

تأثیر الیسیطور دمای پایین در مدت زمان‌های مختلف در محیط کشت ریشه نابجا گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)

فرحناز توکلی^۱، محمد رفیعی الحسینی^۱، رودابه راوش^{۲*} و مرتضی ابراهیمی^۳

^۱ گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

^۲ گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

^۳ استادیار بخش متابولیت‌های ثانویه گیاهان زراعی و باغی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، منطقه مرکزی، اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳)

چکیده

کاربرد الیسیطورهای غیرزیستی در مسیرهای بیوستزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می‌شود بسیار حائز اهمیت است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر الیسیطور دمای پایین بر میزان هایپریرسین، فلاونوئید، فنل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و وزن خشک گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) انجام شد. بذرها از رقم توپاز، بذور در محیط کشت MS در ظروف استریل کشت داده شدند و در اتاق رشد با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند، این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا و تأثیر دماهای ۴، ۸، ۱۶ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین میزان هایپریرسین در دمای ۴ درجه به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۰/۵۹ و ۰/۵۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴ درجه به مدت یک هفته با میزان ۰/۸۷ درصد مشاهده شد. با افزایش دما به ۱۶ درجه (به مدت ۲۴ ساعت) کمترین میزان هایپریرسین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید. اعمال دمای ۴ درجه به مدت یک هفته سبب افزایش میزان فلاونوئید گردید. بیشترین میزان فنل نیز در نمونه‌های تحت تیمار ۴ درجه به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۵/۶۵ و ۵/۰۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک حاصل شد. اعمال دمای ۴ درجه به مدت یک هفته بیشترین تأثیر را بر وزن خشک گیاه نشان داد. با توجه به افزایش متابولیت ثانویه هایپریرسین، فنل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل راعی پس از اعمال دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت)، کاربرد این دما جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه گل راعی توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: الیسیطور غیرزیستی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، وزن خشک، هایپریرسین

مقدمه

لحاظ دارویی، ضروری به نظر می‌رسد. ژنتیک، محیط و اثرات متقابل آن‌ها از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی است (Yavari and Shahgolzari, 2016).

پژوهش در عرصه گیاهان دارویی ایران از نظر مواد مؤثره و کارایی فارماکولوژیکی برای پیدا کردن اکوتیپ‌های غنی از

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: r.ravash@gmail.com

(*et al.*, 2011).

به‌طورکلی استفاده از ایسیتورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت‌های گیاهی با هدف به‌دست‌آوردن اطلاعاتی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می‌شود و همچنین افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه برای کاربرد تجاری دنبال می‌شود (Isah, 2019). امروزه روش‌های ارزشمندی مانند کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی از اهداف مورد توجه محققین است و بررسی و مطالعات بیشتر جهت دستیابی به روش‌های کارآمد و مؤثرتر کشت سوسپانسیون سولی می‌تواند ابزار مناسبی برای افزایش و بهبود ترکیبات ضدالتهابی در گیاهان گردد (Hassanpour *et al.*, 2020). با توجه به بررسی‌های انجام‌شده به‌نظر می‌رسد سازوکارهای فیزیولوژیکی گیاه دارویی گل راعی در پاسخ به ایسیتور دمای کم تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین با توجه به نقش غیرقابل انکار شرایط محیطی بر سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر ایسیتور دما در مدت زمان‌های مختلف بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه گل راعی از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم برخی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و سنتز هایپریسین مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۸ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و با سه تکرار در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور اجرا گردید. تیمارهای مورد بررسی شامل دماهای ۴، ۸، ۱۶ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته بود. بدین منظور بذرهای گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) رقم توپاز از شرکت Pharmasaat کشور آلمان با خلوص ۹۹٪ و قوه نامیه ۸۵٪ که در پروژه مقدماتی جهت توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، تهیه گردید. در ابتدا

حداکثر عملکرد گیاهان دارویی زمانی حاصل می‌شود که ترکیب مناسبی از عوامل محیطی برای گیاه فراهم گردد (Farhang Mehr *et al.*, 2014). جنس *Hypericum* متعلق به خانواده Hypericaceae، بیش از ۴۶۹ گونه در سراسر جهان دارد که تاکنون ۱۹ گونه آن در ایران شناسایی شده است (Crockett, 2010). گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. گیاهی چند ساله و مهم‌ترین گونه این جنس است که به‌دلیل توانایی سازگاری بالا با شرایط محیطی دارای پراکنش وسیعی در آسیا، اروپا و شمال آمریکا است (Valletta *et al.*, 2016). گیاه گل راعی حاوی دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه همچون فلاونوئیدها شامل فلاونول (کامپفرول، کوئرستین)، فلاونها (هیپروزید، ایزو کوئرستین، کوئرستین، روتین) (Wang *et al.*, 2015; Kwiecien *et al.*, 2018)، بی‌فلاونوئیدها (بی‌آپی ژنین، آمنتوفلاون و کاتیشن‌ها)، فنل‌ها (کافئیک، کلروژنیک، پارا-کوماریک، فرولیک، پارا-هیدروکسی بنزوئیک و وانیلیک اسیدها) (Hammer and Birt, 2014; Gaid *et al.*, 2016)، پروانتوسیانیدین‌ها، نفتودیانترون‌ها (هایپریسین و سودوهایپریسین) و آسیل فلوروگلوکوسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) است (Cui *et al.*, 2010; Victor, 2017; Shakya *et al.*, 2014).

نفتودیانترون‌ها به میزان ۰/۱ تا ۰/۱۵ درصد در گل راعی وجود دارند و شامل هایپریسین و پسودوهایپریسین و پیش ماده‌های آن‌ها پروتوهایپریسین، پروتوپسودوهایپریسین و ترکیب نادر سیکلوپسودوهایپریسین هستند. پیش‌ماده‌های مذکور تحت تأثیر نور به ترکیبات حلقوی هایپریسین و پسودوهایپریسین تبدیل می‌شوند (Gadzovska-Simic *et al.*, 2014). نقاط تیره در حاشیه برگ‌ها وجود دارند و محل تجمع هایپریسین هستند. تحقیقات نشان داده که میزان هایپریسین و پسودوهایپریسین در گل بیشتر از ساقه و برگ است (Tian *et al.*, 2014). تاکنون خواص درمانی بالایی برای این گیاه دارویی گزارش شده است که بیشترین تأثیر و کاربرد آن در درمان افسردگی است. همچنین عصاره این گیاه خاصیت ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضدسرطانی و ضدویروسی بالایی دارد (Bertoli

بذرها با آب مقطر و اتانول ۷۰ درصد شست و شو داده شد و استریل گردید. سپس بذرها در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد شستشو داده شدند و با آب مقطر استریل برای ۴ تا ۵ بار در فاصله زمانی ۲۴ ساعت آبکشی شدند. همچنین وسایل مورد استفاده در اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ بار استریل گردیدند. محیط‌کشت جامد MS که شامل آب مقطر، شکر، میواینوزیتول، نمک‌های ماکرو و میکرو، ویتامین‌های ضروری و آگار است، تهیه گردید و سپس بذور در ظروف استریل حاوی محیط‌کشت جامد MS قرار داده شد و در اتاق رشد با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند. بعد از آن، گیاهچه‌های آماده‌شده جهت تولید ریشه‌های نابجا در محیط‌کشت مایع MS و هورمون IBA به مدت ۲۱ روز در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور شیکردار نگهداری شدند.

محیط‌های کشت آماده‌شده پس از مدت ۲۱ روز از شروع رشد جهت اعمال الیسیاتور دمای کم در انکوباتور شیکردار یخچال‌دار جهت هوادهی سلول‌ها و ممانعت از تجمع مواد سمی در یک نقطه در دماهای ۴، ۸ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، هر یک از دماها در سه مدت زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته و در سه تکرار اعمال شدند. لازم به ذکر است تیمار شاهد در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل و در زیر هود لامینار برداشت و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و جهت انجام آنالیز HPLC آماده گردیدند.

سنجش هایپرپسین: نمونه‌ها در داخل آون به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه خشک‌شده درون هاون کاملاً ساییده و پودر گردید. سپس به هر نمونه ۱۰۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت داخل دستگاه التراسونیک مدل BANDELIN SONOREX قرار داده شد و سپس داخل سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه و دور ۸۰۰۰ در دقیقه قرار داده

شدند. بعد از آن محلول رویی جدا و کنار گذاشته شد؛ به باقیمانده محلول ۵۰۰ میکرولیتر متانول اضافه گردید و در ترمومیکس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مجدداً در مدت زمان ۵ دقیقه و دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Eppendorf) گردید. محلول رویی به محلول سری اول اضافه و دو مرتبه سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی کل محلول جدا و عصاره حاصل از فیلتر سر سرنگی عبور داده شد و به این ترتیب عصاره مورد نظر جهت تزریق به دستگاه HPLC مدل SYKAM آماده گردید (Anyowska *et al.*, 2010). دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مدل SYKAM با ستون $18\mu\text{m}$ ، C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر $4.6/0$ میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. از غلظت‌های استاندارد صفر، ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هایپرپسین جهت اندازه‌گیری استفاده گردید. سرعت جریان در دستگاه ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. آشکارساز فلورسنس مدل SYKAM به کار رفت و از پمپ مدل SYKAMs731 REAGENT ORGANIZER و ثابت ۰/۷۴ استفاده گردید.

سنجش فنل: محتوی فنل کل عصاره متانولی ریشه‌ها توسط اسپکتروفتومتر مدل DU530 اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی به همراه ۱/۵۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو ۲ نرمال (شرکت مرک آلمان) درون تیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و به‌طور کامل با هم مخلوط شدند و بعد از ۸ تا ۱۰ دقیقه ۰/۳ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد (w/v) به محلول اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، سپس میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خواننده و محتوای فنل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن ماده خشک گزارش گردید. در این روش گالیک اسید به‌عنوان استاندارد در دامنه ۲/۱۶۵-۰/۱۴ و با استفاده از رابطه $y = 2/2052x - 1/441$ (x: نمونه خوانده شده) برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت (Folin and Ciocalteu, 1927).

سنجش فلاونوئید: بدین منظور ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره

راعی در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۱).
محتوای هایپرپیرسین: نتایج نشان داد با افزایش دما و کاهش مدت زمان القا تیمار، محتوای هایپرپیرسین در گیاه گل راعی کاهش معنی داری را نشان داد. به طوری که بیشترین میزان هایپرپیرسین در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۰/۵۹ و ۰/۵۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک نشان داده شد. کمترین میزان نیز در دماهای ۱۶ و ۲۵ درجه سانتی گراد در محدوده بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۸ میکروگرم بر گرم ماده خشک حاصل شد و در این دماها مدت زمان های القا تیمار تفاوت معنی داری را در تولید هایپرپیرسین ایجاد نکرد (شکل ۱).

محتوای فلاونوئید: بر طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر تیمارهای دما، مدت زمان و اثر متقابل دما × مدت زمان بر میزان فلاونوئید گیاه گل راعی در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۱). با توجه به نتایج، اعمال دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته سبب افزایش میزان فلاونوئید گیاه گل راعی به میزان ۰/۹۷ میلی گرم بر گرم ماده خشک گردید. نمونه‌های تحت تیمار دمایی ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته و ۲۴ ساعت کمترین میزان فلاونوئید را به ترتیب با ۰/۳۸ و ۰/۴۱ میلی گرم بر گرم ماده خشک نشان دادند (شکل ۲).

ظرفیت آنتی اکسیدانی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن است که اثر تیمارهای دما، مدت زمان و اثر متقابل دما × مدت زمان بر ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه گل راعی در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۱). بررسی نتایج نشان داد بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در نمونه‌های گل راعی تحت تیمار دمایی ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته با میزان ۰/۸۷ درصد بود. با افزایش دما به ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی به میزان ۰/۳۶ درصد مشاهده گردید (شکل ۳).

محتوای فنل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی دار شدن اثر تیمارهای دمای پایین، مدت زمان و اثر متقابل دمای پایین × مدت زمان بر میزان فنل گیاه گل راعی در سطح یک درصد بود (جدول ۱). بر طبق نتایج، بیشترین میزان

متانولی ریشه به همراه ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر و ۷۵ میکرولیتر سدیم نیترات ۵ درصد (w/v) در تیوپ ۲ میلی لیتری مخلوط شدند. سپس ۰/۱۵ میلی لیتر آمونیم کلراید ۱۰ درصد (w/v) و ۰/۵ میلی لیتر سدیم هیدروکساید یک مولار به محلول اضافه گردید، پس از آن بلافاصله میزان جذب در ۵۱۰ نانومتر فلاونوئید توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و محتوای فلاونوئید برحسب میلی گرم بر گرم ماده خشک گزارش گردید (Wu et al., 2006). در این آزمایش کوئرستین به عنوان استاندارد و در دامنه ۰/۵۱۵ - ۰/۰۰۴ و با استفاده از رابطه $y = -0.054x + 0.5327$ (x: نمونه خوانده شده) برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت و نتایج برحسب میلی گرم کوئرستین در اکی والان بر گرم ماده خشک بیان شد.

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی: فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد توسط DPPH (۲،۲ دی فنیل اپیکریل هیدرازیل) ارزیابی شد. در این روش ۱/۶ میلی لیتر DPPH، ۰/۲ میلی مولار به ۰/۴ میلی لیتر عصاره متانولی ریشه در محیط تاریک اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی برحسب درصد DPPH با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Cui et al., 2010). ۱/۶ میلی لیتر DPPH ۰/۲ میلی مولار به همراه ۰/۴ میلی لیتر متانول به عنوان محلول شاهد در نظر گرفته شد.

رابطه (۱)

ظرفیت آنتی اکسیدانی: [(میزان جذب محلول شاهد - میزان جذب عصاره) / میزان جذب محلول شاهد] × ۱۰۰
 تجزیه واریانس داده‌های حاصل از پژوهش با نرم افزار آماری SAS، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد صورت پذیرفت.

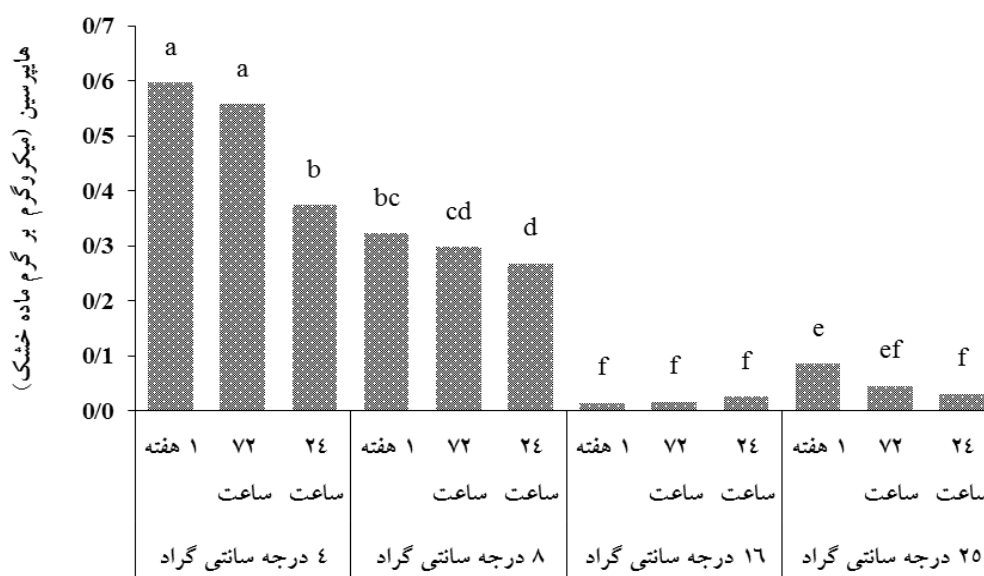
نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای دما، مدت زمان و اثر متقابل دما × مدت زمان بر میزان هایپرپیرسین، فلاونوئید، ظرفیت آنتی اکسیدان، فنل و وزن خشک در گیاه گل

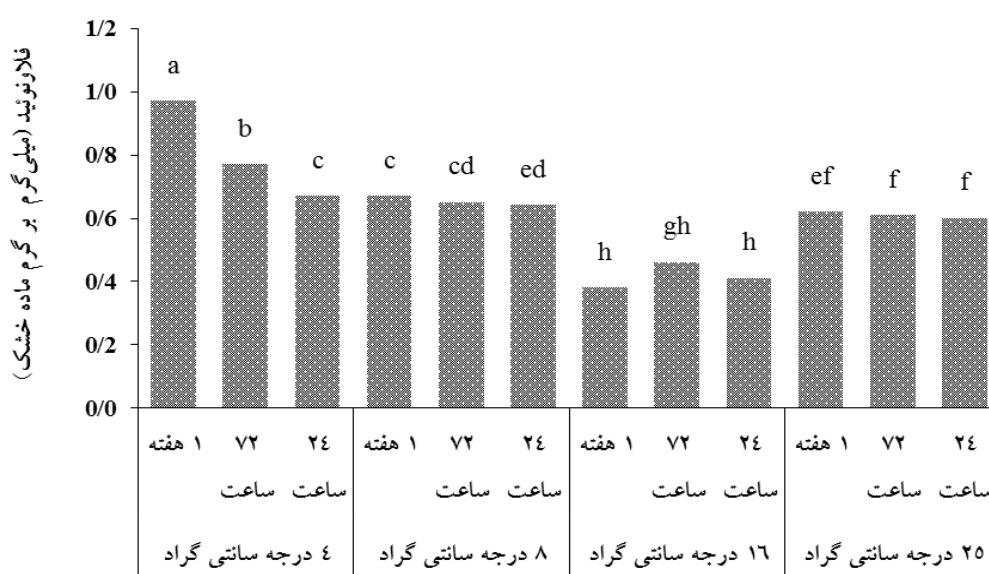
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دما و مدت زمان بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه گل راعی

| منابع تغییرات | درجه آزادی | هایپرسیسین | فلاونوئید | ظرفیت آنتی‌اکسیدانی | فنل | وزن خشک |
|------------------|------------|------------|-----------|---------------------|----------|----------|
| دما | ۳ | ۰/۴۲۵۱** | ۰/۲۲۹۷** | ۰/۲۱۱۱** | ۱۱/۷۵** | ۰/۲۰۲۵** |
| مدت زمان | ۲ | ۰/۰۱۷۲** | ۰/۰۱۹۶** | ۰/۰۲۵۲** | ۰/۵۳۲۶** | ۰/۰۱۱۸** |
| دما × مدت زمان | ۶ | ۰/۰۰۷۴** | ۰/۰۱۸۴** | ۰/۰۰۶۰** | ۰/۵۶۳۱** | ۰/۰۰۵۴** |
| خطا | ۲۴ | ۰/۰۰۰۸ | ۰/۰۰۰۲ | ۰/۰۰۰۲ | ۰/۰۸۳۵ | ۰/۰۰۰۲ |
| ضریب تغییرات (%) | | ۷/۲۰ | ۲/۷۲ | ۲/۳۴ | ۸/۳۲ | ۳/۸۳ |

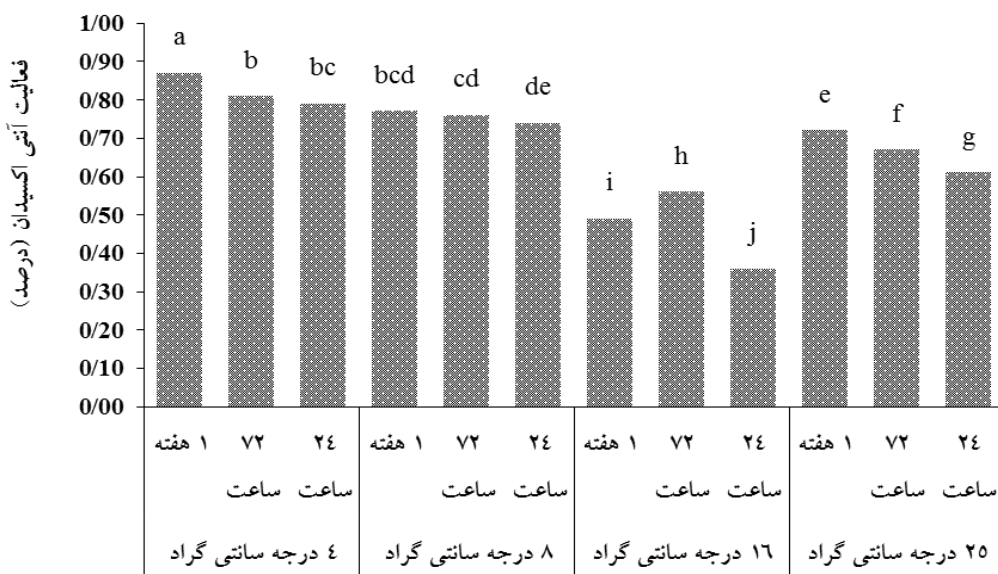
** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد



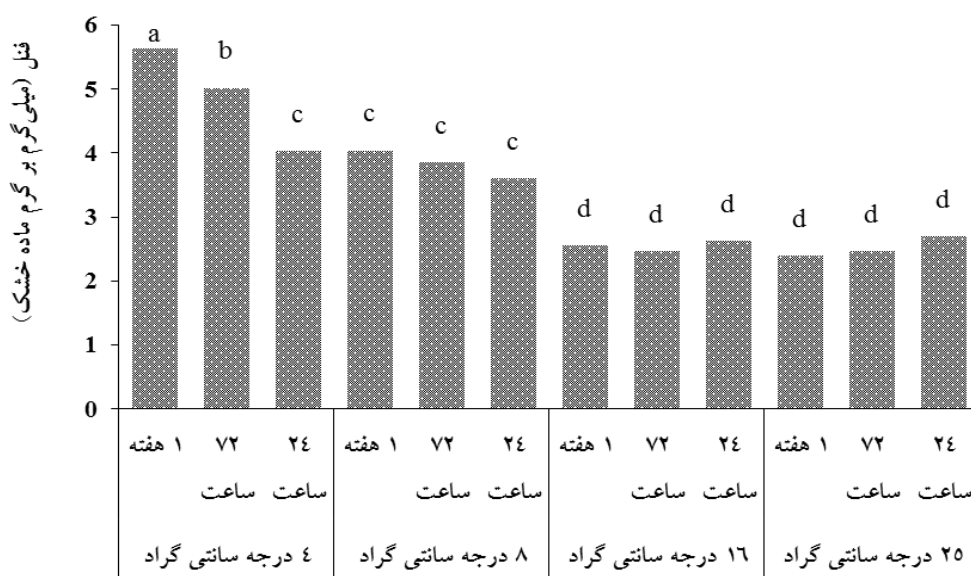
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان هایپرسیسین



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فلاونوئید



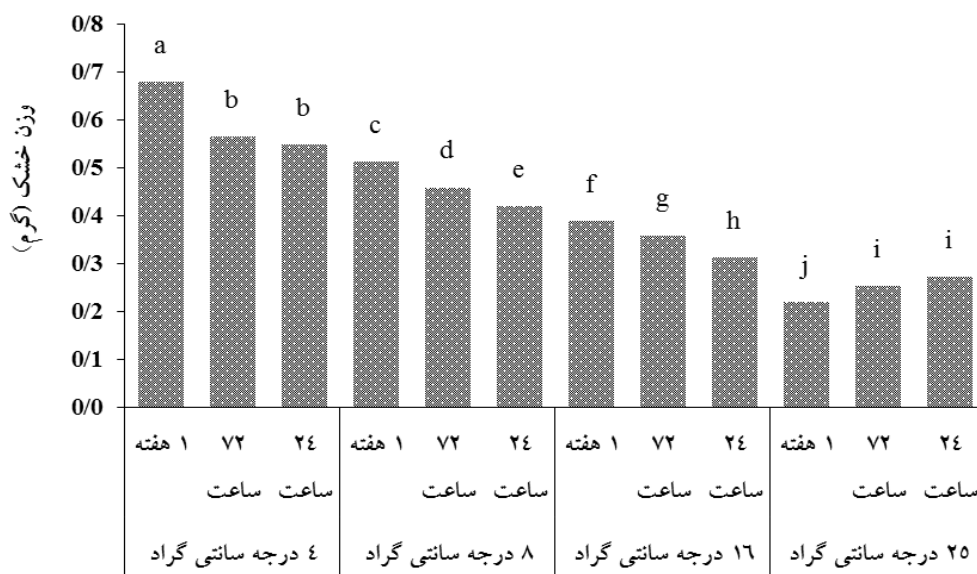
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فعالیت آنزیم اکسیدانی



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فصل

و یک هفته) نتایج بهتری را نشان داد. (شکل ۴).
 وزن خشک: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر تیمارهای دما، مدت زمان و اثر متقابل دما × مدت زمان بر وزن خشک گیاه گل راعی در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۱). بررسی نتایج حاکی از آن است که با افزایش دما و کاهش مدت زمان تیمار، وزن خشک گیاه گل راعی کاهش معنی داری را نشان داد، به طوری که نمونه‌های گیاهی تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته بیشترین میزان وزن خشک را با

فصل در نمونه‌های گیاهی تحت تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۵/۰۳ و ۵/۶۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک حاصل شد. کمترین میزان نیز در نمونه‌های تحت تیمارهای دمایی ۱۶ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محدوده بین ۲/۴۱ و ۲/۷۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک مشاهده شد. بالاترین میزان فصل در تیمار ۴ درجه سلیسوس به مدت یک هفته و ۷۲ ساعت است که در مقایسه با تیمار ۸ درجه سلیسوس در مدت زمان‌های متفاوت (۲۴ و ۷۲ ساعت



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان وزن خشک

متابولیت‌های ثانویه تأیید شده است (Verma *et al.*, 2014). تغییر در عوامل محیطی مانند تنش‌های محیطی می‌تواند باعث تغییر در نحوه رشد و میزان مواد ثانویه در گیاهان دارویی شوند. بر پایه تحقیقات انجام‌گرفته مشخص شده است تنش‌ها به‌عنوان الیستورهای غیرزیستی بر مقدار ماده مؤثره گیاهان دارویی، عناصر تشکیل‌دهنده مواد مؤثره و میزان ماده خشک تولیدشده تأثیر می‌گذارند و می‌توانند تولید برخی از این ترکیب‌ها را تا چندین برابر افزایش دهند، البته این تأثیر همیشگی نبوده و در مواردی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است (Zaker Arezoo *et al.*, 2015). بر طبق نتایج حاصل از این پژوهش، تمامی پارامترهای فیتوشیمیایی و ماده خشک سنجش‌شده در گیاه گل‌راعی در شرایط الیستور دمای کم (۴ درجه سانتی‌گراد) و به‌مدت زیاد (۱ هفته و ۷۲ ساعت)، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند.

اگرچه بیوستز متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله ژن‌ها کنترل می‌شود، ولی تولید آن‌ها به میزان زیادی تحت تأثیر عوامل محیطی است. گزارش شده درجه حرارت بر میزان هایپرپیرسین گیاه گل‌راعی تأثیر داشته و یک رابطه خطی فزاینده بین میزان هایپرپیرسین و درجه حرارت مشاهده شده است (Manero *et al.*, 2012). همچنین در پژوهشی دیگر مشاهده شد بیشترین میزان هایپرپیرسین و تانن موجود در گیاه گل‌راعی در دمای

۰/۶۸۰۰ گرم نشان دادند. کمترین میزان نیز در نمونه‌های تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به‌ترتیب با میزان ۰/۲۲۰۰ و ۰/۲۵۳۳ گرم حاصل شد (شکل ۵).

بحث

میزان و کیفیت مواد مؤثره یک گیاه دارویی به‌دلیل نوسان فعالیت‌های متابولیکی گیاه تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی متغیر است (Yousefi *et al.*, 2015). بنابراین برای کشت گیاهان دارویی به‌منظور استخراج مواد مؤثره باید فاکتورهای محیطی در ارتباط با محصول نهایی مورد سنجش قرار گیرند (Yazdani *et al.*, 2002). همچنین بررسی عوامل محیطی شامل حضور و عدم‌حضور هورمون‌ها و الیستورها، محیط‌های غرقابی و کم‌نمک در گیاهان می‌تواند به بهبود عوامل رشد و کاهش اثرات ناشی از تنش و در نتیجه تنظیم و تولید ترکیبات ضدالتهابی کمک شایانی نماید (Haddadi *et al.*, 2016). عوامل ژنتیکی می‌تواند بر تولید و مقادیر ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان دارویی مؤثر واقع شوند (Mohammadnejad Ganji *et al.*, 2017; Noroozi *et al.*, 2017). همچنین اثربخشی الیستورهای زیستی و غیرزیستی به‌عنوان روشی کارآمد برای بهبود تولید ترکیبات با ارزش مانند

بیشتر از ۱۴ درجه سانتی‌گراد حاصل گردید که با نتایج حاصل از این پژوهش مغایرت دارد (Coste *et al.*, 2011). از طرفی دیگر، تغییرات متابولیسمی و مورفوفیزیکی می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد که افزایش یا کاهش میزان این متابولیت‌ها ناشی از بیان برخی از ژن‌های گیاه در شرایط خاص است.

در این تحقیق، کاهش دما اثر معنی‌دار و قابل توجهی بر افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد نظر و وزن خشک گیاه داشت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شاهد عملکرد حداکثر گیاه در تولید مواد مورد بررسی بودیم، به طوری که وزن خشک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (۶۸/ گرم)، سه برابر بیشتر از وزن خشک در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۲۲/ گرم) بوده است. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محتوای هایپرسیسین (۵۹/ میکروگرم بر گرم ماده خشک)، محتوای فلاونوئید (۹۷/ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، فنل (۵/۶۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۸۷/ درصد) بود که به مقدار قابل توجهی بیشتر از شرایط دمای محیطی (۲۵ درجه سانتی‌گراد) گردیده است. تأثیرگذاری ایسیستور دمای کم بر سنتز متابولیت‌های ثانویه ممکن است به این دلیل باشد که ایسیستور دمای کم بیان ژن‌ها را تغییر داده که این عمل می‌تواند ناشی از نقش ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام در گیاه باشد (Habibi *et al.*, 2016). از آنجا که بیان ژن‌ها در سطح رونوشت‌برداری با میزان تولید متابولیت‌های مربوطه ارتباط مستقیم دارد، زمانی که هدف افزایش تولید متابولیتی خاص باشد با اعمال تیمارهایی مانند سرما با زمان مناسب می‌توان در شرایط کنترل‌شده به آن هدف دست یافت.

همچنین ایسیستورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که می‌تواند آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی نموده و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شود. گزارش شده در مسیر بیوسنتز هایپرسیسین و هایپرفورین، آنزیم PKS (Polyketide synthase) نقش کلیدی ایفا می‌نماید (Karioti and Bilia, 2010). PKS‌ها خانواده‌های ژنی هستند که به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز گروه‌های

متابولیکی فوق و همچنین زانتون‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان به شمار می‌روند. همچنین سنتز هایپرسیسین از امودین آنترون توسط آنزیم کلیدی Hyp-1 (Hypericin-1) در چند مرحله کاتالیز می‌گردد (Huang *et al.*, 2014). آزمایشات mRNA نشان داد میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی هایپرسیسین (Hyp-1 و PKS) تحت تأثیر دمای پایین افزایش یافته و باعث افزایش و تجمع میزات هایپرسیسین و ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیکی می‌گردد. علاوه بر آن، ایسیستورها ممکن است با تغییر و تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و یا تبادل مواد ذخیره‌شده در واکوئل‌ها، تبدیل و یا تجزیه متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهند (Odjakova and Hadjiivanova, 2001). آنزیم PAL (Phenylalanine ammonia lyase) یک آنزیم کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنلی است که در شرایط دمایی پایین با افزایش بیان خود باعث زیادشدن ترکیبات فنلی به‌عنوان پیش-ماده بیوسنتز ترکیبات ضدالتهابی شده مانند هایپرسیسین شده و مقاومت گیاه را در برابر شرایط تنش‌زا افزایش می‌دهد (Myung-Min *et al.*, 2009). همچنین دمای پایین باعث افزایش ترکیبات فنولی به‌عنوان پیش‌ماده مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Mohammad sohael and Babar, 2020) که احتمال می‌رود مسیر بیوسنتزی این ترکیبات یک مسیر وابسته به دما بوده و عوامل تنظیمی پاسخ‌دهنده در ناحیه پروموتوری ژن و بیان ژن‌های مسئول بیوسنتز ترکیب ضدالتهابی هایپرسیسین تحت دمای پایین افزایش یابد (Crocchi, 2011). علاوه بر آن، دمای کم باعث تحریک پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاهای سلولی می‌شود. افزایش فلاونوئید کل، فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز مکانیسم دیگری است که به‌نظر می‌رسد گیاه برای حذف رادیکال‌های آزاد ایجادشده در اثر سرما و جلوگیری از آسیب رساندن آن‌ها به گیاه در پیش گرفته است. ایسیستور دمای پایین به طریقه غیرمستقیم افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در سلول را باعث می‌شود (Mirdehghan and Rahimi, 2016). مکانیسم عمومی ترکیبات فنلی در جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد لیپید و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به

سوپراکسید دارد (Zou et al., 2004). افزایش فلاونوئیدها تحت تیمار سرما در این پژوهش در توافق با سایر پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه است. افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه کراتاگوس (Crataegus) و افزایش بیان ژن‌های مسیر فلاونوئیدها در آرابدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) در شرایط تنش سرما گزارش گردیده است (Kirakosyan et al., 2003; Leyva et al., 1995). در پژوهشی دیگر که روی گیاه گندم (*Triticum aestivum* L. صورت گرفته است تیمار سرما سبب افزایش فلاونوئیدها شده است که با نتایج حاصل از این پژوهش هم‌خوانی دارد (Sheteiwy et al., 2017).

نتیجه‌گیری

گیاهان پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مختلفی نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی نشان می‌دهند. تولید متابولیت‌های ثانویه، از جمله مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر این فاکتورهاست. امروزه متابولیت‌های ثانویه به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم، کاربرد بسیار وسیعی در صنعت داروسازی یافته‌اند. با این حال دسترسی به این ترکیبات در گیاهان، اغلب با مشکلاتی روبه‌رو است. در سال‌های اخیر مشخص شده است که بسیاری از الیستورها می‌توانند منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه جدید در گیاه شوند و یا میزان تولید این ترکیبات را در گیاهان افزایش دهند. با توجه به افزایش متابولیت‌های ثانویه، فنل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل راعی پس از اعمال یک هفته تیمار دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد)، توصیه می‌گردد نقش سرما در افزایش کیفیت و ارزش دارویی گل راعی مورد توجه و بررسی تکمیلی قرار گیرد.

رادیکال‌های آزاد است (Rohman et al., 2010). فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در دمای پایین با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز تولید آن‌ها افزایش می‌یابد (Myung-Min et al., 2009). نتایج مربوط به میزان فنل کل عصاره‌ها نشان داد میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاه گل راعی مربوط به وجود ترکیبات فنلی موجود در آن است که مشابه همین نتایج در گیاهانی چون نعنا (*Mentha*)، بومادران (*Achillea millefolium*)، درمنه (*Artemisia persica*) و برخی گونه‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) تأییدی در این مطلب است که ترکیبات فنلی به‌عنوان دهنده الکترون عمل می‌کنند و از ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (Amiri, 2012). مطالعات انجام‌شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین یکی از نشانگرهای دفاعی گیاه در برابر دمای کم نشان می‌دهد (Vogt, 2010). همچنین تحت دمای کم، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز افزایش پیدا می‌کند، ولی فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده ترکیبات فنلی محلول از قبیل پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز کاهش می‌یابد (Pakkish et al., 2009). این موضوع سبب افزایش تجمع ترکیبات فنلی محلول می‌شود.

علاوه بر آن، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها با تغییر در بیان ژن‌ها و فعالیت پروتئین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیداتیو اثرگذار هستند (Tsfay et al., 2011). ترکیبات فنلی در گیاهان از مسیر شیکمیک اسید و از متابولیسم فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند. عصاره گل راعی محتوی ترکیبات فنلی زیادی از جمله فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی است که بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه است. در تحقیقی که روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاوی مقادیر بالای فلاونوئید گیاه گل راعی صورت گرفت مشخص شد که این عصاره توانایی بالایی در بازدارندگی رادیکال‌های DPPH و

منابع

Amiri, H. (2012) Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 8.

- Anyoewska, M., Kowalczyk, A., Lozak, A., Jablczynska, R. and Fijalek, Z. (2010) Determination of total Hypericins in St. Johns wort and herbal medicinal products. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 67: 587-593.
- Zaker, A., Sykora, C., Gossnitzer, F., Abrishamchi, F., Asili, J., Mousavi, S. and Wawrosch, Ch. (2015) Effects of some elicitors on Tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products* 67: 97-102.
- Bertoli, A., Cirak, C. and Silva, J. A. T. (2011) *Hypericum* species as sources of valuable essential oil. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 5: 29-47.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. and Coldea, G. (2011) Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106: 279-282.
- Crocoll, C. (2011) Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. PhD Thesis, Biologisch Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany.
- Crockett, S. (2010) Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *Natural Product Communications* 5: 1493-1506.
- Cui, X. H., Chakrabarty, D., Lee, E. J. and Paek, K. Y. (2010) Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology* 101: 4708-4716.
- Farhang Mehr, S., Akbari, Sh. and Rezvan Bidakhti, Sh. (2014) Effect of planting date and plant density on flower yield and some morphological characteristics of matricaria (*Matricaria chamomilla* L.). *Plant Physiology* 6: 79-87.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73: 627-650.
- Gadzovska-Simic, S., Tusevski, O. and Delaunay Maury, S. (2014) Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *Scientific World Journal* 2014.
- Gaid, M., Haas, P., Beuerle, T., Scholl, S. and Beerhues, L. (2016) Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *Journal of Biotechnology* 222: 47-55.
- Habibi, Sh., Ghaderi, A. and Fatehi, F. (2016) Investigation of expression of key genes bio synthesis pathway of *Thymus vulgaris* L. under cold stress by PCR method. *Medicinal and Aromatic Plant Science* 64: 50-58.
- Hammer, K. D. and Birt, D. F. (2014) Evidence for contributions of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of *Hypericum perforatum*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54: 781-789.
- Haddadi, B., Hassanpour, H. and Niknam, V. (2016) Effect of salinity and waterlogging on growth, anatomical and anti-oxidative responses in *Mentha aquatica* L. *Journal of Acta physioplant* 38: 119.
- Hassanpour, H. and Niknam, V. (2020) Establishment and assessment of cell suspension culture of *Matricaria chamomilla* as a possible source of apigenin under static magnetic field. *Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture* 142.
- Huang, L. F., Wang, Z. and Chen, S. L. (2014) Hypericin: Chemical synthesis and biosynthesis. *Chinese Journal of Natural Medicines* 12: 81-88.
- Isah, T. (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* 52: 39.
- Karioti, A. and Bilia, A. R. (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 562-594.
- Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P. B., Warber, S., Bolling, S. and Chang, S. C. (2003) Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3973-3976.
- Kwiecien, I., Smolin, J., Beerhues, L. and Ekiert, H. (2018) The impact of media composition on production of flavonoids in agitated shoot cultures of the three *Hypericum perforatum* L. cultivars 'Elixir', 'Helos', and 'Topas'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 54: 332-340.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M. (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39-46.
- Manero, F. J., Algar, E., Martin Gomez, M. S., Saco Sierra, M. D. and Solano, B. R. (2012) Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical Biology* 50: 1201-1209.
- Mirdehghan, S. H. and Rahimi, S. (2016) Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period. *Food Chemistry* 196: 1040-1047.
- Mohammadnejad Ganji, S. M., Moradi, H., Ghanbari, A. and Akbarzadeh, M. (2017) Quantity and quality of secondary metabolites in lavender plant under the influence of ecological factors. *Nova Biologica Reperta* 4: 166-172.
- Mohammad sohael, A. and Babar, M. (2020) Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Journal of Plant Cell Tissue and Organ*

- Culture 85: 219-228.
- Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009) Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology* 166: 180-191.
- Noroozi, V., Yousefzadeh, S., Asilan, K. S. and Mansourifar, S. (2017) Investigating the variation of essential oil content, chlorophyll, carotenoid, anthocyanin and flavonoid of (*Mentha longifolia* (L.) Hods. Subsp. *Longifolia*) in several habitats of Marand. *Eco-Phytochemical Journal of Medical Plants* 5: 52-66.
- Odjakova, M. and Hadjiivanova, C. (2001) The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27: 101-109.
- Pakkish, Z., Rahemi, M. and Baghizadeh, A. (2009) Seasonal changes of peroxidase, polyphenol oxidase enzyme activity and phenol content during and after rest in pistachio (*Pistacia Vera* L.) flower buds. *World Applied Sciences Journal* 6: 1193-1199.
- Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W. R., Utami, R. and Mulatsih, W. (2010) Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam.). *International Food Research Journal* 17: 97-106.
- Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L. and Franklin, G. (2017) Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8: 1-13.
- Sheteiwiy, M., Shen, H., Xu, J., Guan, Y., Song, W. and Hu, J. (2017) Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5- aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 137: 58-72.
- Tesfay, S. Z., Bertling, I. and Bower, J. P. (2011) Effects of postharvest potassium silicate application on phenolics and other antioxidant systems aligned to avocado fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* 60: 92-99.
- Tian, J., Zhang, F., Cheng, J., Guo, S., Liu, P. and Wang, H. (2014) Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L. *Scientific Reports* 4: 5632.
- Valletta, A., De Angelis, G., Badiali, C., Miccheli Brasili, E., Di Cocco, M. E. and Pasqua, G. (2016) Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. root cultures. *Plant Cell Reports* 35: 1009-1020.
- Verma, P., Khan, S. A., Mathur, A. K., Ghosh, S., Shanker, K. and Kalra, A. (2014) Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitation and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma* 251: 1359-1371.
- Victor, B. G., Wafaa, M. A. and Hamed, S. (2014) Preliminary phytochemical screening and evaluation of in vitro oxidant activity of Iraqi species of *Hypericum perforatum* aerial part. *International Research Journal of Pharmacy* 5: 369-373.
- Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Wang, J., Qian, J. and Yao, L. (2015) Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing* 2: 5.
- Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49: 193-199.
- Yavari, A. and Shahgolzari, S. M. (2016) Effect of some ecological factors on quality and quantity of effective ingredient of *Stachys inflata* at Touyserkan region. *Agroecology Journal* 12: 77-85.
- Yazdani, D., Jamshidi, A. and Mojab, F. (2002) Comparison on menthol content of cultivated *Peppermint* at different regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants* 3: 73-77.
- Yousefi, M., Nazeri, V. and Mirza, M. (2015) Effects of environmental conditions on the quantity and quality of *Salvia leriifolia* Benth. essential oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 30: 861-878.
- Zou, Y., Lu, Y. and Wei, D. (2004) Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5032-9.

Effect of low temperature elicitor at different times on adventitious root culture of *Hypericum perforatum* L.

Farahnaz Tavakoli¹, Mohammad Rafieiohossaini¹, Rudابه Ravash^{2*}, Morteza Ebrahimi³

¹ Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

³ Assistant Professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran – Isfahan Branch

(Received: 28/12/2020, Accepted: 13/03/2021)

Abstract

The use of abiotic elicitors is very important in biosynthetic pathways that lead to the formation and regulation of secondary metabolites. The aim of this study was to investigate the effects of Low temperature elicitors on the amount of hypericin, flavonoids, phenol, antioxidant capacity and dry weight of *Hypericum perforatum*. Seeds of Topaz cultivar, were grown in MS medium in sterile containers and stored in a growth chamber at 25 ± 1 ° C with light rotation for 8 hours in the dark and 16 hours of light with fluorescent light. This study was performed as a factorial study in a completely randomized design with three replications and with the effect of temperatures of 4, 8, 16 and 25 ° C for 24 hours, 72 hours and one week. The highest amount of hypericin at 4 ° C for one week and 72 hours with 0.59 and 0.55 $\mu\text{g} / \text{g}$ dry matter, respectively, and the highest antioxidant capacity at was 4 ° C for one week at 0.87% was observed. With increasing temperature to up 16 degrees (for 24 hours) the lowest amount of hypericin and antioxidant capacity was observed. Applying a temperature of 4 degrees for a week increased the amount of flavonoids. The highest amount of phenol was obtained in the samples treated at 4 ° C for one week and 72 hours with the amount of 5.65 and 5.03 mg / g dry matter, respectively. Applying 4 ° C for one week had the greatest effect on the dry weight of the plant. Due to the increase in secondary metabolites of hypericin, phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *H. perforatum* after application of 4 ° C treatment (for one week and 72 hours), this temperature is recommended for enhancement of secondary metabolites of *H. perforatum*.

Keywords: Abiotic elicitor, Antioxidant capacity, Flavonoid, Dry weight, Hypericin

Corresponding author, Email: r.ravash@gmail.com