تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر وزن¬تر، محتوای کل فنل و فلانوئید، درصد مهار رادیکال آزاد و فعالیت آنزیم فنیل¬آلانین آمونیالیاز در کالوس استویا

صبا صمدی[۱]، عظیم قاسم‌نژاد*[۲] و مهدی علیزاده[۲]

[۱] بخش باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، [۲]گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده‌ی تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰٤/۱۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۰۳)

چکیده

استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاهی علفی و چندساله با ارزش اقتصادی بالاست. در پژوهش حاضر اثر الیسیتورهای اسید سالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) بر زیست‌توده، فنل کل، فلاونوئید کل، توان آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در کالوس گیاه استویا مورد بررسی قرارگرفت. به این منظور نمونه‌های برگ استویا در محیط کشت حاوی 2 mg.l BA و 2 mg.l NAA جهت القای کالوس و در پنج سطح صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار SA و MeJA در قالب طرح کاملاً تصادفی تیمار شدند. نتایج این بررسی نشان دادند که تیمار MJ و SA در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار حداکثر میزان تولید ترکیبات فنل‌کل (به ترتیب ۰/۹۹٦ و ۰/٦٦۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) را داشته در حالیکه بالاترین میزان تجمع فلاونوئید کل (۰/۳۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در تیمار با SA در غلظت ۲۰۰ میکرومولار و در تیمار با MJ (۰/۲۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار گزارش شد. علاوه بر این لازم به ذکر است که هر دو تیمار اعمال شده در ۲۰۰ میکرومولار حداکثر توان آنتی‌اکسیدانی (IC 50 ۷۰/۵۷ و ٦۲/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای MJ و SA) را نشان داده‌اند. با این وجود روند کاهشی تجمع ترکیبات با افزایش غلظت از ۲۰۰ میکرومولار قابل مشاهده است. لازم به ذکر است توان آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تیمارهای الیسیتوری در غلظت بالا کاهش قابل توجهی نشان داد. همبستگی مثبت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تجمع ترکیبات فنلی بیانگر نقش کلیدی ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی استویا در کنترل فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌باشد. و همبستگی مثبت فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیانگر این نکته است که PAL به عنوان اولین و مهمترین آنزیم دخیل در فرایند تولید ترکیبات پلی‌فنلی، تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده قرار داشته است، همبستگی منفی بین وزن‌تر و ترکیبات TFC، TPC، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم PAL نیز بیانگر این موضوع بوده که سلول‌های گیاهی در شرایط تنش با کاهش متابولیت‌های اولیه و افزایش متابولیت‌های ثانویه سعی در کاهش اثرات تخریبی حاصل دارند. به طور کلی از نتایج این آزمایش می‌توان بیان کرد که با بهینه‌سازی غلظت الیستورهای استفاده شده می‌توان به تغییر نسبت ترکیبات بیوشیمیایی در جهت حصول متابولیت‌های ثانویه مورد نظر استویا در شرایط درون شیشه‌ای دست یافت.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، توان آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، فنل کل، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، متیل جاسمونات

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: aghasemnajad@hotmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاهی علفی و چندساله از خانواده کاسنی (Asteraceae) است. برگ‌های این گیاه حاوی مقدار فراوانی از یک دی‌ترپنوئید شیرین با نام استویول گلیکوزید است، استویوزید و ربادیوزید از مهم‌ترین شیرین کننده‌های موجود در برگ این گیاه هستند (Fu and Yin, 2014). این گیاه ارزش اقتصادی بسیار قابل توجه‌ای داشته و از نظر تغذیه‌ای، شیرین کننده‌ای بسیار ارزشمند است (Woelwer-Rieck *et al*., 2010). امروزه با تغییر رویه زندگی به سمت ماشینی شدن و کم تحرکی و همچنین افزایش بیماری‌هایی از قبیل دیابت و چاقی توجه مردم به استفاده از غذاهای کم کالری به جای غذاهای پر کالری و پرانرژی بیشتر شده است (Woelwer-Rieck *et al*., 2010). از طرف دیگر استفاده از غذاهایی با ارزش آنتی‌اکسیدانی بالا به علت افزایش بیماری‌هایی مانند مشکلات قلبی و عروقی و سرطان در میان افراد و دانشمندان از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Tadhani *et al*., 2007). استویا گیاهی است که علاوه‌بر استویول گلیکوزیدها حاوی ترکیبات مهمی مانند پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، استرول‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و گلیکوزیدهای قلبی است، هر چند که مقدار این ترکیبات بسیار کمتر است (Taleie *et al*., 2012; Tadhani *et al*., 2003; Fu and Yin, 2014; Kholtoev *et al*., 2007). بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که عصاره برگ این گیاه می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیکی خاصی مانند مشکلات قلبی عروقی (Cardiovascular) و همچنین بالا بودن فشار خون (hypertension) و قند خون (hyperglycemia) تأثیرگذار باشد. از آنجایی که احتمال دارد این اثرات به علت حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان باشد، بنابراین بررسی میزان ترکیبات فنل و فلاونوئید کل و همچنین همبستگی آنها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضروری به نظر می‌رسد (Tadhani *et al*., 2007). لازم به ذکر است تفاوت در میزان مواد دارویی موجود، ناچیز بودن میزان متابولیت‌های ثانویه، از بین رفتن سریع قدرت جوانه‌زنی بذور و سرعت رشد پایین این گیاه در مزرعه محققان را به طرف کشت درون شیشه‌ای و استفاده از الیسیتورها (محرک‌های تولید متابولیت ثانویه) سوق می‌دهد (Fu and Yin., 2014; Ahmadi Moghadam *et al*., 2013). هر چند که در مورد گیاه استویا بررسی انجام شده بر روی میزان فنل و فلاونوئید کل در عصاره آبی و متانولی برگ و کالوس در سال ۲۰۰۷ نیز نشان داد که میزان این ترکیبات در کالوس (۳۵/۸۶ mg g و ۳۱/۹۹ mg g) بیشتر از برگ (۲۵/۱۸ mg g و ۲۱/۷۳ mg g) در واحد وزن خشک است (Tadhani *et al*., 2007).

اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات دو نمونه از الیسیتورهای طبیعی و بی‌خطر هستند که به عنوان ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق القاء تنش کاذب عمل می‌نمایند (Wang *et al*., 2009; divya *et al*., 2013) استفاده خارجی از این ترکیبات به عنوان یک عامل استرس‌زا و انتقال دهنده پیام عمل کرده و مکانیسم‌های مقاومتی گیاه شامل بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را فعال می‌کند (Gundluch *et al*., 1992; Popova *et al*., 1997). در واقع این ترکیبات بخشی از راه کار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب شده که با اثرات همسو و غیر همسوی خود در تنظیم ژن‌های وابسته به تنش و در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (Moungsrimuandee *et al*., 2011; Raman and Ravi, 2011; Gundluch *et al*., 1992).

متیل جاسمونات ترکیبی است که نقش مهمی در انتقال سیگنال و تنظیم بیان ژن‌های دفاعی در گیاهان بازی می‌کند (Farmer and Ryan, 1990). به طوریکه مطالعات نشان داده‌اند در صورتی که این ترکیب به صورت خارجی (۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومولار) بر کشت سلول‌های گیاهی اعمال گردد سبب افزایش جریان تولید ترکیبات ثانویه مانند ترپنوئیدها، قلاونوئیدها، آلکالوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها می‌گردد (Uppalapati *et al*., 2005; Rischer *et al*., 2006; Wasternack and Hause, 2013). هر چند که بدست آوردن غلظت دقیق ترکیب و زمان اعمال نیازمند آزمایش‌های عملی است. اعمال MeJA در کشت ریشه‌های مویین *P. gineng*

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

سبب افزایش تجمع جینسینوزایدها (Kim *et al*., 2004; Palazon *et al*., 2003; Hahn *et al*., 2003) و همچنین افزایش تجمع پاکلی تاکزول در کشت سلولی *Taxus. spp* (Onrubia *et al*., 2013) افزایش تجمع هیوسیامین و آسکوپولامین در کشت ریشه‌های مویین ترانسژنیک *Hyoscyamus niger* (Zhang *et al*., 2007) افزایش استیلبن و t- resveratrol در کشت سلولی انگور (Belchi-Navarro *et al*., 2012) افزایش ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی در کشت سوسپانسیون *Mentha* × *piperita* و *Lavandula vera* (Krzyzanowska *et al*., 2012; Georgiev *et al*., 2006) افزایش گلیکوزیدهای قلبی در *Thevetia peruviana* (Peruvoside) (Zabala *et al*., 2009) و همچنین افزایش تجمع ترکیباتی مانند کاتارانتین و آرتیمیزین در ریشه‌های مویین و کشت سلولی *Catharantus roseus* و *Artimisia annua* شد (Zhou *et al*., 2010; Baldi and Dixit, 2008). کاربرد SA نیز سبب افزایش بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌گردد، که از آن جمله می‌توان به افزایش پاکلی تاکزول در کشت سوسپانسیون *T. chinensis* (۲۰ میلی‌گرم برلیتر) (Wang *et al*., 2007) و *T. baccata* (Khosroushahi *et al*., 2006)، افزایش پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی (Podophyllotoxin) در *Linum album*، افزایش جینسینوزاید در کشت ریشه‌های نابه‌جا و ریشه‌های مویین در *P.ginseng* (Ali *et al*., 2007; Ali *et al*., 2006; Jeong *et al*., 2005; Tewari and Paek, 2011) اشاره کرد. از ترکیبات دیگری که SA می‌تواند نقش محرک در تجمع آنها داشته باشد می‌توان به بیلوبالید و جینکولوئید A و B در سوسپانسیون سلولی *P. ginseng* (Kang *et al*., 2006)، استیلبن در سوسپانسیون سلولی *V. vinifera* و نفتودیانترون‌ها در کشت سلولی *Hypericum perforatum* (Gadzovska *et al*., 2013) اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده: نمک‌های مورد استفاده جهت تهیه محیط کشت MS، آگار، ساکارز، کربنات سدیم، اسید گالیک، آلومینیوم کلرید، استات پتاسیم، کوئرستین، فسفات مونو و دی سدیم از شرکت مرک (آلمان) و SA، MJ، بنزیل‌آدنین، نفتالین استیک اسید، DPPH، فنیل آلانین از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد.

استقرار ریزنمونه در محیط کشت: برای انجام پژوهش، برگ‌های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) از مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع آوری شده و زیر هود لامینار توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی شدند (Tadhani *et al*., 2007) سپس نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شده و در محیط کشت MS مایع (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (جهت کالوس‌زایی) که حاوی الیسیتورهای MeJA و SA در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکرومولار بودند کشت شدند. ظروف کشت شده بر روی شیکر، با دمای محیطی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰ لوکس) نگهداری شدند (Tadhani *et al*., 2007). پس از ٤ هفته اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه انجام شد.

استخراج عصاره متانولی: برای تهیه عصاره متانولی ۰/۲۵ گرم از کالوس در ۲/۵ میلی‌لیتر از متانول ۸۰ درصد هموژنیزه شده، سپس ٢٤ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد، پس از آن مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی صاف شد (واتمن شماره ٤٢) (Raman, 2006).

رشد نسبی کالوس (Callus relative fresh weight Growth): رشد نسبی کالوس‌ها براساس وزن تر (RFWG) برای هر تیمار از روش زیر محاسبه شد (Lokhande *et al*., 2010):

$$RFWG = [(W2-W1)/W1]$$

که در آن W1 و W2 به ترتیب وزن اولیه و نهایی کالوس در مرحله تنش میباشد.

فنل کل: سنجش فنل کل به روش فولین سیوکالتیو انجام شد (Slinkard and Singleton, 1977). به این منظور ۱۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (۰/۲۵ گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪) با ۵۰ میکرولیتر فولین سیوکاتیو و ۵۸۰ میکرولیتر آب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

مقطر مخلوط شده و پس از ۵ تا ۸ دقیقه استراحت ۱۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱ مولار به آن اضافه شد. سپس محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار۴۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شده و در نهایت میزان جذب در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت شد. برای شاهد نیز به جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون فنل کل از استاندارد گالیک اسید استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا با استاندارد یک محلول پایه ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه شد. با توجه به دامنه طول موج جذب شده نمونه‌ها غلظت‌های (۷۰۰، ٦۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۵ میلی‌گرم‌برلیتر) تهیه شده و جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Camspec M501) در طول موج ۷٦۵ قرائت گردید. غلظت صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. با استفاده از برازش خط با نقاط حاصل از جذب قرائت شده، معادله خط تعیین و مقادیر تقریبی نمونه‌ها محاسبه شد.

فلاونوئید کل: سنجش محتوی فلاونوئیدی به روش کلرید آلومینیوم انجام شد (Chang *et al.*, 2002). برای اندازه‌گیری فلاونوئید ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرارداده شد و میزان جذب در طول موج ٤۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای شاهد به جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون فلاونوئید از استاندارد کوئرستین استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا، با استاندارد یک محلول پایه ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تهیه کرده و با توجه به دامنه طول موج جذب شده توسط نمونه‌ها غلظت‌های (۷۰۰، ٦۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۵ میلی‌گرم‌برلیتر) تهیه شده و جذب هر یک به روشی که برای نمونه‌ها ذکر شده، قرائت گردید. غلظت صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شده و نمودار کالیبراسیون با استفاده از برازش خط با نقاط حاصل از جذب قرائت محاسبه گردید.

اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد به روش DPPH: برای تعیین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از روش Bondet و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. ۲ میلی لیتر از DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به ۲ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده از کالوس افزوده و سپس ۱۵دقیقه در محیط تاریک قرارداده شد (AS). بلافاصله با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. یک نمونه به عنوان شاهد (AC) در نظر گرفته شد که حاوی ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با استفاده از متانول انجام شد. اعداد بدست آمده با فرمول: (AC-AS)/AC = درصد مهار رادیکال آزاد به درصد مهار تبدیل شد. سپس نتایج بصورت IC 50 (غلظتی از ماده که لازم است تا ۵۰ درصد از اکسیدان DPPH را کنترل کند) بیان گردید (Brand-Williams *et al.*, 1995).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): سنجش فعالیت آنزیم PAL با استفاده از روش Saunders و همکاران (۱۹۷٤) با کمی تغییر انجام شد. به این منظور ۰/۱ گرم از بافت کالوس با استفاده از ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH =۷ کوبیده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g ۵۰۰۰ در دمای C° ٤ سانتریفیوژ شده و از عصاره رویی برای سنجش آنزیم استفاده شد. برای سنجش آنزیم نمونه شامل ml۲۵۰ عصاره آنزیمی ml ۲۵۰ بافر بورات سدیم (۱۰ مولار، pH = ۸/۸)، ml ۲۵۰ آب مقطر به اضافه ml ۲۵۰ بافر سوبسترای فنیل آلانین (۵۰ میلی مولار) بود. سپس جذب آن در طول موج nm۲۹۰ و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. محاسبه فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیرلامبرت (A= Ɛcl) و با ضریب خاموشی (μ^{-1} cm^{-1} ۹٦۳۰) و بر حسب میکرومول در ۹ واحد وزن تر نسبی انجام شد. که در این فرمول A نشان دهنده میزان جذب، Ɛ نشانگر ضریب خاموشی، C بیانگر غلظت نمونه و l نشان‌دهنده‌ی قطر کووت مورد استفاده است که معمولاً ۱ سانتی‌متر می‌باشد.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار انجام گرفته و داده‌های حاصل از تحقیق با استفاده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

از روش واریانس چند طرفه (ANOVA) آنالیز شده و تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD (Least significant difference) در سطح ۵ درصد بررسی شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Statical package for the social science) و نمودارها و جداول توسط برنامه Excel 2010 انجام شد.

نتایج:

نتایج بررسی حاضر نشان داد که (جدول ۱) **تأثیر** تیمارهای مختلف متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر محتوای فلاونوئید کل، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، وزن‌تر و میزان فعالیت آنزیم PAL کالوس استویا در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است.

تغییر وزن تر نسبی کالوس تحت تأثیر میزان اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات موجود در محیط کشت: نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد (شکل ۱) که کاربرد الیستورها بر میزان وزن‌تر نسبی معنی‌دار بوده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش تنش ناشی از اسید سالیسیلیک از میزان وزن تر نسبی کالوس کاسته شد. به طوریکه بیشترین وزن تر نسبی در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار ۲۵۰ میکرومولار مشاهده شد. نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات نیز نتایجی مشابه با این نتیجه را نشان دادند به طوریکه نمونه‌ی شاهد دارای بالاترین میزان وزن‌تر نسبی بود.

تغییرات ترکیبات فنلی تحت تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید: بررسی اثر متیل جاسمونات بر محتوای فنل کل کالوس (شکل ۲) نشان داد که با افزایش غلظت از صفر تا ۲۰۰میکرومولار میزان ترکیبات فنلی افزایش و در ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار کاهش می‌یابد. محتوای فنلی در۲۰۰ میکرومولار در حداکثر مقدار بوده و نسبت به نمونه شاهد افزایش ۲ برابری نشان داد. البته بین تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. جالب اینکه با افزایش بیشتر غلظت متیل جاسمونات نه تنها افزایش تجمع ترکیبات فنلی مشاهده نشد، بلکه روند تجمع فنل کاهش یافت. میزان فنل کل تحت **تأثیر** اسید سالیسیلیک نیز افزایش نشان داد (شکل ۲). به طوریکه با افزایش غلظت این ترکیب تا ۲۵۰ میکرومولار محتوای فنلی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. البته لازم به ذکر است که بین تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار اختلاف معناداری وجود نداشت.

تأثیر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید کالوس: بررسی انجام شده نشان داد که افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات با افزایش محتوای فلاونوئیدی رابطه‌ی مثبتی داشته است. به طوریکه با افزایش غلظت این ترکیبات محتوای فلاونوئید کل نیز افزایش یافت (شکل ۳). حداکثر محتوای فلاونوئیدی متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به ترتیب در سطوح ۱۰۰ و۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد.

تغییرات توانمندی آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید: بررسی اثر متیل جاسمونات (شکل ٤) بر توانمندی آنتی‌اکسیدانی کالوس بیانگر روند افزایشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تا سطح ۲۰۰ میکرومولار و سپس کاهش آن است. البته بین غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در واقع متیل جاسمونات به عنوان یک الیسیتور تا سطح ۲۰۰ میکرومولار به عنوان محرک عمل کرده و سبب افزایش فعالیت سلول در مقابل با استرس القایی شد. با افزایش سطح متیل جاسمونات و غلبه شرایط استرس بر سیستم فیزیولوژیکی سلول از واکنش سلول کاسته شده و به دنبال آن کاهش تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نیز مشاهده شد. نکته جالب اینکه روند مشابه‌ای در مورد نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک مشاهده شد (شکل ٤). به طوریکه تحت **تأثیر** سطح ۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک حداکثر توانمندی آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس مشاهده شد.

تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز: بررسی انجام شده نشان داد که افزایش غلظت متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک تا سطح ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش محتوای آنزیم PAL و غلظت‌های بیشتر سبب کاهش آن شد.

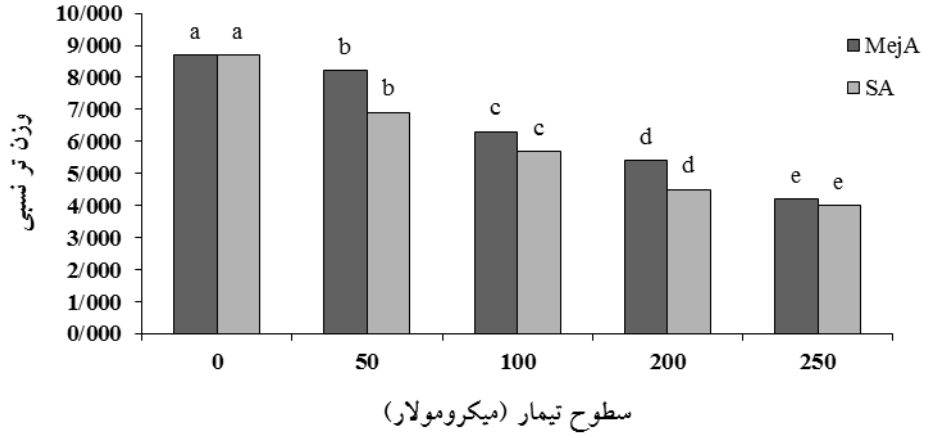
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

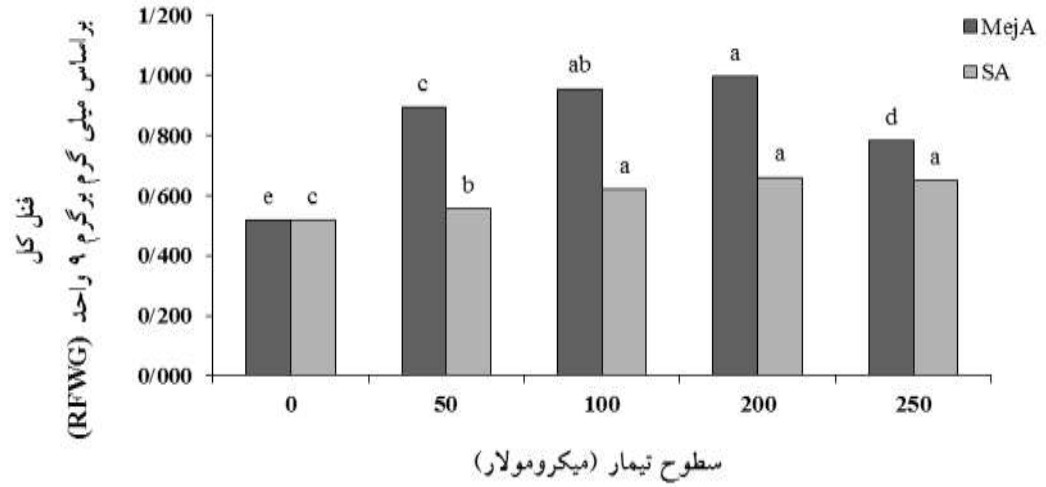
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات بر وزن تر، فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا

		میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	فنل	فلاونوئید	آنتی اکسیدان	وزن تر نسبی	فنیل‌آلانین آمونیالیاز
سالیسیلیک‌اسید	٤	۱/۲۸۹**	۰/۰۸۳**	۸۳۹۷/۳٦۸**	۳۸/۳۸٥**	۰/۱٤٦**
متیل جاسمونات	٤	۰/٤۳۸**	۰/۰۷۸**	۷۰٤۸/٤۱۲**	٤٥/۸۸٤**	۰/۲٤۳ **
خطای آزمایش	٥۰	۰/۰۰۰۰۱۲٦	۰/۰۰۰۰۰۹	۰/۱۰	۰/۰۰۰۰۱۷	۰/۰۲۱
ضریب تغییرات		٤/۷۲۹	۱/۷۱۸	۱/۰۸۰	۰/۷٦۰۷۷	۰/۰۹۱۰

** معنی‌داری درسطح احتمال یک درصد



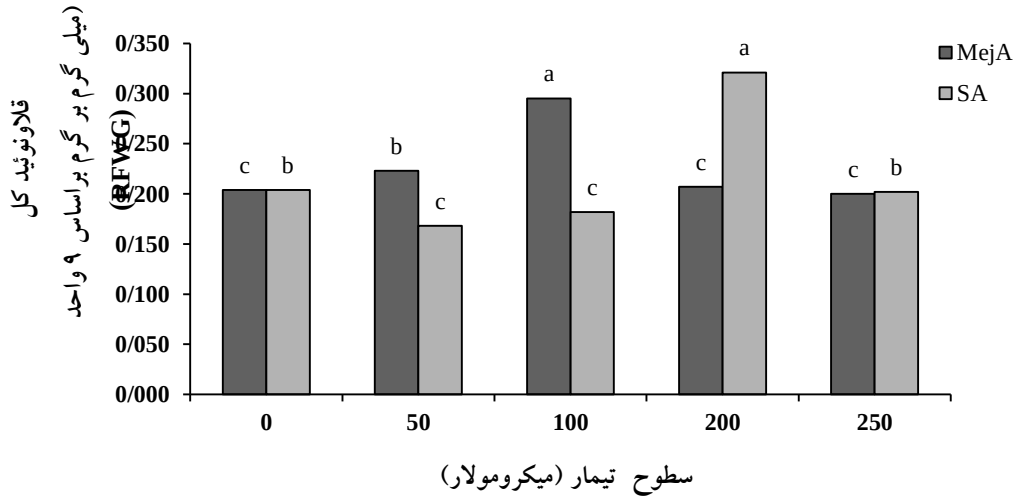
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر وزن تر نسبی کالوس استویا. در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.



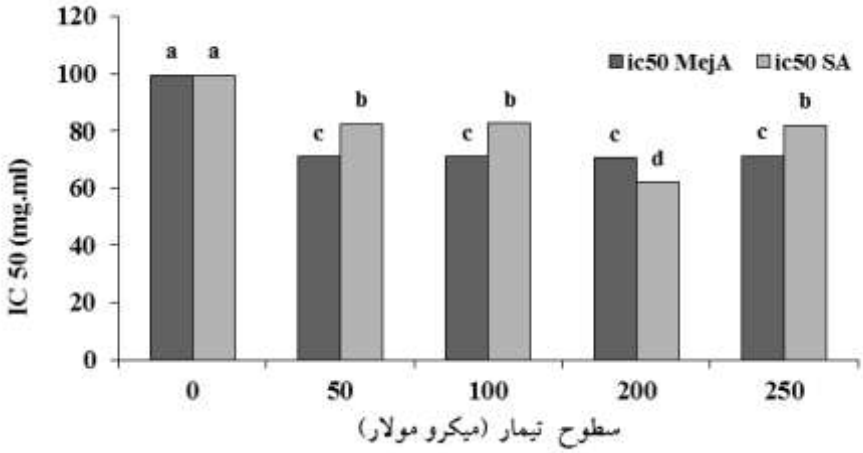
شکل ۲- تغییرات محتوای فنل کل کالوس استویا تحت تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات. در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر محتوای فلاونوئید کل کالوس استویا. در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ٤- مقایسه توان آنتی‌اکسیدانی کالوس استویا تحت تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات. در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

هر چند که لازم به ذکر است در تیمار با اسیدسالیسیلیک میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۵۰ میکرومولار نیز در بیشینه مقدار بوده است. با بررسی نمودارهای مربوط به اثر متقابل الیسیتورها نیز می‌توان مشاهده کرد که آنزیم در تیمار ۱۰۰ میکرومولار از متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در بالاترین میزان فعالیت را داشته و افزایش غلظت سبب کاهش فعالیت PAL می‌گردد (شکل ۵).

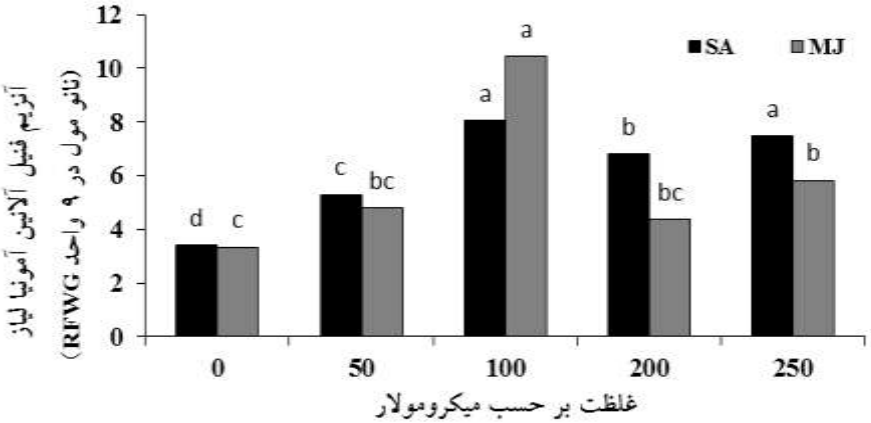
با مقایسه‌ی روند تجمع ترکیبات فنل و فلاونوئید کل می‌توان دریافت روند تغییر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز همبستگی مثبتی داشته و با افزایش و یا کاهش فعالیت آنزیم، محتوای فنلی و فلاونوئیدی نمونه‌ها نیز افزایش و یا کاهش نشان می‌دهد (شکل ۲، ۳، ٤ و ۵). هر چند که لازم به ذکر است این پدیده در متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور با ثبات‌تر به وضوح دیده می‌شود.

بحث

بررسی اثر MJ بر محتوای فنل‌کل کالوس نشان داد که با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]



شکل ۵- تغییرات فعالیت آنزیم PAL در تیمار با سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات. در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

افزایش غلظت از صفر تا ۲۰۰میکرومولار میزان ترکیبات فنلی افزایش و در ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار به دلیل عدم توانمندی بیشتر سلول به پاسخ‌گویی به غلظت‌های بالای الیسیتور کاهش می‌یابد. مطالعه Andi و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نیز نشان داد که کاربرد MJ در غلظت ۵۰ میکرومولار حداکثر تأثیر را در افزایش تولید TPC (۳۹۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) و TFC (۶۰۸/۵۹ میلی‌گرم کاتچین در گرم وزن خشک) در کشت سوسپانسیون انگور داشته است، که این مقدار برای TPC و TFC به ترتیب ۳/۹۲ – ۳/۶۲ و ۵/۷۰ و ۶/۶۶ برابر نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با متانول است. علاوه بر این نتایج بررسی مذکور نشان داد که مصرف MJ سبب افزایش تجمع استیلبن شده در حالیکه میزان تولید این ترکیبات با میزان بیومس رابطه عکس دارد. نتایج این بررسی همچنین بیانگر همبستگی مثبت بین میزان فنل و فلاونوئید کل و همبستگی منفی بین TPC و TFC و وزن‌تر است. در بررسی دیگری در سال ۲۰۱۵ تأثیر UV-C، MJ و SA بر تولید استیلبن در کشت سوسپانسیون انگور مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بیان شد که میزان TFC در نمونه‌های تیمار شده با SA و MJ حدوداً ۱/۴۹ و ۲ برابر نمونه‌های تیمار نشده بوده و میزان TPC در نمونه‌های تیمار شده با MJ پس از ۴۸ ساعت در ماکزیمم مقدار بوده که حدوداً ۳/۹ برابر نمونه‌های تیمار نشده است، این در حالی است که SA تأثیر معنی‌داری بر میزان TPC نداشته است (Xu *et al*., 2015).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر کاهش وزن‌تر کالوس با افزایش غلظت الیسیتورهای به‌کار برده شده است. که این نتایج با نتایج Xu و همکارانش در کشت سوسپانسیون انگور مشابه است، در این بررسی بیان شده که افزایش غلظت SA و MJ سبب کاهش وزن‌تر می‌گردد (Xu *et al*., 2015). کاهش وزن‌تر با افزایش غلظت MJ در مطالعاتی از قبیل کشت سلولی *Fagopyrom esculentum* (Hu *et al*., 2011) و *Mentha piperita* (Krzyzanowska *et al*., 2012) نیز گزارش شده است. مطالعات بیان کرده‌اند کاربرد MJ ااحتمالاً با کاهش جذب مواد غذایی و آب توسط سلول‌ها سبب افزایش زمان تقسیم سلولی می‌گردد (Donnez *et al*., 2011). تأثیر SA بر کاهش وزن تر نیز در کشت سلولی *Rubia cordifolia* (Bulgakov *et al*., 2002) و *Hypericum perforatum* (Gadzovska *et al*., 2013) گزارش شده است. پتانسیل SA در القاء استرس در سلول‌های گیاهی تحت تیمار این ترکیب سبب می‌شود سلول‌ها رفتارهای رشدی یک سلول تحت تنش از جمله افزایش مواد جامد قابل حل، کاهش اندازه‌ی سلول و تغلیظ محلول سیتوپلاسمی را نشان دهند. به همین دلیل کاربرد SA کاهش نسبی وزن‌تر سلول‌ها را به همراه دارد (Namedo., 2007). نتایج این آزمایش مبنی بر کاهش وزن‌تر با نتایج Zangane و همکاران (۲۰۱۰) در کشت سلولی *Datura metel*

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

و Bulgakov و همکاران (۲۰۰۲) در کشت سلولی *rubia cordifolia* مطابقت داشت.

به طور کلی می‌توان بیان کرد کاهش وزن تر با افزایش غلظت SA و MJ احتمالاً راهکاری است که گیاه برای به حداکثر رساندن توان تولید متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهد. در واقع با کاهش تولید و عملکرد متابولیت‌های اولیه، تولید مواد دفاعی برای محافظت از سلول افزایش می‌یابد. بنابراین جهت دستیابی به یک تولید به‌صرفه و پایدار اقتصادی علاوه بر سطح تولید مواد ثانویه باید میزان عملکرد زیست‌توده نیز مد نظر قرار گیرد.

در اکثر گونه‌های گیاهی آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) مرحله کلیدی، تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک و تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی را کاتالیز می‌کند. فعالیت PAL در گیاهان تحت کنترل عوامل داخلی و خارجی مختلفی مانند هورمون‌ها، مواد غذایی، نور (از طریق تأثیر بر فیتوکروم‌ها) آلودگی‌های قارچی و زخم‌ها قرار می‌گیرد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله مواردی هستند که در گیاه در مواجه با استرس‌های زنده و غیرزنده تجمع می‌یابند، تجمع این ترکیبات ناشی از القای بسیار سریع بیان ژن PAL است. بررسی حاضر نیز نشان داد که در گیاه استویا نیز، محرک‌های MJ و SA با تحریک تولید PAL نقش مؤثری در افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ایفا کرده و سبب افزایش تجمع این ترکیبات و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده‌اند (Shabani *et al*., 2009; Wen *et al*, 2005; Kang and Salt Veit, 2003). این نتایج با نتایج مطالعه Lee و همکارانش (۲۰۱۵) مطابقت دارد، آنها نیز نشان دادند که کاربرد MJ و SA در کشت ریشه‌های نابه‌جا *Eleutherococcus koreanum* در بیوراکتور سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) می‌گردد. Ali و همکارانش (۲۰۱۰) نیز با مطالعه کشت سلولی در *Artemisia absinthium* نشان داد که MJ در غلظت بهینه سبب افزایش مهار رادیکال‌های DPPH می‌گردد. در بررسی دیگری بر روی *Phyllanthus pulcher* در کشت درون شیشه‌ای بیان شد که کاربرد MJ و SA سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده، علاوه‌بر این در این پژوهش بیان شد که همبستگی مثبتی بین TFC و TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (Danaee *et al*., 2015). بررسی‌های Xu و همکارانش (۲۰۱۵) در کشت سلولی انگور نیز نشان داد که کاربرد MJ و SA سبب تحریک بیان ژن‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانوئیدی (PAL, 4CL, C4H) می‌شود، در مطالعه دیگری که Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر کشت سلولی گل راعی انجام دادند نشان دادند که کاربرد MJ با تحریک آنزیم PAL سبب افزایش فلاونوئیدها می‌گردد. علاوه بر این Zhao وهمکارانش نیز گزارش کردند که در کشت سلولی *Salvia miltiorrhiza* هم کاربرد الیسیتورهای زنده و هم الیسیتورهای غیرزنده سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL و افزایش تولید تانشینون می‌گردد (Zhao *et al*., 2010).

به ظور کلی می‌توان بیان کرد که MJ می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده رشد ایفای نقش کرده و با بیان ژن و تحریک تولید کلسیم و لیپواکسیژناز سبب ایجاد شرایطی مشابه تنش شود (Creel man and Mullet, 1997). همچنین در رونویسی ژن‌های بازدارنده‌ی پروتئینازها، آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز فلاونوئیدها و لیپواکسیژنازها که همه‌ی آنها سبب ایجاد مقاومت گیاه در برابر انواع استرس‌ها می‌شوند مؤثر است. در پاسخ به آلودگی‌های قارچی متیل‌جاسمونات سنتز آنزیم PAL و چالکون سنتاز را فعال می‌کند که بسیاری از ترکیبات دفاعی از این متابولیت‌ها مشتق می‌شوند (Larrond *et al*., 2003). و SA نیز به عنوان یکی دیگر از عوامل مهم درونی در انتقال سیگنال‌های استرس با تنظیم فعالیت PAL در سطح رونویسی سبب فعال‌سازی بسیاری از پاسخ‌های دفاعی در گیاه می‌شود (walter heldet, 2011). این ترکیب به عنوان یک محرک طبیعی سبب سنتز آنزیم‌های دفاعی گیاه از قبیل β-۱-۳-گلوکوناز (هضم دیواره سلولی قارچ‌ها) و لیپواکسیژناز (آنزیم اصلی مسیر بیوسنتزی اسید جاسمونیک) (آبشار پیام‌رسانی وابسته به یون‌ها Ca^{++} و MAP کینازها (mitogen-activated protein kinase) می‌گردد (Walter heldet, 2011). در واقع SA و MJ از طریق فعال‌سازی آنزیم‌هایی چون PAL و یا بیان ژن‌های دخیل در پروسه بیوسنتزی، باعث القای متابولیت‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

ثانویه از قبیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌شوند (Popova *et al*., 1997). همبستگی مثبت بین فلاونوئید کل، فنل کل و توان آنتی‌اکسیدانی بیانگر نقش این ترکیبات در قابلیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا می‌باشد. از یک طرف SA و MJ با تغییر در سطوح پراکسید هیدروژن سبب فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسیدازدیسموتاز و پلی‌فنل‌اکسیداز (Dat, 1998; Scandalise, 1993) شده و از این طریق سبب فعال شدن مکانیسم مقاومت به تنش‌های محیطی می‌گردند و از طرف دیگر این ترکیبات احتمالاً با تأثیر بر بیان ژن‌ها و کنترل آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در گیاه استویا سبب فعال‌سازی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌گردند (Wen *et al*., 2005; Wang *et al*., 2009). در واقع این ترکیبات با القای تنش، مسیر سیگنالینگ را فعال نموده و با افزایش رونویسی از mRNA خاص PAL سبب افزایش تولید ترکیبات فنولیک شده که این ترکیبات با استرس القاء شده مقابله می‌کنند.

نتیجه‌گیری

ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی دارای ارزش هستند. لذا هر عاملی که بتواند ضمن ایجاد کمترین تغییر در ساختار ژنتیکی گیاه تولید این ترکیبات را افزایش دهد مفید خواهد بود. در مقایسه با گیاهان دست نخورده، سلول‌ها و بافت‌ها برای مطالعه تغییرات تولید متابولیت‌ها قابلیت بیشتری دارند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک به عنوان ترکیبات فیتوهورمونی مهم در اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس گیاه استویا نقش مؤثری ایفا می‌کنند. کالوس گیاه استویا می‌تواند با القای بیان ژن‌ها و تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی نقش مؤثری در افزایش توان آنتی اکسیدانی گیاه و همچنین مقابله با استرس‌های اعمال شده ایفا کند. نتایج بدست آمده نشان دادند که افزایش الیسیتور بیش از حد معمول نه تنها افزایش متابولیت را در بر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌ها که به احتمال قوی تحت **تأثیر** کاهش بیان ژن مربوطه است. تولید متابولیت را کم و یا متوقف می‌کند. بنابراین با بهینه‌سازی غلظت الیسیتور و ترکیبات غذایی محیط کشت می‌توان بدون دستکاری در ساختار ژنتیکی گیاه و با افزایش فعالیت آنزیم‌ها میزان برخی از متابولیت‌های ثانویه‌ی مورد نظر را افزایش داد.

منابع

Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K. H., Bahramnejad, B. and Habibi, P. (2013) Methyl jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). Bulletin on Environmental Pharmacology and Life Science 2: 89-94.

Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H. and Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. Phytochemistry Reviews 9: 357–378.

Ali, M. B., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2007) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolic in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules 12: 607–621.

Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Reports 25: 613–620.

Andi, S. A., Gholami, M. and Ford, C. M. (2017) The effect of methyl jasmonate and light irradiation treatments on the stilbenoid biosynthetic pathway in *Vitis vinifera* cell suspension cultures, Natural Product Research 29: 1-9.

Baldi, A. and Dixit, V. K. (2008) Yield enhancement strategies for Artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. Bioresource Technology 99: 4609–4614.

Belchi-Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R. and Pedreno, M. A. (2012) Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using Cyclodextrins and methyl jasmonate. Plant Cell Reports 31: 81–89.

Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel-Wissenschaft Und -Technologie 30: 609-615.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 28:25- 30.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., Zvereva, E. V., Fedoreyev, S. A. and Zhuravlev, Y. N. (2002) Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. Journal of Biotechnology 97:213–221.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Analysis 10: 178-182.

Creel man, A. R. and Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-81.

Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Abdul Kadir, M., Sinniah, U. R., Mohamad, R. and Taha, R. M. (2015) Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. Brazilian Journal of Botany 38: 265- 272.

Dat, j., Foyer, C. H. and Scott, I. M. (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermo tolerance in mustard seedlings. Plant physiology 118: 1455-1461.

Divya, P., Puthusseri, B. and Neelwarne, B. (2013) The effect of plant regulators on the concentration of caretonoids and phenolic compound in foliage of Coriander. Food Science and Technology 110-120.

Donnez, D., Kim, K. H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clement, C. and Courot, E. (2011) Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. Process Biochemistry 46:1056–1062.

Farmer, E. E. and Ryan, C. A. (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences 87: 7713–7716.

FU, X and Yin, Z. P. (2014) Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63: 262- 268.

Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagege, D., Courtois, D. and Joseph, C. (2013) The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 113:25–39.

Georgiev, M. I., Kuzeva, S. L., Pavlov, A. I., Kovacheva, E. G. and Ilieva, M. P. (2006) Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* cell suspension culture with abiotic elicitors. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 301–304.

Gundluch, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M. and Zenk, M. H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell Cultures. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 98: 389-2393.

Hahn, E. J., Kim, Y. S., Yu, K. W., Jeong, C. S and Paek, K. Y. (2003) Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. Journal of Plant Biotechnology 5: 1–6.

Hu, Y. H., Yu, Y. T., Piao, C. H., Liu, J. M. and Yu, H. S. (2011) Methyl jasmonateand salicylic acid-induced D-chiro-inositol production in suspension cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106:419–424.

Jeong, G. T., Park, D. H., Ryu, H. W., Hwang, B., Woo, J. C., Kim, D. and Kim, S.W. (2005) Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy roots: I. Enhanced production of secondary metabolite in hairy root cultures by elicitation. Applied Biochemistry and Biotechnology 124: 1147–1158.

Kang, H. M., Salt Veit, M. E. (2003) A wound-induced increase in phenolic content of fresh-cut lettuce is reduced by a short immersion in aqueous hypertonic solution. Post-Harvest Biology and Technology 29: 271-277.

Kang, S. M., Min, J. Y., Kim, Y. D., Kang, Y. M., Park, D. J., Jung, H. N., Kim, S. W. and Choi, M. S. (2006) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 42: 44–49.

Kholtoev, F. T., Faizullaeva, N. S., Usubbaev, M. U. and Khakimov, K. H. M. (2003) Selection composition and developing the technology of dry stevia extract tablets. Journal of Pharmaceutical 37: 42-45.

Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. and Omidi, Y. (2006) Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International 30: 262–269.

Kim, Y. H., Kim, Y., Cho, E. K., wak, S., Kwon, S., Bae, J and Huh, G. H. (2004) Alterations in intracellular and extracellular activities of antioxidant enzymes during suspension culture of sweet potato. Phytochemistry 65:2471–2484.

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.

Larrond, F., Gaudillere, J. P., Krisa, S., Decend, A., Deffieux, G. and Merillon, J. M. (2003) Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. American Journal of Enology and Viticulture 54: 63-66.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

Lee, E. J., Park, S. Y. and Yoeup, K. (2015) Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120:1–10.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D, and Penna, S. (2010) Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 102: 17-25.

Moungsrimuandee, B., Moriwaki, H., Nakayama, M., Nishigaki, S. and Yamamato, F. (2011) Effects of injection of etherl, methyl jasmonate and salicylates and *Raffaelea Quercivora* incubation on sapwood discoloration in *Quercus Serrata* 32: 41-53.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiology Plant 15: 473-497.

Namedo, A. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacogonesy Review 1: 69-79.

Onrubia, M., Cusido, R. M., Ramirez, K., Hernandez-Vazquez, L., Moyano, E., Bonfill, M. and Palazon, J. (2013) Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: Paclitaxel and its derivatives. Current Medicinal Chemistry 20: 880–891.

Palazon, J., Cusido, R. M., Bonfill, M., Mallol, A., Moyano, E., Morales, C and Pinol, M. T. (2003) Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiology and Biochemistry 41: 1019–1025.

Popova, L., Pancheva, T. and Uzonova, A. (1997) Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. Plant Physiology 23: 85-93.

Raman, N. (2006) Phytochemical Techniques. New India Publishing Agency, New Delhi, India.

Raman, V. and Ravi, S. (2011) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of heamato *coccus pluvialis*. Acta Physiology Plant 33: 1043-1049.

Rischer, H., Oresic, M., Seppanen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., van Montagu, M. C., Inze, D., Oksman-Caldentey, K. M. and Goossens, A. (2006) Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 5614–5619.

Saunders, J. A., and Mcclure, J. W. (1974) The suitability of a quantitive spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity inbarely, buckwheat and pea seedlings. Plant Physiology 54: 412-413.

Scandalise, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxise dismutase. Plant Physiology 101: 7-12.

Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asghari Gand Emami, J. (2009) Glycyrrhizin production by invitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology 56: 621-626.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49-55.

Tadhani, M. B., Patel, V. H. and Subhash, R. (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis 20: 323–329.

Taleie, N., Hamidoghli, Y., Rabiei, B. and Hamidoghli, S. (2012) Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4: 298-302.

Tewari, R. K. and Paek, K. Y. (2011) Salicylic acid-induced nitric oxide and ROS generation stimulate ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* roots. Journal of Plant Growth Regulation 30: 396–404.

Uppalapati, S. R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D. A., Mitchell, R. E., Jones, W. and Bender, C. L. (2005) The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. The Plant Journal 42: 201–217.

Walter heldet, H. (2011) Plant biochemistry (eds. Abasi, a., Rahmani, M. S. H. and Vafaii, Y.) Pp. 542- 583.Tehran university press, Tehran.

Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y. (2015) Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresources and Bioprocessing 2: 5.

Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z. and Zheng, Y. (2009) Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bayberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 5809-5850.

Wang, Y. D., Wu, J. C. and Yuan, Y. J. (2007) Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. Cell Biology International 31: 1179–1183.

Wasternack, C. and Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Annals of Botany 111: 1021–1058.

Wen, P. F., Chen, J. H., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B., and Hoang, W. D. (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia lyase gene in grape berry. Plant Science 169: 928-934.

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. and Wust, M. (2010) Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana* . European Food Research and Technology 231: 581-588.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

Xu, A., Zhan, J. C. and Huang, W. D. (2015) Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. *Cabernet Sauvignon*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 122: 197–211.

Zabala, M. A., Angarita, M., Restrepo, J. M., Caicedo, L. A. and Perea, M. (2009) Elicitation with methyl-jasmonate stimulates Peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 46: 233–238.

Zangane, V., Asghari, A and Ehsan poor, A. A. (2010) Effect of salicylic acid on atropine production in *Datura metel* L. callus culture. Journal of Plant Science 16: 29-36.

Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W. and Tang, k. (2007) Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyl transferase is methyl jasmonate-dependent. Planta 225: 887–896.

Zhao, J. L., Zhou, L. G. and Wu, J. Y. (2010) Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 87:137–144.

Zhou, M. L., Zhu, X. M., Shao, J. R., Wu, Y. M. and Tang, Y. X. (2010) Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. Applied Microbiology and Biotechnology 88: 737–750.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]

Influence of Salicylic acid and Methyl jasmonate on fresh weight, total phenol, total flavonoids, antioxidant and PAL enzyme activity of Stevia callus

Saba Samadi[1], Azim Ghasemnezhad[2*], Mahdi Alizadeh[2]

[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz , Iran,
[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agriculrural
(Received: 10/07/2017, Accepted: 23/04/2018)

Abstract

Stevia rebaudiana Bertoni is an herbaceous and perennial plant with an important commercial use. In the present study, we investigated effects of various SA and MJ concentration on fresh weight, TFC, TPC, PAL enzyme and antioxidant activity. Leaf explants were placed on Murashige and Skoog (MS) medium and exposed to elicitors (0, 50, 100, 200 and 250 µM SA and MJ). 2 mg.l BA and 2mg.l NAA used for callus induction. Results showed that, when elicitors applied to cell culture, phenyl propanoid compounds, antioxidant activity and PAL enzyme activity were increased. Application of MeJA and SA at 100 and 200µM had the highest effect on the production of measured TPC whereas TFC obtained in 100 µM of both elicitors. Moreover, maximum antioxidant activity was obtained in 200 µM of SA and MJ. A positive correlation between antioxidant activities, TFC and TPC showed that phenolic compounds might play a key role in antioxidant activity of stevia. Although it was noteworthy remarkable that accumulation of Phenolic compounds, antioxidant activity and PAL enzyme activity was in positive correlation, that may be sign of key role of PAL on phenolic compounds production. Observed negative correlation of elicitors' application with callus fresh weight indicated that under real or pseudo stress condition the plant cell tried to balance primary and secondary metabolites. Based on the obtained results, it can be concluded that poly phenolic compounds production, can be strongly changed by application exogenous elicitor compounds.

Key worlds: Flavonoids, Methyl Jasmonate, PAL, Salicylic Acid, Stevia, Total Phenol

Corresponding author, Email: aghasemnajad@hotmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.4.2]