افزایش بیان ژن آنزیم *p*-کومارات ٣-هیدروکسیلاز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تحت تأثیر کیتوزان درکشت سلولی گل میمونی سازویی (*Scrophularia striata*)

مریم کمالی پورآزاد [١]، محسن شریفی [١*]، حسن زارع مایوان [١]، مهرداد بهمنش [٢] و نجمه احمدیان چاشمی [٣]

[١] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، [٢] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، [٣] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

(تاریخ دریافت: ١٣٩٤/١٢/٢٩، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٥/٠٤/٢٠)

چکیده:

کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است که به‌عنوان الیسیتور زیستی در بهبود بیوسنتز متابولیت مای ثانوی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر کیتوزان بر رشد، تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی (فنل کل، پلی فنل اکیناکوزید، فلاونول کل و فلاونوئیدها) و بیان ژن آنزیم *p*-کومارات ٣-هیدروکسیلاز (C3H) در طول دوره زمانی بعد از اعمال تیمار است. در این پژوهش، سلول‌ها با غلظت ١٠ میلی گرم در لیتر کیتوزان تیمار و در بازه زمانی ٣، ٥ و ٧ روز پس از اعمال الیسیتور برداشت شدند. سنجش اکیناکوزید توسط کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) و اندازه‌گیری سایر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با روش اسپکتروفتو متری انجام شد و سطح بیان ژن نیز با روش Semi-quantitative RT-PCR بررسی شد. تیمار سلول‌های گل میمونی سازویی با کیتوزان سبب کاهش رشد سلولی و افزایش معنی‌داری در محتوای اکیناکوزید در تمامی روزهای بعد از اعمال تیمار نسبت به سلول‌های شاهد شد و میزان بیشینه اکیناکوزید ٥ روز پس از اعمال تیمار حاصل شد (٥/٧ برابر شاهد). میزان فنل کل، فلاونول کل و فلاونوئیدها از ابتدا تا انتهای دوره زمانی، تحت تأثیر کیتوزان نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت. بیان ژن آنزیم C3H، پس از افزودن کیتوزان القاء شد و اوج میزان آن پس از گذشت ٥ روز از اعمال تیمار مشاهده گردید (٢ برابر شاهد). کیتوزان با تأثیر بر بیان ژن آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، سبب فرا تنظیمی تولید این ترکیبات از جمله اکیناکوزید می‌شود.

واژگان کلیدی: اکیناکوزید، بیان ژن، کیتوزان، گل میمونی سازویی.

مقدمه:

گل میمونی سازویی (*Scrophularia striata*) با نام محلی تشنه داری یک گیاه بومی ایران است که در مناطق سردسیر و کوهستانی زاگرس رشد می‌کند. از این گیاه برای درمان و بهبود زخم مای حاصل از سوختگی استفاده می‌شود زیرا اجزاء مؤثره گیاه تشنه داری موجب تحریک ساخت کلاژن و انقباض سریع‌تر زخم، رگ زایی، اتساع عروق، کاهش التهاب و خونریزی زخم می‌شوند. (سوهانی و همکاران، ١٣٩٠). همواره اعتقاد بر این بوده که این گیاه علاوه بر اینکه باعث تسریع التیام زخم می‌گردد از عفونت‌های شایع باکتریایی در زخم هم جلوگیری می‌کند؛ همچنین دارای اثرات ضد میکروبی، ضد تومور، ضد التهاب وآنتی اکسیدانی است (Ardeshiry Lajimi

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: msharifi@modares.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

(*et al*., 2010; Mahboubi *et al*., 2013; Safai *et al*., 2012). برخلاف تأثیرات دارویی شناخته شده، در مورد ترکیبات مؤثره موجود در این گیاه اطلاعات بسیار کمی در دست هست. بسیاری از خواص دارویی این جنس را به حضور فنیل پروپانوئیدهایی چون فنیل اتانوئید گلیکوزیدها نسبت می‌دهند. اکیناکوزید، یک فنیل اتانوئید گلیکوزید با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی از جمله محافظت‌کننده عصبی، گشادکننده عروق قلبی و آنتی‌اکسیدان و ... می‌باشد (Jia *et al*., 2009; Zhao *et al*., 2012; Zhu *et al*., 2013). مسیر بیوسنتزی اکیناکوزید از آمینواسید فنیل آلانین شروع شده (مسیر فنیل پروپانوئیدی) و به‌واسطه فعالیت ژن آنزیم‌های هیدروکسیلازی، از جمله *p*-کومارات ۳-هیدروکسیلاز (C3H) پیش می‌رود تا پیش ماده کافئیک اسید و به دنبال آن کافئویل-کوآنزیم A حاصل شود، سپس اتصال ۱ مولکول از این ماده با ترکیب هیدروکسی تایروزول گلیکوزید و ۱ مولکول β-D-گلوکز و ۱ مولکول α-L-رامنوز، ترکیب اکیناکوزید را پدید می‌آورد. (Murthy *et al*., 2014). با توجه به این که سنتز شیمیایی اکیناکوزید مقرون به صرفه نیست، تولیدآن از طریق کشت سلول و اندام گونه‌های سرده راه جایگزین و سودمندی است (Ahmadi-sakha *et al*., 2015). روش مای متعددی برای افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در کشت سلول وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی ویا غیرزیستی هستند که از طریق القاء سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت ها ی ثانوی می‌شوند (Zhao *et al*., 2005). گزارشات فراوانی مبنی بر اثرات مثبت الیسیتورها بر تولید متابولیت‌های ثانوی وجود دارد (Ionkova *et al*., 2007; Zhao *et al*., 2005). کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی می‌باشد. کیتوزان، یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به‌عنوان الیسیتور زیستی کارآمد، برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت مای ثانوی درکشت سلولی بسیاری از گیاهان دارویی تأیید شده است (Cheng *et al*., 2006). مطالعات بسیار اندکی در زمینه استفاده از الیسیتورها به منظور انباشت متابولیت‌های ثانوی در کشت درون شیشه (*in vitro*) گل میمونی سازویی وجود دارد. افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل تحت تأثیر متیل جاسمونات گزارش شده است (خانپور اردستانی و همکاران، ۱۳۹۳). بررسی‌ها نشان داده کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل پروپانوئیدی در کشت تعلیقی نارگیل می‌شود (Chakraborty *et al*., 2006). مطالعات انجام شده توسط Cheng و همکاران (۲۰۰٦) نشان داد کیتوزان تولید فنیل اتانوئید گلیکوزید ها را در کشت سلولی گیاه *Cistanche deserticola* القاء می‌کند. فرایند تحریک (elicitation) با فعال سازی چندین ژن مسئول در پاسخ‌های دفاعی، افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی را به دنبال دارد (اسماعیل زاده بهابادی و شریفی، ۱۳۹۲). پاسخ‌های دفاعی القاء شده توسط الیسیتورها با شرکت در یک مسیر ترارسانی علامت سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شوند، این مولکول‌ها سرانجام توسط ترکیبات فنلی تولید شده جاروب می‌شوند (اسماعیل زاده بهابادی و شریفی، ۱۳۹۲). اکیناکوزید یکی از ترکیبات آنتی اکسیدان می‌باشد که به‌واسطه‌ی جاروب سازی رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در پاسخ‌های دفاعی ایفا می‌کند (Jia *et al*., 2009). با این وجود، دانش ما در مورد بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اکیناکوزید تحت فرآیند تحریک بسیار محدود است. در این مطالعه سنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، اکیناکوزید و بیان ژن دخیل در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات در کشت‌های سلولی گیاه *S.striata* تحریک شده با کیتوزان در یک بازه زمانی پس از اعمال الیسیتور مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

تشکیل کالوس و راه اندازی کشت سلولی: به منظور ایجاد کالوس، قطعاتی از ساقه گیاهچه ها به طول یک سانتی متر به محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) و ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BA) منتقل شد. بعد از گذشت ۳ تا ۷ روز القاء کالوس ها در قطعات شروع شد. کالوس ها در محیط جامد هر دو هفته یکبار واکشت شدند. برای راه اندازی کشت سلولی تعلیقی، درون هر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MS با ترکیبات هورمونی یاد شده در بالا و بدون آگار، مقدار ۲ گرم کالوس ترد و همسن واردگردید و با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی روی شیکر قرار گرفتند و به منظور تکثیر و همگن سازی، هر دو هفته یکبار واکشت گردید. درهر مرحله سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش جمع آوری شدند و به محیط تازه منتقل گردیدند.

تیمار با کیتوزان: برای تهیه محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، با وزن مولکولی پایین، از روش khan و همکاران استفاده شد (Khan *et al*., 2003). برای این منظور ابتدا محلول استیک اسید یک درصد تهیه، سپس محلول کیتوزان در اسید یاد شده تهیه گردید. پس از حل شدن کامل (۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد)، اسیدیته محلول با NaOH به ۵/۷ رسید. سپس محلول کیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. با توجه به منحنی رشد کشت‌های تعلیقی *S. striata* (خانپور اردستانی و همکاران، ۱۳۹۳)، در روز هفتم سلول‌ها با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان تیمار شدند. لازم به ذکر است که غلظت مورد استفاده بر اساس نتایج به دست آمده قبلی در آزمایشگاه بوده است. سلول‌ها پس از گذشت ۳، ۵ و ۷ روز به منظور بررسی رشد سلولی، بیان ژن و میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و اکیناکوزید برداشت شدند بخشی از سلول‌ها جهت انجام آزمایش مای مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت شدند و در فریزر دردمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و بخشی دیگر برای بررسی‌های فیزیولوژی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول‌ها: رشد سلولی با اندازه گیری وزن‌تر سلو ل ها تعیین شد. سلول‌ها توسط نایلون مش (٤٢ میکرومتری) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش از محیط کشت جدا و برای تعیین وزن‌تر بلافاصله توزین شدند. برای تعیین توان زیستی، از اوانس بلو (Evans blue) استفاده شد (Schützendübel *et al*., 2001). بدین صورت که در زمان برداشت سلول‌ها (۳، ۵ و ۷ روز بعد از اعمال تیمار)، یک قطره از کشت تعلیقی حاوی سلول بر روی لام قرار داده شد، سپس یک قطره از محلول آبی اوانس بلو (۰/۱ درصد) به آن اضافه شد و پس از گذشت دو الی سه دقیقه با آب مقطر شسته شد و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. سلول‌هایی که کاملاً به رنگ آبی در آمده بودند و سلول‌هایی که فقط دیواره آنها رنگ آبی به خود گرفته بود به ترتیب سلول‌های مرده و زنده در نظر گرفته شدند و تعداد آنها در ۳ مقطع از سطح لام شمارش شد و به صورت درصد توان زیستی سلول‌ها تعیین گردید.

تعیین میزان فنل کل: میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو (Singleton *et al*., 1965) و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ٧٦٥ نانومتر اندازه گیری شد. ابتدا ۰/۳ گرم از سلول‌های تازه فریز شده در ۳ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت ۳ ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس با سرعت (g)۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفوژ و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل، فلاونوئیدها و فلاونول ها استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ٧٦٥ نانومتر خوانده شد. در نهایت، مقدار فنل کل برحسب میلی گرم در گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

تعیین میزان فلاونول کل: به یک میلی لیتر از عصاره متانولی یک میلی لیتر از محلول کلریدآلومینیوم ۲ درصد و ۳ میلی لیتر از محلول سدیم استات ۵ درصد اضافه گردید. میزان فلاونول کل بر اساس منحنی استاندارد روتین (Rutin) و در طول موج ٤٤٥ نانومتر اندازه‌گیری شد (Akkol *et al*., 2008).

تعیین میزان فلاونوئید کل: سنجش فلاونوئید کل نیز بر اساس منحنی استاندارد روتین (Rutin) سنجیده شد .به یک میلی لیتر از عصاره متانولی ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد (Akkol *et al*., 2008).

استخراج و اندازه‌گیری اکیناکوزید: به ۲ گرم وزن‌تر سلول، ۱۰ میلی لیتر متانول ۹۰ درصد اضافه شد، سپس کاملاً ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه (۵۰۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی گراد) سانتریفوژ گردید. روشناور حاصل به تیوب جدید منتقل و تبخیر شد. در انتها، رسوب خشک شده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول HPLC-grade حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه (۱۳۰۰۰ rpm، ۲۵ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ شد. برای تعیین مقدار اکیناکوزید از روش Vertunai و همکاران (۲۰۱۱) به کمک دستگاه HPLC (Agilent Technologies 1260 infinity, USA) با دتکتور UV استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm × 4.6 mm I.D., 5 µm)، فاز متحرک اسید استیک ۰/۰٤ درصد (حلال A) و استونیتریل (حلال B) به نسبت (۸۲:۱۸) با شارش ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۳۳۰ نانومتر بود. شناسایی و اندازه‌گیری اکیناکوزید به کمک مقایسه زمان بازداری نمونه‌ها با ماده استاندارد (سیگما-آلدریچ) صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR): RNA کل از سلول‌هایی که در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند، با استفاده از محلول RNX (RNA extraction solution) (Cinnagen) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید. از ۲ میکروگرم، RNA کل با استفاده از الیگومر تیمیدین ($Oligo-dT_{18}$) به‌عنوان آغازگر (Primer) برای ساختن cDNA استفاده شد. ساختن cDNA با استفاده از کیت (Cinnagen) و طبق دستور شرکت سازنده آن انجام شد.

بررسی بیان ژن: به منظور بررسی بیان ژن *C3H* از دو دسته آغاز گرهای پیشرو (Forward primer) 5′ YYGGYYTSCTTTGGGAYATGAT 3′ و برگشتی (Reverse primer) 5′ CCCTTCATGTCBAYRTCYTCCTC 3′ و به‌عنوان کنترل داخلی از آغازگرهای اختصاصی پیشرو 5′ TCTGGAGATGGTGTGAGCCA 3′ و برگشتی ۵ ′ GGAAGGTACTGAGGG AGGCC 3′ برای تکثیر cDNA ژن اکتین (House keeping) در RT-PCR استفاده شد. برای طراحی آغازگرهای ژن *C3H*، جستجو در سایت NCBI نشان داد توالی مذکور برای گیاه *S. striata* در پایگاه داده‌های این سایت موجود نمی‌باشد؛ بنابراین برای این ژن آغازگرهایی بر اساس گیاهان نزدیک به این گونه طراحی گردید. توالی ژن آغازگرها با استفاده از توالی‌های مربوط به *C3H* کنجد (*Sesamum indicum*) و اکتین *S. striata* که از سایت NCBI با Accession number های AY065995 و KP123374 به دست آمد، طراحی شدند. برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی در مقایسه با کنترل داخلی، بیان ژن در چرخه‌های متفاوت بررسی شد و پس از ارزیابی نتایج روی ژل، بهترین شرایط تعداد ۳۳ چرخه برای بیان ژن مورد نظر و ۳۵ چرخه کنترل داخلی آن انتخاب شد. مبنای انتخاب بر اساس نرسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصول PCR بود. برای پیدا کردن بهترین دمای اتصال پرایمرها از گرادیان دمایی برای هر کدام از ژن‌ها استفاده شد. چرخه‌های مورد استفاده PCR برای ژن *C3H* به ترتیب شامل ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه بود که سپس ۳۳ چرخه با ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، برای اتصال (Annealing) ٥٦ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۵ دقیقه دنبال شد و برای کنترل داخلی (ACT) به غیر از دمای اتصال (Annealing) که ۵۸ درجه سانتی گراد بود، سایر چرخه‌ها از نظر زمان و دما همانند چرخه‌های PCR مورد استفاده برای ژن *C3H* بود. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (۱ درصد) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده و عکسبرداری شد. برای ارزیابی کمی بیان ژن‌ها از مقایسه شدت چگالی باندهای ژن نسبت به کنترل داخلی و از نرم افزار Image Guage نسخه ٤ استفاده شد. جهت تعیین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

ماهیت و صحت عملکرد پرایمرها، قطعات حاصل از PCR برای تعیین توالی به شرکت سینا ژن ارسال شد. برای بررسی بیان ژن از هر گروه حداقل دو تکرار مستقل از هم استفاده شد و میانگین بیان ژن در هر دو گروه برای ارزیابی نهایی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار و از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون دانکن برای تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج:

اثر کیتوزان بر رشد و توان زیستی سلول‌ها: اثر کیتوزان بر رشد و توان زیستی سلول‌ها در بازه زمانی (۳، ۵ و ۷) روز بعد از اعمال تیمار در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که کیتوزان از ابتدا تا انتهای بازه زمانی، رشد سلولی را به طور معنی‌داری (در سطح ۰۵/ ۰≥ p) کاهش داد (شکل a۱) و در روز هفتم رشد سلولی به میزان ۳۰ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافت. زنده‌مانی سلول‌ها تحت تأثیر کیتوزان در تمامی زمان‌های بعد از اعمال تیمار به طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود (شکل b ۱) و بعد از گذشت هفت روز به میزان ۱۲ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافت.

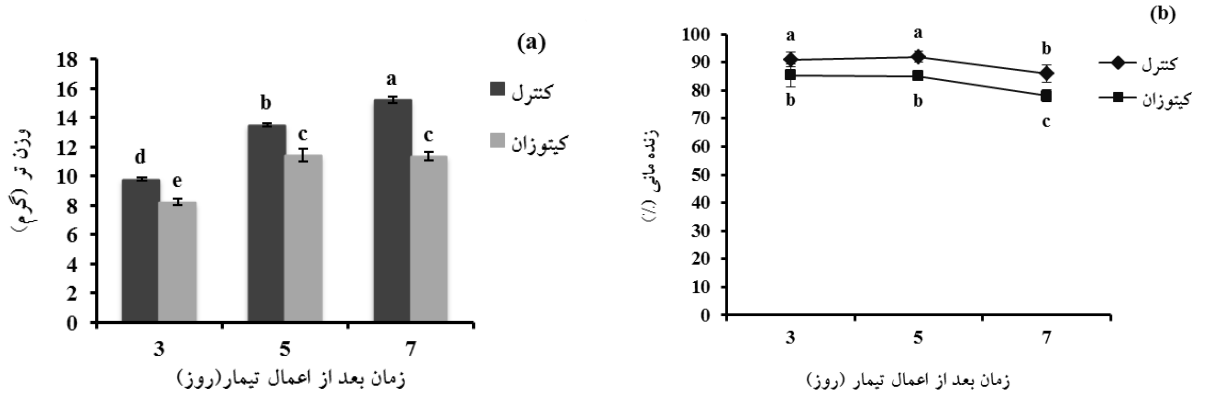
اثر کیتوزان بر فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها: بررسی میزان فنل کل در سلول‌های شاهد نشان داد که در کشت تعلیقی تشنه داری میزان ترکیبات فنلی با شیب ملایمی رو به افزایش است. کیتوزان با پیشروی مدت زمان پس از اعمال تیمار باعث افزایش فنل کل شد، به طوری که بیشترین میزان فنل کل، ۰/٦ میلی گرم در گرم وزن‌تر، پس از گذشت ۵ روز از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل a ۲). میزان فلاونول ها نیز بررسی شد. مقدار فلاونول ها در سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های شاهد در کل بازه زمانی افزایش معنی‌داری (در سطح ۰۵/ ۰≥ p) نشان داد. در سلول‌های تیمار، میزان فلاونول ها از روز ۳ تا روز ۵ با شیب تندی افزایش و از روز ۵ تا روز ۷ با شیب ملایمی کاهش یافت. در سلول‌های شاهد، میزان فلاونول ها تا پایان آزمایش به آرامی افزایش یافت (شکل c ۲). تجزیه واریانس داده های مربوط به فلاونوئیدها نشان داد که میزان فلاونوئیدها از ابتدای بازه زمانی پس از افزودن کیتوزان در سلول‌های تیمار داده شده نسبت به سلول‌های شاهد افزایش معنی داری داشت، این روند تا انتهای دوره آزمایش ادامه پیدا نمود، به طوری که بیشترین میزان آن، ۰/۵ میلی گرم در گرم وزن‌تر، ۵ روز پس از افزوده شدن کیتوزان بود. میزان فلاونوئیدها نیز در سلول‌های شاهد از ابتدا تا انتهای بازه زمانی افزایش یافت (شکل c ۲).

اثر کیتوزان بر میزان اکیناکوزید: نتایج نشان داد که میزان اکیناکوزید در سلول‌های شاهد به آرامی افزایش می‌یابد و درانتهای دوره رشد سرعت افزایش آن بیشتر می‌شود. افزودن کیتوزان باعث افزایش معنی داری (در سطح ۰۵/ ۰≥ p) در میزان اکیناکوزید در سلول‌های تیمار نسبت به نمونه‌های شاهد در کل دوره زمانی شد، این افزایش در سلول‌های تیمار، از روز ۳ (۳۰ میکرو گرم در گرم وزن‌تر) تا روز ۵ (۱۱۲/۷۲ میکرو گرم در گرم وزن‌تر) شیب بسیار تندی داشت که تقریباً ۵/۷ برابر نمونه‌های شاهد بود و از روز ۵ تا روز ۷ با شیب ملایمی کاهش یافت (۹۷/٤۱ میکروگرم در گرم وزن‌تر) (شکل ۳)، لازم به ذکر است در بررسی محیط کشت این ***C3H*** ترکیب شناسایی نشد.

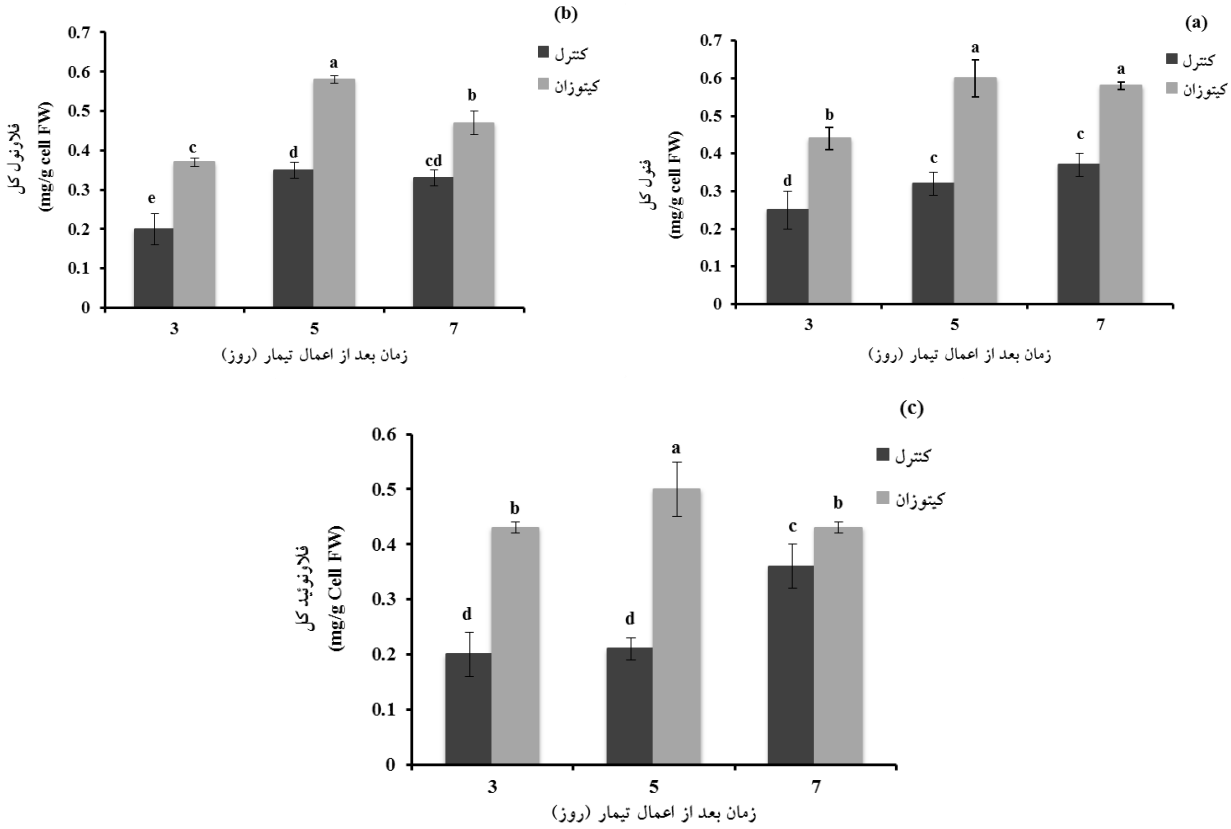
اثر کیتوزان بر بیان ژن: پس از تعیین توالی، جستجوی توالی‌های مربوطه در پایگاه داده‌های سایت NCBI و از طریق search Blast و استفاده از نرم افزار اینترنتی ClustalW انجام شد و نتیجه جستجو، همردیف شدن توالی نوکلئوتیدی این ژن در *S. striata* با توالی *C3H* جداسازی شده از گونه‌های گیاهی دیگر بود. نتیجه حاصل از blast این توالی نشان داد این قطعه با توالی این ژن در گیاه Teucrium *Canadense* با Accession number (AY870921.1)، ۸۲ درصد شباهت دارد. توالی مربوط به ژن *C3H* گیاه *S. striata* در پایگاه داده‌های سایت NCBI با Accession number، KU341990 ثبت گردید. آنالیزهای نیمه کمی با نرم افزار Image Guage و همچنین تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن *C3H* نشان داد که میزان نسبی بیان ژن مذکور در کل بازه زمانی در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]



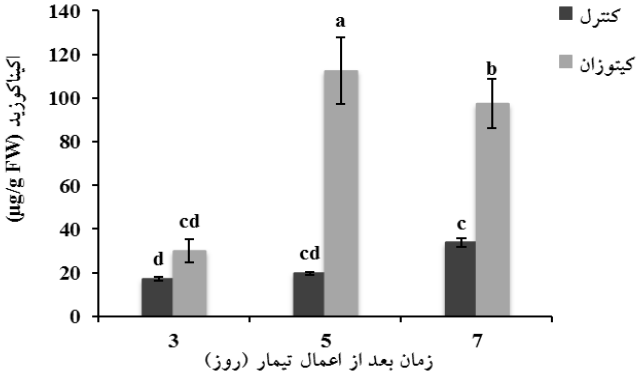
شکل ۱- تأثیر کیتوزان بر (a) رشد سلولی و (b) زنده‌مانی در کشت تعلیقی *S. striata*. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها در زمان‌های ۳، ۵ و ۷ روز پس ازاعمال تیمار برداشت شدند. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و ± SD (خطای معیار) می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.



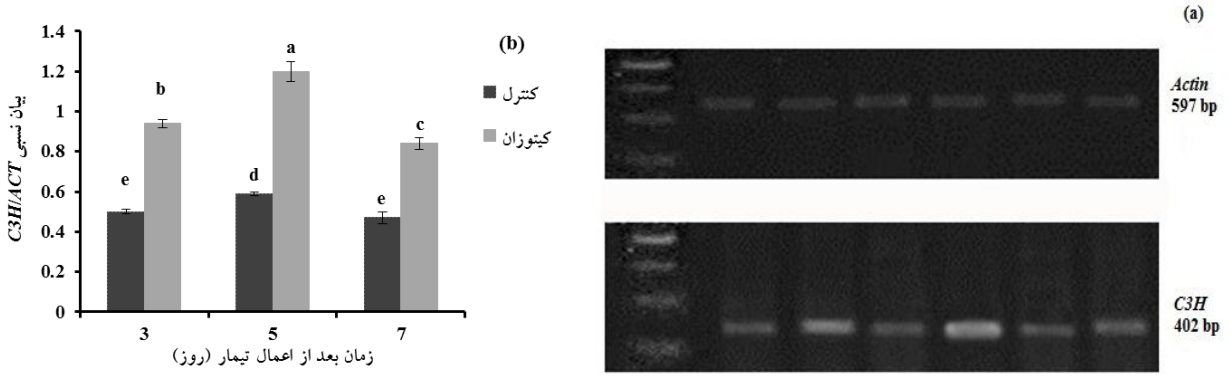
شکل ۲- تأثیر کیتوزان بر (a) فنل کل، (b) فلاونول کل و (c) فلاونوئیدها در کشت تعلیقی *S. striata*. میزان فنل کل بر اساس استاندارد گالیک اسید و میزان فلاونول کل و فلاونوئیدها نیز بر اساس استاندارد روتین (Rutin) اندازه گیری شدند. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها در زمان‌های ۳، ۵ و ۷ روز پس ازاعمال تیمار برداشت شدند. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و ± SD (خطای معیار) می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های شاهد به طور معنی‌داری تغییر کرده است (در سطح ۰/۰۵ ≥ p). به طوری که میزان بیان ژن *C3H* در سلول‌های تیمار از ابتدای دوره زمانی تا روز پنجم با شیب ملایمی افزایش پیدا کرد و در روز پنجم بعد از اعمال

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]



شکل ۳- تغییرات میزان اکیناکوزید تحت تأثیر غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی *S. striata*. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها در زمان‌های ۳، ۵ و ۷ روز پس ازاعمال تیمار برداشت شدند. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و ± SD (خطای معیار) می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.



شکل ٤- بررسی بیان ژن *C3H* در کشت تعلیقی *S. striata*. (a) تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن *C3H* و اکتین (کنترل داخلی) و (b) اندازه گیری مقدار نسبی بیان ژن *C3H* با استفاده از نرم افزار Image guage. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها در زمان‌های ۳، ۵ و ۷ روز پس ازاعمال تیمار برداشت شدند. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و ± SD (خطای معیار) می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

تیمار به اوج خود رسید (۲ برابر سلول‌های شاهد). بیان ژن *C3H* در سلول‌های تیمار، از روز پنجم تا روز هفتم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت و در روز هفتم به کمترین مقدار خود در سلول‌های تیمار رسید (۱/۸ برابر سلول‌های شاهد) ولی همچنان از نمونه‌های شاهد بیشتر بود. در سلول‌های شاهد، میزان بیان ژن در کل دوره تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت (شکل ٤ a و ٤ b).

بحث:

نتایج تحقیق حاضر نشان داد، مدت زمان مواجهه با الیسیتور سبب بیان متفات ژن مسیر بیوسنتزی و در نهایت انباشت مختلف متابولیت‌های ثانوی می‌شود. مطالعات بسیار اندکی در مورد تأثیر الیسیتورها بر تولید فنیل اتانوئید گلیکوزید ها و بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی این متابولیت‌ها انجام شده است (Cheng *et al*., 2006). این اولین گزارش در مورد اثر کیتوزان بر بیان ژن *C3H* می‌باشد. تأثیر کیتوزان به عواملی نظیر غلظت الیسیتور، نحوه اعمال تیمار و مدت زمان قرار گیری در معرض کیتوزان بستگی دارد (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012). به منظور بدست آوردن بیشترین میزان اکیناکوزید و در عین حال کم‌ترین تأثیر بر رشد سلولی، بهینه سازی دقیق غلظت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

کیتوزان در آزمایشگاه انجام شد (داده‌ها نمایش داده نشده‌اند). مطالعات نشان داد که غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرآیند تحریک داشته و عامل موثری بر شدت پاسخ است (Vasconsuelo and Boland, 2007). غلظت مؤثر الیسیتور بر حسب گونه گیاهی متفاوت است، به طوری که ممکن است غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، در گیاه دیگر اثر نداشته باشد. غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان باعث القاء بیشترین میزان تولید آنتراکوئینون (Antraquinone) در کشت سلول *Rubia akane* شد (Jin *et al*., 1999). در حالی که غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان، غلظت بهینه برای تولید منتول در کشت سلول *Mentha piperita* بود (Chang *et al*., 1998). در مطالعات ما در بین غلظت‌های مورد بررسی، غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان با کمترین اثر بر رشد سلول و در مقابل با تاثیری مطلوب بر میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و اکیناکوزید به‌عنوان غلظت بهینه الیسیتور انتخاب شد. مهار رشد سلولی و کاهش زنده‌مانی، در نتیجه زوال تمامیت سلولی و تخریب غشاهای سلولی است که توسط کیتوزان القاء می‌شود در این پژوهش، رشد و زنده‌مانی با افزایش مدت زمان تحریک به طور معنی‌داری کاهش یافت (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012).

با توجه به رابطه معکوس بین رشد با تولید زیتوده و تجمع متابولیت‌های ثانوی، مهار رشد سلولی توسط کیتوزان ممکن است که سنتز متابولیت های ثانوی را القاء نماید با توجه به نتایج به دست آمده، مهار رشد سلول‌ها با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض الیسیتور، منجر به تولید بیشتر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012) و اکیناکوزید شد (شکل a ۲، b ۲، c ۲ و ۳)؛ که به نظر می‌رسد به دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم ثانوی باشد. با توجه به این که پیش ماده‌های بیوسنتز متابولیت های ثانوی از متابولیسم اولیه منشأ می‌گیرد، لذا تحت شرایط تنش شدید، متابولیسم اولیه به سمت متابولیسم ثانوی تغییر می‌یابد و منابع ضروری از رشد به سمت دفاع تغییر مسیر می‌دهند (Iriti and Faoro, 2009).

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داد که کیتوزان از ابتدا تا انتهای دوره زمانی پس از اعمال تیمار سبب افزایش اکیناکوزید می‌شود، به طوری که بیشترین میزان اکیناکوزید ۵ روز پس از اعمال تیمار به میزان ۵/۷ برابر نمونه‌های شاهد مشاهده شد و همچنین کیتوزان پس از گذشت ۵ روز باعث انباشت بیشترین میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی (فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها) شد. به طور مشابه در آزمایشات انجام شده توسط اسماعیل زاده و همکاران (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012)، بیشترین انباشت پودوفیلوتوکسین و لارسی رزینول تحت تأثیر کیتوزان ۵ روز پس از اعمال تیمار مشاهده شد (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012). به طور کلی رابطه نزدیکی بین متابولیسم ثانوی گیاهان و پاسخ‌های دفاعی مشاهده می‌شود (Dixon and Paiva, 1995). گیاهان از طریق فعال سازی یکسری مکانیسم دفاعی با تنش‌ها مقابله می‌کنند از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به جاروب سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌واسطه تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و مشتقاتشان مثل اکیناکوزید (Jia *et al*., 2009) اشاره کرد.

ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند (Kovacik *et al*., 2009). گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان آزاد می‌سازند که نقش دفاعی مهمی دارند (Bais *et al*., 2004). فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنلی توانایی جذب رادیکال مای آزاد را دارند. کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل پروپانوئیدی در کشت تعلیقی نارگیل (Chakraborty *et al*., 2009) و کتان سفید (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012) شد. در این تحقیق نیز میزان فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها تا انتهای دوره رشد تحت تأثیر کیتوزان نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت. به منظور درک رابطه بین القاء متابولیت‌های ثانوی و تیمار کیتوزان، بیان ژن آنزیم C3H بررسی شد. در واقع ژن C3H یک سیتوکروم P450 منو اکسیژناز می‌باشد (Franke *et al*., 2002) که به‌عنوان یکی از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدی در تبدیل *p*-کوماریک اسید به کافئیک اسید ایفای نقش می‌کند (Anterola *et al*., 2002; Palafox-Carlos *et al*., 2014). در این مطالعه میزان بیان ژن *C3H* تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافت و در روز پنجم پس از اعمال تیمار به اوج خود رسید. در این حالت میزان بیان ژن در مقایسه با شاهد ۲ برابر افزایش نشان داد. در این تحقیق روند تغییرات میزان بیان ژن *C3H* با روند تغییرات مقدار ترکیبات فنیل پروپانوئیدی به طور نسبی شباهت دارد (Anterola *et al*., 2002). پژوهشگران نشان داده‌اند بیشترین میزان بیان ژن *C3H* سبب بالاترین محتوی فنولیک اسید در میوه مانگو می‌شود (Palafox-Carlos *et al*., 2014). بنابر این به احتمالی می‌توان گفت که آنزیم C3H در تنظیم مقدار ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و اکیناکوزید در گیاه تشنه داری نقش داشته و میزان فعالیت آنزیم مذکور در سطح نسخه برداری ژن کنترل می‌شود. بر اساس یافته‌های حاصل از این تحقیق و تحقیقات گذشته، همچنان نکات مبهم بسیاری در ارتباط با چگونگی و مکانیسم تنظیم بیان ژن *C3H* تحت تأثیر الیسیتور و شناخت عوامل درگیر در تظیم بیان ژن و به دنبال آن انباشت متابولیت‌های ثانوی وجود دارد که این مسئله بر لزوم انجام تحقیقات بیشتر تاکید می‌کند.

نتیجه‌گیری:

کیتوزان به‌عنوان یک الیسیتور مؤثر عمل نموده و از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی با تأثیر بر ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی این متابولیت‌ها و مشتقاتشان از جمله اکیناکوزید باعث افزایش ترکیبات مذکور در کشت تعلیقی گیاه تشنه داری می‌شود.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که هزینه این طرح پژوهشی را فراهم نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

Shoohani, B, Hemati, A. A, Taheri Moghadam, M. (2010) Effects of *Scrophularia striata* extract on Wound Healing in Rabbit. Journal of Ilam University of Medical Sciences 17: 9-16.

Mahboubi, M, Kazempour, N, Boland Nazar, A.R. (2013) Total Phenolic, Total Flavonoids, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Scrophularia striata* Boiss Extracts. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 8: 15-9.

Safavi, F, Meighani, H, Ebrahimi, P, Hafez Ghoran S. (2012) Antioxidant and antibacterial activity of *Scrophularia striata*. Research in pharmaceutical sciences Journal 7:S582.

Ardeshiry Lajimi, A, Rezaie-Tavirani, M, Mortazavi, S.A, Barzegar, M, et al. (2010) Study of Anti-Cancer Property of *Scrophularia striata* Extract on the Human Astrocytoma Cell Line (1321). Iranian Journal of Pharmaceutical Research 9: 403-410.

Zhao, Q, Gao, J, Li, W, Cai, D. (2012) Neurotrophic and neurorescue effects of Echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease. Brain Research 1346: 224–260.

Zhu, M, Lu, C, Li, W. (2013) Transient exposure to echinacoside is sufficient to activate Trk signaling and protect neuronal cells from rotenone. Journal of Neurochemistry 124: 571-651.

Jia, C, Shi, H, Jin, W, Zhang, K, et al. (2009) Metabolism of Echinacoside, a Good Antioxidant, in Rats: Isolation and Identification of its Biliary Metabolites. Drug Metabolism and Disposition Journal 37: 431-438.

Murthy, H.N, Kim, Y.S, Park, S.Y, Paek, K.Y. (2014) Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of Echinacea species. Applied Microbiology and Biotechnology Journal 98: 7707–7717.

Ahmadi-sakha, S, Sharifi, M, Niknam, N. (2015) Bioproduction of phenylethanoid glycosides by plant cell culture of *Scrophularia striata* Boiss.: from shake-flasks to bioreactor. Plant Cell Tissue and Organ Culture Journal DOI 10.1007/s1 1240-015-0891-3.

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

Ionkova, I. (2007) Biotechnological Approaches for the Production of Lignans. Pharmacognosy Reviews 1: 57– 68.

Cheng, X.Y, Zhou, H.Y, Cui, X, Ni, W, et al. (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Journal of Biotechnology 121: 253-313.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]

Khanpour- Ardestani, N, Sharifi, M, Behmanesh, M. (2014) Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology) 27: 840-853.

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

Esmaeilzadeh, S and Sharifi, M. (2013) Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell and Tissue 4: 119-28.

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

Schützendübel, A, Schwanz, P, Teichmann, T, Gross, K, et al. (2001) Cadmium-Induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. Plant Physiology 127: 887-898.

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

Akkol, E.K, Göger, F, Kosar, M, Baser, H.C. (2008) Phenolic composition and biological activities of Salvia halophile and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry Journal 108: 942–949.

Vertuani, S, Beghelli, E, Scalambra, E, Malisardi, G, et al. (2011) Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. Molecules 16: 7068-7080.

Esmaeilzadeh, Bahabadi, S, Sharifi, M, Safaie, N, Behmanesh, M. (2012) Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. Journal of Plant Biology 11: 13-25.

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

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

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

Iriti, M, Faoro, F. (2009) Chemical diversity and defence metabolism: How Plants cope with pathogens and ozone pollution. International Journal of Molecular Sciences 10: 3371-3399.

Dixon, R.A, Paiva, N. (2008) Stress-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097.

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

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

Franke, R, Humphreys, J.M, Hemm, M.R, Denault, J.W, et al. (2002) The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. The Plant Journal 30: 33-45.

Anterola, A.M, Jeon, J.H, Davin, L.B, Lewis, N.G. (2002) Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis in *Pinus taeda*. Journal of Biological Chemistry 24: 18272–18280.

Palafox-Carlos, H, Contreras-Vergara, C.A, Muhlia-Almazán, A, Islas-Osuna, M.A, et al. (2014) Expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase and *p*-coumarate 3-hydroxylase in mango (*Mangifera indica* 'Ataulfo') during ripening. Genetics and Molecular Research Journal 13: 3850-3858.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.24.6]