Saffron Agronomy & Technology
Vol. 9, No. 1, Spring 2021, P. 81-90

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰ ص. ۹۰-۸۱

مقاله علمی - پژوهشی

اثر سطوح مختلف کیتوزان بر مقادیر و بیان ژن های کروسین و سافرانال در محیط کشت مایع زعفران (*Crocus sativus* L.)

توفیق طاهرخانی[۱]، رسول اصغری زکریا[۲]، منصور امید[۳]، ناصر زارع[۴] و محبوبه طاهرخانی[۵] *

تاریخ دریافت: ۱۷ شهریور ۱۳۹۹ **تاریخ پذیرش:** ۸ دی ۱۳۹۹

طاهرخانی، ت.، اصغری زکریا، ر.، امید، م.، زارع، ن.، طاهرخانی، م. ۱۴۰۰. ثر سطوح مختلف کیتوزان بر مقادیر و بیان ژن های کروسین و سافرانال در محیط کشت مایع زعفران (*Crocus sativus* L.). زراعت و فناوری زعفران، ۹(۱): ۹۰-۸۱.

چکیده

زعفران (*Crocus sativus*) گیاه بسیار مهم دارویی و اقتصادی بومی ایران است که با طعم، عطر و رنگ خاص علاوه بر مصارف غذایی دارای خواص دارویی فراوانی است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر استفاده از کیتوزان به عنوان الیسیتور بر افزایش مقادیر کروسین و سافرانال و تغییرات بیان ژن‌های دخیل در تنظیم رونویسی به عنوان دو ترکیب دارویی مهم این گیاه در کشت سوسپانسیونی زعفران می‌باشد. برای این منظور به کشت بنه‌های زعفران در محیط کشت ۱/۲MS و در محیط سوسپانسیون سلولی و در شرایط رشدی نسبت به اعمال تیمار ۱۰۰ و۱۵۰میلی گرم در لیتر کیتوزان و نمونه شاهد بدون اعمال تیمار اقدام گردید و در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار و همچنین نمونه شاهد نسبت به جمع آوری نمونه در ۳ تکرار اقدام شد. اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه با HPLC و بررسی بیان ژن‌ها باReal time PCR انجام شد. نتایج نشان داد پس از استفاده از ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت دو ژن *CsLYC* و*CsGT-2* به طور چشمگیری افزایش بیان نشان دادند همچنین نتایج نشان داد مقادیر سافرانال و کروسین بر اثر استفاده از کیتوزان دردو زمان برداشت اختلاف معنی‌داری دارند به طوری که ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر در زمان برداشت ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار دارای بیشترین مقدار کروسین و سافرانال است. استفاده از کیتوزان به عنوان یک عامل محرک زیستی در رشد گیاهان دارویی و اقتصادی زعفران باعث افزایش مقادیر ترکیبات ارزشمند کروسین و سافرانال در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه بوده است.

کلمات کلیدی: کیتوزان، سافرانال، کروسین، *HPLC*، *Real time PCR*

۱ - استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی، موسسه آموزش عالی شمس، گنبد کاووس، ایران
۲ - استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳ - استاد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴ - دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۵- گروه شیمی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران
(نویسنده مسئول: mahtaherkhani@yahoo.com)

DOI: 10.22048/JSAT.2020.247224.1409

مقدمه

زعفران (2n=3x=24) با نام علمی *Crocus sativus* L. دارای بوی معطر با طعم کمی تلخ می‌باشد. این تیره شامل ۶۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه می‌باشد (Ebrahimzadeh et al., 2000). اگر چه منشاء زعفران ناشناخته است، ظاهراً از برخی نواحی ایران، ترکیه و یونان منشاء گرفته است. زعفران از گیاهان مهم صنعتی و دارویی در جهان می‌باشد که مطالعات وسیعی در مورد اثرات مختلف آن صورت گرفته است. برخی تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول‌های انسانی و دیگر مدل‌های سرطانی تأثیر خوبی داشته است (Abdullaev, 2002; Nair et al., 1995; Tarantilis et al., 1994). به دلیل اینکه ساخت ترکیبات ثانویه با ارزش با استفاده از روش‌های شیمیایی ناایمن و در برخی مواقع مقرون به صرفه نیست، تولید آنها از طریق بکارگیری روش‌های زیست فناوری و کشت سلولی گیاهی مدنظر قرار گرفته است که نقش مهمی در ایجاد روش‌های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی دارد (Karuppusamy, 2009; Rao & Ravishankar 2002). ترکیب محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش‌سازها، استفاده از الیسیتورهای زنده و غیر زنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، بی تحرک کردن سلول‌های گیاهی و انتخاب سلول‌هایی با کارآیی بالا از مهمترین عوامل مؤثر در افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی می‌باشند. پیش‌سازها شامل ترکیبات زیستی مختلفی هستند که در ابتدا و یا میانه مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه وجود دارند و افزودن آنها به محیط کشت می‌تواند میزان تولید محصول نهایی مورد نظر را افزایش دهد (Rao & Ravishankar, 2002). در زعفران واکنش حلقوی شدن لیکوپن توسط ژن لیکوپن بتا سیکلاز (CsLYC) کد می‌شود (Wani et al., 2017). هیدروکسیل‌دار شدن بتا کاروتن نیز توسط ژن CsBCH کد می‌گردد که منجر به تولید زئازانتین می‌شود (Castillo et al., 2005). آنزیم گلوکواستیل ترانسفراز ۲ (glucosyltransferase 2)که به وسیلهٔ ژن CsUGT2 در کروموپلاست کلاله کد می‌شود، گلوکزیله می‌شود (Trapero et al., 2012). مطالعه تغییرات کمی وکیفی متابولت‌های ثانویه در زعفران نشان داده شده است که ژن‌های CsUGT2، CsLYC و CsBCH در تغییرات تنظیم رونویسی کروسین و سافرانال درگیر هستند (Castillo et al., 2005; Mir et al., 2012; Ahrazem et al., 2010). به‌طورکلی Real time PCR تکنیکی برای مشاهده بی وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می‌باشد. که با این روش می‌توان مقادیر تولید DNA و cDNA یا RNA را اندازه‌گیری کرد. همان گونه که از معنی واژه بر می‌آید مفهوم واژهReal time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرآیند می‌باشد (Bustin et al., 2005; Mzr et al., 2013). کیتوزان، پلیمر تشکیل شده از مونومرهای گلوکز آمین است که از دیوارهٔ سلولی قارچ های زیگومیست (Zygomycete) و پاتوژن‌های مهم گیاهی استخراج می‌شود (Ferri & Tassoni, 2011). پاسخ های سلولی به کیتوزان با افزایش پروتون سیتوزولی و کلسیم، فعال شدن MAP کینازها، تولید جاسمونات‌ها و پاسخ های فوق حساسیت همراه است. البته این پاسخ ها به ویژگی‌های گیاه، سلول‌ها و بافت آن نیز بستگی دارد (Namdeo, 2007). ویژگی های فیزیکوشیمیایی کیتوزان از نظر جرم مولکولی و ویسکوزیته بر میزان پاسخ گیاه و مرگ سلولی تأثیر گذار است (Iriti & Faoro, 2009). ترکیبات الیسیتور های حاصل از دیوارهای سلول قارچها بسیار پیچیده هستند و شامل پروتئین‌ها، اولیگو ساکاریدها، گلیکو پروتئین ها، پپتید ها، کیتین و کیتوزان می باشد (Nandeeshkumar et

al., 2008). به نظر می رسد این ترکیبات در القای متابولیت های ثانوی نقش داشته باشند. اثرات خاص و متنوع الیسیتور های قارچی در ارتباط با بر همکنش ویژه هر قارچ با سلول گیاهی و مسیر ترارسانی علامت مربوطه و بنابراین پاسخ‌های دفاعی سلول گیاهی متناسب با هر قارچ می باشد (Nandeeshkumar et al., 2008). شناسایی ترکیبات فعال عصاره های قارچی در درک مکانیسم برهمکنش سلولهای گیاهی-الیسیتورهای قارچی و پاسخهای دفاعی کمک خواهد کرد. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از ترارسانی علامتی را القاء می‌کند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. الیسیتورهای قارچی و ترکیبات اصلی دیواره سلول بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کیتین و کیتوزان باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه، به ویژه آنهایی که در سازوکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شوند (Pu et al., 2009). کاربرد کیتوزان باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی می‌شود. استفاده از کیتوزان در گیاه آفتابگردان آلوده به halstedi Plasmopara نیز باعث افزایش بیان ژن بتاگلوکاناز و القای مقاومت به بیماری سفیدک کرکی آفتابگردان شده است (Nandeeshkumar et al., 2008). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن‌دار، به‌ویژه اسید رزمارینیک۱ و اوژنول۲ می‌شود (Kim et al., 2004). در تحقیقی اثر کیتوزان به میزان ۱۵۰ میلی گرم در لیتر روی ریشه مویین *Artemisinin annua* L. مورد بررسی قرار گرفت، که باعث افزایش آرتمیزینین به مقدار ۱/۸ $\mu g.mg^{-1}$ شد (Putalun et al., 2007). کیتوزان باعث تولید فیتوآلکسین‌ها (Righetti et al., 2007) و بسیاری از ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی می‌شود (Kim et al., 2004).

بررسی تأثیر استفاده از غلظت‌های مختلف کیتوزان در مقادیر سافرانال و کروسین و تغییرات در بیان ژن‌های دخیل در تنظیم رونویسی این متابولیت‌ها از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سترون سازی بنه زعفران ، تهیه کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی واعمال تیمارها

این آزمایش در آزمایشگاه مرکزی مرکز تحقیقات زیست فناوری ایران انجام شد، ابتدا تمام بنه گیاه (شماره هرباریوم: ۱-۰۳۱۹- ۱۴۳تربت حیدریه) شسته و آلودگی‌های خارجی آن حذف گردید. سپس در زیر هود به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرارداده شد و بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر $HgCl_2$ ۰/۱ درصد قرار داده شد سپس با آب مقطر شسته شد و بعد سطح سوخ زعفران استریل کردن، بنه زعفران در محیط ۱/۲MS که با ۰/۱میلی گرم بر لیتر هورمون2-4-D و ۰/۵میلی گرم بر لیتر هورمون BAP اضافه و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی کشت گردید و بعد از گذشت ۱۴ روز کالوس بر روی ریز نمونه‌ها مشاهده شد و بعد از ظهور کالوس روی ریز نمونه‌ها در هر ۲۸ روزیکبار و به تعداد حداقل چهار بار کالوس‌ها واکشت گردیدند تا کالوس لاین ایجاد گردید. کالوس‌ها با اندازه های یکسان ۰/۵ گرم پس از انتقال به محیط مایع که همان شرایط محیط جامد را دارا بود، در شرایط رشدی بهینه یعنی یازده روز پس از شروع سوسپانسیون، با استفاده از کیتوزان به عنوان الیسیتور در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر تیمار شدند و همچنین نمونه شاهد یا نمونه بدون اعمال تیمار نیز به تعداد ۳ تکرار برداشت شد. کالوس‌ها در دو مرحله ۲۴و۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها و نمونه شاهد برداشت شده و مورد سنجش قرار گرفتند.

1-Rosmarinic acid
۲-Eugenol

شناسایی ترکیبات مؤثره از طریق دستگاه HPLC

تمامیِ کالوس‌هایی که در ارلن‌ها بودند، جمع آوری شده و به دو قسمت تقسیم شدند. یک بخش در دستگاه فریز درایر خشک شده و وزن خشک آن‌ها ثبت شد. کالوس‌های خشک شده در اتانول ۵۰٪ حجمی- حجمی سوسپانسیون شدند و برای۲۴ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سوسپانسیونِ حاصله سانتریفیوژ شد و مایع رویی آن جداسازی و نگهداری شد. عصارهٔ باقیمانده مجدداً به وسیلهٔ اتانول ۵۰٪ حجمی- حجمی عصاره‌گیری و سانتریفیوژ شد و مجددا مایع رویی به مایع جدا شدهٔ قبلی اضافه شد. سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد تا برای آنالیز HPLC[۱] آماده گردد.

برای تعیین ترکیبات کروسین و سافرانال ، نمونه‌های آماده سازی شده توسط دستگاه HPLC مدل Agilent 1100 که با ستون آنالیتیکال C18 (250×4.6 mm) مجهز شده است و بر اساس روش توصیف شده استاندارد مورد آنالیز و ارزیابی قرار گرفتند. جهت آنالیز نمونه‌ها، فاز متحرک شامل استونیتریل و آب دیونیزه بود. ستون با استفاده از نسبت ۸۰٪ استونیتریل به ۲۰ ٪ آب به نسبت حجمی-حجمی به مدت ۲۰ دقیقه شستشو شده و در ادامه با نسبت ۸۰ به ۲۰ (آب به استونیتریل) به مدت ۱ دقیقه شستشو متعادل سازی شد. سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بوده و ترکیبات سافرانال و کروسین به ترتیب در طول موج‌های ۳۳۰ و ۲۷۴ نانومتر شناسایی شدند. استاندارد ترکیبات مورد مطالعه از برند سیگما با کد اختصاصی (CAS number) ۱-۶۵-۴۲۵۵۳ برای کروسین و ۷-۲۶-۱۱۶ برای سافرانال تهیه شد. حجم اولیه تزریق شده به ستون ۲۰ میکرولیتر بود (INSO, 2013).

استخراج RNA و تخلیص آن

RNA کل طبق پروتکل شرکت پارس توس (A101231) از کالوس لاین‌ها استخراج شد، جهت خالص سازی RNA و حذف DNA ژنومی، یک میکرولیتر آنزیم DNAase و یک میکرولیتر $MgCl_2$ به ۱۰۰۰ میکروگرم از RNA کل اضافه شد و پس از اسپین کردن به مدت ۱۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بر روی هات‌پلیت قرار داده شد، سپس یک میکرولیتر از EDTA به ویال‌ها اضافه شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه قرار داده شد.

سنتز cDNA رشته اولیه

ابتدا طبق پروتکل شرکت Geneall به مقدار دو میکروگرم از RNAی DNAزدایی شده را برداشت کرده، به همراه یک میکرولیتر Oligo dT ،که غلظت آن ۵۰ میکرومولار بود، با هم مخلوط شد و حجم کل ویال را با آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و بر روی هات‌پلیت در دمای ۶۵ درجه به مدت ده دقیقه قرار گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس شامل Reverse transcriptas، dNTP، Stabilizer، RNAaes inhibitor و بافر واکنش بود، به محیط اضافه شده و تمام مواد اسپین شد. بعد در دستگاه PCR در دو مرحله: الف-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه. ب- ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ویال‌ها قرار گرفتند، cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بیان ژن نگهداری شد. آغازگرها طبق جدول ۱ جهت سنتز به شرکت روبین طب گستر سفارش داده شد (Nair et al., 1995).

بررسی بیان ژن با استفاده از Real-Time PCR

یک میکرولیتر از cDNA رقیق شده را به همراه نیم میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، پنج میکرولیتر مستر Real time و سه میکرولیتر آب در داخل هر ویال قرار داده شد. حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. هر یک از ویال‌های آماده شده در داخل دستگاه Real time PCR با شرایط زیر قرار گرفت: ابتدا

۱- high-performance liquid chromatography

برای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه، سپس مرحلهٔ اصلی به شرح زیر اعمال شد: ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه که این مرحله به مدت ۴۵ سیکل تکرار شدند. نرم افزار لایت سایکلر ۴۸۰ (Thermo real time, Yekta Tajhiz Azma) برای جمع آوری داده‌های فلورسانس مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان نسبی ژن‌ها ابتدا از نرم افزار linReg PCR نسخه ۲۰۱۵ مقادیر ضریب‌تأثیر PCR را بدست آورده و همراه با CT بدست آمده از دستگاه Real-Time PCR با نرم افزار Rest 2009 نسبت به محاسبه بیان نسبی ژن در هریک از تیمارها نسبت به شاهد (عدم تیمار) نرمالایز شده با ژن خانه‌دار (Housekeeping gene) که توبولین بود، اقدام نموده و سپس با نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمر برای تکثیر ژن‌های مهم مسیر بیوسنتز ترکیبات سافرانال و کروسین در زعفران با طول مورد انتظار

Table 1- Primer sequence for amplification of important genes of biosynthesis pathway of safranal and crocin compounds in saffron with expected length (Mir et al., 2012)

آغازگر* Primer*	آغازگرهای مستقیم و معکوس Direct and reverse primers	اندازه پرایمر (جفت باز) Primer size (base pair)
CsLYC - F	AGATGGTCTTCATGGATTGGAG	247
CsBCH - F	TCGAGCT TCGGCATCACATC	295
CsGT2 - F	GATCTGCCGTGCGTTCGTAAC	400
CsTUB - F	TGATTTCCAACTCGACCAGTGTC	225
CsLYC - R	ATCACACACCTCTCATCCTCTTC	247
CsBCH - R	GCAATACCAAACAGCGTGATC	295
CsGT2 - R	GATGACAGAGTTCGGGGCCTTG	400
CsTUB - R	ATACTCATCACCCTCGTCACCATC	225

* *Cs*: *Crocus sativus*; *LYC*: lycopene-ßcyclase, *BCH*: ß carateoned hidrocsilaz, *GT2*: glucosyltransferase 2.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده در آزمایش ها

تجزیه واریانس داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و مقایسه میانگین از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵، با استفاده از نرم افزار SPSS ver.17 و رسم نمودارها توسط نرم افزار Microsoft Excel, 2010 صورت گرفت.

نتایج و بحث

الف - تأثیر سطوح مختلف کیتوزان بر بیان ژن های مسیر بیوسنتز کروسین و سافرانال

نتایج بررسی بیان ژن‌ها در سوسپانسیون سلولی زعفران تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نشان داد که این الیسیتور بر تغییر بیان ژن‌های *CsLYC* و *CsGT-2* در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت برداشت پس از اعمال تیمار تأثیرگذار بود ولی این تیمار تأثیری بر بیان ژن *CsBCH* نداشت (جدول ۲).

در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به میزان ۰/۶۷ کاهش بیان نشان داد و بیان ژن‌های *CsGT-2* به میزان ۱/۴۰ برابر افزایش یافت. همچنین اعمال همین سطح از این الیسیتور پس از ۷۲ ساعت موجب شد که بیان ژن های *CsLYC* به میزان ۲/۶۹ برابر و *CsGT-2* به میزان ۲/۴۵ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دهد (جدول ۲). برای ژن *CsBCH* تغییر معنی‌داری در بیان ژن مشاهده نشد.

همچنین تغییرات در سوسپانسیون سلولی زعفران تیمار شده با ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان تأثیرات زیادی بر بیان ژن‌های مذکور نشان داد به طوری که نتایج حاکی از آن است که این الیسیتور بر بیان ژن‌های *CsLYC* و *CsGT-2* در بیوسنتز سافرانال و کروسین در هر دو زمان برداشت ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مؤثر بود که در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به میزان ۳/۴۹ و بیان ژن‌های *CsGT-2* به میزان ۳/۳۳ برابر افزایش نسبت به شاهد نشان داد. همچنین اعمال این سطح از این الیسیتور پس از ۷۲ ساعت موجب شد که

بیان ژن های *CsLYC* به میزان ۵/۴۷ برابر، *CsGT-2* به میـزان ۵/۳۸ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۲) ولی بیان ژن *CsBCH* تغییر معنی‌داری نشان نداد.

ب- تأثیر سطوح مختلف کیتـوزان بـر مقـادیر کروسـین و سافرانال در سوسپانسیون سلولی

تجزیه واریانس مقادیر سافرنال و کروسین با استفاده از تیمار سطوح مختلف کیتوزان نشان می‌دهد اختلـاف معنـی‌داری بـین مقادیر سافرانال و کروسین با استفاده از۱۰۰و ۱۵۰ میلی گرم بـر لیتر کیتوزان در طی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از رشد بهینه و اثـرات متقابل آن‌ها وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۲- تأثیر استفاده از کیتوزان بر بیان ژن‌های مهم مسیر بیوسنتز ترکیبات کروسین و سافرانال در زعفران

Table 2- The effect of using chitosan on the expression of important genes in the biosynthesis pathway of crocin and safranal compounds in saffron

تیمار کیتوزان Chitosan treatment	زمان برداشت Harvest time	*CsBCH*	*CsLYC*	*CsGT-2*
100 mg.l^{-1} (T1)	۲۴ ساعت 24 hours (E1)	0.006 ± 0.0001	0.67 ± 0.0017	1.40* ± 0.0497
	۷۲ ساعت 72 hours (E2)	0.04 ± 0.001	2.69* ± 0.0263	2.45* ± 0.0120
150 mg.l^{-1} (T2)	۲۴ ساعت 24 hours (E1)	0.14 ± 0.066	3.49** ± 0.097	3.33** ± 0.0226
	۷۲ ساعت 72 hours (E2)	0.4 ± 0.039	5.47** ± 0.0292	5.38** ± 0.0294

**معنادار در سطح ۰/۰۱ ، * معنادار در سطح۰/۰۵ ، n.s غیر معنا دار.

** Significant at 0.01, * significant at .05, ns: not significant.

جدول ۳- تجزیه واریانس مقادیر سافرانال و کروسین بر اثرتیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف کیتوزان

Table 3- Analysis of variance of safranal and crocin levels by cell suspension treatment with different levels of chitosan

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares	
		سافرانال Safranal	کروسین Crocin
تیمار Treatment	2	82.774**	136711.821**
زمان برداشت Harvest time	1	30.222**	55204.556**
تیمار* زمان برداشت Treatment * harvest time	2	15.189**	13189.237*
اشتباه آزمایشی Experimental error	12	0.869	1779.146
ضریب تغییرات (%) C.V.		55.7	27.5

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ ، ns غیر معنی‌دار.

** Significant at 0.01, ns: not significant.

به طوری که مقایسه میانگین مقادیر سافرانال بـا اسـتفاده از تیمار سطوح مختلف کیتوزان نشـان داد مقـدار سـافرانال در ۷۲ ساعت پس از تیمار بـا ۱۵۰ میلـی‌گـرم در لیتـر کیتـوزان دارای بالاترین مقدار با میانگین ۱۱/۹۴۰میکرو گرم در یک گرم کالوس بوده و این مقدار، اختلاف معنی‌داری با سـایر تیمارهـای اسـتفاده شده با کیتوزان داشت (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین مقادیر سافرانال و کروسین بر اثرتیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف کیتوزان

Table 4- Comparison of mean levels of safranal and crocin on the effect of cell suspension treatment with different levels of chitosan

تیمارکیتوزان Chitosan treatment	زمان برداشت Harvest time	سافرانال Safranal (microgram per gram of callus)	کروسین Crocin (microgram per gram of callus)
تیمار شاهد (T0) Control treatment (T0)	۲۴ساعت 24 hours	2.231 ^{c} ± 0.630	229.543 ^{c} ± 53.417
	۷۲ساعت 72 hours	2.559 ^{c} ± 1.042	241.088 ^{c} ± 29.541
100 mg.l^{-1} (T1)	۲۴ساعت 24 hours	1.781 ^{c} ± 0.678	248.150 ^{c} ± 53.697
	۷۲ساعت 72 hours	2.997 ^{c} ± 0.578	370.963 ^{b} ± 34.671
150 mg.l^{-1} (T2)	۲۴ساعت 24 hours	5.710 ^{b} ± 1.010	426.897 ^{b} ± 11.150
	۷۲ساعت 72 hours	11.940 ^{a} ± 1.561	624.817 ^{a} ± 52.538

میانگین های با حروف غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

Means with different letters have significant differences.

همچنین مقایسه میانگین مقادیر کروسین با استفاده از تیمار سطوح مختلف کیتوزان نشان داد مقدار کروسـین در ۷۲ سـاعت پس از رشد بهینه با استفاده از مقـدار ۱۵۰ میلـی گـرم بـر لیتـر کیتوزان دارای بالاترین مقدار با میانگین ۶۲۴/۸۱۷ میکـرو گـرم کروسـین در یـک گـرم کـالوس بـوده و ایـن مقـدار، اختلـاف معنی‌داری با سایر تیمارهای اسـتفاده شـده بـا کیتـوزان داشـت (جدول ۴).

کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیست تخریب پـذیر در ایـن تحقیق مورد استفاده قرار گرفـت. نتـایج نشـان داد کـه کـاربرد کیتـوزان در مقـادیر سـافرانال و کروسـین تـأثیر گـذار بـوده و بیشترین دوز و طولانی تـرین مـدت برداشـت موجـود در تیمـار، دارای بیشترین مقدار کروسین و سافرانال گزارش شده می‌باشـد. نتایج حاصل از ایـن تحقیـق نشـان داد کـه ژن‌هـای *CsLYC* و *CsGT2* توسط تیمار کیتوزان به مدت ۷۲ ساعت بیشترین القـا و افزایش بیان نشان دادند. افزایش در میزان متابولیت‌هـای تیمـار شده با القای این الیسیتور در بازه‌های زمانی متفاوت رؤیت شـد. در کاربرد این محرک زیستی نشـان داده شـد کـه غلظـت‌هـای مختلفی از کیتوزان در محیط کشت، تجمـع متفـاوتی از مقـادیر مختلف متابولیت‌ها را به دنبال دارد. نتایج حاصله در تطابق کامل با نتایج آزمایشات مشابه گزارش شده در سـالهای گذشـته مـی-باشد. به طور مشابهی نشـان داده شـد کـه رویکـرد اسـتفاده از کیتوزان به عنوان یک عامل محـرک زیسـتی در رشـد گیاهـان دارویی مختلف باعث افزایش عملکرد رشدی و رویشـی گیاهـان همراه با افزایش در مقادیر متابولیت‌های ثانویه گیاهان بوده است

Salehi & Rezayatmand, 2017; Mehregan et al., 2017; Ozhan et al., 2017). به طور مثال در گیاه *Mentha piperita* نشان داده شد که با افزایش میزان کاربرد کیتوزان، میزان ترکیبات تام فنولی و فلاونوئیدی افزایش یافته و در همین راستا فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه نیز افزایش می‌یابد (Salimgandomi & Shabrangi, 2016). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شد که کاربرد کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی در گیاه سداب (*Ruta graveolens*) موجب افزایش قابل توجه در میزان ترکیبات کومارینی و برخی ترکیبات آلکالوئیدی گردیده است (Orlita et al., 2008).

نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که استفاده از کیتوزان به عنوان الیسیتور می‌تواند موجب افزایش قابل توجه در رشد نسبی بیومس گیاه و همچنین تشدید قابل توجه بیوسنتز متابولیت‌های ارزشمند دارویی در گیاه *Panax ginseng* گردد (Jeong & Park, 2005). به طور کلی می‌توان چنین گفت که استفاده از کیتوزان می تواند به عنوان یکی از راه‌کارهای مهم بیوتکنولوژیک جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهان دارویی در محیط‌های کشت سوسپانسیون مورد استفاده قرار گیرد (Häkkinen et al., 2013).

نتیجه گیری

بازار جهانی گیاهان دارویی و داروهای گیاهی مشتق شده از آنها رو به افزایش است. از طرف دیگر مقدار کمی و ارزش کیفی ترکیبات این گیاهان که به متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند و مبنای ارزش دارویی و اقتصادی این گیاهان است نیز متأثر از شرایط کشت و نگهداری گیاه می‌باشد. دست‌ورزی محیط کشت گیاهان با بکارگیری الیسیتورهای زیستی یکی از راهکارهای مهم جهت افزایش القای متابولیسم متابولیت‌های ثانویه از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاه و در نتیجه افزایش ارزش دارویی و اقتصادی گیاهان دارویی است. نتایج این تحقیق نشان داد که الیسیتور کیتوزان جهت افزایش مقادیر ترکیبات کروسین و سافرانال با القای ژن‌های *CsLYC* و *CsGT-2* در تولید این ترکیبات مناسب می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی که با اختصاص امکانات آزمایشگاهی موجبات انجام این تحقیق را فراهم آوردند تشکر می‌شود.

منابع

Abdullaev, F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine 227 (1): 20-25.

Ahadi, P., Naghdi Badi, H., and Labbafi, M. 2017. Quantitative changes of Trigonelline metabolite in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) sprouts under Chitosan and water stress induction. Journal of Medicinal Plants 16 (64): 22-32.

Ahrazem, O., Rubio Moraga, A., Lopez, R.C., and Gomez, L. 2010. The expression of chromoplast specific beta lycopene cyclase gene is involved in the high production of saffron precursors. Journal of Experimental Botany 61 (1): 105-119.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. Journal of Molecular Endocrinology 34 (3): 597-601.

Castillo, R., Fernandez, J.A., and Gomez-Gomez, L. 2005. Implications of carotenoid biosynthetic

genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. Plant Physiology 139 (2): 674-689.

Ebrahimzadeh, H., Rajabian, T., Abrishamchi, P., Karamian, R., and Saboora, O. 2006. Saffron of Iran with a Research Prspective Information. Publishing House. Iran. 644 p.

Ferri, M., and Tassoni, A. 2011. Chitosan as Elicitor of Health Beneficial Secondary Metabolites in In-vitro Plant Cell Cultures. In: Mackay RG and Tait JM. Handbook of Chitosan Research and Applications. Nova Science Publishers Inc. USA, pp. 389-414.

Häkkinen, S.T., Ritala, A., Rischer, H., and Oksman-Caldentey, K.M. 2013. Medicinal Plants, Engineering of Secondary Metabolites in Cell Cultures. In: Christou P. Savin R. Costa-Pierce BA. Misztal I and Whitelaw CBA Sustainable Food Production. Springer, New York, USA. 420 p.

INSO (Iranian National Standardization Organization). 2013. Saffron, Test methods. 259-2, 5th Revision. Iranian National Standardization Organization. Tehran, Iran. 80 p.

Iriti, M., and Faoro, F. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. Plant Signaling and Behavior 4 (1): 66-68.

Jeong, G.T., and Park, D.H. 2005. Enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis: Effect of elicitors derived from plants and insects. Biotechnology and Bioprocess Engineering 10 (1): 73-77.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3 (13): 1222-1239.

Kim, S.J., Lee, S.Y., and Park, S. 2004. Agrobacterium mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports, 23 (6): 386-390.

Mehregan, M., Mehrafarin, A., Labbafi, M., and Naghdi Badi, H. 2017. Effect of different concentrations of Chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of *Stevia* plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Journal of Medicinal Plants 2 (62): 169-181.

Mir, J.I., Ahmed, N., Wafai, A.H., and Qadri, R.A. 2012. Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. Physiology and Molecular Biology of Plants 18 (4): 371-375.

Mzr, J.I., Ahmed, N., Mokhdomi, T.A., Wafai, A.H., Wani, S.H., and Bukhari, S. 2013. Relative expression of apocarotenoid biosynthetic genes in developing stigmas of *Crocus sativus* L. Journal of Crop Science and Biotechnology 16 (3): 183-188.

Nair, S.C., Kurumboor, S.K., and Hasegawa, J.H. 1995. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biotherapy 10 (4): 257-264.

Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews 1 (1): 69-79.

Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K., Prakash, H.S., Niranjana, SR., and Shekar, S. 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. Physiological and Molecular Plant Pathology 72 (4-6): 188-194.

Orlita, A., Sidwa-Gorycka, M., Paszkiewicz, M., Malinski, E., Kumirska, J., Siedlecka, E., Łojkowska, E., and Stepnowski, P. 2008. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). Biotechnology and Applied Biochemistry 51 (Pt2): 91-96.

Ozhan, N., Goldani, M., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., and Parsa, M. 2017. Changes in Nepetalactone content and biochemical traits of catnip (*Nepeta cataria* L.) in response to induction of biostimulants compounds. Journal of Medicinal Plants 4 (64): 32-44.

Parray, J.A., Kamili, A.N., Hamid, R., and Husaini, A.M. 2012. In vitro cormlet production of saffron (*Crocus sativus* L. *Kashmirianus*) and their flowering response under greenhouse. GM Crops and Food 3 (4): 289-295.

Pu, G.B., Ma, D.M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H., Li, G.F., Ye, H.C., and Liu, B.Y. 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Report 28 (7): 1127-1135.

Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., and Shoyama, Y. 2007. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnology letters 29 (7): 1143-1146.

Rao, R.S., and Ravishankar, G.A. 2002. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20 (2): 101-153.

Righetti, L., Franceschetti, M., Ferri, M., Tassoni, A., and Bagni, N. 2007. Resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions treated with several elicitors. Caryologia 60 (1-2): 169-171.

Salehi, S., and rezayatmand, Z. 2017. The effect of foliar application of chitosan on yield and essential oil of savory (*Satureja isophylla* L.) under salt stress. Herbal Drugs (JHD) 8 (2): 101-108.

Salimgandomi, S., and Shabrangi, A. 2016. The effect of Chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. Journal of Pharmaceutical and Health Sciences **(**JPHS) 4 (2): 135-142.

Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M., and Manfait, M. 1994. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. Anticancer Research 14 (5A): 1913-1918.

Trapero, A., Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Jimeno, M.L., Gómez, M.D., and Gómez-Gómez, L. 2012. Characterization of a glucosyltransferase enzyme involved in the formation of kaempferol and quercetin sophorosides in *Crocus sativus*. Plant Physiology 159 (4): 1335-1354.

Wani, Z.A., Kumar, A., Sultan, P., Bindu, K., Riyaz-Ul-Hassan, S., and Ashraf, N. 2017. *Mortierella alpina* CS10E4, an oleaginous fungal endophyte of *Crocus sativus* L. enhances apocarotenoid biosynthesis and stress tolerance in the host plant. Scientific Reports 7 (1): 8598.

Effect of Different Levels of Chitosan on Amounts and Expression Level of Crocin and Safranal Genes in Culture of Saffron Suspension (*Crocus sativus* L.)

Tofigh Taherkhani[1], Rasool Asghari Zakaria[2], Mansoor Omidi[3], Nasser Zare[4] and Mahboubeh Taherkhani[5]*

Submitted: 7 September 2020 **Accepted:** 28 December 2020

Taherkhani, T., Asghari Zakaria, R., Omidi, M., Zare, N., and Taherkhani, M. 2021. Effect of different levels of chitosan on amounts and expression level of crocin and safranal genes in culture of saffron suspension (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy & Technology, 9(1): 81-90.

Abstract

Saffron (*Crocus sativus*) is an important medicinal and economical plant of Iran. It is rich in flavor, aroma and color, along with medicinal properties in addition to nutritional benefits. The effects of chitosan on Crocin and Safranal amounts as two important medicinal components and expression of their controlling genes in the suspension culture of saffron were considered the main aims of this study. For this purpose, saffron bulbs were cultured in ½ MS medium that was treated with 100 and 150 mg.l^{-1} of chitosan under cell the suspension medium and callus optimal growth conditions. Samples were taken at 24 and 72 hours after the application of treatment in 3 replications. Measurement of secondary metabolites was done with HPLC and analysis of genes' expression was performed with real-time PCR. The results showed that after the use of 100 and 150 mg/l of chitosan and after 24 and 72 hours, the two CsLYC and CsGT^{-2} genes expression significantly increased. Also, the results showed that Safranal and Crocin levels by the use of chitosan are significantly different at both harvesting times. Thus we may conclude that 150 mg.l^{-1} at harvest time of 72 hours after applying of the treatment resulted in the highest amount of Crocin and Safranal. Usage of chitosan as a bio-stimulant in the growth of medicinal and economic plants of saffron increased the amount of valuable secondary metabolites in the plant's cell suspension culture.

Keywords: Chitosan, Safranal, Crocin, Saffron (*Crocus sativus*), HPLC, Real-time PCR.

1 - Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Shams Institute of higher education, Gonbad kavous, Iran
2 - Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3 - Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
4 - Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
5 - Department of Chemistry, College of Science, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran
(*- Corresponding author Email: mahtaherkhani@yahoo.com)
DOI: 10.22048/JSAT.2020.247224.1409