

افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و فنلی تحت تاثیر دیواره قارچ *Fusarium graminearum* در کشت تعلیقی کتان سفید *Linum album*

ژاله تحصیلی^۱، مظفر شریفی^{۱*}، ناصر صفایی^۲، مهرداد بهمنش^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۰۳

تاریخ تصویب: ۹۴/۰۳/۱۸

چکیده:

کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss) یکی از گونه های بومی ایران، دارای پودوفیلوتوکسین و دیگر ترکیبات لیگنانی است. پودوفیلوتوکسین، لیگنانی است که در گونه های گیاهی معدودی حضور دارد و به دلیل خواص ضد سرطانی اهمیت دارویی زیادی پیدا کرده است. دست ورزی محیط های کشت سلولی با الیسیتورها یکی از راهکارهای مهم جهت القای تولید متابولیت های ارزشمند می باشد. در این پژوهش، دیواره جدا شده قارچ *Fusarium graminearum* پس از تعیین غلظت بهینه، در روز ۷ بعد از واکشت به کشت سلولی کتان سفید با غلظت ۱ درصد (v/v) اضافه گردید. پس از برداشت سلول ها در روزهای

۱ دانشجویار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۲ دانشجویار، گروه بیماری های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳ دانشجویار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، (نویسنده مسئول *msharifi@modares.ac.ir)

۳ و ۵ و ۷ بعد از تیمار، میزان ترکیبات لیگنانی با *HPLC* بررسی گردید. همچنین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، فلاونول ها و لیگنین بررسی شد. نتایج نشان داد میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول بعد از تیمار در مقایسه با نمونه های شاهد افزایش قابل ملاحظه ای داشته است. میزان ترکیبات فنلی در روز ۵ بعد از تیمار و میزان ترکیبات فلاونوئیدی و فلاونولی در روز ۳ و ۷ بعد از تیمار افزایش داشته است. لیگنین نیز به عنوان یک ترکیب دفاعی بعد از تیمار با دیواره قارچ افزایش یافت.

واژه های کلیدی: *Linum album*، لیگنان ها، ایستور قارچی، *Fusarium graminearum*، کشت تعلیقی

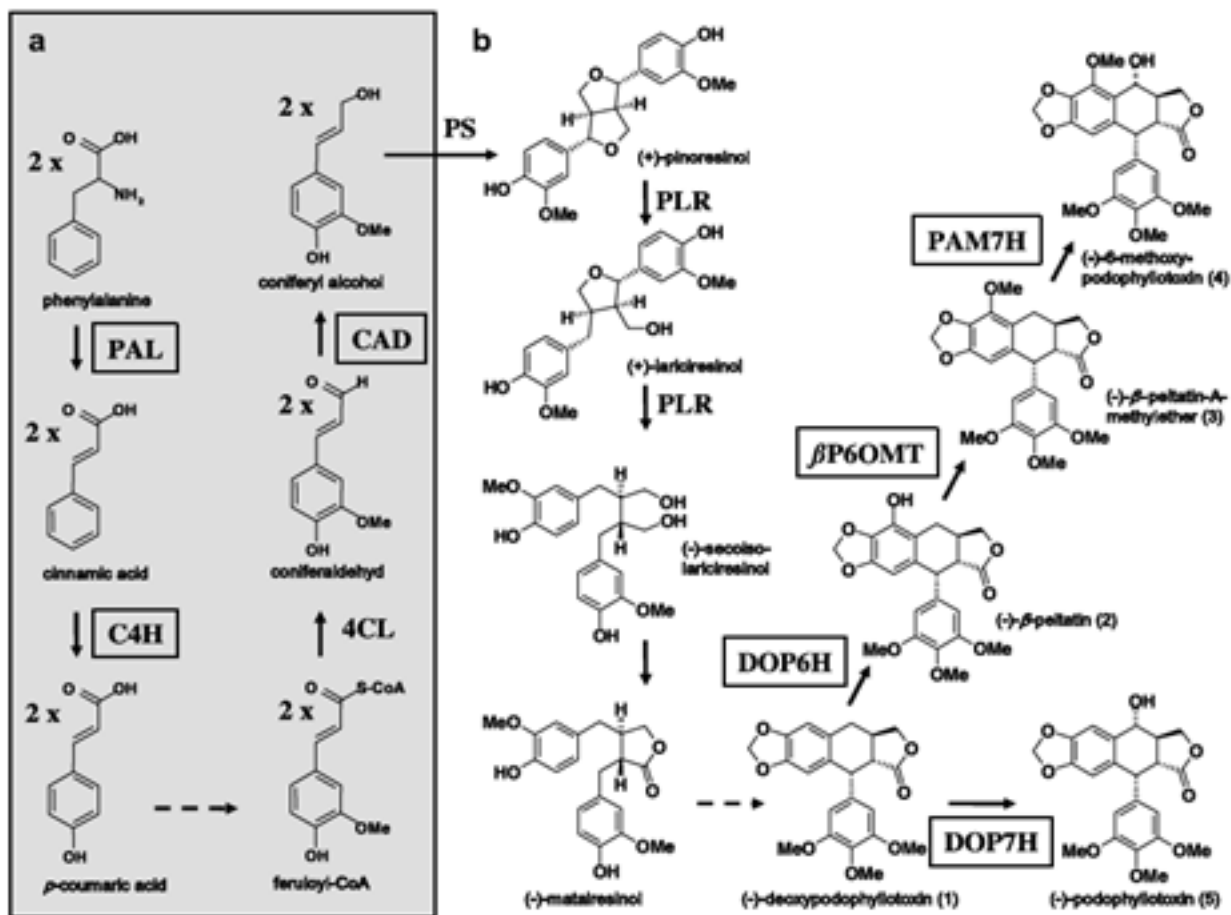
مقدمه

بر علیه عوامل بیماری زای گیاهی و گیاهخواران شرکت می کنند (Suzuki and Umezawa, 2007) همچنین لیگنان ها جزء ترکیبات فیتواستروژن می باشند و شبیه استروژن های انسانی عمل می کنند. این ترکیبات زمانی که وارد بدن انسان می شوند به وسیله باکتریهای روده ای، از نظر ساختمانی شبیه هورمون های استروژنی شده و از بروز سرطان ها جلوگیری می کنند (Sok et al., 2009). لیگنان ها همچنین به علت داشتن ویژگی های ضد قارچی، ضد میکروبی و ضد ویروسی در درمان بیماریها دارای اهمیت هستند. یکی از مهمترین لیگنان ها، پودوفیلوتوکسین از گروه آریل تترالین ها می باشد که مشتقات نیمه سنتزی آن در درمان سرطان استفاده می شوند. سایر لیگنان ها از قبیل سکوایزولاریسی

Linum از تیره کتان (Linaceae) است. گیاهان تیره کتان از نظر جغرافیایی در دنیا دارای پراکنش وسیعی می باشند و حدود ۳۰۰ گونه را شامل می شود. در بعضی از گونه های جنس *Linum* انواع مختلفی از ترکیبات لیگنانی وجود دارد (Arroo et al., 2003). گونه های مختلفی از این جنس در ایران پراکنش دارند و از بین آنها گونه *L. album* به دلیل این که گونه انحصاری ایران می باشد، اهمیت ویژه ای دارد. لیگنان ها دسته ای از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی هستند که با جفت شدن دو واحد فنیل پروپان تشکیل می شوند. مطالعات کمی در زمینه عملکرد اکولوژیکی و فیزیولوژیکی لیگنان ها در گیاهان انجام شده است، با این حال مشخص شده که این ترکیبات در دستگاه دفاعی گیاه

فنیل آلانین توسط فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) است که با حذف آمین از L-فنیل آلانین، سینامیک اسید را تولید می‌کند (Vogt, 2010). در ادامه مسیر با فعالیت آنزیم های ۴ - کومارات کوآلیگاز (۴CL) و سیناموئیل کوآ ردوکتاز (CCR)، متابولیت های دیگری از جمله کونيفرآلدهید تولید می‌شود که این ترکیبات توسط سیناموئیل الکل دهیدروژناز (CAD) به فرم الکی خود تبدیل شده و در ادامه از اتصال دو کونيفریل الکل توسط یک پروتئین هدایت‌گر (DIR) اولین محصول، پینورزینول بدست می‌آید. پینورزینول حاصل، توسط

رزینول و متارزینول باعث کاهش وقوع سرطان های سینه، پروستات و سایر سرطانهای هورمونی در افراد دارای رژیم های غذایی حاوی فیبر بالا می‌شوند (Imbert, 1998; Westcott and Muir, 2003). مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها مانند تمام ترکیبات فنلی دیگر از آمینو اسید فنیل آلانین آغاز شده (مسیر فنیل پروپانوییدی) تا پیش ماده کونيفریل الکل بدست آید و از اتصال دو مولکول از این ماده، اولین ترکیب لیگنانی به نام پینورزینول بدست می‌آید که منشا بیوسنتز سایر ترکیبات لیگنانی می‌باشد. آغاز بیوسنتز لیگنانها از



شکل ۱: مسیر بیوسنتزی ترکیبات لیگنانی در گیاه کتان (Federolf et al. ۲۰۰۴).

آنزیم پینورزینول لاریسی رزینول ردوکتاز (PLR) احیاء شده و ابتدا به لاریسی رزینول و سپس به سکوایزولاریسی رزینول تبدیل می شود. این ترکیب نیز به متارزینول تبدیل شده و متارزینول توسط آنزیم داکسی پودوفیلوتوکسین ۶-هیدروکسیلاز (DOP₆H) به سمت بیوسنتز ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین هدایت می شود و یا با تبدیل شدن به داکسی پودوفیلوتوکسین و توسط آنزیم داکسی پودوفیلوتوکسین ۶-هیدروکسیلاز (DOP₇H) به پودوفیلوتوکسین تبدیل می شود (Federolf et al., 2004).

پیشرفت در زمینه زیست فناوری امکان تولید بیشتر متابولیت های ثانوی مهم مانند آکالوئیدها، ترپنوئیدها، لیگنان ها را فراهم کرده است. بررسی ها نشان داده است که در کشت سلول گونه های *Linum* مقدار قابل توجهی از پودوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین تولید می شود، بنابراین کشت سلول می تواند به عنوان یک راه مناسب برای بیوسنتز لیگنان ها در این گیاه به کار رود (Fuss, 2003; Yousefzadi et al. 2010). یکی از روش هایی که به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانوی در کشت درون شیشه (in vitro) به کار می رود، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی می باشد. الیسیتورها از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانوی می شوند (Zhao et al., 2005). الیسیتورهای زیستی شامل پلی ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکو پروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکرو ارگانیسم ها (کیتین و گلوکان) می باشند (Vasconsuelo and Boland, 2007). در بین الیسیتورها، الیسیتورهای قارچی به طور گسترده به منظور تولید متابولیت های ثانوی در کشت سلول گیاهان به کار گرفته می شوند و در تحریک تولید بسیاری از متابولیت های ثانوی همچون ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آکالوئیدها و فلاونوئیدها موثر می باشند (Ionkova, 2007; Namdeo, 2007; Vasconsuelo and Boland, 2007; Zhao et al., 2005). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات دیواره سلول قارچها به عنوان یک الیسیتور شیمیایی خاص عمل می کنند که باعث القای افزایش Ca^{2+} داخل سلولی شده و پاسخ های دفاعی را فعال کرده و منجر به تولید فیتو آکسین ها و ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین (فنیل پروپانوئیدها، ترپن ها و ...) می شوند (Cordell et al., 1997).

به طور کلی علیرغم اهمیت دارویی ترکیبات لیگنانی مطالعات کمی در زمینه استفاده از الیسیتورهای مختلف به منظور افزایش تولید لیگنان ها در کشت درون شیشه وجود دارد. اما به طور مثال افزودن متیل ژاسمونات میزان پودوفیلوتوکسین را

پیشرفت در زمینه زیست فناوری امکان تولید بیشتر متابولیت های ثانوی مهم مانند آکالوئیدها، ترپنوئیدها، لیگنان ها را فراهم کرده است. بررسی ها نشان داده است که در کشت سلول گونه های *Linum* مقدار قابل توجهی از پودوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین تولید می شود، بنابراین کشت سلول می تواند به عنوان یک راه مناسب برای بیوسنتز لیگنان ها در این گیاه به کار رود (Fuss, 2003; Yousefzadi et al. 2010). یکی از روش هایی که به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانوی در کشت درون شیشه (in vitro) به کار می رود، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی می باشد. الیسیتورها از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانوی می شوند (Zhao et al., 2005). الیسیتورهای زیستی شامل پلی ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکو پروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکرو ارگانیسم ها (کیتین و گلوکان) می باشند (Vasconsuelo and Boland, 2007). در بین الیسیتورها، الیسیتورهای قارچی به طور گسترده به منظور تولید متابولیت های ثانوی در کشت سلول گیاهان به کار گرفته می شوند و در تحریک تولید بسیاری از متابولیت های ثانوی همچون ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آکالوئیدها و فلاونوئیدها موثر می باشند (Ionkova, 2007; Namdeo, 2007; Vasconsuelo and Boland, 2007; Zhao et al., 2005). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات دیواره سلول قارچها به عنوان یک الیسیتور شیمیایی خاص عمل می کنند که باعث القای افزایش Ca^{2+} داخل سلولی شده و پاسخ های دفاعی را فعال کرده و منجر به تولید فیتو آکسین ها و ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین (فنیل پروپانوئیدها، ترپن ها و ...) می شوند (Cordell et al., 1997).

به طور کلی علیرغم اهمیت دارویی ترکیبات لیگنانی مطالعات کمی در زمینه استفاده از الیسیتورهای مختلف به منظور افزایش تولید لیگنان ها در کشت درون شیشه وجود دارد. اما به طور مثال افزودن متیل ژاسمونات میزان پودوفیلوتوکسین را

بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در مطالعات گذشته استفاده از الیسیتورهای قارچی بیشتر مبتنی بر استفاده از عصاره کل آنها بوده است و تاثیر اجزای مختلف قارچ مانند دیواره کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش ها:

۱- جمع آوری، کشت بذرها و تهیه کشت

بافت *L.album*

بذرهای گیاه کتان سفید *Kotschy ex Boiss L. album* از منطقه سوهانک N ۱۹° ۴۸' ۳۵"، E ۲۲° ۳۲' ۵۱" تهران جمع آوری شدند (یوسف زادی، ۱۳۸۹). بذرهای سترون شده به مدت یک ساعت در ژیریلین سترون، قرار گرفتند و سپس در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شدند. بذرها به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و از گیاهچه‌های حاصل برای ایجاد قطعات جداکشت و کشت بافت استفاده شد (فخاری، ۱۳۸۹). به منظور القای کالوس، قطعاتی از گیاهچه به طول یک تا دو سانتی متر به محیط کشت MS پایه حاوی دو میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۰/۴ میلی گرم در لیتر کینتین منتقل شد (فخاری، ۱۳۸۹). بعد از گذشت دو تا سه هفته القاء کالوس ها شروع شد و سپس در

در کشت تعلیقی *L. album* تا دو برابر افزایش داده است (Furden et al., 2005). در سال‌های اخیر استفاده از الیسیتورهای زیستی به خصوص انواع قارچ‌ها و اجزای آنها در کشت‌های سلولی گیاهان برای افزایش متابولیت‌های ثانوی در حال افزایش است. کشت هم زمان قارچ‌های شبه میکوریزی با کشت سلول این گونه منجر به افزایش ۴ برابری در میزان پودوفیلوتوکسین شده است (Baldi et al., 2008) و یا کیتو اولیگوساکاریدها منجر به افزایش ۱۵ برابری پودوفیلوتوکسین در کشت سلول *Juniperus chinensis* شدند (Muranaka et al., 1998). همچنین استفاده از عصاره محیط قارچ (Culture filtrate) در کشت تعلیقی کتان سبب افزایش رشد و افزایش لیگنان‌ها شده است (Kumar et al., 2012). اسمعیل زاده و همکاران نیز اثر ۵ عصاره قارچی مختلف را در کشت تعلیقی کتان بررسی کرده و گزارش کردند که عصاره قارچی *Fusarium graminearum* بیشترین تاثیر را بر میزان ترکیبات لیگنانی داشته است (Esmailzadeh et al., 2011). بنابراین با توجه به اثرات دارویی ترکیبات لیگنانی و در دسترس بودن گیاه کتان سفید به عنوان یک گیاه بومی و در نظر داشتن مطالعات گذشته، در این تحقیق اثر دیواره جدا شده قارچ *F. graminearum* بر میزان ترکیبات لیگنانی و فنلی مورد

محیط جامد هر دو هفته یک بار واکشت شدند. بعد از ۵-۶ بار واکشت کالوس‌ها در محیط جامد، قسمتی از آنها به محیط تعلیقی MS با همان نسبت هورمونی منتقل شدند و سلول‌ها هر هفته یک بار واکشت گردیدند.

۲- تهیه تیمار دیوار قارچ و تیماردهی سلول‌های کتان (*L. album*)

گونه‌های قارچ فوزاریوم به طور گسترده در خاک پراکنده هستند و گروه بزرگی از قارچ‌های رشته‌ای (خانواده Nectriaceae) را شامل می‌شوند. برای تیماردهی قارچ *Fusarium graminearum* (استرین Sg^{۲۲}) - که از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس - گروه بیماری‌های گیاهی، دکتر ناصر صفایی، تهیه گردید) در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت شد و پس از پنج روز از حاشیه فعال کلونی (پرگنه)، یک یا چند پلاگ به محیط مایع سیب زمینی دکستروز (PDB) منتقل گردید و به مدت پنج روز بر روی شیکر با سرعت ۱۳۵ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس میسلیوم‌های قارچی برداشت شده و با آب مقطر استریل شسته شدند. برای ادامه کار میسلیوم‌ها در نیتروژن مایع فریزر شدند. استخراج دیواره قارچ مذکور به روش دی پیترو و همکاران انجام شد (Di Pietro et al. 2009). به طور خلاصه ابتدا میسلیوم فریز شده به همراه بافتری که

شامل تریس ۱۰ میلی مولار بود ساییده شد، بعد از سانتریفوژ دو فاز ایجاد گردید. بخش رسوب که شامل دیواره قارچی بود چندین بار به وسیله آب بدون یون و کلرید سدیم شست و شو داده شد و در نهایت به وسیله دستگاه خشک کن انجمادی کاملاً به صورت پودر در آمد. برای تیماردهی ابتدا میزان ۱۰ میلی گرم از پودر نرم دیواره برداشته شد و با ۱۰ میلی لیتر آب بدون یون مخلوط گردید و سپس توسط فیلتر ۰/۴۲ میکرومتر فیلتر گردید. در نهایت محلول به دست آمده به عنوان الیسیتور قارچی با درصدهای مختلف استفاده شد.

۳- اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول‌ها

رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها تعیین شد. بدین منظور سلول‌ها توسط نایلون مش (۴۲μm) از محیط کشت جدا شدند و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. برای تعیین توان زیستی، در زمان برداشت سلول‌ها، یک قطره از کشت تعلیقی حاوی سلول بر روی لام قرار داده شد سپس یک قطره از محلول ایوانزبلو (محلول آبی ۰/۱ درصد) به آن اضافه و پس از گذشت سه الی چهار دقیقه با آب مقطر شسته شد و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. سلول‌هایی که کاملاً به رنگ آبی در آمده بودند مرده و سلول‌هایی که فقط دیواره

کروماتوگرام حاصل از HPLC استفاده شد. بخش متحرک شامل استونیتریل و آب بود و همچنین از سیستم گرادیان استفاده گردید. از پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در متانول به عنوان استاندارد استفاده و در نهایت بر اساس سطح زیرمنحنی بدست آمده، منحنی استاندارد رسم شد. ستون مورد استفاده از نوع ODS₃-C₁₈ دارای طول ۲۵۰ میلی متر و قطر ۴/۶ میلی متر بود. جذب لیگنان ها با استفاده از دتکتور UV در طول موج ۲۹۰ نانومتر بررسی شد. به منظور تایید وجود لیگنان ها در نمونه های مورد بررسی از تکنیک LC-MS استفاده گردید (اسمعیل زاده ۱۳۹۰).

۵- سنجش و اندازه گیری فنل کل

سنجش فنل کل به روش فولین دنیس انجام شد. گالیک اسید نیز به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و میزان فنل کل بر اساس گالیک اسید سنجیده شد (Boonyuen et al. 2009). ۰/۵ گرم از یاخته های فریز شده در هشت میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد و به مدت سه ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد گذاشته شد. سپس با سرعت ۹۰۰۰ (g) به مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفوژ شد. عصاره متانولی از رسوب جدا شد و از عصاره متانولی باقی مانده برای سنجش فنل کل، فلاونوئیدها و فلاونولها استفاده

آنها رنگ آبی به خود گرفته بودند سلول های زنده در نظر گرفته شدند. با شمارش سلول های زنده و مرده و محاسبه کل آنها درصد توان زیستی سلول ها تعیین گردید (Schützendübel et al., 2001).

۴- استخراج و سنجش لیگنان ها

استخراج ترکیبات لیگنانی با استفاده از دی کلرومتان صورت گرفت. به یک گرم از یاخته های فریز شده چهار میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد و در هاون کاملاً ساییده شد تا بصورت همگن درآیند. مخلوط حاصل در فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته و به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. در ادامه چهار میلی لیتر دی کلرومتان و چهار میلی لیتر آب به آن اضافه و کاملاً مخلوط گردیدند. پس از سانتریفوژ با سرعت ۷۵۰۰ (g)، به مدت ۱۰ دقیقه، سه بخش کاملاً از هم جدا بدست آمد. در بخش زیرین ترکیبات لیگنانی در دی کلرومتان، بخش میانی یاخته های رسوب کرده و بخش رویی فاز آبی قرار می گیرد. بخش زیرین توسط سمپلر جمع آوری شد و به وسیله هوادهی کاملاً خشک گردید. در انتها، رسوب خشک شده در یک میلی لیتر متانول حل شد و برای سنجش لیگنان ها به دستگاه HPLC تزریق گردید (Van Uden et al. 1989).

برای اندازه گیری مقدار ترکیبات لیگنانی از روش محاسبه سطح زیرمنحنی

گردید. برای سنجش فنل سه میلی لیتر از (Akkol et al., 2008).

۸- سنجش و اندازه گیری لیگنین

برای سنجش لیگنین از روش استیل بروماید استفاده شد. به طور خلاصه ۰/۵ گرم از سلول های فریز شده در ۱۲ میلی لیتر آب مقطر ساییده شد. بعد از سانتریفوژ به رسوب حاصل به نسبت چهار برابر نمونه، اتانول مطلق اضافه گردید بعد از سانتریفوژ به رسوب اتانول اضافه شد و دوباره سانتریفوژ گردید. سپس به مدت یک شب نمونه ها در متانول و کلروفرم بودند سپس استون به آنها اضافه گردید و در نهایت پودر خشک دیواره به دست آمد. پودرهای خشک شده به وسیله الک ۲۵۰ میکرونی صاف شدند. به شش میلی گرم هریک از پودرها در لوله آزمایش ۲/۵ میلی لیتر استیل بروماید ۲۵ درصد اضافه شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داد و پس از آن به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب یخ قرار داده شد. نمونه ها به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردیدند. به بخش مایع پنج میلی لیتر سدیم هیدروکسید دو نرمال و شش میلی لیتر استیک اسید گلیسیال اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (Iiyamaa and Wallis 1988).

۹- تجزیه و تحلیل آماری

کلید آزمایشها با سه تکرار از حداقل

عصاره متانولی موجود خشک، و رسوب حاصل در یک میلی لیتر آب بدون یون شده حل شد. به یک میلی لیتر از عصاره آبی، دو میلی لیتر معرف فولین دنیس اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از پنج دقیقه دو میلی لیتر محلول سدیم کربنات هفت درصد اضافه شد. حجم نهایی با آب بدون یون شده به ۱۲/۵ میلی لیتر رسانده و جذب بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد.

۶- سنجش و اندازه گیری فلاونوئیدها

فلاونوئید کل بر اساس منحنی استاندارد روتین سنجیده شد. به یک میلی لیتر از عصاره متانولی، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (Akkol et al., 2008).

۷- سنجش و اندازه گیری فلاونول

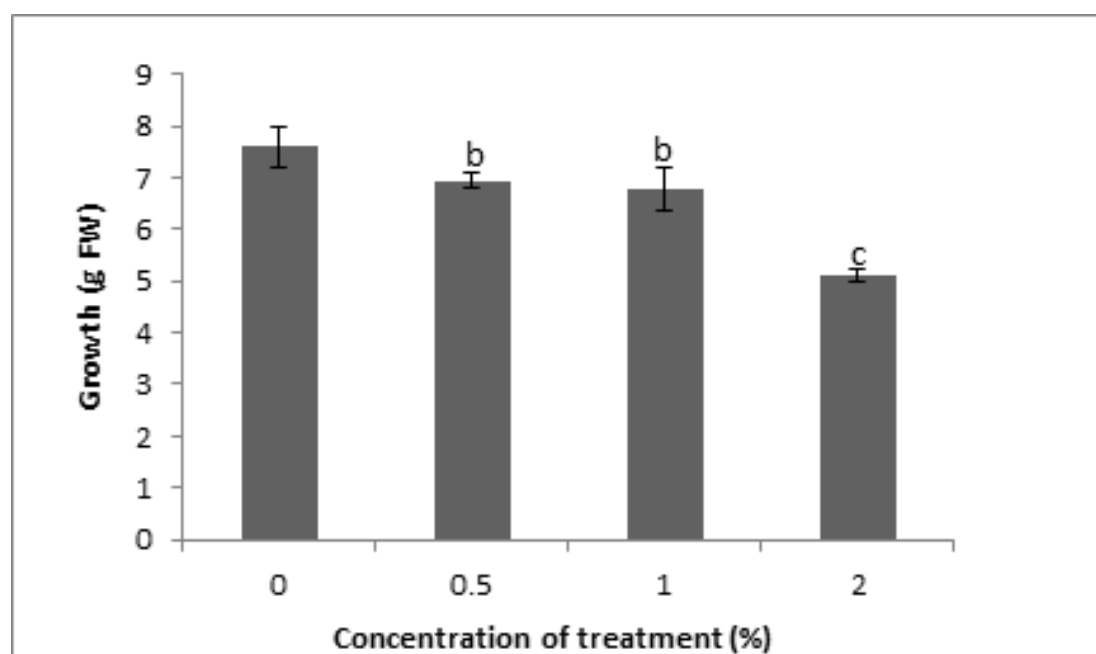
میزان فلاونول نیز بر اساس منحنی استاندارد روتین سنجش گردید. به یک میلی لیتر از عصاره متانولی، یک میلی لیتر از محلول کلرید آلومینیوم دو درصد، سه میلی لیتر از محلول سدیم استات پنج درصد اضافه گردید و جذب نمونه ها بعد از دو ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، در طول موج ۴۴۵ نانومتر خوانده شد

۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC و آزمون دانکن جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \geq 0.05$ انجام شد.

نتایج

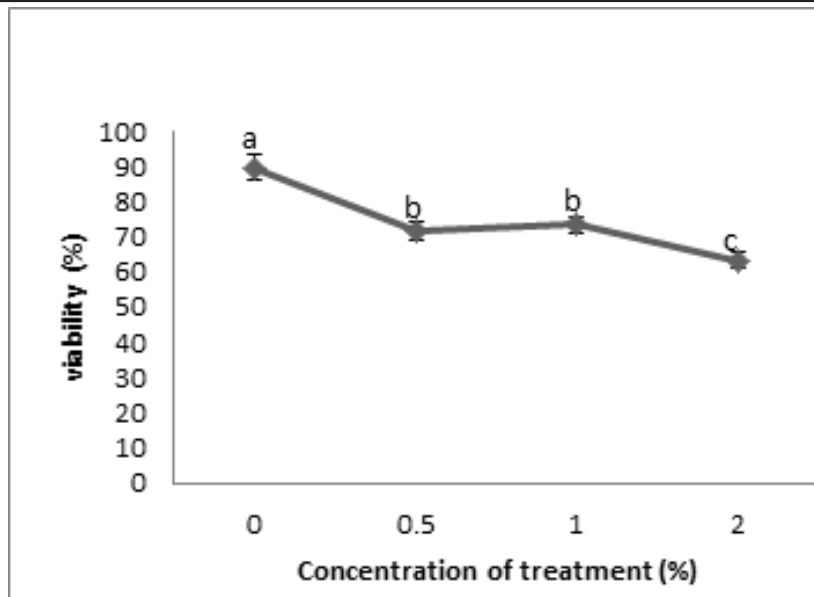
۱- تعیین غلظت بهینه تیمار دیواره سلولی قارچ فوزاریوم

برای تعیین بهترین غلظت تیمار، دیواره جدا شده قارچ فوزاریوم در چهار غلظت ۰، ۰/۵، ۱ و ۲٪ (v/v) بررسی شد. بدین منظور در روز هفتم از دوره رشد سلولی، به محیط کشت سلول گیاه اضافه گردید و پس از پنج روز، وزن تر سلولی مورد بررسی قرار گرفت. وزن تر نسبت به شاهد کاهش یافت، بیشترین کاهش رشد در غلظت ۲٪ (v/v) مشاهده شد (شکل ۱).



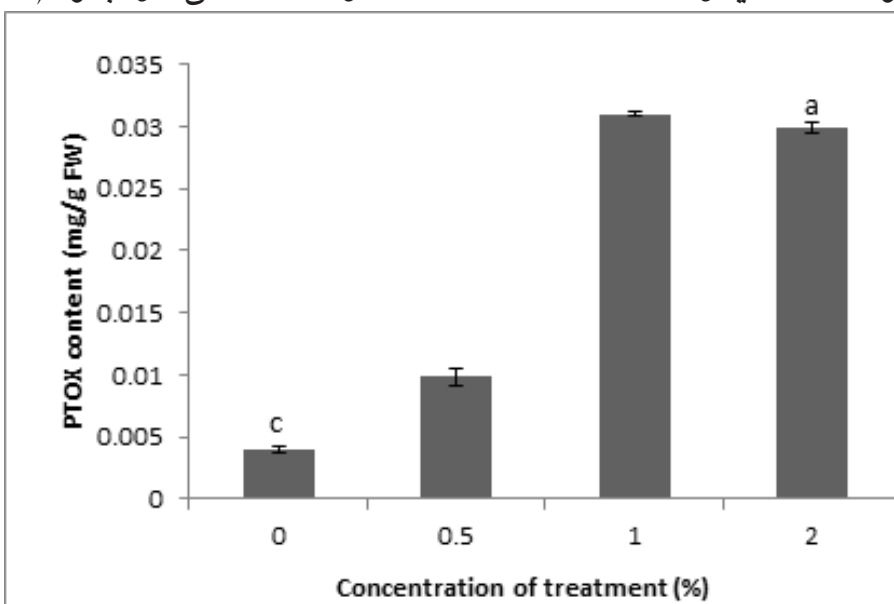
شکل ۱: تغییرات وزن تر سلول‌های کتان، ۵ روز بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف (۰/۵ - ۱ و ۲) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول‌های شاهد. داده‌ها حاصل ۳ تکرار، میله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p \leq 0.05$) است.

زنده مانی سلول‌ها در تمام غلظت‌های تیمار به طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود به گونه‌ای که بعد از گذشت پنج روز زنده مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲٪ (v/v) به میزان ۲۵ درصد کاهش نشان داد. همچنین در حضور غلظت‌های ۰/۵ و ۱٪ (v/v) زنده مانی سلول‌ها با گذشت ۵ روز ۱۵ درصد کاهش نشان داده است (شکل ۲).



شکل ۲: تغییرات زنده مانی سلول های کتان، ۵ روز بعد از تیمار با غلظت های مختلف (۰/۵ - ۱ و ۲) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) است.

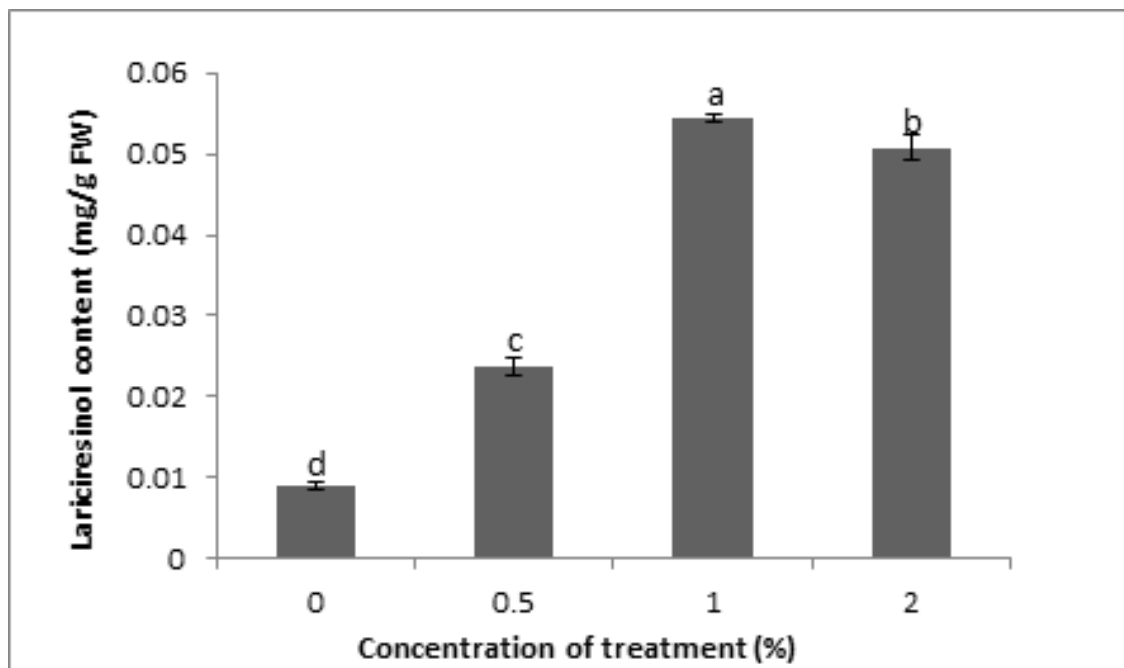
نتایج بررسی میزان پودوفیلوتوکسین (v/v) بیشترین مقدار را داشت. با افزایش در کشت سلول نشان داد در حضور غلظت دیواره قارچی تا ۲٪ (w/v) میزان پودوفیلوتوکسین نیز نسبت به شاهد افزایش معنی داری غلظت ۰/۵٪ (v/v) دیواره قارچی میزان پودوفیلوتوکسین به طور معنی داری افزایش یافت، و تحت تاثیر غلظت ۱٪ غلظت ۱ درصد معنی دار نبود (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین سلول های کتان، ۵ روز بعد از تیمار با غلظت های مختلف (۰/۵ - ۱ و ۲) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) است.

نتایج مطالعه میزان لاریسی رزینول موجود در سلول ها نیز نشان داد که غلظت ۰/۵٪ (v/v) دیواره قارچی میزان لاریسی رزینول را افزایش داد، اما افزایش

میزان لاریسی رزینول در غلظت ۱٪ (v/v) قابل توجه بود. در غلظت ۲ درصد میزان لاریسی رزینول کاهش داشت (شکل ۴). بر اساس نتایج حاصل، غلظت ۱٪ (v/v)



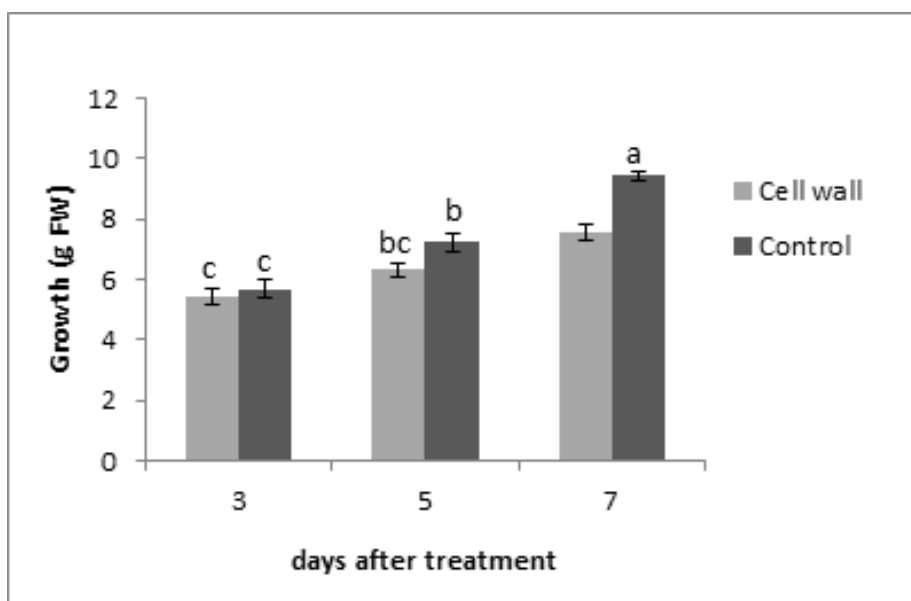
شکل ۴: تغییرات میزان لاریسی رزینول سلول های کتان، ۵ روز بعد از تیمار با غلظت های مختلف (۰/۵ - ۱ و ۲) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) است.

زمان های نمونه برداری به طور معنی داری کمتر از نمونه های شاهد بود. بعد از ۵ روز از تیماردهی زنده مانی ۱۵ درصد نسبت به شاهد کمتر بود در حالی که بیشترین کاهش میزان زنده مانی سلول ها در روز ۷ بعد از تیمار مشاهده گردید که حدود ۲۰ درصد نسبت به شاهد کمتر بود (شکل ۶).

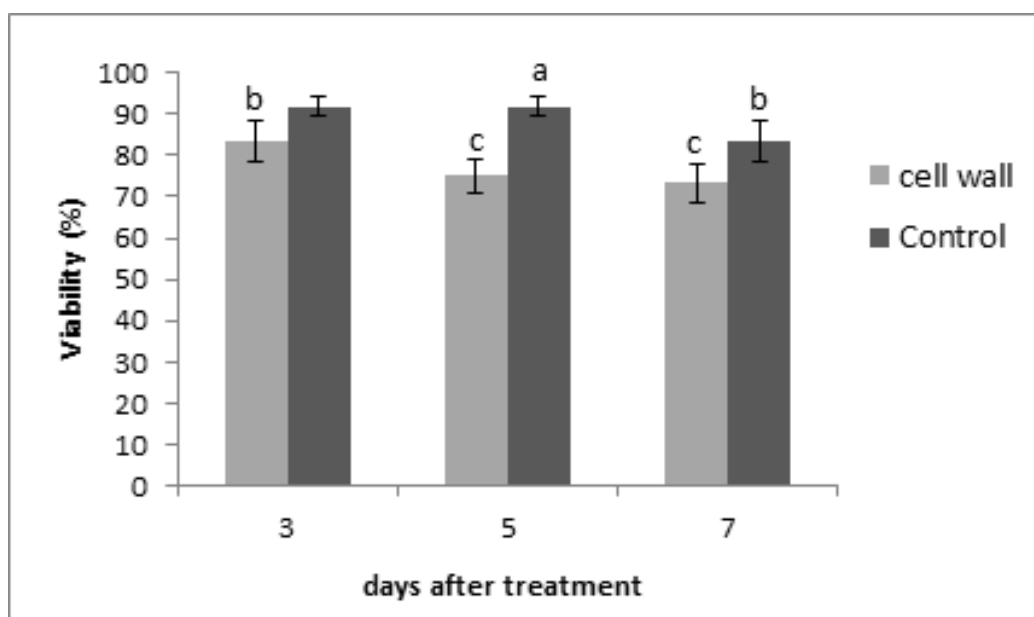
۳- تاثیر غلظت بهینه دیواره فوزاریوم بر میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول نتایج بررسی لیگنان ها نشان داد که

به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد و در بازه زمانی (۳، ۵ و ۷ روز) برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. ۲- تاثیر غلظت بهینه دیواره فوزاریوم بر رشد و زنده مانی سلول ها در زمان های مختلف

نتایج نشان داد که در حضور غلظت ۱٪ (v/v) رشد سلولی کاهش می یابد به گونه ای که بعد از گذشت ۷ روز بیشترین کاهش رشد نسبت به شاهد مشاهده گردید (شکل ۵). زنده مانی سلول ها در تمام



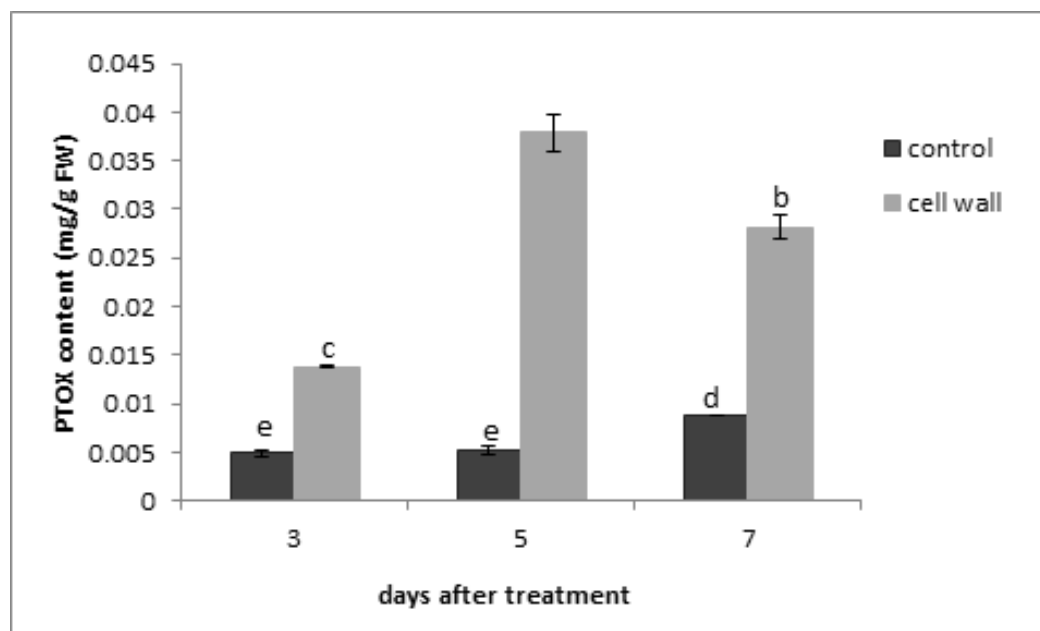
شکل ۵: تغییرات وزن تر سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p<۰/۰۵) است.



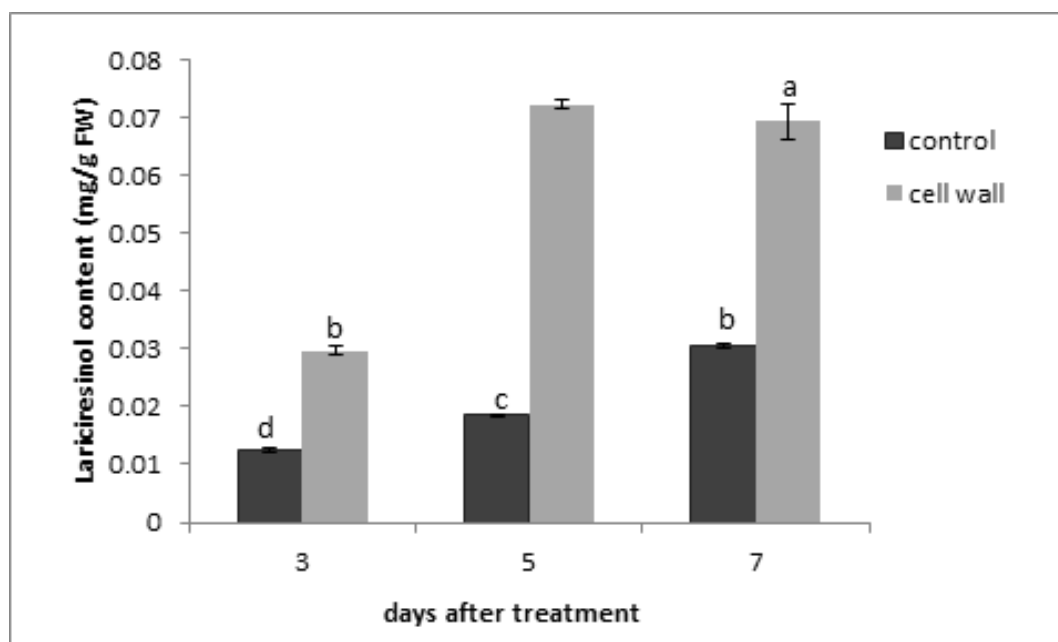
شکل ۶: تغییرات زنده مانی سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p<۰/۰۵) است.

افزودن دیواره *F. graminearum*، بعد از گذشت سه روز باعث افزایش معنی داری در میزان پودوفیلوتوکسین نسبت به نمونه های شاهد شده است و پس از گذشت پنج روز باعث القای تولید بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین به میزان هفت

برابر نمونه های شاهد (شکل ۷) شد. میزان لاریسی رزینول نیز سه روز بعد از افزودن تیمار، افزایش یافت و پس از گذشت پنج روز هشت برابر نمونه های شاهد بود (شکل ۸). این افزایش در روز ۷ بعد از تیمار هم مشاهده گردید اما میزان

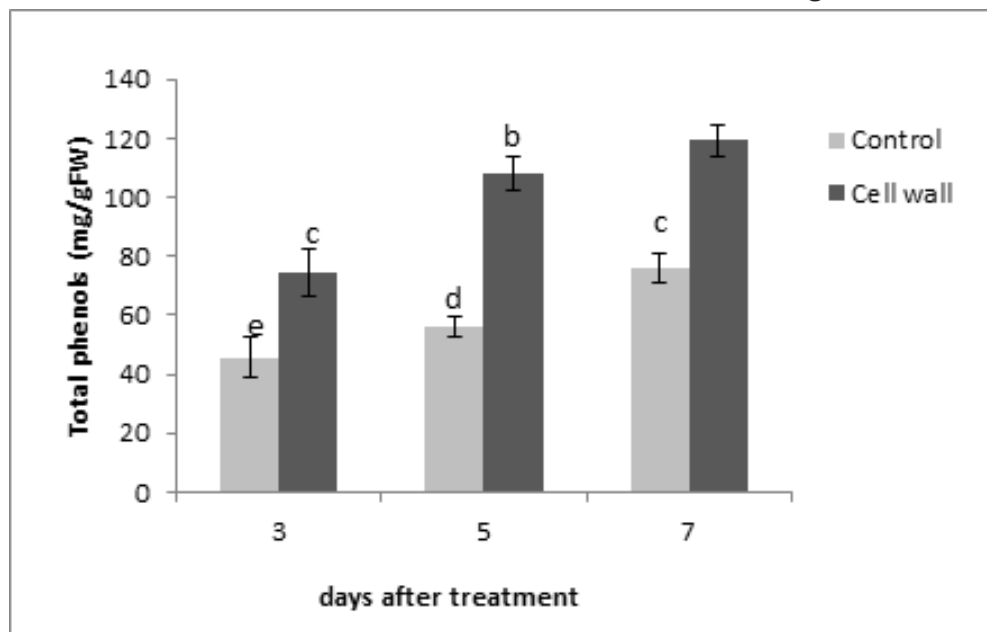


شکل ۷: تغییرات پودوفیلوتوکسین سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq 0.05$) است.

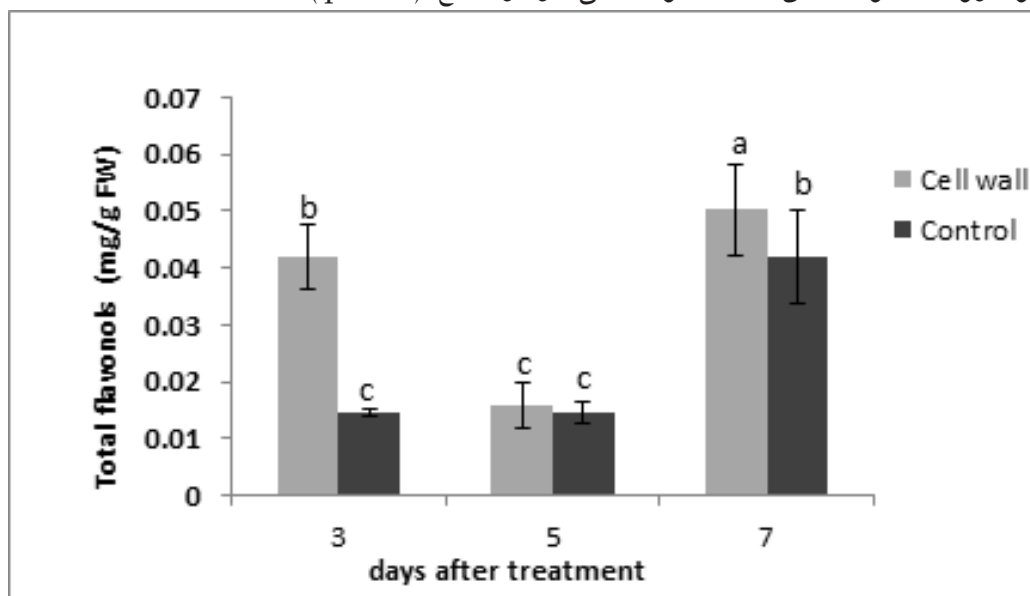


شکل ۸: تغییرات لاریسی رزینول سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq 0.05$) است.

آن با روز ۵ تفاوت معنی داری نشان نداد. در محیط کشت تعلیقی باعث افزایش ۴- تاثیر غلظت بهینه دیواره فوزاریوم بر فنل کل، فلاونول و فلاونوئیدها بررسی میزان فنل کل نشان داد که ترکیبات دیواره قارچ پس از افزوده شدن ۹). میزان فلاونول بعد از گذشت ۳ و ۷



شکل ۹: تغییرات فنل کل سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p < 0.05) است.

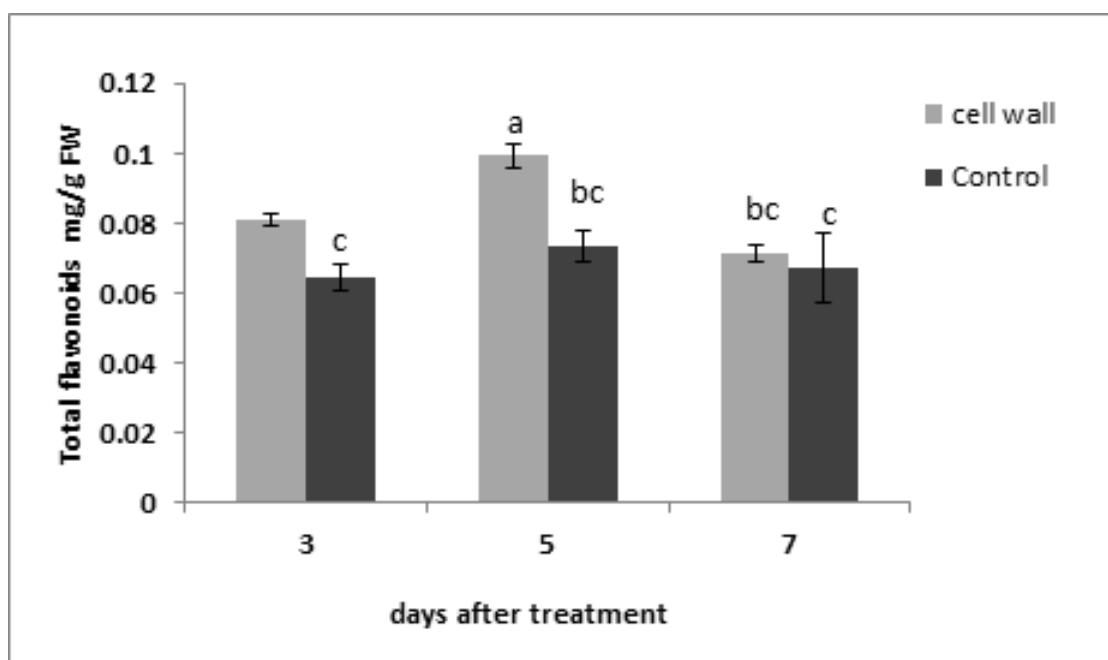


شکل ۱۰: تغییرات فلاونول سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p < 0.05) است.

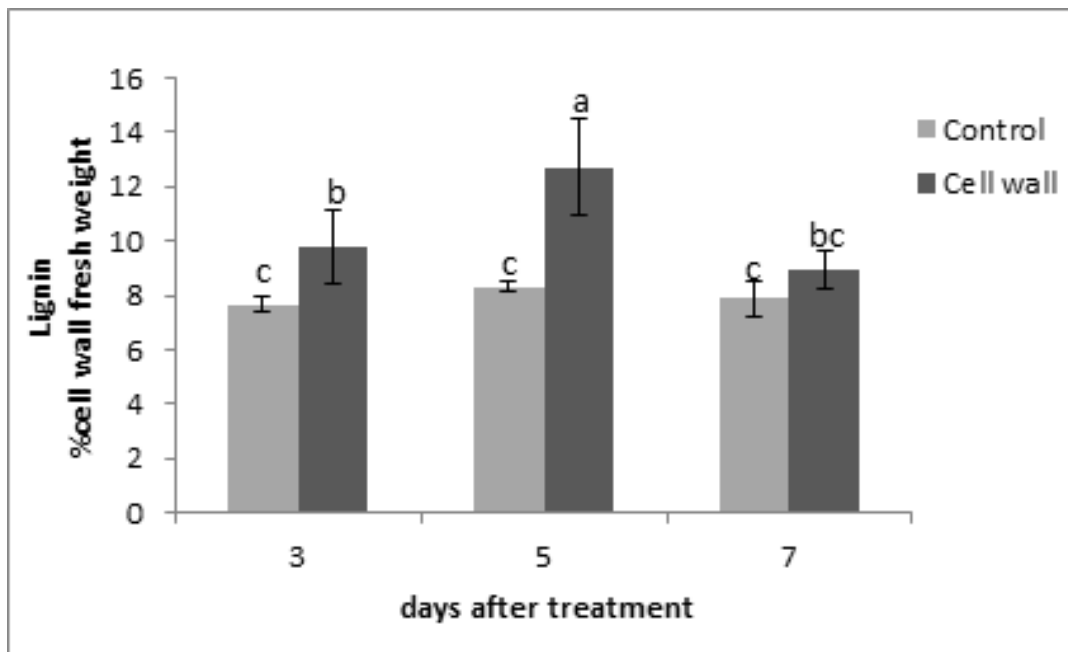
تفاوت معنی داری ندارد (شکل ۱۱).
۵- تاثیر غلظت بهینه دیواره فواریوم بر میزان لیگنین

نتایج بررسی میزان لیگنین در کشت تعلیقی کتان سفید نشان داد که بعد از گذشت سه و پنج روز از آغاز تیمار سلولها، میزان آن به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت و این روند تا انتهای دوره آزمایش ادامه پیدا کرد، میزان لیگنین پنج روز بعد از اعمال تیمار حدود ۲ برابر نسبت به سلول های شاهد افزایش یافت (شکل ۱۲).

روز از تیمار افزایش معنی داری نشان داد در حالی که افزایش فلاونول در روز ۵ نسبت به شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۱۰). همچنین بررسی میزان فلاونوئیدها نشان داد که با افزودن تیمار دیواره، میزان فلاونوئیدها افزایش قابل توجهی در مقایسه با نمونه های شاهد در روزهای ۳ و ۵ بعد از تیمار دارد. این افزایش در روز پنجم بعد از تیمار به بیشترین میزان می رسد. در حالی که در روز ۷ میزان فلاونوئیدها نسبت به شاهد



شکل ۱۱: تغییرات فلاونوئید سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فواریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($p \leq 0.05$) است



شکل ۱۲: تغییرات میزان لیگنین سلول های کتان، ۳-۵ و ۷ روز بعد از تیمار با غلظت بهینه (۱٪) دیواره قارچ فوزاریوم در مقایسه با سلول های شاهد. داده ها حاصل ۳ تکرار، میله های عمودی معرف انحراف استاندارد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (p<0/05) است.

بحث

کرده و باعث تشکیل متابولیت های ثانوی شوند. همچنین گزارش شده است که ترکیبات دیواره سلول قارچ ها باعث تولید فیتوآکسین ها و ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین (فنیل پروپانویدها، ترپن ها و ...) می شوند (Cordell et al., 1997). مطالعات نشان می دهد الیسیتورهای قارچی می توانند باعث مهار رشد سلول های گیاهی شود (Misawa, 1994). به طور مثال رشد سلول های *Morinda elliptica* تحت تاثیر عصاره قارچ *Aspergillus niger* بیش از ۳۵ درصد نسبت به نمونه های شاهد کاهش یافت (Chong et al., 2005). کاهش رشد سلولی تحت تاثیر الیسیتورهای قارچی

یکی از این روش هایی که امروزه به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانوی در کشت درون شیشه (in vitro) به کار می رود، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی می باشد (Zhao et al., 2005). مطالعات نشان داده است که ترکیبات دیواره سلول بسیاری از قارچ ها باعث افزایش میزان متابولیت های ثانویه، بویژه آنهایی که در مکانیسم های دفاعی گیاه نقش دارند، می شوند (Kang et al., 2004; Pu et al., 2009). بسیاری از ترکیبات دیواره قارچ می توانند سبب بیان شدن ژن های جدید شوند که آنزیم ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه اندازی

کشت سلول *Tobacco baccata* منجر به بیشترین میزان مرگ سلول ها و کمترین میزان تاکسول شد، در حالی که غلظت پایین آن (۲۵ میلی گرم در لیتر) منجر به تولید بیشترین میزان تاکسول و کمترین میزان مرگ و میر سلول ها شده است (Khosroshahi et al., 2005). همچنین بیشترین میزان بتالائین در کشت ریشه موئین *Beta vulgaris* در غلظت پایین الیسیتور قارچی ۱٪ (v/v) مشاهده شده است، در حالی که رشد به طور معنی داری کاهش داشته است (Savitha et al., 2006). در این تحقیق غلظت ۱٪ (v/v) دیواره قارچی بیشترین تاثیر افزایشی را بر میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول داشت و این در صورتی است که در این غلظت میزان زنده مانی و رشد نسبت به سلول های شاهد کاهش داشته است. اسماعیل زاده و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که غلظت ۱٪ (v/v) عصاره قارچی *F.graminearum* بیشترین تاثیر افزایشی بر میزان پودوفیلوتوکسین داشته و همچنین در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کیتوزان به ویژه در روز ۵ بعد از تیمار، بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین مشاهده شده است. در این تحقیق نیز نتایج بررسی در بازه زمانی (۳، ۵ و ۷ روز) نشان داده که میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در روز ۳ و ۵ بعد از تیمار نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی داشته است. مطالعات

در کشت سلول *Rhodiola sachalinesis*، نیز *Taxus spp.*، *Catharanthus roseus* گزارش شده است (Chong et al., 2005). این کاهش رشد سلول ها تحت تاثیر الیسیتورهای قارچی می تواند به دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم ثانوی باشد (Chen et al., 2000 Wang et al., 2001). گزارشاتی نیز مبنی بر افزایش رشد تحت تاثیر الیسیتورهای قارچی وجود دارد، بنابراین به نظر می رسد الیسیتور های قارچی اثرات متنوعی بر رشد دارند. در این تحقیق با افزودن دیواره قارچ به ویژه در غلظت ۲٪ کاهش زنده مانی سلول ها مشاهده شده است. در کتان زراعی (*L. usitatissimum*) نیز تحت تاثیر الیسیتور های قارچی بعد از ۵ روز زنده مانی به میزان ۳۰-۵۰ درصد نسبت به سلول های شاهد کاهش نشان داده است (Hano et al., 2006). مطالعات نشان داده است که غلظت الیسیتور اهمیت زیادی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری بر شدت پاسخ است. غلظت مؤثر الیسیتور بر حسب گونه گیاهی فرق می کند، به طوری که غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است در گیاهی دیگر اثر نداشته باشد (Namdeo et al., 2007). به طور مثال گزارش ها نشان می دهد که غلظت بالای الیسیتور قارچی *Rhizopus stolinifer* (۵۰ میلی گرم در لیتر) در

مانی سلول ها می شوند اما اثر آنها بر روی ترکیبات لیگنانی در مقایسه با سلول های شاهد قابل توجه است.

اثرات خاص و متنوع الیسیتور های قارچی در ارتباط با بر همکنش ویژه هر قارچ با سلول گیاهی و مسیر ترانسسانی علامت مربوطه و بنابراین پاسخ های دفاعی سلول گیاهی متناسب با هر قارچ می باشد (Imre et al., 1998). تاکنون مطالعات مختلفی در مورد ترکیبات فنلی و نقش های زیستی متنوع این ترکیبات در گیاهان مختلف انجام شده است (Wojdyo et al., 2007). ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در این رابطه مشتقات سینامیک اسید موثرتر از مشتقات بنزوئات هستند. ترکیبات فنلی در همکاری با پراکسیدازها در جمع آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می کنند (Kovacik et al., 2009). مطالعاتی در این زمینه انجام شده است به طور مثال عصاره قارچ *Fusarium oxysporum* در کشت سلول تاکسوس باعث افزایش تاکسول و ترکیبات فنلی شد (Khosroshahi et al., 2005). افزایش ترکیبات فنلی تحت تاثیر الیسیتورهای قارچی در کشت سلول کتان زراعی مشاهده شده است (Hano et al., 2006). همچنین در تحقیق دیگر، مسیر فنیل پروپانوییدی در کشت تعلیقی *Vanilla planifolia* تحت تاثیر کیتوزان القا شده

میزان لیگنان ها در زمان های مختلف بعد از اعمال تیمار عصاره قارچی نشان داده که بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در سلول های تیمار شده با الیسیتورهای قارچی و کیتوزان در روز پنجم بعد از تیمار مشاهده شده است (اسمعیل زاده، ۱۳۹۰). بنابراین، مدت زمانی که سلول ها در معرض الیسیتور قارچی قرار می گیرند می تواند نقش مهمی در تولید بیشتر لیگنان ها داشته باشد. اما به نظر می رسد از آنجا که سلول های تیمار شده بعد از گذشت ۷ روز زنده مانده و رشدشان در مقایسه با سلول های شاهد کاهش می یابد، کاهش در میزان لیگنان ها مشاهده شود و یا حتی ممکن است این ترکیبات پس از روز ۵ که بیشترین میزان را دارند، به ترکیبات دیگری از مسیر تبدیل شوند. در برخی گزارش ها متابولیزه شدن ترکیبات لیگنانی و ورود آنها به مسیرهای دیگر برای تولید سایر ترکیبات فنلی مشاهده شده است (Tokunaga et al., 2005). ترکیبات الیسیتورهای حاصل از دیواره های سلول قارچها بسیار پیچیده هستند و شامل پروتئین ها، اولیگو ساکاریدها، گلیکو پروتئین ها، پپتیدها، کیتین و کیتوزان می باشد (Scheel and Parker, 1990). با توجه به نتایج، به نظر می رسد این ترکیبات در القای ترکیبات لیگنانی نقش موثری دارند هر چند که در غلظت های بالا، سبب کاهش رشد و زنده

نیز نشان داد که لیگنین تحت تاثیر دیواره قارچ به میزان دو برابر نمونه های شاهد افزایش می یابد، که می تواند نشانه عملکرد دفاعی لیگنین در برابر الیسیاتور باشد. تحقیق حاضر اولین مطالعه روی تاثیر دیواره جدا شده قارچ فوزاریوم بر مسیر بیوسنتزی ترکیبات لیگنانی و فنلی در کشت تعلیقی کتان سفید است. نتایج نشان می دهد الیسیاتورهای قارچی در مقایسه با دیگر الیسیاتورها به طور کارآمدتری در افزایش تولید پودوفیلوتوکسین و سایر ترکیبات لیگنانی موثر هستند (اسمعیل زاده، ۱۳۹۰). به نظر می رسد ترکیبات فعال دیواره قارچی نقش مؤثری در القای پاسخ های دفاعی و افزایش تولید لیگنان ها دارند. همچنین علاوه بر افزایش ترکیبات لیگنانی، میزان ترکیبات فنلی به عنوان عوامل درگیر در پاسخ های دفاعی نیز افزایش یافت. با توجه به این نتایج، می توان با بررسی ترکیبات فعال دیواره قارچ و همچنین بررسی فعالیت و بیان ژن آنزیم های درگیر در بیوسنتز ترکیبات لیگنانی و فنلی درک بهتری از مکانیسم عمل الیسیاتور و ارتباط میان مسیرهای متابولیسمی گیاه به دست آورد.

است (Funk et al; 1992). فلاونوئیدها نیز یکی از گسترده ترین و متنوع ترین ترکیبات طبیعی هستند که مشابه با سایر ترکیبات فنلی توانایی جذب رادیکال های آزاد را دارند. در این مطالعه میزان فنل کل و فلاونوئید تحت تاثیر دیواره قارچی، در تمام روزهای برداشت بعد از تیمار در مقایسه با شاهد روند افزایشی نشان دادند. از طرفی میزان فلاونول کل نیز با وجود کاهش نسبی در روز ۵ بعد از تیمار روندی افزایشی داشت. این افزایش تایید کننده پاسخ های دفاعی سلول های کتان سفید نسبت به حضور الیسیاتور می باشد.

با توجه به اینکه پیش ماده های لیگنان ها و لیگنین یکی بوده و از مسیر متابولیسم فنیل پروپانویید تامین می شوند انتظار می رود با افزایش لیگنان ها با کاهش سنتز لیگنین مواجه شویم، اما لیگنین یکی از ترکیباتی است که نقش دفاعی دارد و در پاسخ به تنش میزان آن افزایش می یابد. افزایش لیگنین تحت تاثیر الیسیاتور های قارچی در کشت سلول کتان زراعی و صنوبر نیز گزارش شده است (De Alwis, 2009; Hano et al., 2006). نتایج این تحقیق

منابع

- اسمعیل زاده ص. (۱۳۹۰). بررسی اثر الیسیتورهای قارچی بر میزان پودوفیلوتوکسین و بیان ژن و فعالیت آنزیمهای فنیل آلانین آمونیا لیاژ و سینامیل الکل دهیدروژناز در *Linum album*. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی.
- فخاری ص. (۱۳۸۹). بررسی تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین در پاسخ به تنظیم کننده های رشد گیاهی و متیل جاسمونات در کشت کالوس و گیاهچه *Linum album*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی.
- یوسف زادی م. (۱۳۸۹). بررسی اثر تیروزین، تریپتوفان، نور و سالیسیلیک اسید بر میزان پودوفیلوتوکسین، فعالیت آنزیمی و بیان ژن برخی از آنزیمهای مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین در گیاه *Linum album*. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده علوم زیستی.
- Akkol, E. K., Goger, F., Kosar, M., Baser, K. H. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*. 108: 942–949.
- Arroo, R.R., Alfermann, A.W., Medarde, M., Petersen, M., Woolley, J.G. (2003). Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochemistry Reviews*. 1: 2735-.
- Baldi, A., Jain A., Bisaria V.C. (2008). Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cells of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxin: a first report. *Biotechnology Letter*. 30: 1671–1677.
- Boonyuen, C., Wangkarn, S., Suntornwat, O., Chaisuksant, R. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract. *Kasetsart Journal: Natural Science*. 43: 2127-.
- Chen, S.Y., Dickson, D.W., Mitchel, D.J. (2000). Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. *Journal of Nematology*. 32: 190197-.
- Chong, T., Abdulah, M., Lajis, N. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*. 40: 3397- 3405.
- Cordell, G.A. (1997). *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic Press,

- New York, USA. 380384-.
- De Alwis, R., Fujita, K., Ashitani, T. (2009). Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. *Plant Biotechnology Reports*. 3:57–65.
- De Pietro, A., Rosales, R.P., Luque-Gracia, J. L., Martines lopez, R., Gil, C. (2009). The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. *Proteomocs*. 9 : 47554769-.
- Esmailzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T., and Satake, H., 2011. Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant Biotechnology Report*, 5:367373-.
- Funk, C., Brodelius, P.E. (1992). Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilia planifolia*. *Plant Physiology*. 94: 95–101.
- Furden, B.V., Humburg, A., Fuss, E. (2005). Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Report*. 24: 312–317.
- Federolf, K., Alfermann, A.W., Fuss, E. (2004). Aryltetralin-lignan formation in two different cell lines of *Linum album*: deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. *Phytochemistry*. 68:13971406-.
- Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Review*. 2: 307–320.
- Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Baltora-Rosset, S., Doussot, J., Maury, S., Mesnard, F., Chabbert, B., Hawkins, S., Laine, E., Lamblin, F. (2006). Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta*: 223: 975–989.
- Iiyama, K., Wallis, A. (1988). An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Science Technology*: 22: 271280-.
- Imbert, T. F. (1998). Discovery of podophyllotoxin. *Biochimie*. 80: 207222-.
- Imre, E., Somssich, I.E., Hahlbrok, K. (1998). Pathogen defence in plant-a

- paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*. 3:86–90.
- Ionkova, I. (2007). Biotechnological approaches for the production of lignans. *Pharmacognosy Reviews*. 1: 427443-.
- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K., Choi, M.S. (2004). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*. 166: 745751-.
- Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, M. Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., Omid, Y. (2005). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. 30: 262269-.
- Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M., Repečak, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Report*. 28:135–143.
- Kumar, V., Rajauria, G., Sahai, V., Bisaria, V.S. (2012). Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. *Process Biochemistry*. 47:901–907.
- Missawa, M. (1994). *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites*. Daya Publishing House. Toronto, Canada. Chapter 7.
- Muranaka, T., Miyata, M., Tachibana S. (1998). Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry*. 49: 491–496.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473497-.
- Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Review*. 1: 320345-.
- Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H., Li, G.F. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Report*. 28: 1127–1135.

- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*. 41: 50–60.
- Scheel, D., Parker, J.E. (1990). Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 45: 56975-.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. (2001). Cadmium-Induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*. 127: 887898-.
- Sok, D.E., Cui, H.S., Kim, M. (2009). Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 1: 8795-.
- Suzuki, S., Umezawa, T. (2007). Biosynthesis of lignans and norilignans. *Journal of Wood Science*. 53: 273284-.
- Tokunaga N., Sakakibara N., Umezawa T., Ito Y., Fukuda H. and Sato Y. (2005). Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology*, 46:224232-. Umezawa T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Review*, 2:371390.
- Van Uden, W., Pras, N., Visser, J.F., Malingre, T.M. (1989). Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Report*. 8:165–168.
- Vasconsuelo, A., Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172: 861875-.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 3: 220-.
- Wang, C.G., Wu. J.Y. (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 404–410.
- Westcott, N.D., Muir, A.D. (2003). Flax seed lignan in disease prevention and health promotion. *Phytochemistry Review*. 2: 401417-.

- Wojdyo, A., Oszmian, J., Czemerzys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105: 940–949.
- Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E., Palazon, J. (2010). Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. *Biotechnology Letter*. 32: 1739–1743.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advance*. 23: 283–333.