

تأثیر متیل جاسمونات و کیفیت نور بر متابولیت‌های ثانویه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

مهسا امامی^۱، اصغر استاجی^{۱*}، علیرضا قنبری^۱، زهرا خزائی^۱ و حسن قربانی قوژدی^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ گروه کشاورزی، دانشکده علوم، مجتمع آموزش عالی گناباد، خراسان رضوی، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹)

چکیده

گیاهان دارویی دارای مواد مؤثره با ارزشی هستند که در شرایط طبیعی به‌طور محدود تولید می‌شوند، لذا استفاده از روش‌هایی مانند کشت بافت و استفاده از محرک‌ها برای تولید بیشتر متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی مفید است. در این پژوهش اثرات متیل جاسمونات و نور LED به عنوان دو القاء‌کننده بر صفات فیزیولوژیک و متابولیت‌های ثانویه در ریشه گیاهچه‌های ۳۰ روزه شیرین بیان در محیط MS مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه از غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار متیل جاسمونات و تیمارهای نوری آبی، قرمز و آبی + قرمز در سه تکرار در قالب طرح آزمایش کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج نشان داد که، محتوای فلاونوئید فقط در طول موج ۳۰۰ نانومتر در غلظت ۱ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد همچنین میزان ترکیبات فنولیک در تیمار با متیل جاسمونات در غلظت ۱ میکرومولار و در تیمار نور آبی افزایش نشان داد و بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در نور آبی مشاهده شد درحالی‌که بیشترین میزان گلیسیریزین ($12/10 \mu\text{g/g FW}$) در تیمار نور قرمز حاصل شد همچنین نور قرمز نسبت به بقیه تیمارها افزایش معنی‌داری بر رشد و پرآوری گیاه داشت. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از محرک‌هایی مانند متیل جاسمونات و نورهای قرمز و آبی موجب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌شود.

کلمات کلیدی: شیرین بیان، کشت بافت، متابولیت ثانویه، متیل جاسمونات، نور آبی و قرمز

مقدمه

(Fedina et al., 2000). ماده اصلی موجود در ریشه و

ساقه‌های زیرزمینی این گیاه یک ترکیب ساپونین تری تریپنوتیدی به نام اسید گلیسیریزیک یا گلیسیریزین است که حدود ۳۰ تا ۵۰ برابر ساکارز شیرینی دارد (Facchini and St- Pierre, 2005) گلیسیریزین ماده اصلی موجود در ریشه و ریزوم شیرین بیان، عامل شیرین شدن این گیاه است که به عنوان ماده شیرین‌کننده در بسیاری از محصولات تجاری،

شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* متعلق به خانواده Fabaceae یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران و یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در فارماکوپه‌های بسیاری از کشورهای آسیایی و اروپایی است (Eghlima et al., 2019) که کاربردهای درمانی گوناگونی داشته و از ریشه شیرین بیان در طب سنتی به‌طور عمده برای درمان زخم معده استفاده می‌شود

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: aestaji@yahoo.com

2015). متیل جاسمونات مشتق متیل استر اسید جاسمونیک است. متیل جاسمونات اغلب به عنوان یک عامل تحریک‌کننده در کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده می‌شود، زیرا باعث پاسخ دفاعی از طریق تحریک آنزیم‌های خاصی مانند PAL، CAT، CHI، استیلن سینتاز و آنتوسیانین سینتاز که دخیل در تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در گیاهان هستند در مقابل زخم و حمله پاتوژن‌ها می‌شوند (Portu et al., 2017). مشخص شده است که وقتی متیل جاسمونات به محیط‌کشت اضافه می‌شود، تولید آنزیم PAL افزایش یافته که در نهایت منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zhou, Memelink, 2016).

شیرازی و همکاران (۱۳۹۹) در تحقیقی در کشت بافت ریشه‌های مویین شیرین بیان نتیجه گرفتند که غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر تولید گلیسیریزین و ایزولیکو پیریتینجین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میانگین وزن خشک ریشه‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار بیشتر شد ولی بیشترین وزن خشک ریشه‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات مشاهده شد. Wongwicha و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقات خود نشان دادند که استفاده از متیل‌جاسمونات به عنوان الیستور در غلظت ۱۰۰ میکرومولار موجب افزایش گلیسیریزین در گیاه شیرین بیان شد. Shabani و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده‌اند که کاربرد محرک‌های متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید در گیاه شیرین بیان میزان گلیسیریزین را افزایش داد.

نور یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر تولید محصولات کشاورزی و دارویی در کشت‌های کنترل شده و متراکم است. استفاده از LEDها در کشاورزی در محیط‌های کنترل‌شده سبب می‌شود تا تنها طول‌موج‌های ضروری و مؤثر در رشد و عملکرد گیاه در دسترس آن قرار بگیرد و از هدررفت انرژی به منظور تولید نور سفید که حاوی طیف‌های غیرضروری است، جلوگیری شود (Gupta and Agarwal, 2017). نور تنها منبع انرژی فتوسنتزی و مهم‌ترین فاکتور محیطی است که در فعالیت فتوسنتزی، تنظیم رشدونمو گیاهان و بیوسنتز مواد فیتوشیمیایی نقش حیاتی دارد. از این‌رو تنظیم شرایط نوری مناسب برای

صنایع دارویی و غذایی کاربرد دارد (Pandey and Ayangla, 2017). فرمول گلیسیریزین به صورت $C_{42}H_{62}O_{16}$ است که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتینیک (آگلیکون) تشکیل شده است. مگناسویت (Magnasweet) نام تجاری گلیسیریزین است. این ماده برای ایجاد طعم در محصولات غذایی، تجاری و فرآورده‌های دارویی کاربرد دارد (گیاهی و کرامت، ۱۳۹۵). ترکیبات فنولیک دسته دیگری از متابولیت‌های ثانویه گیاه شیرین بیان است. فلاونوئیدها از دسته ترکیبات فنولی بوده که طیف وسیعی از مواد رنگی را شامل می‌شوند. به نظر می‌رسد فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات حفاظت‌کننده در مقابل اثرات زیان‌بار اشعه ماورای بنفش عمل می‌نمایند (Michalak, 2016). از گونه‌های مختلف جنس *Glycyrrhiza* بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب فلاونوئیدی گزارش شده است که در حدود ۷۰ نوع آن از گونه گلابرا جداسازی شده است. این ترکیبات اثرات دارویی مانند آنتی‌ویروسی، ضدالتهابی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌توموری (Hosseinzadeh and Nassiri-Asl, 2015) ضدتصلب شرایین (Esmaeili et al., 2019) فعالیت استروژنی (شبانی و احسان‌پور، ۱۳۸۸) و خواص آنتی‌باکتری دارد (Vlaisavljevic et al., 2019).

جاسمونات در دهه ۱۹۶۰ در اسانس گیاه گل یاس به عنوان متابولیت ثانویه دیده شد. دو دهه بعد از این شناسایی اولیه، اثرهای فیزیولوژیکی آن‌ها مانند تسریع پیری، بازدارنده رشد و همچنین الیستور یا محرکی برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان عالی شناسایی شد. جاسمونیک اسید و متیل استر آن یعنی متیل‌جاسمونات از مشتقات سیکلوپنتان لینولنیک اسید هستند که از مسیر اتادکانوئید سنتز می‌شوند. در این مسیر، لینولنیک اسید تبدیل به اسید جاسمونیک می‌شود (Koo and Howe, 2009). متیل جاسمونات (MeJA) یک هورمون گیاهی مهم است که در فرآیندهای مختلفی مانند جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه، جاذبه، تشکیل تریکوم، رشد جنینی، رشد گیاهچه، تشکیل غده، حرکت برگ، رسیدن میوه و پیری برگ شرکت می‌کند (Wasternack et al. 2014; Gumerova et al., 2014).

را در میزان تغییر متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مورد نظر را نیز فراهم می‌کند. از این رو کشت سلول، بافت و اندام گیاهی یک راهکار مفید به منظور مطالعه و بررسی بیولوژیکی متابولیت‌های ثانویه فعال تحت شرایط درون‌شیشه‌ای است (امیرمردادی و همکاران، ۱۳۹۹) و با استفاده از روش‌هایی چون کشت تعلیق یاخته‌ای و کشت ریشه مؤین می‌توان ترکیباتی را که تنها در مراحل خاصی از رشد یا در اندام‌های خاص در گیاه کامل ساخته می‌شوند را به میزان بالا و با سهولت تولید نمود (Chandran *et al.*, 2020). سریع‌ترین و بهترین روش برای تولید گیاه جهت مصارف صنعتی روش کشت بافت است. به کار بردن محرک‌ها، تنظیم‌کننده‌ها و بازدارنده‌های رشد در گیاهان دارویی هم موجب رشد گیاه و هم موجب تحریک و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک شیرین‌بیان به تیمار متیل‌جاسمونات و تیمار نوری از طریق مطالعه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز ترکیبات فنولیک شیرین‌بیان است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیل در زمستان ۱۴۰۰ در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. بذرهای گیاه شیرین‌بیان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. سپس بذر را به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار گرفت و سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شد و بعد به مدت ۱۵ ثانیه در الکل ۹۶٪ قرار گرفت و دوباره با آب مقطر استریل شسته شد. در ادامه بذر در محیط کشت جامد MS حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار کشت شد و به اتاق کشت دارای تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۲۰۰ لوکس قرار داده شد. پس از جوانه‌زنی بذور و گذشت حدود دو هفته گیاهچه‌ها واکشت شدند تا به اندازه مناسب (۳-۴ برگ) برای اعمال تیمار برسند سپس گیاهچه‌های مناسب در محیط MS حاوی تیمار متیل جاسمونات کشت شدند. همچنین محلول متیل جاسمونات ابتدا

تجمع ترکیبات فیتوشیمیایی در حد مناسب در گیاهان اهمیت زیادی دارد (محسن‌پور، ۱۳۹۵). گیاهان به کمک چندین گیرنده قادر به تشخیص طول‌موج‌های خورشید هستند و توسط گیرنده‌های نوری گوناگون به پارامترهای نوری مثل شدت نور، کیفیت نور، مدت نور و جهت نور پاسخ می‌دهند. گیرنده‌های فیتوکروم، کریپتوکروم و فتوتروپین‌ها متداول‌ترین گیرنده‌های نوری در گیاهان هستند، اولین گیرنده نوری فیتوکروم است که یک رنگیزه پروتئینی است. طیف تابشی نور خورشید دامنه گسترده‌ای از طول‌موج ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر را شامل می‌شود که از این بین تنها ۵۰ درصد از انرژی تابشی خورشیدی در دامنه ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر در قالب تابش فعال فتوسنتزی (PAR) توسط گیاهان قابل جذب و استفاده است (Georgiev *et al.*, 2018) و طول‌موج ۶۶۰ نانومتر (نور قرمز) و ۳۸۰ نانومتر (نور آبی) پیک‌های جذب فیتوکروم هستند. نور قرمز دور در طول‌موج ۷۳۰ نانومتر (نور قرمز دور) بالاترین پیک جذب و نور آبی در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر کمترین پیک جذب فیتوکروم را دارند. گیاهان از تمام تابش فعال فتوسنتزی استفاده نمی‌کنند و تنها بخش‌هایی از آن را توسط گیرنده‌های نوری مختلف مانند کلروفیل b و a، کارتنوئیدها، فیتوکروم‌ها، سیتوکروم و فتوتروپین جذب نموده و در فرآیندهای مختلف مانند فتوسنتز، فتوپرودیسم، نورگرایی و همچنین برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و مسیرهای تولید متابولیکی استفاده می‌کنند (Zakurin *et al.*, 2020; میرعمادی و همکاران، ۱۳۸۸). رشد و نمو گیاه، میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه و خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه تحت تأثیر بعضی عوامل محیطی مثل شدت نور، مدت نور و کیفیت نور قرار می‌گیرد (شیرازی و همکاران، ۱۳۹۹) در پژوهشی دریافتند که وزن تر کاهو در تیمار با نور ترکیبی قرمز و آبی افزایش یافت (Jasus *et al.*, 2011).

وابسته بودن به منابع طبیعی و روش‌های کشت به صورت سنتی به ماه‌ها و سال‌ها زمان جهت حصول گیاهان دارویی دارد. به همین جهت استفاده از روش‌هایی مانند کشت بافت این زمان را کوتاه‌تر کرده و امکان بررسی الیستورهای مختلف

این محلول، استانداردهایی با غلظت ۱۰/۵، ۲۱، ۴۲، ۸۳ و ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد و شدت جذب این محلول‌ها و همچنین نمونه‌های گیاهی در طول موج ۲۵۴ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و منحنی جذب برحسب غلظت رسم شد. با استفاده از فرمول به دست آمده از رسم نمودار ($y = 0.0012x - 0.0053$) میزان غلظت هر نمونه محاسبه شد (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲).

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی: اندازه‌گیری ترکیبات فنلی طبق روش Folin-ciocalteu به صورت زیر انجام شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم از ریشه هر گیاهچه داخل هاون چینی ریخته شد و به آن ۳ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه کرده و خوب ساییده شد. عصاره حاصل داخل لوله‌های آزمایش ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت به محلول حاصل ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد. در ادامه این محلول‌ها به مدت یک ساعت دیگر در تاریکی قرار گرفت و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر شدت جذب هر نمونه در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲).

اندازه‌گیری فلاونوئیدها: برای سنجش میزان فلاونوئیدها ۰/۱ گرم وزن تر گیاهچه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی ساییده شد و به مدت ۱۰ دقیقه عصاره حاصل با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. مقایسه میزان ترکیبات فلاونوئیدی براساس شدت جذب خوانده شده انجام گرفت (Guan et al., 1995).

اندازه‌گیری آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز: برای سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز از ریشه گیاهان تحت تیمار متیل‌جاسمونات مقدار ۰/۱ گرم درون هاون چینی سرد قرار دادیم و به آن مقدار ۲ میلی‌لیتر بافر بورات با $pH = 8.8$ دارای ۳۸ گرم بوراکس یا دی‌سدیم تترابورات، ۶ گرم PVP (Polyvinylidon)، چند قطره مرکاپتواتانول و ۲ میلی‌مولار

به وسیله فیلتر سرسرنگی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر در زیر هود استریل شد و غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار جهت تیمار گیاهچه‌ها به محیط‌کشت MS افزوده شد. شیشه‌های کشت‌شده جهت تیمار نوری به اتاق رشد دارای نور (LED) قرمز، نور آبی و نور قرمز+ آبی با زمان بدون خاموشی و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس (۸۰٪ قرمز و ۲۰٪ درصد آبی) منتقل شدند. از نور فلورسانت موجود در اتاق کشت به عنوان شاهد استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ روز گیاهچه‌ها از محیط‌کشت بیرون آورده شدند و برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر و نمونه‌برداری استفاده شدند.

اندازه‌گیری محتوای گلیسیریزین: میزان محتوای گلیسیریزین طبق روش تغییر یافته Jeffry و همکاران (۱۹۸۳) اندازه‌گیری شد بدین صورت که ابتدا به ۰/۵ گرم بافت خشک گیاهچه شیرین‌بیان ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و در هاون چینی ساییده شد. سپس محتوای هاون به لوله آزمایش انتقال یافته و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از اینکه محلول‌ها خنک شد به این محلول‌ها قطره‌قطره اسید سولفوریک غلیظ ۹۵ درصد اضافه شد تا اسید گلیسیریزیک به تدریج رسوب کند. محتویات فوقانی رسوب جدا شد و در ادامه برای حذف اسید به محلول‌ها آب و اتانول به نسبت ۱ به ۱ اضافه شد و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ قرار گرفت. سپس از بخش بالایی رسوب، آب و اتانول حذف شده و رسوب به دست آمده در آن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. در ادامه به این ترکیب ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد تا رسوب به شکل محلول در آید و شدت جذب محلول‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۵۴ نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت گلیسیریزین محاسبه می‌شود. به منظور رسم منحنی استاندارد مقدار ۱۰ میلی‌گرم از پودر نمک آمونیوم گلیسیریزیک اسید با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد؛ بنابراین محلول استاندارد با غلظت ۱ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر تهیه شد (Shabani et al., 2009). سپس از

بدون افزودن هیچ عصاره‌ای استفاده شد.

داده‌های به دست آمده از این تحقیق در برنامه نرم‌افزاری SPSS (IBM Spss Statistics 22) وارد شدند. نرمال بودن داده‌ها بررسی و آمار استنباطی مانند تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD محاسبه شد و نیز رسم نمودارها با استفاده از برنامه اکسل انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر روی میزان فنول در سطح ۵٪ و فلاونوئید nm ۳۰۰ در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است ولی بر سایر صفات تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). همچنین در تیمار نوری نیز این تیمار بر صفات وزن تر ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک کل و میزان فنول در سطح ۱٪ و در صفات میزان گلیسیریزین و فعالیت آنزیم PAL در سطح ۵٪ معنی‌دار شده بود (جدول ۲).

تأثیر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر روی وزن تر ساقه

و ریشه و وزن خشک کل: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در صفات وزن تر ساقه، ریشه و وزن خشک کل تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات مشاهده نشد، هر چند که تیمارهای ۰/۵ میکرومولار در صفت وزن تر ساقه و ریشه مقداری بیشتری را نشان داد ولی تأثیر آن بی‌معنی بود (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد که در گیاهچه‌های تیمار شده با نورهای قرمز و آبی صفات وزن تر ساقه (۰/۳۲ گرم)، وزن تر ریشه (۰/۱۷ گرم) و وزن خشک کل (۰/۴۹ گرم) بیشترین مقدار را دارا بودند. ولی بین تیمار نور آبی و شاهد و ترکیبی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین وزن تر ساقه در تیمار ترکیبی قرمز و آبی (۰/۱۵ گرم) مشاهده شد. همچنین کمترین میزان وزن خشک کل در گیاه شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

تأثیر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر روی محتوای

گلیسیریزین: نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای گلیسیریزین در ریشه‌های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات نشان

به آن اضافه کردیم و بافت‌ها در آن ساییده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ساتریفیوژ شد. از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز استفاده کردیم. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر بافر بورات ۰/۱ مولار با pH=۸ و ۲۵۰ میکرولیتر محلول فنیل‌آلانین ۳ میلی‌مولار و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به میکروتیوب دیگری منتقل گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت و در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر HCl ۵ نرمال به این محلول اضافه شد. سپس شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفومتر خوانده شد (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز بعد از اندازه‌گیری در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی معادل $9500 \text{ cm}^{-1}\text{m}^{-1}$ به دست می‌آید. فعالیت این آنزیم براساس سرعت تبدیل فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید تعیین می‌شود. یک واحد از فعالیت PAL معادل یک میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه است. مقدار جذب خوانده شده بر عدد ۹۵۰۰ تقسیم می‌گردد و میزان فعالیت آنزیم برحسب میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه محاسبه می‌گردد (Cheng and Breen, 1991).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم

پراکسیداز به روش Koroj (۱۹۸۹) اندازه‌گیری گردید. مخلوط مورد استفاده شامل بافر استات (۰/۲ میلی‌مولار و pH=۴/۸)، پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد و بنزیدین ۰/۰۴ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد است. دو میلی‌لیتر بافر استات و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بنزیدین و ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن را در حمام یخ مخلوط کرده و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه کرده و بلافاصله با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتر عدد جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده می‌شود. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن برگ تر حساب گردید. برای صفر شدن دستگاه از ترکیب دو میلی‌لیتر بافر استات و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بنزیدین و ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن

جدول ۱- تجزیه واریانس حاصل از تیمار متیل جاسمونات بر صفات فیزیولوژیک و متابولیت‌های گیاهیچه شیرین بیان

میانگین مربعات											
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه	وزن خشک کل	فنول	فلاونوئید ۲۷۰ nm	فلاونوئید ۳۰۰ nm	فلاونوئید ۳۳۰ nm	میزان گلیسیریزین	فعالیت PAL	فعالیت پراکسیداز
تیمار	۴	۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰	۱۰۴/۰۳۵*	۰/۰۹۰ ^{ns}	۰/۱۹۴**	۰/۲۸۰*	۳۱/۳۲۰ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۵۰۴ ^{ns}
خطا	۱۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۸	۲۱/۰۰۱	۰/۰۵۷	۰/۰۳۲	۰/۰۵۰	۱۹/۵۱۴	۰/۰۰۱	۰/۱۵۷
ضریب تغییرات (%)		۱۹/۲	۲۰/۴	۱۵/۸	۱۴/۴	۱۸/۱	۱۶/۶	۱۹/۳	۱۵/۳	۱۳/۵	۱۲/۸

^{ns}، * و ** به ترتیب به معنی عدم معنی دار بودن و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمار نوری بر صفات فیزیولوژیک و میزان متابولیت‌های گیاهیچه شیرین بیان

میانگین مربعات											
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه	وزن خشک کل	فنول	فلاونوئید ۲۷۰ nm	فلاونوئید ۳۰۰ nm	فلاونوئید ۳۳۰ nm	میزان گلیسیریزین	فعالیت PAL	فعالیت پراکسیداز
تیمار	۳	۰/۰۱۶**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰**	۱۱۸/۶۹۹**	۰/۰۲۰ ^{ns}	۰/۰۲۰ ^{ns}	۰/۰۲۳ ^{ns}	۳۱/۸۱۷*	۰/۰۱۸*	۰/۰۰۴ ^{ns}
خطا	۸	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۱	۱۳/۷۲۶	۰/۰۱۴	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۷/۱۳۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات (%)		۱۵/۴	۵/۳	۱۱/۴	۱۳/۴	۱۵/۱	۱۴/۰	۱۸/۷	۱۵/۴	۱۳/۳	۱۷/۸

^{ns}، * و ** به ترتیب به معنی عدم معنی دار بودن و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین تیمار متیل جاسمونات بر صفات فیزیولوژیک و متابولیت‌های ثانویه گیاهیچه شیرین بیان

تیمار	وزن تر ساقه (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک کل (g)	فنول (mg/L)	فلاونوئید ۲۷۰ nm	فلاونوئید ۳۰۰ nm	فلاونوئید ۳۳۰ nm	میزان گلیسیریزین (μg/g FW)	فعالیت PAL (U/mg protein)
شاهد	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۰۳	۹/۷۰ ^{abc}	۰/۶۵	۰/۴۹ ^c	۱/۲۷ ^a	۵/۵۲	۰/۰۱
۰/۲	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۰۳	۱/۴۷ ^c	۰/۸۷	۰/۹۰ ^{ab}	۰/۷۴ ^{bc}	۲/۸۳	۰/۰۴
۰/۵	۰/۳۰	۰/۲۱	۰/۰۵	۲/۳۶ ^{bc}	۰/۵۰	۰/۷۳ ^{bc}	۰/۴۹ ^c	۴/۲۶	۰/۰۴
۱	۰/۲۷	۰/۱۹	۰/۰۵	۱۵/۳۶ ^a	۰/۹۴	۱/۱۷ ^a	۰/۹۴ ^{ab}	۹/۰۶	۰/۰۴
۲	۰/۲۹	۰/۱۸	۰/۰۵	۱۰/۷ ^{ab}	۰/۷۴	۰/۷۱ ^{bc}	۱/۰۹ ^{ab}	۱۰/۴۸	۰/۰۴

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

آبی میزان گلیسیریزین ۶/۵ میکروگرم حاصل شد و همچنین کمترین میزان گلیسیریزین در تیمار نور ترکیبی قرمز و آبی به میزان ۴/۵۲ میکروگرم به دست آمد. میزان گلیسیریزین در تیمار با نورهای آبی و نور ترکیبی قرمز و آبی در مقایسه با نور فلورسانت محیط کشت (گیاه شاهد) کاهش نشان داد (جدول ۳).

اثر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر محتوای فنول

داد که اثر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر محتوای گلیسیریزین معنی دار نمی‌باشد (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد که اثر تیمار نوری بر میزان گلیسیریزین در گیاهیچه‌های شیرین بیان در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان گلیسیریزین در تیمار نور قرمز (۱۲/۱۰ μg/g FW) به دست آمد که نسبت به گیاه شاهد ۱/۵۷ برابر افزایش نشان می‌دهد و در تیمار با نور

جدول ۴- مقایسه میانگین تیمار نوری بر صفات برخی صفات فیزیولوژیک و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه شیرین بیان

فعالیت	فعالیت	میزان	فلاونوئید	فلاونوئید	فلاونوئید	فنول	وزن	وزن تر	وزن تر	تیمار
پراکسیداز	PAL	گلیسیریزین	فلاونوئید	فلاونوئید	فلاونوئید	فنول	خشک کل	ریشه	ساقه	
(U/min.mg)	(U/mg)	($\mu\text{g/g FW}$)	۳۳۰ nm	۳۰۰ nm	۲۷۰ nm	(mg/L)	(g)	(g)	(g)	
(protein)	(protein)									
۰/۰۶	۰/۰۲ ^b	۷/۸۲ ^{ab}	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۳	۱۶/۴۸ ^b	۰/۰۳۱ ^b	۰/۱۲ ^b	۰/۲۰ ^b	شاهد
۰/۰۱	۰/۱۹ ^a	۶/۵ ^b	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۳۵	۲۴/۳۲ ^a	۰/۰۳۲ ^b	۰/۱۲ ^b	۰/۲۱ ^b	آبی
۰/۱۰	۰/۰۵ ^b	۱۲/۱۰ ^a	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۸	۸/۹۶ ^c	۰/۰۴۹ ^a	۰/۱۷ ^a	۰/۳۲ ^a	قرمز
۰/۰۵	۰/۰۴ ^b	۴/۵۲ ^b	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۲	۱۵/۶۴ ^{bc}	۰/۰۲۷ ^b	۰/۱۲ ^{ab}	۰/۱۵ ^b	ترکیب آبی و قرمز

در هر ستون، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

در غلظت یک میکرومولار (۱/۱۷) که نسبت به گیاه شاهد ۲/۳۸ برابر بیشتر است (جدول ۳). نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر در تمام غلظت‌های متیل جاسمونات نسبت به گیاه شاهد بیشتر بود. در غلظت ۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار متیل جاسمونات میزان فلاونوئید به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۹۰ حاصل شد که نسبت به گیاه شاهد افزایش نشان داد (جدول ۳). بیشترین میزان فلاونوئید در طول موج ۳۳۰ نانومتر (۱/۲۷) در غلظت صفر متیل جاسمونات مشاهده شد. در غلظت ۲ میکرومولار متیل جاسمونات میزان فلاونوئید (۱/۰۹) بدست آمد که در مقایسه با غلظت‌های دیگر بیشتر بود. کمترین میزان فلاونوئید در ۰/۵ میکرومولار متیل جاسمونات حاصل شد (جدول ۳). همچنین تأثیر تیمار نوری بر محتوای فلاونوئید گیاهچه شیرین بیان بی‌معنی بود (جدول ۱).

اثر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر میزان فعالیت آنزیم

فنیل آلانین آمونیلایز (PAL): نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر روی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز معنی‌دار نبود (جدول ۱). در مورد اثر تیمار نوری بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار نوری بر فعالیت این آنزیم در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها هم نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در تیمار نور آبی (۰/۱۹ U/mg protein) مشاهده شد

شیرین بیان: نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار ترکیبات

فنول در ریشه‌های شیرین بیان بعد از تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که بیشترین محتوای فنول در تیمار با غلظت ۱ میکرومولار متیل جاسمونات (۱۵/۳۶ mg/L) حاصل شد که نسبت به گیاه شاهد ۱/۵۸ برابر افزایش نشان داد. در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۲ میکرومولار متیل جاسمونات میزان فنول ۱۰/۷۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. همچنین کمترین میزان فنول گیاهچه‌ها هم در تیمار با غلظت ۰/۲ میکرومولار به میزان ۱/۴۷ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۳). میزان ترکیبات فنل در اثر تیمار با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ میکرومولار نسبت به گیاه شاهد کاهش نشان داد. تجزیه واریانس حاصل از تیمار نوری بر میزان فنول گیاهچه‌های شیرین بیان نشان داد که اثر تیمار نوری بر میزان فنول گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین تیمار نوری هم نشان داد که بیشترین میزان فنول در تیمار نور آبی (۲۴/۳۲ mg/L) دیده شد که نسبت به گیاه شاهد ۱/۴۷ برابر بیشتر است. کمترین میزان فنول هم در تیمار نور قرمز به میزان ۸/۹۶ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و میان ترکیبات فنولی در تیمار با نور قرمز و آبی ۱۵/۶۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که نسبت به گیاه شاهد ۰/۹۴ برابر کاهش نشان داد (جدول ۲).

اثر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر محتوای فلاونوئید

شیرین بیان: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر

که نسبت به گیاه شاهد (۰/۰۲)، ۹/۵ برابر بیشتر بود. در تیمار با نور قرمز میزان این آنزیم ۰/۰۵ و در نور ترکیبی میزان آن ۰/۰۴ واحد مشاهده شد که هر دو نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. کمترین میان فعالیت آنزیم در گیاه شاهد حاصل شد (جدول ۴).

اثر متیل جاسمونات و تیمار نوری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات و همچنین تیمار نوری بر روی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۳ و ۴).

بحث

نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای نوری شامل نور قرمز، آبی و نور ترکیبی قرمز و آبی بر صفات مورفولوژیکی شیرین بیان نشان داد که وزن تر ساقه و ریشه و همچنین وزن خشک کل در تیمار نور قرمز نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در پژوهشی بر پاسخ زرین گیاه به شدت و ترکیب‌های مختلف نور در شرایط درون شیشه‌ای، بیشترین میزان باززایی ساقه و تعداد برگ در تیمار نوری ۸۰ درصد قرمز + ۲۰ درصد آبی به دست آمد (Chamani et al., 2022). همچنین در پژوهشی دیگر در پنج تیمار نوری با ترکیبات مختلف، بالاترین وزن تر گیاه در ترکیب نور قرمز و آبی روی نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) را گزارش کردند (Heydarizadeh et al., 2014). به علاوه نتیجه پژوهش بر روی گیاه اطلسی (*Petonia hybrida*) نشان داد بیشترین وزن‌های تر و خشک برگ‌ساره و ریشه، سطح برگ و قطر ساقه در نسبت‌های نوری ۱۵ درصد آبی و ۸۵ درصد قرمز با شدت ۶۵ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه بود (Rashidi et al., 2017). ریزوم گیاه شیرین بیان دارای ترکیب فنول، فلاونوئیدی، ایزوفلاونوئیدی، کومارین‌ها و استیلبنوئیدهاست. رنگ زردی که از عصاره شیرین بیان استخراج می‌شود به دلیل مقادیر بالای فلاونوئیدی آن است (خاکپور، ۱۳۹۸). در تحقیق حاضر تحت تیمارهای نوری بیشترین محتوای گلیسیریزین (۱۲/۱۰ میکروگرم بر گرم وزن

خشک) به عنوان مهم‌ترین و بارزترین ماده مؤثره شیرین بیان در تیمار نور قرمز مشاهده شد و کمترین میزان (۴/۵۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در تیمار نور ترکیبی قرمز + آبی به دست آمد. Heydarizadeh و همکاران (۲۰۱۴) نور قرمز باعث بهبود درصد اسانس نعنای فلفلی نسبت به شرایط عادی مزرعه شد. احمدی و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی تأثیر طیف‌های مختلف نور LED بر شاخص‌های رشد و محتوای رزمارینیک اسید در گیاه بادرنجبویه گزارش دادند که میزان این ماده در اندام هوایی به عنوان مهم‌ترین ماده گیاه در نورهای قرمز نسبت به سایر نورها افزایش معنی‌داری داشت. بیشترین میزان ماده رزمارینیک اسید در نور قرمز به میزان ۴/۶۱۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود که در راستای نتیجه تحقیق حاضر است. تحقیقات نشان داده است که متیل جاسمونات به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان مانند الیستورهای دیگر، بیان ژن‌های مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاه القا می‌کند. در واقع متیل جاسمونات یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه از ترکیبات پیام‌رسان کلیدی محسوب می‌شود. پاسخ‌های دفاعی گیاه هم موجب کاهش تولید مواد اولیه و بیوستنز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاه می‌شود. متیل جاسمونات دامنه وسیعی از پاسخ‌های نموی گیاه را تنظیم می‌کند و موقع ایجاد تنش در گیاه، القای بیوستنز آن‌ها موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Chen et al., 2013).

ترکیبات فنلی رایج‌ترین گروه از خانواده متابولیت‌های ثانویه بوده که به عنوان ترکیبات دفاعی، نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد دارند (پنجه‌کار و همکاران، ۱۳۹۷). از آنجا که نورهای شدید قرمز و آبی برای گیاه شیرین بیان می‌تواند به عنوان نوعی تنش عمل نماید احتمالاً با افزایش محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در جلوگیری از تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد نقش بسزایی داشته باشد. بر خلاف نتایج حاصل از مطالعه حاضر که بیشترین محتوای فنول در تیمار با نور آبی مشاهده شد بیشتر گزارش‌ها نشان دادند که نور قرمز باعث افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی شده است. Li و

همکاران (۲۰۱۱) در کاهو نشان دادند که نور قرمز موجب افزایش میزان ترکیبات فنولیک گردیده است. اینکه چه سازوکاری باعث می‌شود که متابولیت‌های ثانویه گیاهی در برخی گیاهان با نور قرمز و در برخی دیگر با نور آبی القا شود و تجمع یابد هنوز به درستی مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد احتمالاً این طول‌موج‌ها با فعال‌سازی بعضی ژن‌های گیاهی مرتبط بوده و از طریق این ژن‌ها موجب افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شوند. تولید مواد مؤثره گیاهان دارویی معمولاً تحت تأثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی قرار دارد (Heydarizadeh *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر تیمار نوری موجب افزایش معنی‌داری بر سنتز محتوای ترکیبات فنولی در گیاهچه شیرین بیان داشت به طوری که بیشترین میزان فنول در نور آبی به دست آمد که نسبت به گیاه شاهد افزایش نشان داد. همچنین نتایج تحقیق ما نشان داد که تیمار نوری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود. خلیلی و خانقلی (۱۳۹۹) در مطالعات خود گزارش کردند که نور قرمز موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به نور سفید شد که با نتایج مقایسه میانگین داده‌های ما مطابقت داشت. مطالعات مختلف نشان داد که، متیل جاسمونات موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده و از این طریق موجب کاهش رادیکال‌های آزاد در گیاهان می‌شود. فلاونوئیدها از دسته ترکیبات فنولی بوده که طیف وسیعی از مواد رنگی را شامل می‌شوند. به نظر می‌رسد فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات حفاظت‌کننده در مقابل اثرات زیان‌بار اشعه ماورای بنفش عمل می‌نمایند (مختاری و همکاران، ۱۳۹۷). در تحقیق حاضر تیمار نوری بر شدت جذب فلاونوئید بی‌معنی بود. از آنجا که نورهای قرمز و آبی به عنوان نوعی تنش غیرزیستی عمل نموده و از این طریق در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش بسزایی می‌تواند داشته باشد (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر شاید شدت نور به کار رفته کافی نبوده باشد. شدت جذب فلاونوئید در ۳۰۰ نانومتر در اثر تیمار با متیل جاسمونات در غلظت یک میکرومولار نسبت به دیگر غلظت‌ها بیشتر بود که نسبت به تیمار شاهد ۲/۳۸ درصد

افزایش نشان داد. در شدت جذب ۲۷۰ نانومتر بیشترین فلاونوئید نیز در اثر تیمار با غلظت یک میکرومولار حاصل شد؛ اما شدت جذب فلاونوئید در ۳۳۰ نانومتر در گیاهچه‌های بدون متیل جاسمونات مشاهده شد که البته با غلظت یک میکرومولار تفاوت معنی‌داری نداشت. محققان بیان کردند که چالکون سنتز که پیش‌ساز فلاونوئیدها است به وسیله متیل جاسمونات القا می‌شود. گزارش شده است که محتوای فلاونوئید در اثر تیمار با متیل جاسمونات افزایش می‌یابد (خان‌پور اردستانی و همکاران، ۱۳۹۳). شبانی و احسان‌پور (۱۳۸۸) گزارش کردند که بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئید در غلظت یک میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد که با نتیجه این مطالعه همخوانی دارد. همچنین افزایش در غلظت فلاونوئیدها ناشی از فعالیت زیاد آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و یا سرعت بالای سنتز این آنزیم تحت تنش است که در تحقیق ما نور آبی افزایش معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز نسبت به تیمار شاهد ۹/۵ برابر افزایش نشان داد. Heydarizadeh و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که در نور آبی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافت. به نظر می‌رسد که نورهای LED بتوانند با تحریک رشد و القاء تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاه به طور همزمان تولید و کیفیت گیاه را در محیط‌های کنترل شده در مقایسه با شرایط طبیعی مزرعه افزایش دهند (Kamali *et al.*, 2014). آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) جز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هست که نقش دفاعی در گیاهان دارد. این آنزیم در گیاهان حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه بوده و به عنوان نخستین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید موجب تبدیل L فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید می‌شود و از این طریق منجر به بیوسنتز متابولیت‌های با ارزشی مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین، لیگنین، تانن و دیگر ترکیبات فنلی می‌گردد. PAL به عنوان آنزیم کلیدی در تشکیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان هست نقش

اساسی ایفا می‌کند و یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و نیز یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در مقابل تنش‌های محیطی است (Zhang et al., 2004). همچنین در این تحقیق اثر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل‌آنالین آمونیلایز و آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود. فارسی و همکاران (۱۳۹۹) گزارش کردند که استفاده از متیل‌جاسمونات و جاسمونیک اسید به عنوان محرک در کشت سلولی گیاه ترتیزک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد که با نتیجه تحقیق حاضر همخوانی نداشت. به نظر می‌رسد که در این مطالعه محرک متیل‌جاسمونات موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نشده و در نتیجه میزان تولید ترکیبات فلاونوئیدی هم در تحقیق حاضر زیاد قابل توجه نبود چون که در طول موج ۲۷۰ نانومتر اثر متیل‌جاسمونات بی‌معنی بود و در طول موج‌های ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر هم به ترتیب در غلظت یک میکرومولار و صفر میکرومولار بیشترین شدت جذب فلاونوئید مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

منابع

- احمدی، ط.، شبانی، ل. و سبزیعلیان، م. ر. (۱۳۹۶) بررسی تأثیر طیف‌های مختلف نور LED بر شاخص‌های رشد و محتوای رزمارینیک اسید در *Melissa officinalis* L. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۶: ۲۱۳-۲۲۲.
- امیر مرادی، س.، کاظمی تبار، س.، ابراهیمی، م.، کیانی، غ. و خان احمدی، م. (۱۳۹۹) بررسی تأثیر میواینوزیتول بر زیست توده و میزان متابولیت‌های ثانویه ریشه نابجا گل راعی (*Hypericum perforatum* L.). فرآیند و کارکرد گیاهی ۹: ۱۸۳-۱۶۹.
- پنبه کار، ف.، مختاری، ب.، رستگارزاده، س. و کلاهی، م. (۱۳۹۷) بررسی فیتوشیمیایی، سنجش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه گیاه وتیور (*Chrysopogon zizanioides*). زیست‌شناسی تکوینی ۱۰: ۴۵-۵۸.
- خاکپور، ع.، ذوالفقاری، م. و سرخه، ک. (۱۳۹۸) بررسی برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) در شرایط فصل پاییز و بهار در استان خوزستان. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۵: ۹۱-۱۰۰.
- خان‌پور اردستانی، ن.، شریفی، م. و بهمنش، م. (۱۳۹۳) اثر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سلول *Scrophularia straita* Boiss. پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی) ۲۷: ۸۴۰-۸۵۳.
- خلیلی، و. و خانقلی، ش. (۱۳۹۹) اثر نورهای LED بر شاخص مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاه مرزنگوش (*Origanum vulgare* L.). دهمین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، همدان.

در این تحقیق بیشترین میزان گلیسیریزین در تیمار با نور قرمز به دست آمد و در گیاهچه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات میزان این ماده در غلظت دو میکرومولار نسبت به غلظت‌های دیگر افزایش داشت هر چند بدون تأثیر معنی‌دار و بیشترین میزان فنول در غلظت یک میکرومولار و بیشترین محتوای فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر در غلظت یک میکرومولار متیل‌جاسمونات مشاهده شد و بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آنالین آمونیلایز در نور آبی مشاهده شد و نور قرمز نسبت به بقیه تیمارها افزایش معنی‌داری بر رشد و پرآوری گیاه داشت. تحقیقات نشان داده است که میزان مواد مؤثره در گیاهان دارویی و اندام‌های آن‌ها هیچ‌وقت ثابت نبوده و متناسب با مراحل رشدی و شرایط محیطی گیاه قابل تغییر هست. به نظر می‌رسد نورهای قرمز و آبی با تحریک رشد و همچنین القا تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه موجب افزایش تولید و کیفیت گیاه در محیط‌های کنترل شده باشند. از آنجا که برخی گیاهان در نور قرمز و برخی دیگر در نور آبی بیشترین سنتز مواد مؤثره را دارند لذا انجام تحقیقات دیگر و بیشتر در مورد تأثیر نورها ضروری به نظر می‌رسد.

- سلطانی‌نژاد، ر.، رضوی‌زاده، ر. و علومی، ح. (۱۳۹۲) بررسی تغییرات میزان برخی متابولیت‌های گیاهچه شیرین‌بیان در تیمار اکسید مس و اکسید روی. زیست‌شناسی گیاهی ایران ۵: ۸۰-۶۷.
- شبابی، ل. و احسان‌پور، ع. ا. (۱۳۸۸) الفاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت درون‌شیشه‌ای شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۲: ۷۰۳-۶۹۱.
- شیرازی، ز.، پیری، خ.، میرزایی اصل، ا.، حسنلو، ط. و قیاسوند، ط. (۱۳۹۹) اثر محرکه‌ای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجین در ریشه‌های موین شیرین‌بیان. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۴۴۹-۴۴۰.
- فارسی، م.، عبدالهی، ف.، صالحی، ا. و قاسمی، ش. (۱۳۹۹) تأثیر متیل جاسمونات بر رشد و مقدار اسانس مرزنجوش (*Origanum majorana*) در شرایط تنش خشکی. پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی) ۳۳: ۷۱۲-۶۹۸.
- گیاهی، ا. و کرامت، د. (۱۳۹۵) معرفی و بررسی کاربردهای شیرین‌بیان و گلیسیریزین موجود در آن به عنوان شیرین‌کننده. دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی.
- محسن‌پور، م. (۱۳۹۵) تأثیر نوردی تکمیلی با نور آبی و فرابنفش A روی برخی ویژگی‌های آگزوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی نعنای فلفلی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- مختاری، م.، فلاح، س. و رحیمی چگنی، ا. (۱۳۹۷) تأثیر متیل جاسمونات بر تحمل گیاهچه کدوی پوست کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) به تنش سرما. تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۱۱: ۱۰۵۷-۱۰۴۵.
- میرعمادی، پ.، عزت پناه، ح.، لاریجانی، ک.، عزیزی نژاد، ر. و متقیان، پ. (۱۳۸۸) مقایسه روش‌های مختلف استخراج گلیسیریزیک از پودر عصاره شیرین‌بیان. علوم غذایی و تغذیه ۸: ۲۷-۲۱.
- Chamani, E., Shahbazi Yajlou, R., Azarmi, R. and Pourbeyrami Hir, Y. (2022) Response of *Dracocephalum kotschy* to different light intensities and combinations under in-vitro condition. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 23: 145-156. (In Persian).
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. and Sharma, K. (2020) Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. Journal of Applied Biotechnology Reports 00450.
- Chen, Z., Ricigliano, J. W. and Klessig, D. F. (2013) Purification and characterization of a solublesalicylic acid-Binding protein from tobacco. Proceedings of the Nationalences 90: 9533-9537.
- Cheng, G. W. and Breen, P. J. (1991) Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. Journal of American Society Horticultural Science 116: 865-869.
- Eghlima, Gh., Sanikhani, M., Kheiry, A., Hadian, J. and Aelaei, M. (2019) Study and comparison of phytochemical and antioxidant activity in different native populations of *Glycyrrhiza glabra* L. from Iran. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants 26: 65-77.
- Esmaili, H., Karami, A., Hadian, J., Saharkhiz, M. J. and Nejad Ebrahimi, S. (2019) Variation in the phytochemical Sicily and Spain. Nature Medicine 52: 259-264.
- Facchini, P. J. and St-Pierre, B. (2005) Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Current Opinion in Plant Biology 8: 657-666.
- Fedina, I. S. and Benderliev, K. M. (2000) Response of scenedesmus incrassatulus to salt stress as affected by methyl jasmonate. Biologia Plantarum 43: 625-627.
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I. and Pavlov, A. (2018) Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. Engineering in Life Sciences 18.
- Guan, J. Y., Wang, W. W., Ma, M. T., Zhang, S. Y. and Xing, Y. (1995) Investigation of technological preparation on soak of Saussurea involucre. Journal of Shenyang Pharmacology University 12: 209-211.
- Gumerova, E. A., Akulov, A. N. and Rumyantseva, N. I. (2015) Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. Russian Journal of Plant Physiology 62: 195-203.

- Gupta, S. D. and Agarwal, A. (2017) Artificial lighting system for plant growth and development: Chronological advancement, working principles, and comparative assessment. In *Light emitting diodes for agriculture*. Springer, Singapore 1-25.
- Heydarizadeh, P., Zahedi, M. and Sabzalian, M. R. (2014) The effect of LED light on growth, essential oil content and activity of antioxidant enzymes in pepper mint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Plant Process and Function* 3: 13-24. (In Persian).
- Hosseinzadeh, H. and Nassiri-Asl, M. (2015) Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* Spp. and its bioactive constituents: Update and review. *Phytotherapy Research* 29: 1868-1886 (In Persian).
- Jasus-Gonzalez, L. D. E. and Weathers, P. J. (2011) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploid. *Plant Cell Reports* 21: 809-813.
- Jeffrey, H. W., Michael, M. J., Robert, A. and Martin, J. R. (1983) High performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin in licorice products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 387-389.
- Kamali, M., Khosroyar, S. and Jalilvand, M. R. (2014) Investigation on the composition of phenol, flavonoid, anthocyanin and antioxidant capacity of different aerial organs extract of medicinal *Dracocephalum kotschyi* Bioss plants. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* 6: 627-634. (In Persian).
- Koo, A. J. and Howe, G. A. (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70: 1571-1580.
- Koroi, S. A. A. (1989) Gel elektrophoresische und spektrale photometrische Untersuchungen zueinander in Abhängigkeit von der Temperatur auf Struktur und Aktivität der Amylase und Peroxidase Isoenzyme. *Physiological Journal* 20: 15-23.
- Li, Y. J., Chen, J., Li, Y., Li, Q., Zheng, Y. F., Fu, Y. and Li, P. (2011) Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 8181-8191.
- Michalak, A. (2016) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15: 523-530.
- Pandey, D. K. and Ayangla, N. W. (2017) Biotechnological aspects of the production of natural sweetener glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* sp. *Phytochemistry Reviews* 17: 1-34
- Portu, J., Lopez, R., Santamaria, P. and Garde-Cerdan, T. (2017) Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: Effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chemistry* 237: 416-422.
- Rashidi, A., Tehranifar, A. and Nemati, H. (2017) The effect of blue and red spectrum combinations and light intensity on vegetative growth of *Petunia* seedling. *Iranian Journal of Horticultural Science* 48:443-446. (In Persian).
- Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asgari, G. and Emami, J. (2009) Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 621-626.
- Vlaisavljevic, S., Sibul, F., Sinka, I., Zupko, I., Ocsovszki, I. and Jovanovic Santa, S. (2019) Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. *Industrial Crops and Products* 112: 217-224.
- Wasternack, C. (2014) Action of jasmonates in plant stress responses and development - applied aspects. *Biotechnology Advances* 32: 31-39.
- Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Putalun, W. (2011) Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures. *Zeitschrift für Naturforschung* 66: 423-428.
- Zakurin, A. O., Shchennikova, A. V. and Kamionskaya, A. M. (2020) Artificial-light culture in protected ground plant growing. Photosynthesis, photo morphogenesis, and prospects of LED application. *Russian Journal of Plant Physiology* 67: 413-424.
- Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W. K. and Wu, J. (2004) Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. *Planta Medica* 70: 147-151.
- Zhou, M. and Memelink, J. (2016) Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* 34: 441-449.

The effect of methyl jasmonate and light on licorice secondary metabolites (*Glycyrrhiza glabra* L.) under in vitro condition

Mahsa Emami¹, Asghar Estaji^{*1}, Alireza Ghanbari¹, Zahra Khazaei¹, Hassan Ghorbani Ghouzhd²

¹Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohagheh Ardabili, Ardabil, Iran

²Lecturer, Department of Agriculture, Faculty of sciences, University of Gonabad, Khorasan Razavi, Iran
(Received: 06/05/2022, Accepted: 11/10/2022)

Abstract

Medicinal plants contain valuable active compounds that are produced in limited quantities under natural conditions, so the use of methods such as tissue culture and stimulant materials is useful to produce more secondary metabolites in medicinal plants. In this study, the effects of methyl jasmonate and LED lights as two elicitors on physiologic and secondary metabolites in the roots of 30-day-old licorice seedlings in MS media were investigated. In this study, concentrations of zero, 0.2, 0.5, 1 and 2 μM methyl jasmonate as well as blue, red and blue+red light treatments, were used in three replications in a completely randomized design. The results showed that flavonoid content at wavelengths of 300 nm at a concentration of 1 μM methyljasmonate showed a significant increase compared to the control. According to results, the amount of phenolic compounds in methyl jasmonate treatment increased at a concentration of 1 μM and in blue light treatment. The highest activity of phenylalanine ammonialyase was observed in blue light, but the greatest amount of glycyrrhizin (12.10 $\mu\text{g/g}$ FW) was recognized in red light treatment. Also, red light significantly increased the growth and proliferation of plants compared to other treatments. In general, it can be concluded that the use of stimulants such as methyl jasmonate and red and blue lights increases the amount of secondary metabolites in medicinal plants.

Keywords: Blue and red light, Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), Methyl jasmonate, Tissue culture, Secondary metabolite

Corresponding author, Email: aestaji@yahoo.com