

اثر متیل جاسمونات، IAA و BAP بر توان کالزایی، محتوای برخی ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کلپوره (*Teucrium polium* L.)

زهرا محمدزاده^۱، منیره چنیانی^{۱*} و لیلا سمیعی^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

^۲ گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵)

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر هورمون‌های گیاهی (IAA و BAP) و الیستور متیل جاسمونات بر توان کالزایی ریزنمونه برگ کلپوره (*Teucrium polium* L.) و محتوای برخی ترکیبات فنلی (فنل کل، *o*-دی فنل، اسیدهای فنلی، فلاونوئید و فلاون) و ظرفیت آنتی اکسیدانی آن انجام شد. ریزنمونه برگ از گیاه بالغ رشدیافته در شرایط هیدروپونیک تهیه و در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مجزا و تلفیقی IAA (۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر) و BAP (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. تیمارهای دارای بیشترین درصد کالزایی و وزن تر و خشک به عنوان شرایط هورمونی بهینه، جهت بررسی تأثیر متیل جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) بر متابولیت‌های فنلی انتخاب شدند. هشت هفته پس از رشد کالوس‌ها، محتوای ترکیبات فنلی مختلف و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها (براساس دو آزمون DPPH و FRAP) سنجش شدند. اگرچه درصد کالزایی بالاتری در همه تیمارهای هورمونی نسبت به شاهد دیده شد، اما کالزایی صددرصد در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر مشاهده شد. بیشترین وزن تر و خشک کالوس‌ها نیز در تیمارهای تلفیقی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر ثبت شد. نتایج حاصل از بخش دوم آزمایشات نشان داد که محتوای ترکیبات فنلی و همه زیرمجموعه‌های آن بجز *o*-دی فنل، دارای بیشینه میزان در زمان تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات، در تمامی تیمارهای هورمونی، بودند. همچنین همبستگی قوی بین خاصیت آنتی اکسیدانی DPPH (r²= -0.735) و FRAP (r²= 0.876) با محتوای ترکیبات فنلی مشاهده شد. از این رو متیل جاسمونات به عنوان یک محرک توانمند می‌تواند موجب بالابردن سنتز ترکیبات فنلی و به طبع آن افزایش توان آنتی اکسیدانی در کالوس کلپوره گردد و این شیوه را به عنوان یک فن مؤثر در جهت تأمین ترکیبات دارویی- فنلی در شرایط کشت کالوس معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی: *Teucrium polium*، کالزایی، گیاه دارویی، مشتقات فنلی، DPPH، FRAP

مقدمه

گرفته است (Chandra et al., 2013). به طوری که امروزه و در طب مدرن نیز، گیاهان به عنوان منابع مستقیم عوامل درمانی، برای سنتز ترکیبات دارویی جدید مورد توجه هستند (Abdul

گیاهان دارویی از گذشته دور تاکنون در تمامی تمدن‌ها و فرهنگ‌ها به عنوان منبع دارویی تجدیدپذیر مورد استفاده قرار

تولید و افزایش ترکیبات مؤثره و دارویی آن در شرایط آزمایشگاهی مورد توجه مجامع علمی است (Vanisree *et al.*, 2004). هرچند پژوهش‌ها در مورد تأثیر هورمون‌ها بر نرخ کالزایی کلپوره توسط Javidimoghadam و همکاران (۲۰۱۶)، Hashemyan (۲۰۱۸)، Tabarifard (۲۰۲۰) صورت گرفته است، اما مطالعه تأثیر متیل‌جاسمونات در شرایط کشت درون شیشه، اکثراً مربوط به سایر گیاهان است (Ahmadi moghadam *et al.*, 2013; Aghaei, 2014; Hashemyan, 2018). در این پژوهش تلاش شد ضمن بررسی اثرات محیط‌کشت MS غنی با تیمارهای مختلف هورمونی (BAP و IAA) بر نرخ کالزایی ریزنمونه برگ، به تأثیر الیستور غیرزیستی متیل‌جاسمونات (MeJa) بر محتوای برخی ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس این گیاه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

بررسی توان کالزایی: برای بررسی توان کالزایی کلپوره، از گیاه دوساله رشد داده شده در شرایط هیدروپونیک (نگهداری شده در اتاق رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) استفاده گردید. از آنجا که براساس مطالعات پیشین (Javidimoghadam *et al.*, 2016)، ریزنمونه برگ به‌عنوان بهترین ریزنمونه ایجادکننده کالوس در سایر تیمارهای هورمونی شناسایی شد، لذا در تحقیق حاضر نیز از ریزنمونه مذکور استفاده گردید و برش‌های میانی برگ‌ها بر روی محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی (جدول ۱) قرار داده شد (پنج ریزنمونه در هر شیشه). نمونه‌ها به‌مدت چهار هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با آشکار شدن نشانه‌های کالزایی، شیشه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت دو هفته منتقل شدند. عملیات واگشت در پایان هفته ششم روی محیط‌های کشت دارای همان غلظت‌های هورمونی انجام شد و درنهایت، صفات کالزایی شامل درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها در پایان هفته

(Nasim *et al.*, 2010). ترکیبات مؤثره گیاهی که از سوی مصرف‌کنندگان به‌عنوان ترکیبات طبیعی و بی‌خطر شناخته شده‌اند، عمدتاً شامل روغن‌های ضروری، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها هستند (Amiri fard *et al.*, 2013) که در میان آن‌ها، ترکیبات فنلی به‌عنوان گسترده‌ترین طبقه از متابولیت‌های ثانوی در طبیعت، شامل فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، تانن‌های متراکم، لیگنین‌ها و لیگنان‌ها هستند (Karaman *et al.*, 2010). خواص آنتی‌اکسیدان، ضدآلرژیک، ضدالتهاب، ضد میکروب، اثرات محافظت قلبی و عروقی به ویژگی‌های دارویی این دسته از متابولیت‌ها نسبت داده شده است (Benavente-Garcia *et al.*, 1997; Samman *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2000; Puupponen-Pimia *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2004). از دیگر اعمال ترکیبات فنلی، عمل دفاع به‌همراه ترکیبات طبیعی مثل ویتامین C و E و کاروتنوئیدها است که با حذف رادیکال‌های آزاد و یا مهار آنزیم‌های اکسایشی مانند سیکلوکسیژناز و لپوکسیژناز و کلاته‌کردن آن‌ها با یون‌های آهن صورت می‌گیرد (Shi *et al.*, 2001).

کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* L. گیاهی علفی، گل‌دار با بوته‌های چوبی و معطر است (Goulas *et al.*, 2011). گونه‌های مختلف این جنس، در همه کشورهای مدیترانه‌ای، با گسترش به سمت جنوب غرب آسیا و اروپا می‌رویند (Feinbrun-Dothan, 1978). در ایران، بیشتر در تپه‌های خشک و سنگلاخی تا ارتفاع ۳۰۰۰ متر رشد می‌کند (Kovacevic *et al.*, 2015; Gorgini Shabankare *et al.*, 2001). از این گیاه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مزمن معدی و نیز به‌عنوان ادرارآور، ضد فشارخون، ضدباکتری، ضداسهال، ضدنفخ، ضددیابت و ضدتشنج استفاده می‌شود (Ardestani *et al.*, 2008; Hasani-Ranjbar *et al.*, 2008). در روزگار اخیر، استفاده‌های نادرست انسان از گیاهان دارویی و از جمله کلپوره موجب افزایش نگرانی‌ها در خصوص خطر انقراض این گیاهان شده است. تولید کم بذر، خواب پیچیده و چندگانه بذر از مشکلات اصلی تکثیر مدیریت شده این گیاه است. لذا استفاده از روش کشت‌بافت به‌عنوان یک روش جایگزین برای

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به کاررفته در محیط کشت MS برای بررسی القاء کالزایی

هورمون	غلظت (میلی گرم در لیتر)																
IAA	۰	۰	۰	۰	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱	۱	۱	۱
BAP	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۱/۵

هشتم بررسی شد. عملیات کشت هر تیمار، با دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی صورت گرفت.

براساس نتایج بیشینه درصد کالزایی و وزن خشک کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی آزمایش اول، بهترین تیمارهای هورمونی ("IAA_{0.1}+BAP_{0.5}", "IAA_{0.1}+BAP₁", "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر) برای اعمال الیستور متیل جاسمونات انتخاب شدند. به این نحو که مجدداً عملیات کشت ریزنمونه‌های برگ روی تیمارهای هورمونی منتخب انجام شد و کلیه مراحل و مدت زمان نگهداری ریزنمونه‌ها، مطابق آزمایش اول صورت گرفت. در پایان هفته ششم، نمونه‌ها به محیط‌های کشت MS فاقد هورمون و دارای غلظت‌های مختلف الیستور متیل جاسمونات (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) منتقل شدند. در پایان روز دهم از اعمال تیمار الیستور، کالوس‌ها در جهت بررسی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جمع‌آوری و در فریزر با دمای منفی ۲۰ نگهداری شدند.

عصاره‌گیری برای سنجش ترکیبات ثانوی- فنلی: پودر خشک کالوس‌ها با متانول ۸۰ درصد (w/v) با نسبت ۱ به ۱۰۰ عصاره‌گیری شدند و پس از قرارگیری به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Japan, Parsonic, 2500s) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۵٪ ± ۲۸ (KHz)، با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. عملیات خشک نمودن عصاره‌ها در زیر هود معمولی و در شرایط تاریکی مطلق و به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. عصاره خشک شده به عنوان "پودر عصاره"، وزن شد و با حل نمودن در متانول ۸۰ درصد (w/v)، برای کلیه سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید (Annegowda et al., 2012).

سنجش محتوای فنل کل: سنجش محتوای فنل کل به شیوه فولین- سیو کالچو و براساس روش Marinova و همکاران

(۲۰۰۵) انجام گرفت. به این منظور ۲/۵ میلی لیتر فولین ۱۰ درصد (v/v) و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (w/v) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه گردید. پس از ۱/۵ ساعت قرارگیری در شرایط تاریکی، جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. محتوای ترکیبات فنلی کل بر مبنای منحنی استاندارد گالیک اسید و معادله خط $y = 0.0032x + 0.0313$ محاسبه شد و نتایج برحسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه گردید.

سنجش محتوای ۰-دی فنل: محتوای ۰-دی فنل با استفاده از روش Carrasco-Pancorbo و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی حاصل از هر نمونه کالوسی، دو میلی لیتر متانول آبی ۵۰ درصد (v/v) و ۰/۵ میلی لیتر سدیم مولیبدات دو آبه ۵ درصد (w/v) اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت شد. محتوای ۰-دی فنل عصاره‌ها بر مبنای منحنی استاندارد گالیک اسید ($y = 0.0042x + 0.0674$) محاسبه و برحسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه هر کالوس ارائه گردید.

سنجش محتوای اسیدهای فنلی: آب به میزان ۱/۲۵ میلی لیتر، هیدروژن کلرید به میزان ۲۵۰ میکرولیتر و معرف آرنو [سدیم مولیبدات (آبی) ۱۰ درصد (w/v) و سدیم نیتريت (آبی) ۱۰ درصد (w/v)] به میزان ۲۵۰ میکرولیتر به ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری نمونه‌ها در شرایط تاریکی و در دمای محیط (25 ± 2) درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید آبی (۵۰ درصد) به نمونه افزوده شد و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوای اسیدهای فنلی عصاره‌ها، بر مبنای معادله خط $y = 0.0041x + 0.0258$ منحنی استاندارد کافئیک اسید، برحسب میلی گرم کافئیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه

کالوس ارائه گردید (Matkowski, 2008).

سنجش محتوای فلاونوئید: برای ارزیابی محتوای فلاونوئید برمبنای روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹)، ۳۰۰ میکرولیتر عصاره به ۳/۴ میلی لیتر متانول ۳۰ درصد (v/v)، ۱۵۰ میکرولیتر سدیم نیتريت ۰/۵ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۰/۳ مولار افزوده شد. پس از ۵ دقیقه مکث، ۱ میلی لیتر سدیم-هیدروکسید ۱ مولار به نمونه افزوده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. محتوای فلاونوئید، برمبنای منحنی استاندارد کاتچین و معادله خط $y = 0.0018x + 0.0106$ رسم و برحسب میلی گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس محاسبه شد.

سنجش محتوای فلاون کل: در ارزیابی محتوای فلاون کل (Kosalec et al., 2004)، میزان ۲۵۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه کالوسی در لوله آزمایش ریخته شد و سپس به آن ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (w/v) و ۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار افزوده شد. سپس به هر محلول، ۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) و ۱/۴ میلی لیتر آب مقطر افزوده گردید تا حجم نهایی آن به ۲/۵ میلی لیتر برسد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در شرایط تاریکی (دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد)، جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فلاون عصاره‌ها، بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین (معادله خط $y = 0.0022x - 0.007$) محاسبه شد و برحسب میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه ارائه گردید.

بررسی ظرفیت آنتی اکسیدان به روش DPPH: این آزمون به روش De Torre و همکاران (۲۰۱۹) در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. در هر خانه از پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۲ میلی مولار) به آن اضافه شد. از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص به عنوان بلانک و از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH به عنوان شاهد استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت نیم ساعت در شرایط تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس توسط دستگاه الایزا

(America, Gentaur, ST2100)، جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر ثبت شد.

شاخص آنتی اکسیدانی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$I\% = \frac{[I - (A_S - A_B)]}{(A_C - A_B)} \times 100$$
 درصد حذف رادیکال‌های آزاد در معادله فوق A_S نشان دهنده جذب نمونه عصاره، A_B نشان دهنده جذب نمونه بلانک و A_C نشان دهنده جذب نمونه کنترل است. میزان IC_{50} برابر با توانایی خنثی نمودن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره و قابل محاسبه از معادله ذکر شده است. ارزیابی توان آنتی اکسیدانی آسکوربیک اسید به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

بررسی ظرفیت آنتی اکسیدان به روش احیاء یون آهن FRAP III: برای اندازه‌گیری توان آنتی اکسیدان به روش احیاء یون آهن عصاره‌ها، از روش Li و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. این روش براساس کاهش کمپلکس فریک تری پیریدیل تری آزین به فرم فروس در حضور ترکیبات آنتی اکسیدان است. ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۳۰ میکرولیتر محلول FRAP تازه تهیه شده (محلول ۳۰۰ میلی مولار بافر استات سدیم، محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ و محلول ۲۰ میلی مولار کلرید آهن ۳ آبه با نسبت‌های حجمی ۱۰:۱:۱)، مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه استراحت در تاریکی، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. براساس معادله خط $y = 0.0165x + 1.323$ حاصل از غلظت‌های مختلف سولفات آهن II، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۵) و برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ۵ درصد استفاده شد. جهت بررسی ارتباط بین صفات بیوشیمیایی از ضریب همبستگی پیرسونی استفاده شد. نمودارها به وسیله نرم افزار Excel (۲۰۱۶) رسم شدند.

نتایج و بحث

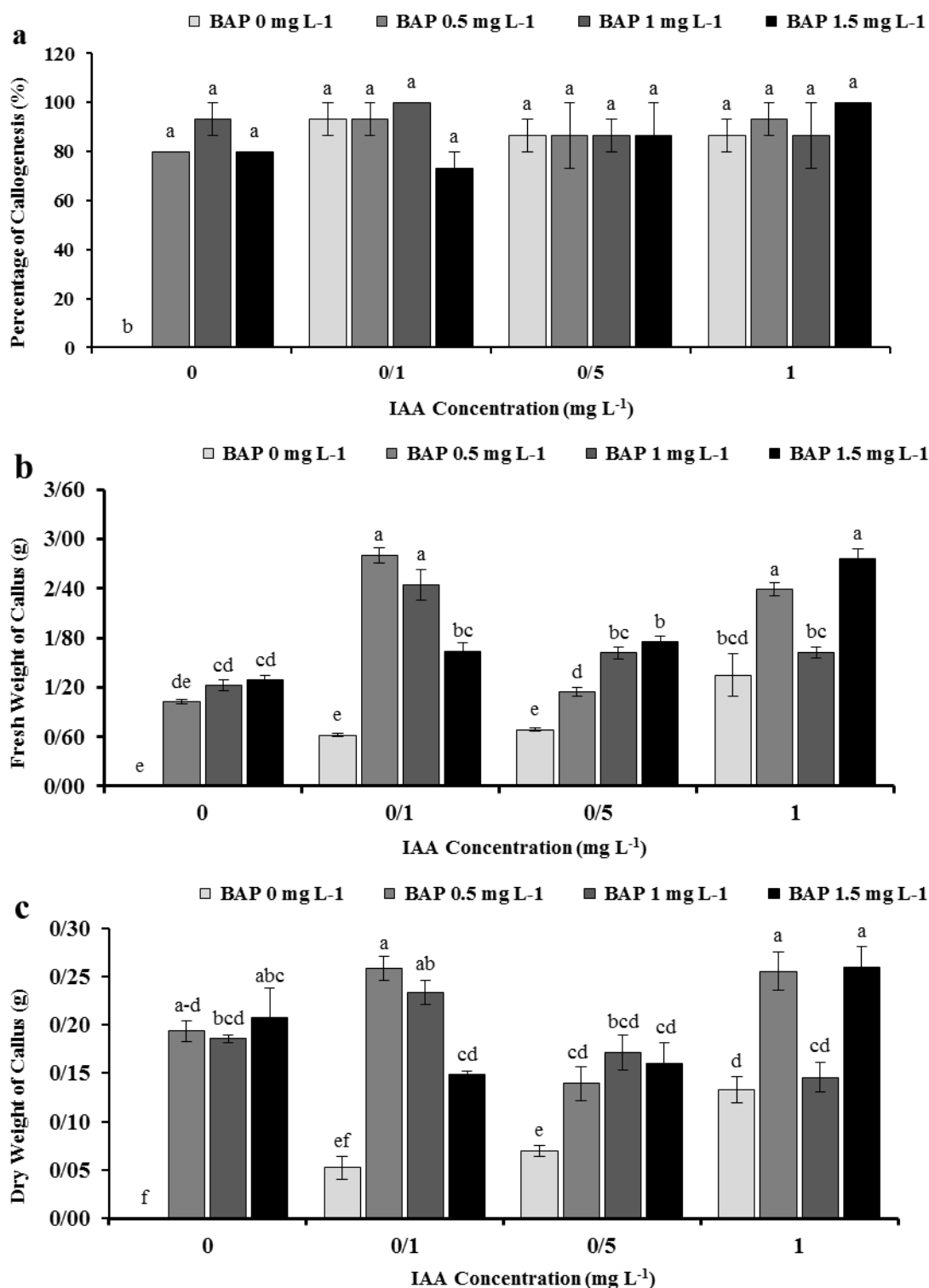
بهینه سازی کالزایی: با توجه به اهمیت کشت بافت برای تولید

2018) تیمار شده با هورمون‌های 2,4-D و BAP نمونه‌هایی از این پژوهش‌ها هستند. آنچه در فرایند کالزایی مهم و مؤثر است، وادار نمودن سلول‌ها به شروع و تشدید تقسیمات سلولی است، به این نحوه سلول‌های تمایز یافته ریزنمونه وارد مرحله تمایز زدایی شوند و سپس با کسب قابلیت شبه‌میریستی، تقسیمات سلولی را از سر گیرند. مسلم شده است که از بین هورمون‌های گیاهی، اکسین‌ها نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی بر عهده دارند (Kandouz et al., 2010). انواع اکسین به موجب مدیریت القاء کننده‌های مرحله G₁، تسریع برای ورود به مرحله S چرخه سلولی (Inze and Veylder, 2006) و بازدارندگی تمایز سلولی (Zivyar et al., 2014) و سیتوکینین‌ها از طریق کنترل مهار کننده‌های چرخه سلولی (Lambardi and Rugini, 2003) و مدیریت سرعت تقسیم سلولی (Zivyar et al., 2014)، بر کالزایی مؤثر هستند. هر چند کسب نتایج متفاوت در کاربرد همزمان و یا مجزا اکسین و سیتوکینین بر تولید کالوس را می‌توان به تفاوت در تعداد و نوع گیرنده‌های هورمونی و میزان تنظیم کننده‌های رشد داخلی موجود در بافت‌های مختلف کشت شده به‌عنوان ریزنمونه نسبت داد (Sarkheil et al., 2009).

بررسی صفات کالزایی و بیوشیمیایی متأثر از ایسیستور و

هورمون: بر مبنای بیشینه درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها، محیط‌های کشت "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان محیط‌های کشت بهینه انتخاب شدند و پس از کالزایی مجدد، با ایسیستور متیل‌جاسمونات تیماردهی شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده و تلفیقی ایسیستور متیل‌جاسمونات و تیمارهای مختلف هورمون تأثیر معنی‌داری بر صفات کالزایی و محتوای ترکیبات فنلی کالوس‌ها داشت (P≤0.05). داده‌های تغییرات وزن نشان داد تأثیری که غلظت‌های مختلف ایسیستور بر وزن تر کالوس در شرایط هورمونی انتخاب شده اعمال می‌کند مشابه نیست، با این وجود غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات توانست

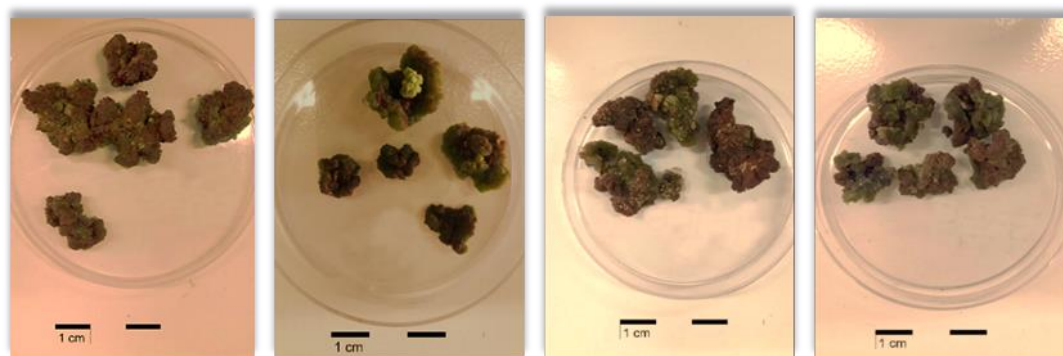
سریع ارقام برتر از گیاهان مادری، تولید گیاهان عاری از بیماری و تکثیر گیاهان تراریخته حاصل از مهندسی ژنتیک (Bhojwani and Dantu, 2013)، از غلظت‌های متفاوت اکسین و سیتوکینین در جهت تولید کالوس، بافت و نمونه گیاهی در شرایط در شیشه استفاده می‌گردد (Griesbach, 1997). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر ساده هورمون IAA و BAP و نیز اثر متقابل این هورمون‌ها تأثیر معنی‌داری به درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس ریزنمونه برگ داشتند (داده‌ها نشان داده نشده است). به غیر از محیط فاقد هرگونه هورمون (نمونه شاهد)، تمامی غلظت‌های IAA و BAP (در تیمار مجزا و یا در برهم‌کنش با یکدیگر) موجب کالزایی ریزنمونه برگ شدند و کالزایی صددرد، در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۱a). ارزیابی داده‌های وزن تر و خشک کالوس‌ها، نتایج مشابهی را نشان داد به این نحو که بیشترین وزن‌های اندازه‌گیری شده در حضور تیمارهای تلفیقی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی‌گرم در لیتر به ثبت رسید (شکل ۱b) و ۱c). نمایی از این کالوس‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. هر چند در مطالعات Caruso و همکاران (۲۰۰۰)، IAA در تیمار مجزا توانست موجب کالزایی برگ و جوانه انتهایی رزماری (*Rosmarinus officinalis*) گردد ولیکن بسیاری از پژوهش‌های دیگر، اشاره به موفقیت عملکرد IAA در کنار سیتوکینین‌ها بر کالزایی دارد (Nabila et al., 2003; Chaudhry et al., 2010). در زمینه اثرات موفق انواع مختلف اکسین در کنار BAP بر القاء کالوس نیز مطالعات بسیاری صورت گرفته است. القاء کالوس از ریزنمونه ساقه *Salvia canariensis* L. (Mederos, -Molina, 2004)، از برگ آویشن ایرانی (*Thymus persicus*) (Bakhtiar et al., 2016) و از برگ کلپوره (Tabarifard, 2020) در محیط MS دارای تیمار هورمونی NAA و BAP؛ همچنین کالوس‌زایی قطعات تک‌گره‌ی ساقه گیاه مریم‌گلی گریزی (*Salvia virgate* L.) (Izadghabul et al., 2011) و ایجاد کالوس از ریزنمونه برگ کلپوره (Hashemyan,



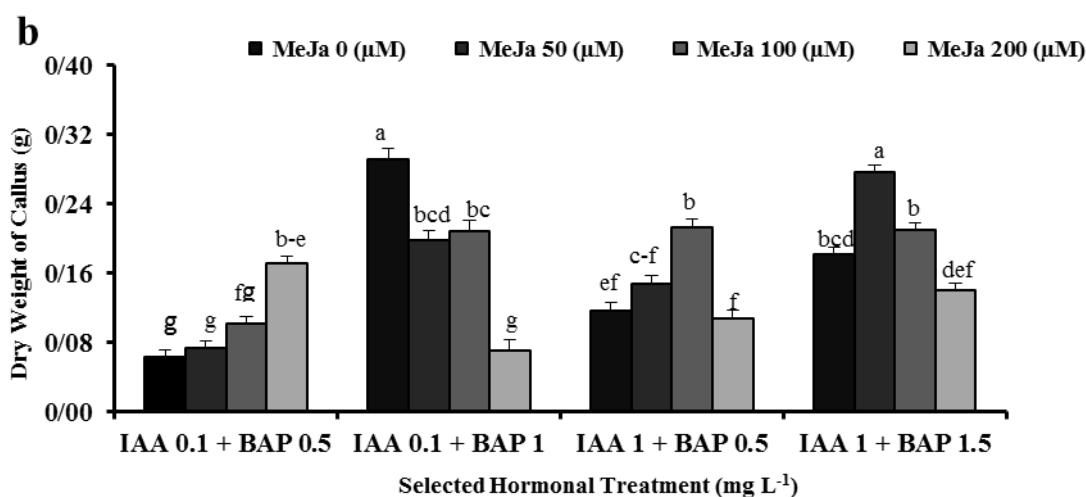
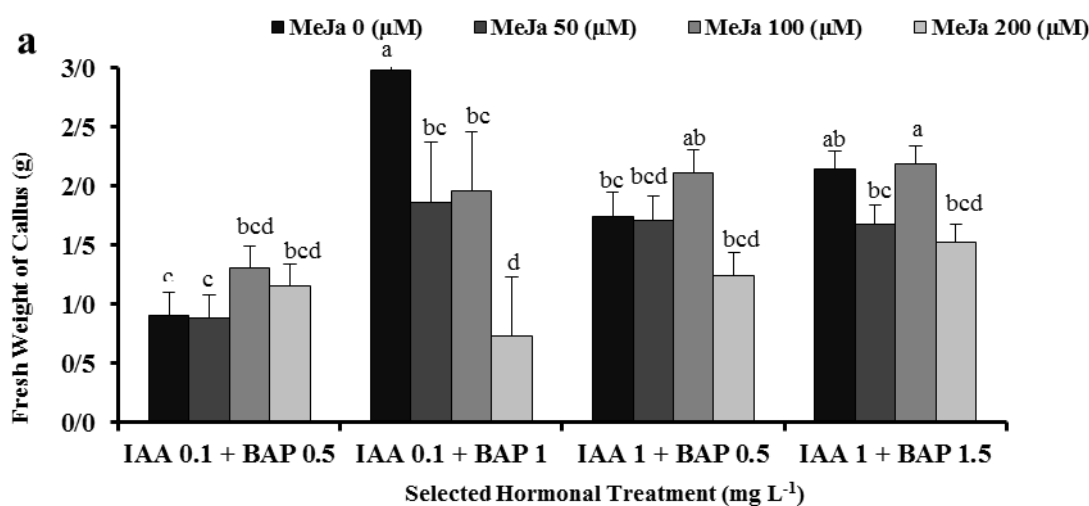
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف IAA و BAP بر صفات کالزایی ریزنمونه برگ: درصد کالزایی (a)، وزن تر کالوس (b) و وزن خشک کالوس (c). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

صرف‌نظر از محیط شاهد در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}" میلی‌گرم در لیتر که دارای بالاترین وزن تر

موجب افزایش وزن تر کالوس در تمام تیمارهای هورمونی نسبت به دو غلظت دیگر متیل‌جاسمونات گردد (شکل ۳a).



شکل ۲- نمایی از کالوس‌های دارای بیشترین وزن تر و خشک. از چپ، تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+ BAP_{0.5}" (میلی گرم در لیتر)، (b): تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{1.5}" (میلی گرم در لیتر)، (c): تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+ BAP₁" (میلی گرم در لیتر) و (d): تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{0.5}" (میلی گرم در لیتر). مقیاس ارائه شده در تصاویر معادل یک سانتی متر است.



شکل ۳- برهمکنش الیستور متیل‌جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر صفات کالزایی ریزنمونه برگ: وزن تر کالوس (a) و وزن خشک کالوس (b). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

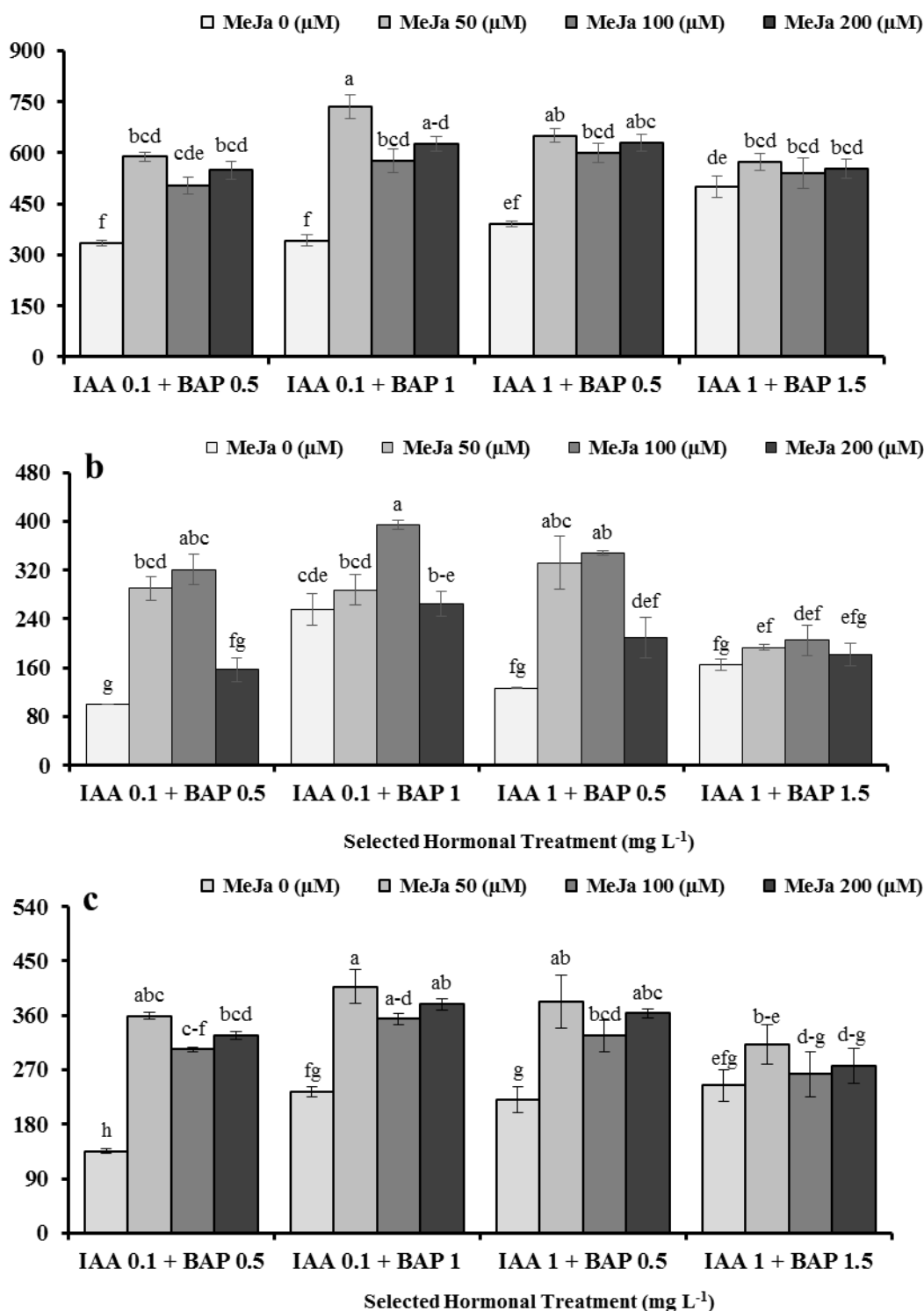
و خشک کالوس در بین تمام نمونه‌ها بود، غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، به ترتیب موجب بیشینه

وزن خشک کالوس‌ها در تیمارهای هورمونی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}", "IAA_{0.1}+BAP₁" و "IAA₁+BAP_{0.5}" میلی‌گرم در لیتر شدند (شکل ۳b). مطالعات Abdollahpoor و همکاران (۲۰۱۷) بیانگر تأثیر منفی تیمار متیل‌جاسمونات بر صفات وزنی کالوس *Hypericum perforatum* نسبت به شاهد بود به طوری که کمترین قطر و وزن تر کالوس در تیمار ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به ثبت رسید. چنین تأثیر منفی از سوی تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات بر وزن تر کالوس *Taxus×media var. Hatfieldii* نیز تأیید شده است (Furmanowa et al., 1997). با این وجود، گزارشاتی از تأثیر مثبت تیمار با متیل‌جاسمونات (تا ۲۵۰ میکرومولار) بر رشد سلولی کشت سوسپانسیون نیز ارائه شده است (Walker et al., 2002). ثابت شده است که تیمار خارجی جاسمونات‌ها می‌تواند موجب تنوع بالا پاسخ‌های موفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان گردد (Furmanowa et al., 1997) و این تنوع عملکرد کاملاً وابسته به غلظت الیستاتور و مدت زمان در معرض قرارگیری است (Acikgoz et al., 2019). با این حال، کاهش در زیست‌توده را به لیپوکسیداسیون غشاء در زمان تیمار با این الیستاتور نسبت داده‌اند (Abdollahpoor et al., 2017).

بررسی غلظت فنل کل در پژوهش حاضر نشان‌دهنده دامنه نوسان محتوا از غلظت ۳۳۳/۴۵ الی ۷۳۵/۱۸ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم نمونه خشک کالوس بود. به طوری که حد بیشینه غلظت فنل در زمان اعمال متیل‌جاسمونات ۵۰ میکرومولار بر تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴a). اعلام غلظت ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌عنوان بهترین تیمار در افزایش محتوای فنل کل کالوس کلپوره در شرایط هورمونی BAP_{1.5} میلی‌گرم بر لیتر (Hashemyan, 2018) و شرایط هورمونی BAP_{1.5} + NAA_{0.5} میلی‌گرم در لیتر (Tabarifard, 2020)، هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر است. با این وجود، مطالعات Samadi و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که متیل‌جاسمونات تا غلظت ۲۰۰ میکرومولار هم می‌تواند موجب تجمع زیاد ترکیبات فنلی در کالوس استویا (*Stevia*

rebaudiana) گردد و چنانچه غلظت تیمار تا ۲۵۰ میکرومولار افزایش یابد، این تأثیر منفی خواهد شد. جاسمونات‌ها به‌عنوان ترکیبات سیگنال در فرایند تحریک‌سازی، موجب رونویسی و ترجمه از نو (*de novo*) و به‌دنبال آن، بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهی می‌گردند (Acikgoz et al., 2019). به طوری که القاء و فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در تشکیل متابولیت‌های ثانوی توسط این گروه از ترکیبات تأیید شده است (Yukimune et al., 1996; Cheong and Kim, 2003; Singh and Dwivedi, 2018). همکاران (۲۰۱۳)، تشدید بیان ژن‌های *C4H* و *4CL*، *PAL* و مسیر فنیل‌پروپانوئید و در راستای افزایش تولید ترکیبات فنلی در شرایط تیمار با متیل‌جاسمونات به اثبات رسیده است. هر چند پژوهش‌ها گویای این مطلب مهم نیز است که غلظت و زمان تیماردهی با الیستاتور از عوامل تعیین‌کننده بر نحوه انباشتگی متابولیت‌ها و من‌جمله ترکیبات فنلی هستند (Krzyzanowska et al., 2012; Acikgoz et al., 2019).

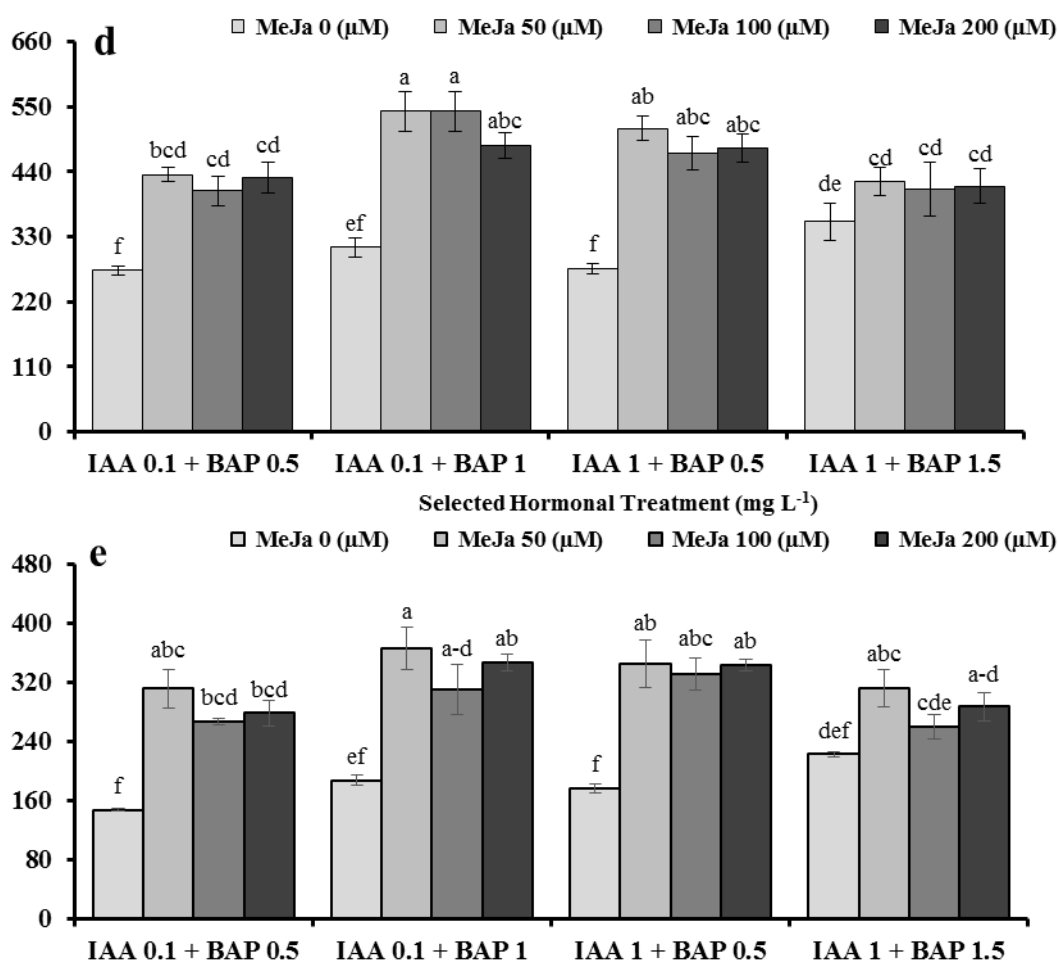
شکل ۴b نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین محتوای *o*-دی‌فنل به ترتیب متعلق به محیط‌های کشت تیمار شده با "IAA_{0.1}+BAP₁/100 μM MeJa" و "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}/0 μM MeJa" بود. اثر الیستاتور بر محتوا این دسته از ترکیبات نشان داد که با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار، محتوای *o*-دی‌فنل کالوس‌ها افزایش یافت ولیکن ادامه افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تیمار شده در محیط‌کشت، موجب کاهش محتوای *o*-دی‌فنل‌های کالوس‌های حاصل از برگ گردید. این نتایج همسو با مطالعات Hemmati و همکاران (۲۰۲۰)، و Shoja و همکاران (۲۰۲۰) است. با انجام فرایند *o*-اکسیداسیون توسط پلی‌فنل اکسیدازها (PPO)، مونوفنل‌ها به *o*-دی‌فنل‌ها تبدیل می‌گردند. در شرایط طبیعی سلول، این دسته از آنزیم‌ها در کلروپلاست حضور دارند درحالی‌که عمده جایگاه حضور فنل‌ها در واکوئل و فضای دیواره‌ای است. لذا هر عاملی که این نظام کده‌بندی را برهم بزند، می‌تواند موجب عملکرد PPOها بر فنل‌ها گردد (Steffens et al., 1994). ثابت شده است که متیل‌جاسمونات یکی از عوامل فراتنظیمی



شکل ۴- برهمکنش الیستور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر دستجات مختلف ترکیبات فنلی کالوس: فنل کل (a)، ۰-دی فنل-ها (b)، اسیدهای فنلی (c). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

متیل جاسمونات بر توتون (*Tobacco spp.*) نشان دادند که سطح رونویسی *PPO* (*NiPPO*) افزایش می یابد به طوری که در

ژنهای *PPO* است (Constabel and Ryan, 1998; Flurkey and Inlow, 2008). Aziz و همکاران (۲۰۱۷) با اسپری



ادامه شکل ۴- برهمکنش الیسیستور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر دستجات مختلف ترکیبات فنلی کالوس فلاونوئیدها (d) و فلاونها (e). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

به عنوان بالاترین محتوا این نوع ترکیبات، در تیمار همزمان هورمون "IAA_{0.1}+BAP₁" و متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار حاصل شد. هرچند نحوه تأثیر غلظت‌های مختلف الیسیستور بر محتوای فنل کل و اسیدهای فنلی مشابه بود اما از لحاظ آماری، تفاوتی بین تأثیر غلظت ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر محتوای اسیدهای فنلی محیط‌های کشت مختلف دیده نشد (شکل ۴c). بررسی Skrzypczak-Pietraszek و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در مقایسه با تیمارهای بالاتر این الیسیستور، موجب افزایش کمیت و کیفیت اسیدهای فنلی در کشت سوسپانسیون *Exacum affine Balf. f.* *ex Regal* می‌گردد. به طوری که وابسته به غلظت بودن تأثیر مثبت متیل جاسمونات بر محتوای اسیدهای فنلی در بسیاری از

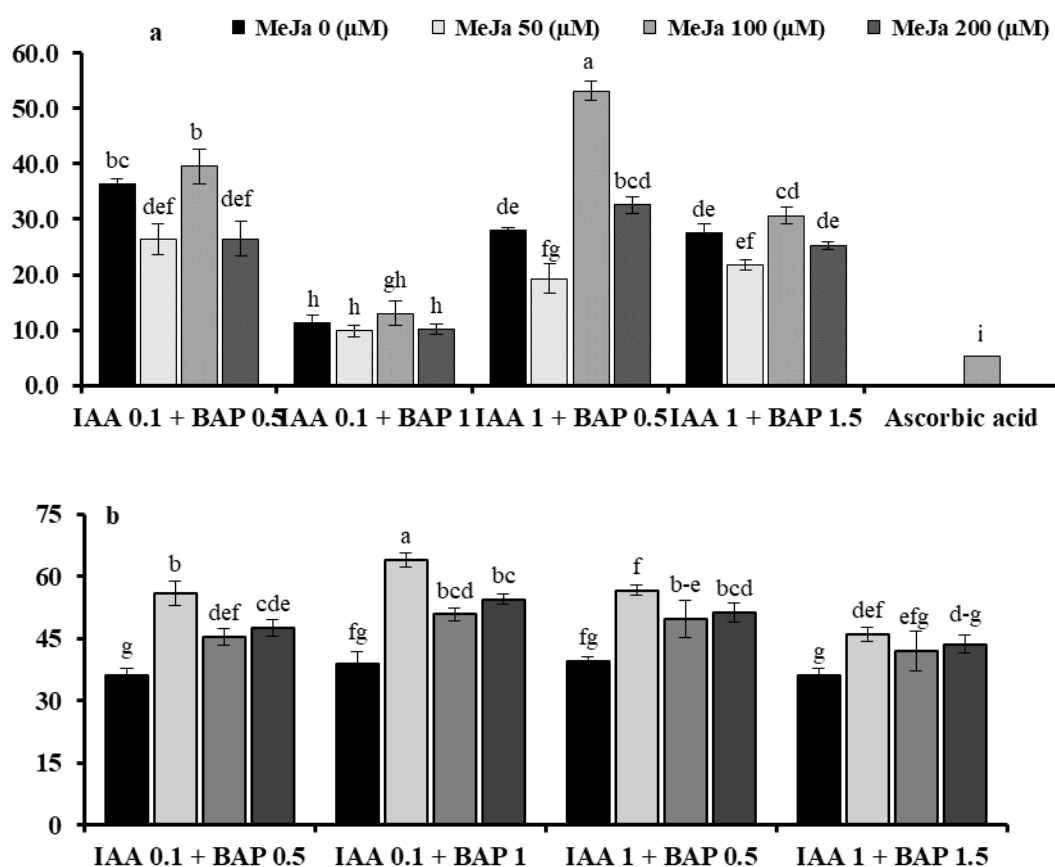
غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات، سطح mRNA به دو برابر و با افزایش غلظت متیل جاسمونات تا ۵۰۰ میکرومولار، این افزایش رونویسی همچنان ادامه یافت. از این رو، افزایش غلظت متیل جاسمونات تیمار شده تا ۱۰۰ میکرومولار در پژوهش حاضر، ضمن اختلال احتمالی در کده بندی سلولی، افزایش بیان ژن‌های *PPO* و به دنبال آن تجمع بالا *o*-دی فنل‌ها را به همراه داشت. اسیدهای فنلی به عنوان دسته مهمی از ترکیبات فنلی از دو زیرگروه هیدروکسی بنزوئیک اسیدها و هیدروکسی سینامیک اسیدها تشکیل شده‌اند (Manach et al., 2004). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در شکل ۴c، محتوای ۴۰۷/۶۴۸ میلی‌گرم اسیدهای فنلی در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون DPPH، از حجم‌های ۱ الی ۶ میکرولیتر عصاره‌ها استفاده و مشخص گردید که اثر الیسیاتور در تیمار هورمونی، تأثیر معنی‌داری بر توان آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس‌های حاصل دارد. براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها کمترین میزان IC_{50} که بیانگر بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی است، در حضور تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁ / 50 μ M MeJa" و "IAA_{0.1}+BAP₁ / 200 μ M MeJa" به میزان ۹/۸۰ و ۱۰/۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشترین محتوای IC_{50} - به منزله کمترین قدرت آنتی‌اکسیدانی - در حضور تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{0.5} / 100 μ M MeJa" و به میزان ۵۳/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۵a). توان آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید معادل، ۵/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بررسی داده‌های آزمون FRAP - به‌عنوان دومین آزمون ارزیابی‌کننده توان آنتی‌اکسیدان - نیز نشان داد که کاربرد ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در همه تیمارهای هورمونی، موجب بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس حاصل از برگ شد (شکل ۵b).

ارزیابی ارتباط بین ترکیبات فنلی مختلف و ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی، براساس ضریب همبستگی پیرسون نیز انجام شد (جدول ۲). نتایج بدست‌آمده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌ها، همبستگی معنی‌دار و قوی را بین محتوای فنل کل، اسیدهای فنلی، فلاونوئید و فلاون با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مذکور نشان داد. درحالی‌که همبستگی بین محتوای *o*-دی‌فنل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر مبنای آزمون DPPH) عصاره‌ها ضعیف‌تر بود (جدول ۲). نتایج بدست‌آمده از بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش احیاء یون آهن III (FRAP) نشان داد که همبستگی قوی و معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بین محتوای فنل، *o*-دی‌فنل، اسیدهای فنلی و فلاونوئید وجود دارد درحالی‌که این همبستگی بین محتوای فلاون با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ضعیف ($r=0.316$) مشاهده شد. ارتباط قوی بین محتوای فنل و آزمون DPPH (Dakah et al., 2014;) و آزمون FRAP (Javidimoghadam et al., 2016)

Hakim et al., 2007;) است (Yousefian, 2014). (Mirshekar et al., 2014) و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی ارتباطات مولکولی، بیش‌بینی ژن‌های مؤثر بر مسیر تولید اسیدهای فنلی را عامل القاء از سوی الیسیاتور متیل‌جاسمونات معرفی کردند. این مسأله در مورد ارتباط سطح افزایشی اسیدهای فنلی با بیش‌بینی ژن PAL نیز اثبات شده است (Mandal, 2010). نکته مهم این است که افزایش بیش از حد محرک و یا الیسیاتور، نه تنها موجب افزایش متابولیت‌ها نمی‌گردد، بلکه از طریق کاهش بیان ژن PAL و احتمالاً سایر ژن‌های درگیر در مسیر، تولید این دسته از ترکیبات را کم و یا متوقف می‌کند (Bais et al., 2004).

مقایسه میانگین داده‌های فلاونوئید و فلاون کل کالوس‌های کلپوره نشان داد که بیشترین محتوای این ترکیبات در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت دارای تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" میلی‌گرم در لیتر و الیسیاتور متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار "بدست‌آمد (به‌ترتیب ۵۴۲/۲۴ و ۳۶۵/۷۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس). شایان ذکر است که غلظت ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات موجب بیشینه محتوای ترکیبات فلاونوئید و فلاون در کالوس‌های همه تیمارهای هورمونی شد و از سوی دیگر، تفاوت معنی‌داری بین تأثیر تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات - در شرایط هورمونی مختلف - دیده نشد (شکل‌های ۴e و ۴d). تأثیر مثبت غلظت‌های پایین متیل‌جاسمونات بر محتوا فلاونوئید کشت سوسپانسیون سلولی *Pueraria tuberosa* L. (Goyal, 2008) و *Pueraria perforatum* (Wang et al., 2015)، کشت‌بافت *Pueraria lobata* (Thiem and Krawczyk, 2010) و کالوس کلپوره (Hashemyan, 2018) ارائه شده است. هر چند انتظار می‌رفت که سطح mRNA ژن‌های مسیر بیوسنتزی منتج به فلاونوئیدها به‌عنوان عاملی برای افزایش محتوای این ترکیبات گزارش گردد (Flores et al., 2014)، اما درنهایت افزایش بیان ژن PAL به‌عنوان عامل اصلی گزارش شد (Gonzalez-Aguilar et al., 2004; Kim et al., 2006).



شکل ۵- برهمکنش الیستور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر ظرفیت آنتی اکسیدان کالوس بر مبنای دو آزمون DPPH (a) و FRAP (b). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

جدول ۲- نمایش همبستگی بین ظرفیت آنتی اکسیدان با محتوای فنل، o-دی فنل، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و فلاونها (بر اساس ضریب همبستگی پیرسون) در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط کشت MS دارنده هورمون و الیستور متیل جاسمونات.

صفات بیوشیمیایی	محتوا فنل کل	محتوا o-دی فنل	محتوا اسیدهای فنلی	محتوا فلاونوئید	محتوا فلاون	آزمون FRAP	آزمون DPPH
محتوا فنل کل	۱						
محتوا o-دی فنل	۰/۹۲۰ **	۱					
محتوا اسیدهای فنلی	۰/۵۲۱ *	۰/۶۷۴ **	۱				
محتوا فلاونوئید	۰/۹۶۸ **	۰/۶۵۷ **	۰/۹۴۵ **	۱			
محتوا فلاون	۰/۴۶۳ *	۰/۳۵۸ ns	۰/۴۰۸ *	۰/۴۶۶ *	۱		
آزمون FRAP	۰/۸۷۶ **	۰/۶۲۸ **	۰/۹۲۸ **	۰/۸۹۵ **	۰/۳۱۶ ns	۱	
آزمون DPPH	-۰/۷۳۵ **	-۰/۳۸۹ ns	-۰/۶۷۵ **	-۰/۶۹۰ **	-۰/۵۹۲ **	-۰/۶۹۷ **	۱

ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال خطای ۵ درصد ($P \leq 0.05$) و ۱ درصد ($P \leq 0.01$)

(Giri et al., 2012)، بارها برای نمونه‌های کشت شده در شرایط در شیشه گزارش شده است. آزمون DPPH بر مبنای

در غلظت‌های منتخب، در القاء کالوس از ریزنمونه برگ کلپوره مؤثر هستند. همچنین متیل‌جاسمونات به‌عنوان یک الیستور توانمند می‌تواند موجب بالابردن راندمان تولید مشتقات مختلف فنل‌ها و به‌طبع آن افزایش توان آنتی‌اکسیدان در کالوس کلپوره گردد و این شیوه را به‌عنوان یک تکنیک مؤثر در جهت تأمین ترکیبات دارویی فنلی در شرایط کشت کالوس معرفی نماید.

سیاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با کد طرح به شماره ۳/۵۱۴۹۵) سپاسگزاری می‌کنند.

دهندگی الکترون و یا هیدروژن است درحالی‌که آزمون FRAB، تنها به بررسی قدرت‌دهندگی الکترون می‌پردازد. اگر چه در سیستم‌های درشیشه (*in vitro*) روش‌های دیگری هم برای ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی ترکیبات وجود دارد، اما عموماً همبستگی چندانی با یکدیگر ندارند. اما مطالعه حاضر نشان داده است که دو آزمون به‌کار رفته ارتباط خوبی با یکدیگر دارند ($r^2 = 0.697, P \leq 0.01$) و نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی به‌عنوان عوامل اصلی فعالیت آنتی‌اکسیدان و روبشگری رادیکال‌های آزاد در عصاره کالوس کلپوره، از طریق سیستم دهندگی الکترون عمل می‌کنند.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر تأیید می‌کند که شرایط هورمونی IAA و BAP

منابع

- Abdollahpoor, M., Kalantari, S., Azizi, M. and Saadat, Y. (2017) Effects of methyl jasmonate and chitosan on shoot and callus growth of Iranian *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. *Journal of Medicinal Plants and By-products* 2: 165-72.
- Abdul Nasim, S., Aslam, J., Kapoor, R. and Ahmad Khan, S. (2010) Secondary metabolites production through biotechnological intervention a review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 22: 147-161.
- Acikgoz, M. A., Kara, S. M., Aygun, A., Ozcan, M. M. and Ay, E. B. (2019) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of camphor and phenolic compounds in cell suspension culture of endemic Turkish yarrow (*Achillea gypsicola*) species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 43: 351-359.
- Aghaei, K., Taei, N., Kanaani, M. and Yazdani, M. (2014) Salinity stress effect on physiological and biochemical traits of two species of *Salvia*. *Plant Process and Function* 3: 86-96.
- Ahmadi moghadam, Y., Piri, Kh, Bahramnejad, B. and Habibi, P. (2013) Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *portulaca oleracea* (Purslan). *Bulletin of Environment. Pharmacology and Life Sciences* 2: 89-94.
- Amiri fard, R., Ostadian, S., Mohtasham, R. and Rostami, A. K. (2013) Study of the therapeutic properties of *Teucrium polium* and *Juniperus communis* in traditional medicine. *The First National Conference of Medical Herbs and Stable Agriculture*.
- Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A. and Mansor, S. M. (2012) Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of Food Science and Technology* 49: 510-514.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. and Jamshid, S. (2008) Therapeutic effects of *Teucrium polium* extracts on oxidative stress in pancreas of Streptozotocin-induced diabetes rats. *Journal of Medical Food* 11: 525-532.
- Aziz, E., Akhtar, W., Ilyas, M., Rehman, Sh., Koiwa, H. K., Shinwari, Z. and Mahmood, T. (2017) Response of Tobacco polyphenol oxidase gene to wounding, abscisic acid (aba) and methyl jasmonate (mej). *Pakistan Journal of Botany* 49: 499-502.
- Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9: 26-32.
- Bakhtiar, Z., Mirjalili, M. and Sonboli, A. (2016) In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 48-5.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A. and Del Rio, J. A. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4505-4515.
- Bhojwani, S. S. and Dantu, P. K. (2013) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer Publications.

- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T. and Fernandez-Gutierrez, A. (2005) Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 818-825.
- Caruso, J. L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. and Wingetm, G. D. (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Reports* 19: 500-503.
- Chandra, K., Nautiyal, B. P. and Nautiyal, M. C. (2013) Herbal-based traditional medicinal knowledge of local inhabitants in Rudraprayag district of Uttarakhand. *Ethnobotany Research and Applications* 11: 299-313.
- Chaudhry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H. and Anjum, M. A. (2010) Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. moneymaker. *Pakistan Journal of Botany* 42: 155-163.
- Cheong, J. J. and Choi, Y. D. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409-413.
- Constabel, C. P. and Ryan, C. A. (1998) A survey of wound- and methyl jasmonate induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47: 507-511.
- Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S. and Wink, M. (2014) In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21: 317-323.
- De Torre, M. P., Cavero, R. Y., Calvo, M. and Vizmanos, J. (2019) A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants* 8: 142-153.
- Feinbrun-Dothan, N. (1978) Flora palaestina: Alismataceae to orchidaceae. *Israel Academy of Sciences and Humanitie* 3: 101-106.
- Flores, G. and del Castillo, M. L. R. (2014) Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. *Postharvest Biology and Technology* 97: 77-82.
- Flurkey, W. H. and Inlow, J. K. (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 2160-2170.
- Furmanowa, M., Glowniak, K., Skyłowska-Baranek, K., Zgorka, G. and Jozefczyk, A. (1997) Effects of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus × media* var. Hatfieldii. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 75-79.
- Giri, L., Dhyania, P., Rawata, S., Bhatta, I. D., Nandia, S. K., Rawala, R. S. and Pande, V. (2012) In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crop and Products* 39: 1-6.
- González-Aguilar, G. A., Tiznado-Hernández, M. E., Zavaleta-Gatica, R. and Martí'nez-Te'liez, M. A. (2004) Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 694-701.
- Gorgini Shabankare, H., Asgharipour, M. R. and Fakheri, B. (2015) Morpho-chemical diversity among Iranian *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) populations in Fars province. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17: 705-716.
- Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerathanassis, I. P., Segura-Carretero, A. and Gutierrez, A. F. (2011) Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical scavenging activity detection. *LWT-Food Science and Technology* 46: 104-109.
- Goyal, S. H. (2008) Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 849-853.
- Griesbach, R. J. (1997) Flavonoids in *Saintpulia ionantha* expressing the fantasy mutation. *Phytochemistry* 48: 829-831.
- Hakim, R. S., Blackburn, M. B., Corti, P., Gelman, D. B., Goodman, C., Elsen, K., Loeb, M. J., Lynn, D., Soin, T. and Smagghe, G. (2007) Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 64: 63-73.
- Hasani-Ranjbar, S., Larijani, B. and Abdollahi, M. (2008) A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. *Archives of Medical Science* 4: 285-292.
- Hashemyan, M. (2018) Investigating the effect of some abiotic elicitors on the content of phenolic compounds and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. in vitro. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Hemmati, N., Cheniany, M. and Ganjeali, A. (2020) Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica* 44: 163-173.
- Inze, D. and Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40: 77-105.
- Izadghabul, S., Behrooznam, B. and Sadeghi, H. (2011) Micropropagation of *Salvia virgata* L. 6th National Conference on New Ideas in Agriculture.
- Javidimoghadam, M., Cheniany, M., Ganjeali, A. and Lahouti, M. (2016) An investigation on callogenesis and antioxidant capacity of different explants of *Teucrium polium*. *Iranian Journal of Plant Biology* 8: 37-52.
- Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chenna, F., Yasmeen, A. and Moustafa, A. E. A. (2010) *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cell via the restoration of the E-

- cadherin/catenin complex. *Journal of Ethnopharmacology* 129: 410-415.
- Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K. and Apak, R. (2010) Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry* 120: 1201-9.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Choi, J. H. (2006) Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *Journal Agriculture Food Chemistry* 54: 7263-7269.
- Kim, Y. B., Kim, J. K., Uddin, M. R., Xu, H., Park, W. T., Tuan, P. A., Li, X., Chung, E., Lee, J. H. and Park, S. U. (2013) Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PloS One* 8: 64199.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. and Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004) Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica-Zagreb* 54: 65-72.
- Kovacevic, N. N., Lakusic, B. S. and Ristic, M. S. (2001) Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research* 2: 110-115.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T., Stochmal, A. and Oleszek, W. (2012) The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 73-81.
- Lambardi, M. and Rugini, E. (2003) Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In *Micropropagation of Woody Trees and Fruits* 621-646.
- Li, T., Elhadi, D. and Chen, G. Q. (2017) Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic Engineering* 43: 29-36.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
- Mandal, S. (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology* 9: 8038-8047.
- Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40: 255-26.
- Matkowski, A. (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants. *Biotechnology Advances* 26: 548-560.
- Mederos-Molina, S. (2004) In vitro callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tissue Culture* 14: 167-172.
- Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.
- Mirshekar, A., Honarvar, M., Mohammadi, F. and Alizadeh, A. (2014) Optimization of tissue culture of *Thymus daenensis* Celak. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 14: 949-953.
- Nabila, S. K., Fawzia, M. J., Naser, A. A. and Rida, A. S. (2003) Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticose*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 117-121.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A. and Oksman-Caldentey, K. M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507.
- Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and Alizade, M. (2019) Fresh weigh, total phenol, total flavonoids, antioxidant and PAL enzyme activity of stevia callus variation affected by salicylic acid and methyl jasmonate. *Journal of Plant Process and Function* 8: 325-337.
- Samman, S., Lyons Wall, P. M. and Cook, N. C. (1998) Flavonoids and Coronary Heart Disease. *Dietary Perspectives*.
- Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, S. A. and Davazdahemami, S. (2009) The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 25: 364-375.
- Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E. (2001) Flavonoids and other polyphenols. *Methods Enzymology* 335: 157-166.
- Shoja, A. A. (2020) Effect of nano titanium dioxide -TiO₂- on the production rate of phenolic compounds in *Salvia tebesana* Bunge in in vitro condition. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Singh, A. and Dwivedi, P. (2018) Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 750-757.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Slota, J. and Pietraszek, J. (2014) The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex *Regel* shoot culture. *Acta Biochimica Polonica* 61: 47-53.
- Steffens, J. C., Harel, E. and Hunt, M. D. (1994) Polyphenol oxidase. In: *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. (ed. Ellis, B. E.) Pp. 275-312. Plenum Press, New York.
- Tabarifard, M. (2020) Effect of methyl jasmonate on the production of phenolic compounds in *Teucrium polium* L. in tissue culture. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Thiem, B. and Krawczyk, A. (2010) Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated in vitro cultures of kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi). *Herba Polonica* 56: 48-56.
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. and Tsay, H. S. (2004) Studies on the production of

- some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanica Bulletin Academia Sinia* 45: 1-22.
- Walker, T. S., Bais, H. P. and Vivanco, J. M. (2002) Jasmonic acid induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. Johns wort). *Phytochemistry* 60: 289-293.
- Wang, B., Sun, W., Li, Q., Li, Y., Luo, H., Song, J., Sun, C., Qian, J., Zhu, Y., Hayward, A., Xu, H. and Chen, S. (2015) Genome-wide identification of phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza*. *Planta* 241: 711-725.
- Yousefian, S., Lohrasebi, T., Farhadpour, M. and Haghbeen, K. (2020) Effects of methyl jasmonate on phenolic acids accumulation and the expression profile of their biosynthesis-related genes in *Mentha spicata* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 142: 285-297.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. and Hara, Y. (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology* 14: 1129-1132.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
- Zivyar, S., Miri, S. M. and Rahimi Meydani, A. (2014) The effect of plant growth regulator of BAP and NAA on callus formation from corm explants of *gladiolus*. *The First National Congress of Flower and Ornamental Plants*.

Effect of methyl jasmonate, IAA and BAP on callogenesis potential, content of some phenolic compounds and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L.

Zahra Mohammadzadeh ¹, Monireh Cheniany ^{1*}, Leila Samiei ²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Research Center of Plant Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 29/04/2021, Accepted: 06/07/2021)

Abstract

This study was conducted with the aim of investigating the effect of plant hormones (IAA and BAP) and methyl jasmonate elicitor on callogenesis potential of *Teucrium polium* leaf explants and the content of some phenolic compounds (total phenols, o-diphenols, phenolic acids, flavonoids, and flavones) and its antioxidant capacity. Leaf explants were prepared from hydroponically-grown plants which were cultured on MS medium with separate and combined concentrations of IAA (0.1, 0.5 and 1 mg L⁻¹) and BAP (0.5, 1 and 1.5 mg L⁻¹). The treatments with the highest percentage of callogenesis and fresh and dry weight were selected as the best hormonal conditions to evaluate the effect of methyl jasmonate (50, 100 and 200 μM) on phenolic derivatives. Eight weeks after callus growth, the content of different phenolic compounds and the antioxidant capacity of the extracts (based on DPPH and FRAP assays) were measured. Although a higher percentage of callogenesis was observed in all hormonal treatments than the control, conditions "IAA_{0.1} + BAP₁" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹ were with 100% callus induction. The highest fresh and dry weight of calli were in the combined treatments "IAA_{0.1} + BAP_{0.5}", "IAA_{0.1} + BAP₁", "IAA₁ + BAP_{0.5}" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹. The results of the second part of the experiment showed that the highest amount of phenolic compound and all its derivatives except o-diphenol was observed under the treatment of 50 μM methyl-jasmonate- in all hormonal treatments. A strong correlation was also observed between the antioxidant potentials DPPH (r² = -0.735) and FRAP (r² = 0.876) with the content of phenolic compounds. Therefore, methyl jasmonate as a potent elicitor can increase the synthesis of phenolic derivatives and the antioxidant capacity in *Teucrium* callus. So, this method would be an effective technique for the supply of medicinal-phenolic compounds.

Keywords: *Teucrium polium*, Medicine plant, Callogenesis, Phenol derivatives, DPPH, FRAP.

Corresponding author, Email: Cheniany@um.ac.ir