زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

افزایش بیان ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و تولید پودوفیلوتوکسین با اثر کیتوزان در کشت سلول کتان سفید

صدیقه اسمعیل زاده‌بهابادی[1*]، مظفر شریفی[2]، مهرداد بهمنش[3]

1- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
2- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* کدپستی 538-98615، زابل، ایران.
shirin_esm@yahoo.com, esmaeilzadeh@uoz.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/5/17، پذیرش: 92/2/16)

چکیده - کتان سفید (*Linum album*) گیاهی علفی و دارویی است که لیگنان‌های مهمی مانند پودوفیلوتوکسین تولید می‌کند. پودوفیلوتوکسین و مشتقات آن، ویژگی‌های خواص ضدویروسی و ضدسرطان دارند. با توجه به این که ساخت شیمیایی پودوفیلوتوکسین اقتصادی نیست، تولید آن با کشت سلول گونه‌های سرده *Linum*، جایگزین سودمندی است. روش‌های زیادی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول *استفاده* می‌شود. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر رشد سلول و میزان پودوفیلوتوکسین، 1، 2، 3 و 5 روز پس از افزودن به محیط در کشت سلول گونه *L album* بررسی شد. بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین، روز پنجم پس از تیمار، با اندازه‌ی دو برابر دیده شد. برای درک سازو کار کیتوزان، بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز (*PAL*)، سینامیل آلکل دهیدروژناز (*CAD*)، سینامویل کوآ ردوکتاز (*CCR*) و پینورزینول لاریسی رزینول ردوکتاز (*PLR*) بررسی شد. بیان ژن‌ها بعد از افزودن کیتوزان، افزایش یافت و اوج بیان آن‌ها پس از 3 روز دیده شد. کیتوزان با اثر بر بیان ژن آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین، باعث افزایش میزان پودوفیلوتوکسین شد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، پودوفیلوتوکسین، کیتوزان و *Linum album*

1- مقدمه

لیگنان‌ها، گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانوی است که در بسیاری از گیاهان ساخته می‌شود. این ترکیبات معمولاً از دو واحد فنیل‌پروپانوئیدی ساخته می‌شوند و در سازوکار دفاعی گیاهان برابر علفخواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند و فعالیت‌های زیستی گوناگونی از

خود نشان می‌دهند [1]. پودوفیلوتوکسین از مهم‌ترین ترکیبات لیگنانی است که امروزه به‌عنوان ماده اولیه برای تولید برخی داروهای ضدسرطانی، اهمیت بسیاری پیدا کرده است. پودوفیلوتوکسین به‌خاطر سمیت سلولی بسیار بالایی که از خود نشان می‌دهد، به‌طور مستقیم استفاده نمی‌شود؛ و از آن برای ساخت سه داروی ضد سرطان etopside، etophose و teniposide استفاده می‌شود که در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان و تومورهای مغزی کاربرد دارد [2]. اکنون پودوفیلوتوکسین را از گونه‌های مختلف *Podophyllum* که در معرض انقراض است، به‌دست می‌آورند. از آنزیم‌های مهم مسیر بیوسنتز پودوفیلوتوکسین می‌توان به فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، سیناموئیل CoA ردوکتاز (CCR)، سیناموئیل الکل دهیدروژناز (CAD) و پینورزینول- لاریسی رزینول ردوکتاز (PLR) اشاره کرد. گیاه کتان سفید (*Linum album*) از گونه‌های بومی ایران است که در اندام‌های مختلف، پودوفیلوتوکسین و دیگر ترکیبات لیگنانی دارد. با توجه به این که ساخت شیمیایی پودوفیلوتوکسین اقتصادی نیست، تولید آن با کشت سلول و اندام گونه‌های سرده *Linum*، راه جایگزین سودمندی است. روش‌های زیادی برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین با کشت سلول وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی یا غیرزیستی است که با القای سامانه‌ی دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شود [3]. کیتوزان (شکل د-استیله کیتین)، پلی‌ساکاریدی پلی‌کاتیونی است که از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است و اثر آن به‌عنوان یک الیسیتور زیستی کارامد برای بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در کشت سلولی بسیاری از گیاهان دارویی تأیید شده است [4].

اگرچه کاربرد الیسیتورها در کشت سلول گیاهان برای افزایش متابولیت‌های ثانوی چشم‌گیر بوده است، استفاده از این مواد برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در کشت درون شیشه‌ای کمتر بررسی شده است نتایج پژوهش Muranaka و همکاران (1998)، نشان داد که استفاده از کیتواولیگوساکاریدها در کشت سلول *Juniperus chinesis* سبب افزایش 15 برابری انباشت پودوفیلوتوکسین می‌شود [5]. همچنین Esmaeilzadeh و همکاران (2011) نشان دادند که به‌دنبال افزودن الیسیتورهای قارچی، میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی کتان سفید افزایش می‌یابد [6]. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی گیاه *Linum album* بررسی شد. برای درک بهتر سازوکار اثر کیتوزان، بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین بررسی شد. از آن‌جا که آنزیم‌های PAL، CAD، CCR، تنظیم‌کننده آغاز مسیر و آنزیم PLR، تنظیم‌کننده پایان مسیر بیوسنتز پودوفیلوتوکسین و لیگنان‌های مرتبط با آن است، میزان بیان این ژن‌ها بررسی شد تا ارتباط بیان این ژن‌های کلیدی و تغییرات میزان لیگنان‌ها به دست آید.

2- مواد و روش‌ها

2-1- جمع‌آوری و کشت بذرها

بذرهای *L. album* از منطقه سوهانک N ً19 َ48 °35، E ً22 َ32 °51 تهران جمع‌آوری شد. بذرها پس از شست‌شوی سطحی، 10 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 1 درصد قرار گرفتند، و سه بار با آب مقطر سترون، آبکشی شدند. سپس 10 دقیقه در پراکسید هیدروژن 3/3 درصد قرار داده شدند و دوباره سه بار با آب سترون شست‌شو شدند. در مرحله‌ی پایانی یک دقیقه در الکل 70

درصد قرار گرفتند و با آب مقطر سترون آبکشی شدند. بذرهای سترون، یک ساعت در محلول 0/5 گرم در لیتر ژیبرلین سترون‌شده، قرار گرفتند و سپس در محیط پایه MS کشت داده شدند. بذرها دو هفته در 25 درجه سانتی‌گراد و دوره 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار گرفتند؛ از گیاهچه‌های حاصل برای ایجاد قطعات جداکشت و کشت بافت استفاده شد.

2-2- القای تولید کالوس و راه‌اندازی کشت سلولی

برای القای کالوس، قطعاتی از گیاهچه به طول 2-1 سانتی‌متر برش داده شد و پس از آن، جداکشت‌های ساقه-برگ به محیط کشت MS پایه دارای دو میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک‌اسید و 0/4 میلی‌گرم در لیتر کینتین جابه‌جا شد. پس از دو هفته، القای کالوس آغاز شد. برای تهیه کشت تعلیقی، دو گرم کالوس نرم، سفید و هم‌سن که پس از دو ماه، هشت بار واکشت شده بود به 50 میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع با ترکیبات هورمونی گفته‌شده در بالا اضافه شد و روی لرزاننده با سرعت 120 دور در دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگه‌داری شده و هفته‌ای یک بار واکشت شد.

2-3- تیمار سلول‌ها با کیتوزان

در این گام، نخست برای ایجاد یک کشت همگن، کشت سلولی تهیه‌شده مرحله پیش، شش بار واکشت شد. در هر مرحله، سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش، جمع‌اوری و به محیط تازه جابه‌جا شدند. پیش از اعمال تیمارها، دوره رشد برای سلول‌ها تعیین شد؛ پس از جابه‌جایی یاخته‌ها به محیط جدید، از روز 1 تا روز 15 پس از جابه‌جایی، به فاصله زمانی دو روز، نمونه‌برداری انجام شد و بر اساس وزن خشک سلول‌ها منحنی رشد رسم شد. برای تهیه محلول کیتوزان از روش خان و همکاران [7] استفاده شد؛ نخست، محلول استیک اسید یک درصد تهیه و سپس محلول کیتوزان در این اسید تهیه شد. پس از حل شدن کامل (2 ساعت در دمای 55 درجه سانتی‌گراد)، pH محلول با NaOH به 5/7 رسید. سپس محلول کیتوزان و کیتین، 10 دقیقه در 120 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. برای اعمال تیمارها، 500 میلی‌گرم سلول (وزن تر) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش برداشت شد و به بشقاب دارای پنج میلی‌لیتر از محیط کشت مایع، وارد شد. با توجه به منحنی رشد به دست‌آمده، در روز هفتم، سلول‌ها جداگانه با غلظت‌های 50، 100 و 200 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، تیمار شدند و با اندازه‌گیری میزان پودوفیلوتوکسین در آن‌ها، غلظت بهینه کیتوزان برای افزایش تولید این ماده به‌دست آمد. سپس سلول‌ها در زمان‌های 1، 2، 3 و 5 روز پس از تیمار با غلظت بهینه کیتوزان، برای بررسی اثر آن بر رشد سلولی، میزان پودوفیلوتوکسین و بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی آن، برداشت شدند.

2-4- اندازه‌گیری رشد سلولی

رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها تعیین شد. سلول‌ها با نایلون مش (42μm) با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش، از محیط کشت جدا شده و برای تعیین وزن تر، بلافاصله و برای اندازه‌گیری وزن خشک، پس از لیوفیلیزاسیون، وزن شدند.

2-5- استخراج و سنجش لیگنان‌ها

به 50 میلی‌گرم وزن خشک سلول، یک میلی‌لیتر متانول 80 درصد اضافه، ساییده و همگن شد. مخلوط به دست

آمده، 15 دقیقه در حمام اولترا سونیک قرار گرفت و سانتریفوژ شد. محلول به‌دست آمده به لوله جدید جابه‌جا شد و فاز متانولی تبخیر شد. در ادامه به عصاره آبی باقی‌مانده، یک میلی‌لیتر آب و یک میلی لیتر اتیل‌استات افزوده و سانتریفوژ شد. سپس فاز اتیل‌استات به لوله جدید جابه‌جا و تبخیر شد. سرانجام، رسوب خشک‌شده در یک میلی‌لیتر متانول حل و برای انجام HPLC با فیلتر 0/45 میکرون (Millipore, Bedford, MA, USA) فیلتر شد. سپس اجزای نمونه با دستگاه HPLC (Shimadzu, Japan) در طول موج 280 نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تأیید وجود پودوفیلوتوکسین در نمونه‌های بررسی شده از روش LC-MS استفاده شد. تعیین جرم مولکولی اجزای نمونه با روش Electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) همراه سامانه LC-20AD (Shimadzu, Japan) تعیین شد.

2-6- بررسی بیان ژن‌ها

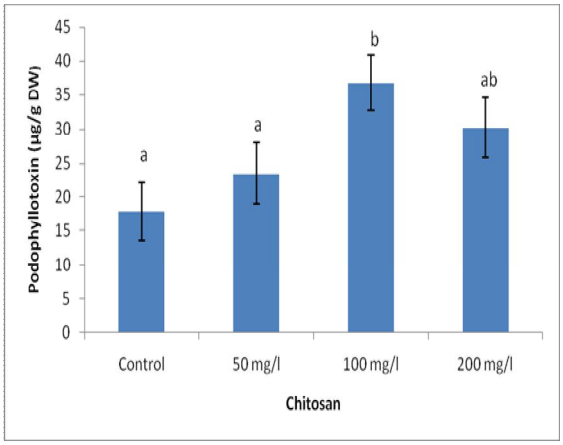
برای بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین از روش real time PCR با استفاده از SYBER Green استفاده شد. RNA هر یک از نمونه‌های بررسی شده با استفاده از کیت QIAGEN Rneasy Plant mini kit با سه تکرار جداگانه استخراج شد و برای حذف DNA ژنومی نیز از کیت DNAase استفاده شد. پس از تعیین غلظت RNA استخراج‌شده سنجش از جذب نوری در طول موج‌های 260 و 280، نانومتر رشته‌ی DNA مکمل از روی mRNA الگو با استفاده از آنزیم Superscript III reverse transcriptase ساخته شد.

آزمایش‌های qPCR روی نمونه‌ها در دستگاه ABI PRISM 7000 Sequence و با استفاده از کیت SYBR Green PCR Master mix (Takara,Japan) انجام شد. در بررسی کمی بیان ژن‌های مورد نظر، از ژن *GAPDH* به عنوان شاهد داخلی استفاده شد.

3- نتایج

3-1- اثر غلظت‌های گوناگون کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین

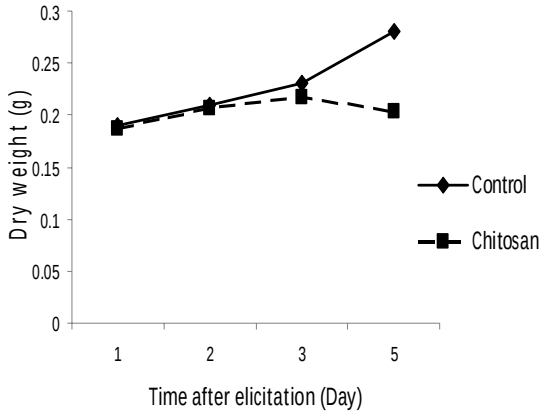
بررسی لیگنان‌ها نشان داد که غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به سایر غلظت‌ها پودوفیلوتوکسین را به گونه‌ای معنی دار به میزان 2 برابر (36/7 میکروگرم بر گرم وزن خشک) نمونه‌های شاهد افزایش داد (شکل 1). در غلظت‌های 50 و 200 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، تفاوت معنی‌داری در میزان پودوفیلوتوکسین دیده نشد.



شکل 1 اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم از دوره رشد به محیط کشت اضافه شد و نمونه‌ها پس از 5 روز برداشت شدند. مقادیر نشان داده شده، میانگین 3 تکرار و SE ± (انحراف معیار) است. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار، از نظر آماری در سطح 5 درصد، تفاوت معنی‌دار ندارند.

3-2- اثر غلظت بهینه کیتوزان بر رشد سلولی با گذشت زمان

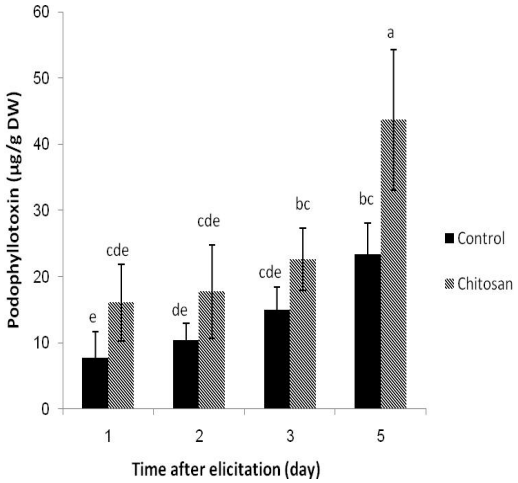
کیتوزان با غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر تا روز سوم اثر معنی‌داری بر رشد سلولی نسبت به نمونه‌های شاهد نداشت. پس از روز 4، میزان رشد سلول‌ها کاهش یافت به‌گونه‌ای‌که بیشترین کاهش پس از پنج روز، به میزان 30 درصد نسبت به نمونه‌های شاهد بود (شکل 2).



شکل 2 منحنی رشد سلولی تحت اثر 100 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها، 1، 2، 3 و 5 روز پس از تیمار، برداشت شدند.

3-3- اثر غلظت بهینه کیتوزان بر میزان پودوفیلوتوکسین

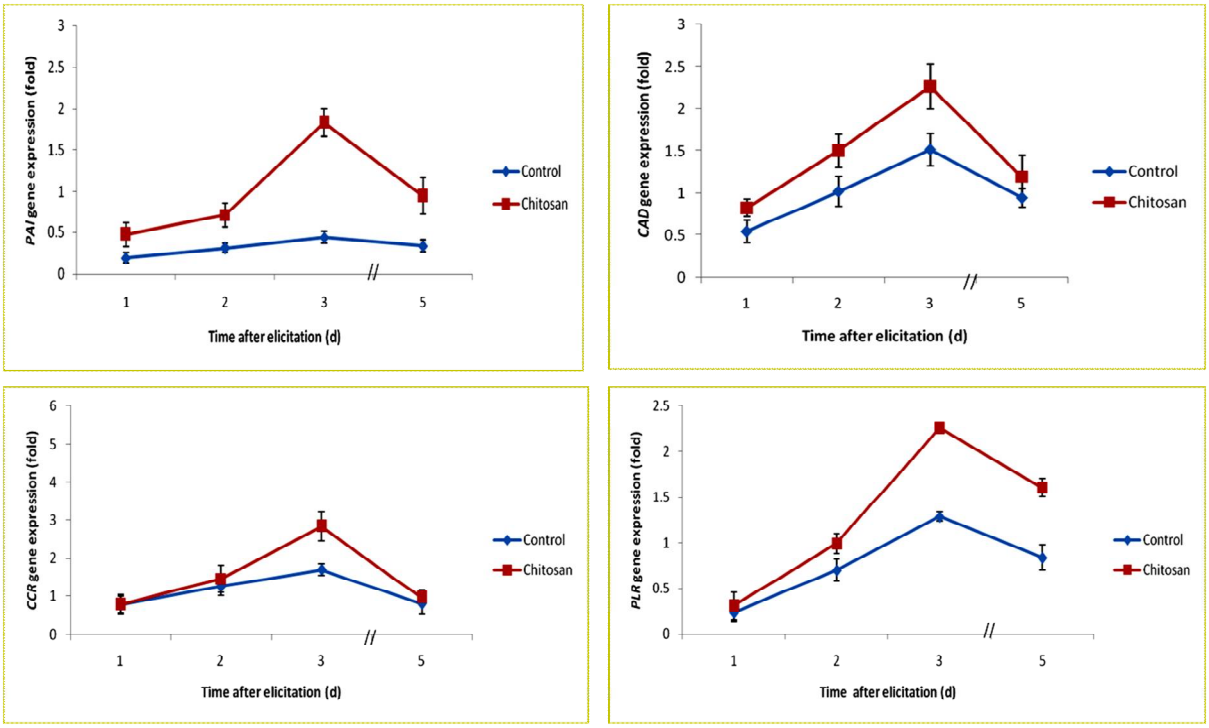
میزان پودوفیلوتوکسین در سلول‌های شاهد (تیمارنیافته) به آرامی افزایش یافت و در پایان دوره رشد، سرعت افزایش آن بیشتر شد. افزودن کیتوزان در روز هفتم، پس از گذشت یک روز، باعث افزایش معنی‌دار میزان پودوفیلوتوکسین نسبت به نمونه‌های شاهد شد و این افزایش با گذشت زمان بیشتر شد، به‌گونه‌ای که پس از گذشت 5 روز، به حدود دو برابر نمونه‌های شاهد رسید (شکل 3).



شکل 3 تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین تحت اثر 100 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در کشت تعلیقی کتان سفید. کیتوزان در روز هفتم دوره رشد به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها، 1، 2، 3 و 5 روز پس از تیمار برداشت شدند. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

3-4- اثر غلظت بهینه کیتوزان بر بیان ژن آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین

بررسی بیان ژن آنزیم‌های PAL، CAD، CCR و PLR، نشان داد که بیان آن‌ها تحت اثر کیتوزان، افزایش یافت. بیشینه بیان آن‌ها در روز سوم دیده شد و در روز پنجم پس از تیمار، کاهش یافت (شکل 4).



شکل 4 اثر کیتوزان بر بیان ژن‌های *PAL*، *CAD*، *CCR* و *PLR*. نسبت تغییرات بیان ژن‌ها تحت اثر تیمار شاهد داخلی و مقایسه با بیان همان ژن در سلول‌های شاهد نشان داده شده است.

4- بحث

تا کنون بررسی‌های کمی در مورد اثر الیسیتورها بر میزان لیگنان‌ها در کشت تعلیقی کتان سفید انجام شده است [8]. این بررسی، نخستین گزارش اثر کیتوزان بر مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین است. بررسی‌های زیادی نشان داده است که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کیتین و کیتوزان، باعث افزایش متابولیت‌های ثانوی می‌شود [9]. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها بررسی شد. برای به دست آوردن بیشترین میزان لیگنان‌ها بهینه‌سازی دقیق غلظت کیتوزان ضروری است. بررسی‌ها نشان داده است که غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرایند تحریک دارد و بر شدت پاسخ مؤثر است [10]. غلظت مؤثر الیسیتور بر حسب گونه گیاهی فرق می‌کند. به‌عبارت دیگر غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است بر گیاهی دیگر اثر نداشته باشد. غلظت 20 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث القای بیشترین میزان تولید آنتراکوئینون (Antraquinone) در کشت سلول *Rubia akane* شده است [11]، در حالی که غلظت 200 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، غلظت بهینه برای تولید منتانول در کشت سلول *Mentha piperita* بوده است [12]. اثر الیسیتور کیتوزان بر میزان فنیل‌اتانوئیدگلیکوزید در کشت سلول *Cistanche deserticola* نیز بررسی شده و بیشترین میزان فنیل‌اتانوئیدگلیکوزید در غلظت 10 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان دیده شده است [4]. غلظت 1 درصد (v/v) الیسیتورهای قارچی در کشت سلول کتان سفید، بیشترین

اثر افزایشی را بر میزان لیگنان‌های پودوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول نشان داده است [13]. در این پژوهش، بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان دیده شد. نتایج این پژهش نشان داد که کیتوزان، یک روز پس از افزوده شدن به محیط کشت، باعث افزایش میزان پودوفیلوتوکسین می‌شود و تا پایان دوره رشد، این روند ادامه دارد؛ به‌گونه‌ای که بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین، پنج روز پس از اعمال تیمار به میزان دو برابر نمونه‌های شاهد، دیده شد. برای درک سازوکار کیتوزان و دلیل افزایش پودوفیلوتوکسین، بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی لیگنان‌ها بررسی شد. افزایش بیان ژن *PAL* و دیگر ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی، از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش است [14]. بررسی بیان ژن‌های *PAL*، *CAD*، *CCR* تحت اثر الیسیتورهای قارچی در کشت سلول کتان زراعی (*Linum usitatissimum*) نشان می‌دهد بیان ژن این آنزیم‌ها به سرعت پس از 8 ساعت افزایش می‌یابد [15]. بررسی‌های Yousefzadi و همکاران (2010) نشان داد که افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های کتان سفید تحت اثر سالیسیلیک اسید، در ارتباط با افزایش بیان ژن‌های *PAL*، *CAD*، *CCR* بوده ولی بیان ژن *PLR* تحت اثر این هورمون قرار نمی‌گیرد [16] در حالی‌که Esmaeilzadeh و همکاران (2012) نشان دادند که افزایش تولید لیگنان‌ها در کشت سلولی کتان سفید در حضور الیسیتورهای قارچی، تحت اثر افزایش بیان ژن‌های *PAL*، *CAD*، *CCR* و *PLR* صورت می‌گیرد [13]. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد کیتوزان نیز با افزایش بیان ژن آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی لیگنان‌ها باعث افزایش میزان پودوفیلوتوکسین در کشت تعلیقی کتان سفید می‌شود. با توجه به این نتایج، می‌توان با افزایش بیان ژن‌ها، تولید بیشتر پودوفیلوتوکسین را القا کرد.

5- مراجع

[1] Suzuki, and S. Umezawa, T. (2007): Biosynthesis of lignans and norilignans. *Journal of Wood Science*. 53, 273-284.

[2] Farkya, S., Bisaria,V.S., and Sirvastava, A.K. (2004) Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65, 504–519.

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

[4] Cheng, X., Zhou U., and Cui,X. (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Biotechnology Journal*. 121, 253–260.

[5] Muranaka, T., Miyata, M, Ito, K., and Tachibana, S. (1998) Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry*. 49, 491–496.

[6] Esmaeilzadeh, S., Sharifi, M., Safaei, 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, 367-73.

[7] Khan, W., Prithiviraj, and B. Smith D.L. (2003) Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyaseand tyrosine ammonia-lyase activities in *soybean* leaves.

Journal of Plant Physiology. 160, 859–63.

[8] Shams Ardakani, M., Hemati, S., and Mohagheghzadeh, A. (2005): Effect of elicitors on the enhancement of Podophyllotoxin biosynthesis in suspension culture of *Linum album*. *Daru*. 13, 56-60.

[9] Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H., and Li, G.F. (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua L. Plant Cell Report*.28, 1127–1135.

[10] Vasconsuelo, A., and Boland, R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172, 861-875.

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

[12] Chang, J.H., Shin, I.S., and Chung, H.J. (1998) Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letter*. 20, 1097–1099.

[13] Esmaeilzadeh, S., Sharifi, M., Behmanesh, M., Safaei, N., Murata, J., Araki, R., Yamagaki, T., and Satake H. (2012) Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. Journal of Plant Physiology. 169,487– 491.

[14] Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J.C., Pan, Q.H., and Huang, W.D. (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Journal of Plant Growth Regultor*. 55:1–10.

[15] Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Baltora-Rosset, S., Doussot, J., Maury, S., Mesnard, F., Chabbert, B., Hawkins, S., Laine, E., and Lamblin, F. (2006) Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta*: 223: 975–989.

[16] Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E., and 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 Letters*. 32, 1739–1743.