/۲ حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر **2,4-D** و **Kin** تولید شد. کالوس‌های تولیدشده در این تیمار بافتی نرم داشته و به رنگ کرم بودند (شکل **1-A**).

منحنی رشد سلول: داده های حاصل نشان داد که سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار به مدت نه روز (روز اول تا نهم کشت) در فاز تاخیر قرار دارند. از روز نهم به بعد رشد سلولی افزایش یافته و سلول‌ها وارد فاز لگاریتمی شده و به مدت یازده روز در این فاز باقی ماندند. رشد سریع سلول‌ها پس از نوزده روز متوقف شده و سپس سلول‌ها وارد فاز ثابت شدند. در این تحقیق درصد زنده‌مانی سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار به مدت سی روز سنجش شد. نتایج نشان داد که با گذشت زمان زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد. به‌طوریکه در روز سی‌ام کشت به کمترین مقدار خود رسیده و نسبت به روز اول ۵۰٪ کاهش یافت (شکل **1-B**).



شکل ۱.A) کالوس حاصل از قطعه جداکشت برگ در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، B) منحنی رشد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس برگ کاهوی موجدار *(Lactuca undulate)* در طی استقرار کشت سلولی

Figure 1. A) Leaf derived callus on ½ MS medium supplemented with 0.1 and 1 mg/L 2,4-D and Kin, B) The growth curve and viability of cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* during cell culture stablishment

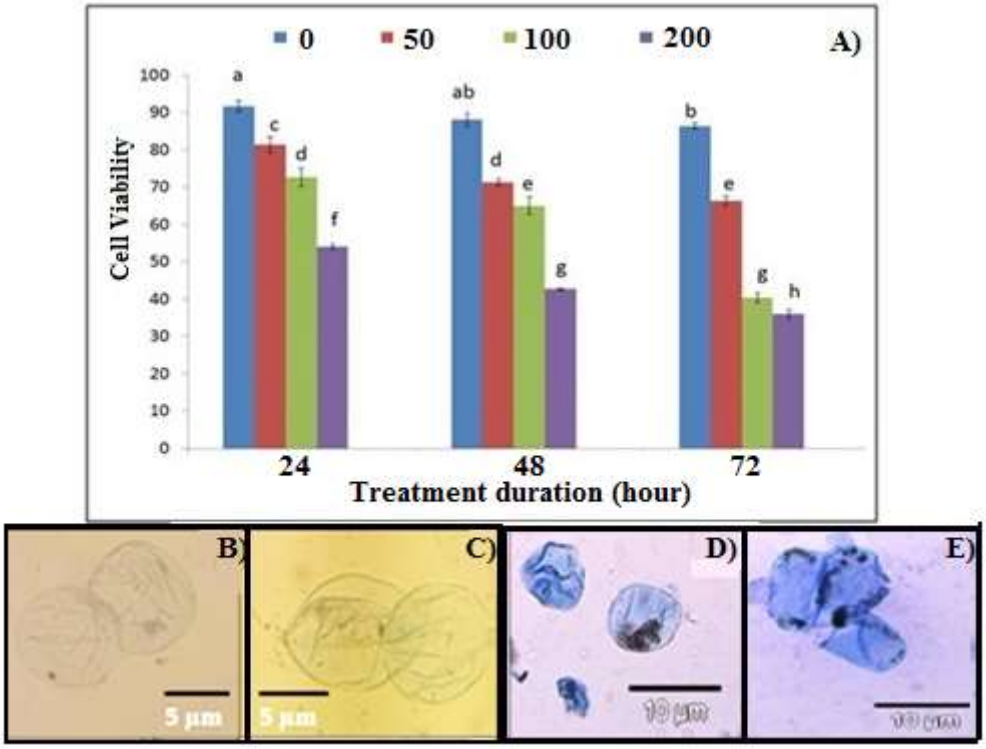
درصد زنده‌مانی سلول‌ها: تیمار سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس برگ با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب کاهش معنی‌دار درصد زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به نمونه شاهد (سوسپانسیون سلولی بدون اعمال تیمار) شد. کمترین درصد زنده‌مانی (۳۶٪) در تیمار سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان

و پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل 2-A). از طرفی دیگر رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان‌بلو نیز نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان و مدت زمان تیمار درصد زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی کاهش می یابد. در این آزمایش ورود رنگ به داخل سلول‌ها نشاندهنده مرگ سلول می‌باشد (شکل 2-B). گزارش‌های مشابه دیگر نیز نشان داده که افزایش غلظت کیتوزان از ۱۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش رشد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سلولی *Scrophularia striata* می‌شود (Kamalipourazad et al. 2016).

فنل و فلاوونوئید کل: تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش مقدار فنل و فلاوونوئید کل در تیمارهای مختلف نشان داد که بین داده‌ها در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقدار فنل و فلاوونوئید کل در همه تیمارهای کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۳). با افزایش غلظت کیتوزان مقدار فنل کل در همه تیمارها افزایش یافت، بطوری‌که بیشترین مقدار در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و پس از ۲۴ (۶۱/۴۵ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) و ۴۸ ساعت (۶۳/۵۶ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) مشاهده شد. مقدار فنل کل در این تیمارها نسبت به شاهد (۲۵/۲۵ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) افزایش ۲/۵ برابری نشان داد (شکل 3-A). با افزایش مدت زمان تیمار به ۷۲ ساعت، مقدار فنل کل در مقایسه با تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته کاهش معنی‌دار نشان داد. تیمار سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار با غلظت‌های مختلف کیتوزان نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقدار فلاوونوئید کل در همه تیمارها نسبت به شاهد بود (شکل 3-B). بیشترین مقدار فلاوونوئید کل (۵۳/۹۶ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) در تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش ۲/۶ برابری آن نسبت به نمونه شاهد (۲۰/۶۲ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) است. این نتایج مطابق با نتایج Singh است که نشان داد تیمار کیتوزان سبب افزایش مقدار فنل و فلاوونوئید کل در برگ‌های گیاه اسفناج می‌شود (Singh 2016). همچنین .Kamalipourazad et al (2016) افزایش سه برابری میزان فنل و فلاوونوئید کل را در کشت سلولی *Scrophularia striata* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده کردند. در ارتباط با تجمع ترکیبات فنلی، نتایج دیگر محققان نشان داده که تیمار ریشه‌های موئینه *Daucus carota* L به مدت ۳۶ ساعت با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان سبب ۶ برابر شدن تولید هیدروکسی بنزوئیک در مقایسه با نمونه‌های شاهد شده است (Sircar & Mitra 2009). اثر کیتوزان بر مقدار مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم PAL: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده درسوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف کیتوزان بوده است (جدول ۱). با افزایش غلظت کیتوزان مقدار مالون‌دی‌آلدهید تولید شده افزایش یافت. بطوری‌که بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدهید پس از ۴۸ ساعت و در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (به ترتیب ۱۱/۶۶ و ۱۱/۵۷ نانومول بر گرم وزن تر) و ۷۲ ساعت و در تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۲/۶۵ نانومول بر گرم وزن تر) کیتوزان مشاهده شد (شکل 4-A). کاهش درصد زنده‌مانی همراه با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در تایید نتایج .Zuppini et al است. این محققان نشان دادند که تیمار سوسپانسیون سلولی سویا با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان سبب نشت Ca+2 و افزایش H2O2، انقباض غشای پلاسمایی، متراکم شدن کروماتین و تحریک

فعالیت پروتئازها می‌شود (Zuppini et al. 2003). در پژوهشی Cabrera et al. (2006) گزارش کردند که غلظت‌های بالای کیتوزان سمی بوده و سبب مرگ سلول‌ها می‌شود. باتوجه به اینکه در پژوهش حاضر کمترین درصد زنده‌مانی و بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در تیمار با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و پس از ۷۲ ساعت از شروع تیمار مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد که کاهش زنده‌مانی سلول‌ها در این تیمار بدلیل آسیب به غشاهای سلولی باشد. از طرفی با افزایش مدت زمان تیمار مواد مغذی در محیط سوسپانسیون سلولی کاهش یافته و تجمع ترکیبات سمی تولید شده توسط سلول‌ها افزایش می‌یابد. همچنین Singh نشان داد که مرگ سلولی در غلظت‌های بالای کیتوزان بدلیل افزایش تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به غشاها رخ می‌دهد. مولکول‌های ROS در مقادیر پایین سبب فعال‌شدن مسیر سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله ترکیبات فنلی می‌شوند، در حالی‌که اگر توازن بین مقدار تولید این مولکول‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان بهم بخورد تنش اکسیداتیو و اختلال در فرآیندهای سلولی صورت گرفته که در نهایت مرگ سلولی را سبب می‌شود (Singh 2016).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار فعالیت آنزیم PAL در کشت سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف کیتوزان است (جدول ۱). مقدار فعالیت PAL پس از ۲۴ ساعت تیمار با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان (۲/۶۷ میکرومول سینامیک اسید تولیدی در دقیقه در گرم بافت تر) افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد (۲/۰۴ میکرومول سینامیک اسید تولیدی در دقیقه در گرم بافت تر) نشان داد. اما با افزایش مدت زمان تیمار و غلظت کیتوزان مقدار فعالیت PAL ثابت باقی ماند (شکل ٤-ب). داده‌های حاضر نشان می‌دهد که کیتوزان در غلظت‌های پایین فعالیت PAL را در سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار تحریک می‌کند. افزایش فعالیت PAL و به دنبال آن افزایش مقدار فنل و فلاوونوئید کل، کافئیک اسید و مشتقات آن نشاندهنده فعال‌شدن مسیر سنتز فنیل‌پروپانوئید در تیمار با کیتوزان است. پیش از این Mejía-Teniente et al. (2013) نشان دادند که تیمار کیتوزان سبب افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در گیاه *Capsicum annum* می‌شود Landi و Landi et al. (2014) نیز گزارش کردند که تیمار میوه توت‌فرنگی با کیتوزان ۱٪ سبب افزایش ۴ برابری در بیان ژن *PAL* و افزایش ۲ برابری فعالیت این آنزیم بعد از ۲۴ ساعت می‌شود. تیمار کشت سلولی کتان (*Linum usitatissimum* L.) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان نیز سبب افزایش مقدار لیگنان‌ها و افزایش ۵ برابری در فعالیت PAL بعد از ۲۴ ساعت شده است (Ahmad et al. 2018). از طرفی دیگر نشان داده شده است که اسپری برگ‌های اسفناج با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان باعث افزایش ۴ برابری فعالیت PAL می‌شود (Singh 2016). همچنین Chakrabortya et al. (2009) افزایش ۴ برابری فعالیت PAL را بعد از ۸ ساعت و افزایش ۷ برابری فعالیت آنزیم ۴-کومارویل‌کوآلیگاز را بعد از ۲۴ ساعت گزارش دادند.



شکل۲. A) درصد زنده‌مانی سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار (*Lactuca undulate*) بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.01$) با توجه به آزمون دانکن است. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان‌بلو پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان: B) صفر میلی‌گرم بر لیتر (شاهد)، C) ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۲۴ ساعت، D) ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۷۲ ساعت، E) ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۷۲ ساعت

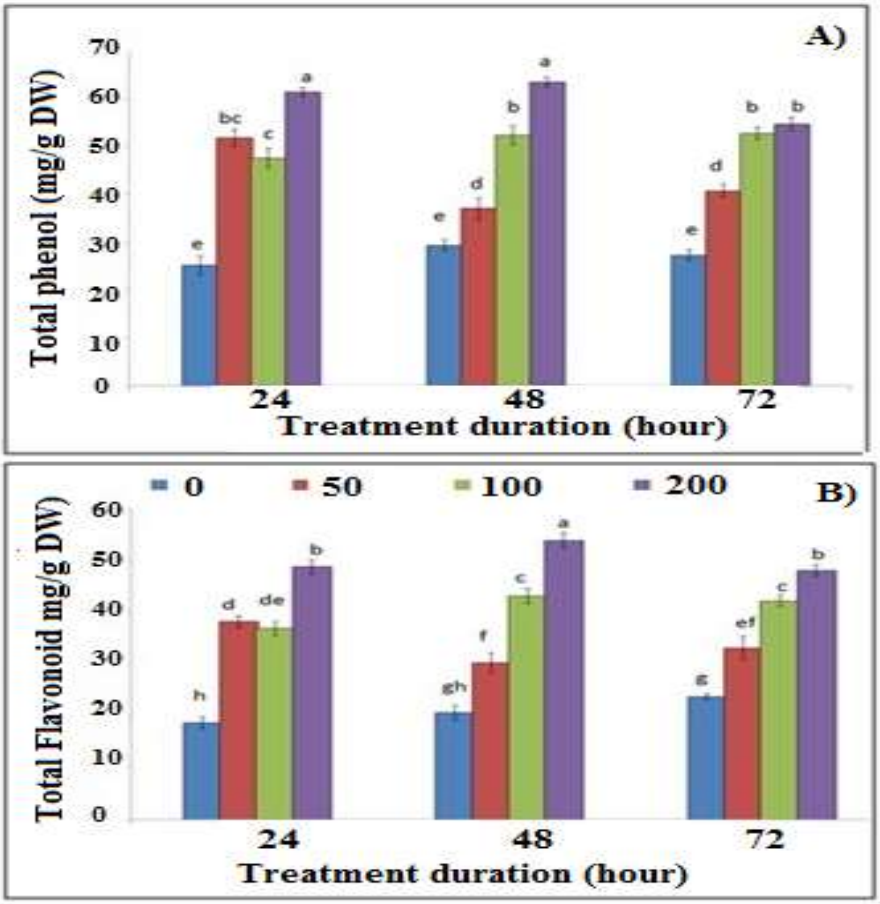
Figure 2. A) The percent of cell viability in cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* under treatment of different concentrations (50, 100 and 200 mg/L) of chitosan during 24, 48 and 72 hours. Data are means ±SE. Columns with different letters indicate significant difference at $p\leq0.05$, according to Duncans test. Cells staining with trypan blue after treatment with different concentrations of chitosan: B) 0 mg/L (control), C) 50 mg/L after 24 hours, D)100 mg/L after 72 hours and E) 200 mg/L after 72 hours

اثر کیتوزان بر مقدار شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید: تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش مقدار شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید در تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان نشان داد که بین داده‌ها در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). بیشترین مقدار تجمع شیکوریک اسید در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و پس از ۲۴ (۱۱/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۴۸ (۹/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) ساعت به‌دست آمد. این نتیجه نشان‌دهنده افزایش ۲/۸ برابری مقدار شیکوریک اسید نسبت به تیمار شاهد (۴/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) است.

جدول ۱. تجزیه واریانس داده‌های تفاوت میانگین درصد زنده‌مانی، مقدار فنل کل، فلاوونوئید کل، شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، مقدار مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم PAL در سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار تحت غلظت‌های مختلف کیتوزان. کیتوزان با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت سوسپانسیون سلولی افزوده و بعد از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت از شروع تیمار نمونه‌ها برداشت شد. هر تیمار ۳ بار تکرار شده است

Table 1. Data analysis variance of mean difference of cell viability, total phenol, total flavonoid, cichoric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, malondealdehyde amount and PAL activity in cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* under treatment of chitosan different concentrations (50, 100 and 200 mg/L) during 24, 48 and 72 hours. Data are means ±SE

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
VIAB	Between Groups	12334.306	11	1121.301	171.046	.000
	Within Groups	157.333	24	6.556		
	Total	12491.639	35			
PHEN	Between Groups	5711.708	11	519.246	73.255	.000
	Within Groups	170.116	24	7.088		
	Total	5881.824	35			
FLV	Between Groups	4371.432	11	397.403	73.125	.000
	Within Groups	130.430	24	5.435		
	Total	4501.862	35			
CHIC	Between Groups	210.165	11	19.106	39.930	.000
	Within Groups	11.484	24	.478		
	Total	221.648	35			
CHLR	Between Groups	.459	11	.042	22.829	.000
	Within Groups	.044	24	.002		
	Total	.503	35			
CAF	Between Groups	.660	11	.060	80.172	.000
	Within Groups	.018	24	.001		
	Total	.678	35			
PAL	Between Groups	3.297	11	.300	10.461	.000
	Within Groups	.688	24	.029		
	Total	3.985	35			
MDA	Between Groups	224.128	11	20.375	16.892	.000
	Within Groups	28.948	24	1.206		
	Total	253.076	35			

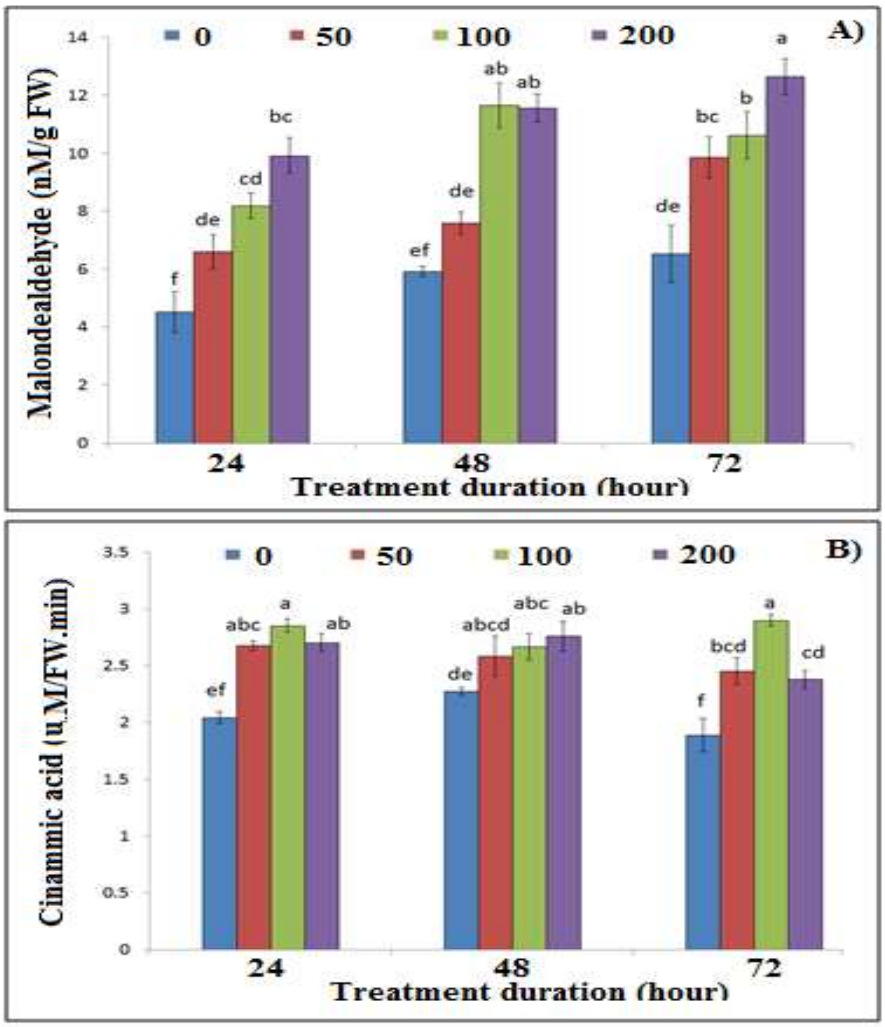


شکل ۳. مقدار A) فنل کل و B) فلاونوئید کل در سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار (*Lactuca undulate*) در تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است.حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.01$) با توجه به آزمون دانکن است

Figure 3. The amount of A) total phenol and B) total flavonoid in cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* under treatment of different concentrations (50, 100 and 200 mg/L) of **chitosan during 24, 48 and 72 hours. Data are means ±SE. Columns with different letters indicate significant difference at $p\leq0.05$, according to Duncans test**

مقدار شیکوریک اسید در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ (۶/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۲۰۰ (۷/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۲۴ ساعت کاهش نشان داد؛ اما بازهم در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشت (شکل 5-A). همچنین مقدار شیکوریک اسید در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ (۶/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۲۰۰ (۳/۴۴

میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۴۸ ساعت کاهش نشان داد. کمترین مقدار شیکوریک اسید (۳/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بررسی‌های اولیه نشان داد که مقدار شیکوریک اسید در بین جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران متفاوت است. به طوریکه بیشترین مقدار شیکوریک اسید (۳/۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در جمعیت جمع‌آوری شده از فیروزکوه مشاهده شده است (Mofid Bojnoordi et al. 2020). از طرفی دیگر نتایج حاصل از کشت بافت این گیاه نشان داد که بیشترین مقدار شیکوریک اسید (۳/۹۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در کالوس حاصل از قطعه جداکشت برگ در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر Kin و 2,4-D مشاهده شده است .(Ramezannezhad et al. 2019) در پژوهش حاضر تیمار کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و پس از ۲۴ ساعت سبب افزایش تقریبا ۳ برابری در مقدار شیکوریک اسید (۱۱/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در کشت سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ شده است. بیشترین مقدار کلروژنیک اسید در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان پس از ۲۴ (۰/۵۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و ۴۸ (۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) ساعت مشاهده شد (شکل 5-B). مقدار کلروژنیک اسید در سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان نداد. بیشترین مقدار کافئیک اسید (۰/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. اما تیمار ۷۲ ساعته سبب کاهش معنی‌دار (۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) آن شده است (شکل 5-C). نتایج گزارش .Kamalipourazad et al (2016) نیز نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار کیتوزان از ۵ به ۷ روز در کشت سوسپانسیون سلولی *Scrophularia striata* مقدار سینامیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید و اکیناکوزاید کاهش می‌یابد. کلروژنیک اسید و مشتقات آن بعنوان بیومارکرهای مقاومت به تنش‌های زیستی معرفی شده‌اند که سبب افزایش مقاومت گیاهان در برابر علفخواران و پاتوژن‌ها می‌شوند (Hammerschmidt 2014). کافئیک اسید پیش‌ساز کلروژنیک اسید و شیکوریک اسید بوده و ضمنا یک ترکیب حدواسط در سنتز لیگنین است. کلروژنیک اسید، در اثر اتصال یک واحد کافئیک اسید با کوینیک اسید بدست می‌آید. همچنین شیکوریک اسید در اثر پیوند استری دو واحد کافئیک اسید با تارتاریک اسید تشکیل می‌شود. تغییر در مقدار هر یک از این ترکیبات با افزایش یا کاهش متابولیت‌های دیگر همراه است. در پژوهشی .Mhlongo et al (2016) گزارش کردند که سنتز یا افزایش یک ترکیب خاص در یک غلظت معین الیسیتور منجر به بیشینه شدن توان دفاعی گیاه در مقابل تنش‌های زیستی می‌شود (Mhlongo et al. 2016). بروز پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاه با اتصال الیسیتور به گیرنده شروع می‌شود. گیرنده کیتوزان با نام GPCR در غشای سلولی *Rubia tinctorum* شناسایی شده است (Vasconsuelo et al. 2006). اتصال کیتوزان به گیرنده منجر به فعال شدن مسیر انتقال پیام شده و با افزایش غلظت Ca^{2+} درون‌سلولی فعالیت فسفولیپازها و پروتئین‌کینازها نیز افزایش می‌یابد (Ahmed et al. 2018). همچنین کیتوزان باعث فعال‌شدن مسیر اکتادکانوئیک اسید شده که منجر به بیوسنتز جاسمونیک اسید می‌شود (Zhang et al. 2018).



شکل A.٤) مقدار مالون‌دی‌آلدهید و B) فعالیت آنزیم PAL در سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار *(Lactuca undulate)* **در تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت. نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.01$) با توجه به آزمون دانکن است. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است**

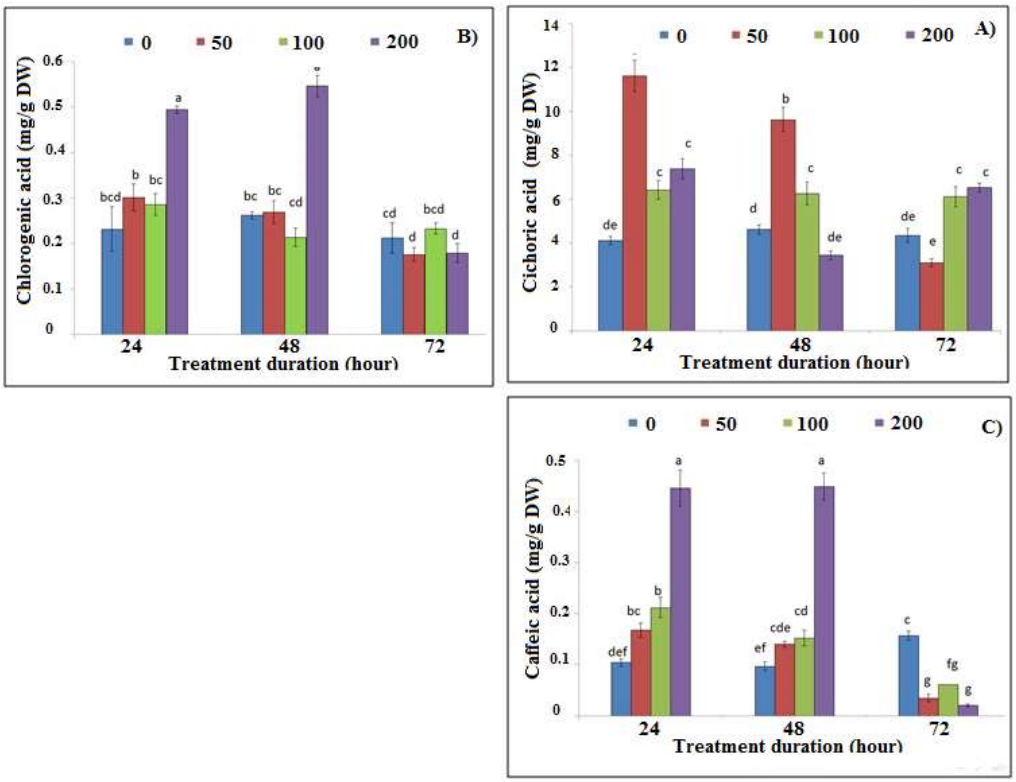
Figure 4. A)The amount of malondealdehyde and B) PAL activity in cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* under treatment of different concentrations (50, 100 and 200 mg/L) of **chitosan during 24, 48 and 72 hours. Data are means ±SE. Columns with different letters indicate significant difference at $p\leq0.05$, according to Duncans test**

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

چندین گزارش مبنی بر تجمع کافئیک اسید و مشتقات آن در گیاهان تحت تیمار سالیسیلیک اسید وجود دارد. بعنوان مثال Nair et al. (2013) گزارش کردند تیمار گیاه *Rauvolfia serpentina* با سالیسیلیک اسید باعث افزایش شیکوریک، کافئیک، کفتاریک و کلروژنیک اسید شده است. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد تجمع شیکوریک اسید و ترکیبات مرتبط با آن در اثر تیمار سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار با کیتوزان با دخالت تنظیم‌کننده‌های رشد خصوصا جاسمونیک و سالیسیلیک اسید رخ داده باشد. همچنین کیتوزان با فعالسازی NADPH–اکسیداز باعث انفجار اکسیداتیو شده که منجر به افزایش H_2O_2 می‌شود. در ادامه H_2O_2 بعنوان پیامبر ثانویه ممکن است باعث فعال شدن مسیرهای منجر به تجمع ترکیبات فنلی شود. تغییر در فتوسنتز و متابولیسم نیتروژن و کربن از دیگر اهداف کیتوزان در بروز پاسخ‌های دفاعی هستند (Ahmed et al. 2018). به نظر می‌رسد مجموعه این تغییرات منجر به تجمع ترکیبات ثانویه ازجمله فنل‌ها، فلاوونوئیدها و اسیدهای فنلی در کشت سوسپانسیون سلولی کاهوی موجدار می‌شود. از طرفی کیتوزان علاوه بر افزایش متابولیت‌های ثانویه باعث القای پروتئین‌هایی بنام پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن (PRP) در سلول‌های گیاهی می‌شود. بعضی از این پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ‌ها مثل کیتیناز و گلوکاناز هستند که در طول تکامل به‌منظور مقابله با قارچ‌ها و حشرات در گیاهان بوجود آمده‌اند (Hadwiger. 2013).

شیکوریک اسید و دیگر اسیدهای فنلی مطالعه شده در این تحقیق کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف غذایی و داروسازی دارند. منبع اصلی تولید شیکوریک اسید در دنیا گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) است که میزان تولید این ماده در آن بسته به شرایط کشت، سن برداشت، زمان برداشت، و نحوه نگهداری آن بین ۴,۱ تا ۲۱,۴ میلی گرم در گرم وزن خشک گزارش شده است (Lee and Scagle 2013). سرخار گل بومی ایران نبوده و کشت آن از سال ۱۳۷۲ در ایران آغاز شده است (Omidbaigi 2002). در حال حاضر چالش‌های زیادی در زمینه تولید و بازاریابی شیکوریک اسید در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. یکی از این چالش‌ها رقابت و نوآوری‌های مستمر در زمینه تولید این محصول است. شناسایی میزان تقاضا (که به طور روزافزون در حال گسترش است) این ماده باارزش و ارائه تکنولوژی‌های جدید از جمله فرصت‌های پیش رو است. شناسایی منابع گیاهی جدید و بومی حاوی اسید شیکوریک و نیز ارائه روش‌های جدید جهت افزایش تولید این ماده با ارزش گام بزرگی در صنایع تولیدی است. در این مسیر کشت بافت و سلول گیاهی از جمله استراتژی‌های مهم تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. کاهوی موجدار گیاهی علفی و بومی ایران است که به آسانی در مزرعه و در شرایط محیط کشت رشد می‌کند. در این تحقیق از این گیاه به عنوان یک مدل مناسب جهت تولید شیکوریک اسید استفاده از السیتور کیتوزان در شرایط کشت بافت استفاده شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که غلظت الیسیتور برحسب گونه گیاهی اثر مهی در شدت پاسخ گیاه در رابطه با تجمع ترکیبات ثانویه دارد (Ahmad et al. 2018). بنابراین یکی از چالش‌های اصلی در رابطه با تولید ترکیبات ثانویه, انتخاب غلظت مناسب الیسیتور و مدت زمان تیمار می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، کاهش شیکوریک اسید همراه با افزایش مرگ سلول‌ها و آسیب به غشاهای سلولی در غلظت‌های بالای

کیتوزان و با افزایش مدت زمان تیمار رخ می‌دهد: بنابراین غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان با مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار بعنوان غلظت بهینه جهت تولید این ترکیب ارزشمند توصیه می‌گردد.



شکل ۵. مقدار A) شیکوریک اسید، B) کلروژنیک اسید و C) کافئیک اسید در سوسپانسیون سلولی کالوس حاصل از برگ کاهوی موجدار (*Lactuca undulate*) در تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.01$) با توجه به آزمون دانکن است. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است

Figure 5. The amount of A) cichoric acid, B) chlorogenic acid and C) caffeic acid in cell suspension culture of callus derived from leaf of *Lactuca undulate* under treatment of different concentrations (50, 100 and 200 mg/L) of chitosan during 24, 48 and 72 hours. Data are means ±SE. Columns with different letters indicate significant difference at $p\leq0.05$, according to Duncans test

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان‌دهنده اثر مثبت کیتوزان بعنوان یک الیسیتور مناسب در افزایش تولید شیکوریک اسید و ترکیبات مرتبط با آن در کشت سلولی کاهوی موجدار است که بعنوان یک روش کارا و موثر می‌تواند در جهت تولید این ترکیب ارزشمند بکار گرفته شود.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گلستان و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Ahmad W, Zahir A, Nadeem M et al. (2018) Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (Linum usitatissimum L.) cell cultures, Process Biochemistry. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.025.

Cabrera JC, Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P (2006) Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. Physiol Plant 127, 44-56.

Chakrabortya M, Karunb A, Mitra A (2009) Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of Cocos nucifera. J Plant Physiol 166, 63-71.

Chang C, Yang M, Wen H, Chern J (2002) Estimation of total flavonoid content in Propolis by Two complementary colorimetric Methods. J Food and Druge Analysis 10, 178-182.

Fernández-Bautista N, Domínguez-Núñez JA, Castellano MM, Berrocal-Lobo M (2016) Plant Tissue Trypan Blue Staining During Phytopathogen Infection. Bio-Protocol 6, e2078

Ferri M, Tassoni A (2011) Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures. In R. G. Mackay & J. M. Tait (Eds.), Handbook of chitosan research and applications 389-414. Nova Science Publishers.

Hall RD (2000) Plant Cell Culture initiation. Practical tips. Mol Biotechnol 16, 161-173.

Hammerschmidt R (2014) Chlorogenic acid: A versatile defense compound. Physiol Mol Plant Pathol 88, e35.

Hudec J, Burdova M, Kobida L, et al. (2007) Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile of Echinacea purpurea, Nettle (Urtica dioica L.) and Dandelion (Taraxacum officinale) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators. J Agric Food Chem 55, 5689−5696.

Iriti M, Giulia C, Sara V, et al. (2010) Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. Biol Control 54, 241-247.

Kamalipourazad M, Sharifi M, Zare Maivan H, Behmanesh M et al. (2016) Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in Scrophularia striata Boiss. Cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiol Biochem107, 374-384.

Kazi GAS, Yamanaka T, Osamu Y (2019) Chitosan coating an Efficient Approach to Improve the Substrate Surface for In Vitro Culture System. J Electrochem Soc 166, B3025

Khan W, Prithiviraj B, Smith DL (2003) Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. J Plant Physiol 160, 859-863.

Landi L, Feliziani E, Romanazzi G (2014) Expression of Defense Genes in Strawberry Fruits Treated with Different Resistance Inducers. J Agric Food Chem 62, 3047−3056.

Lee J, Scagel CF (2013) Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. Front Chem 1, 117-123.

Luo XB, Chen B, Yao S Z, Zeng JG (2003) Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives & alkamides in roots and extracts of Echinacea purpurea by HPLC-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. J Chromatogr 986, 73-81.

Meda A, Euloge C, Romito M, et al. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem 91, 571-577.

Mejía-Teniente L, Dalia Duran-Flores F, Chapa-Oliver AM, et al. (2013) Oxidative and molecular responses in Capsicum annuum L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. Int J Mol Sci 14,10178-10196.

Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, et al. (2016) Phenylpropanoid Defences in Nicotiana tabacum Cells: Overlapping Metabolomes Indicate Common Aspects to Priming Responses Induced by Lipopolysaccharides, Chitosan and Flagellin-22. PLoS One 11, e0151350.

Mofid Bojnoordi M, Aghdasi M, Fatemi M (2020) An investigation on phytochemical components and antioxidant activity of Luctuca undulate in 5 natural habitats of Iran. Medic Plant 75, 65-75.

Nair VD, Panneerselvam R, Gopi R, Hong-bo S (2013) Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from Rauvolfia serpentina Benth. Ex. Kurtz. Ind Crops Prod 45, 406-415.

Nuissier G, Rezzonico B, Grignon-Dubois M 2010. Chicoric acid from Syringodium filiforme. Food Chem 120, 783-788.

Omidbaigi R (2002) Study of cultivation and adaptability of purple coneflower (*Echinaceae purpurea*) in the North of Tehran. JWSS-Isfahan University of Technology, 6 231-241.

Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. Plant Sci 161, 765-771.

Ramezannezhad R (2018) An investigation on antioxidative activity and Caffeic acid derivatives production in some Iranian native species of Asteraceae family under nature and tissue culture condition. PhD thesis, Golestan University. pp:124-139.

Ramezannezhad R, Aghdasi M, Fatemi M (2019) An investigation on cichoric acid content and antioxidant activity in some Iranian native species compared to Echinacea purpurea L. in different developmental stages. Iran J Medic Aromatic Plant 34, 909-923.

Singh S (2014) A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: Their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. J Appl Microbiol 117, 1221-1244.

Singh S (2016) Enhancing phytochemical levels, enzymatic and antioxidant activity of spinach leaves by chitosan treatment and an insight into the metabolic pathway using DART-MS technique. Food Chem 199, 176-184.

Sircar D, Mitra A (2009) Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of Daucus carota 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. J Plant Physiol 166, 1370-1380.

Sykłowska-Baranek k, Pietrosiuk A, Naliwajski MR, et al. (2012) Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of Arnebia euchroma (Royle) Johnst. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 48, 555-564.

Valletta A, De Angelis G, Badiali C, et al. (2016) Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in Hypericum perforatum L. root cultures. Plant Cell Rep 35, 1009-1020.

Vasconsuelo A, Picotto G, Giuletti AM, Boland R (2006). Involvement of G-proteins in chitosan-induced Anthraquinone synthesis in Rubia tinctorum. Physiol Plantarum 128, 29-37.

Yin H, Frette XC, Christensen LP, Grevsen K (2012) Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (Origanum vulgare ssp. hirtum). J Agric Food Chem 60, 136-143.

Zhang X, Li K, Xing R, et al. (2018) miRNA and mRNA Expression Profiles Reveal Insight into Chitosan-Mediated Regulation of Plant Growth. J Agric Food Chem 66, 3810-3822.

Zlotek U, Swieca M (2016) Elicitation effect of Saccharomyces cerevisiae yeast extract on main health-promoting compounds and antioxidant and anti-inflammatory potential of butter lettuce (Lactuca sativa L.). J Sci Food Agric 96, 2565-2572.

Zuppini A, Baldan B, Millioni R, Favaron F et al. (2003) Chitosan induces Ca Blackwell Publishing, Ltd. 2+-mediated programmed cell death in soybean cells. New Phytologist 161, 557-568.