مقاله پژوهشی

# تأثیر الیسیتور دمای پایین در مدت زمان‌های مختلف در محیط‌کشت 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 الیسیتورهای غیرزیستی در مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می‌شود بسیار حائز اهمیت است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر الیسیتور دمای پایین بر میزان هایپریسین، فلاونوئید، فنل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و وزن خشک گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) انجام شد. بذرها از رقم توپاز، بذور در محیط‌کشت MS در ظروف استریل کشت داده شدند و در اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند، این پژوهش به‌صورت 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 هایپریسین در دمای ۴ درجه به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به‌ترتیب با میزان ۰/۵۹ و ۰/۵۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴ درجه به‌مدت یک هفته با میزان ۰/۸۷ درصد مشاهده شد. با افزایش دما به ۱۶ درجه (به‌مدت ۲۴ ساعت) کمترین میزان هایپریسین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید. اعمال دمای ۴ درجه به‌مدت یک هفته سبب افزایش میزان فلاونوئید گردید. بیشترین میزان فنل نیز در نمونه‌های تحت تیمار ۴ درجه به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به‌ترتیب با میزان ۵/۶۵ و ۵/۰۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک حاصل شد. اعمال دمای ۴ درجه به‌مدت یک هفته بیشترین تأثیر را بر وزن خشک گیاه نشان داد. با توجه به افزایش متابولیت ثانویه هایپرسین، فنل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل راعی پس از اعمال دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت)، کاربرد این دما جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه گل راعی توصیه می‌گردد.**

**واژه‌های کلیدی: الیسیتور غیرزیستی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، وزن خشک، هایپریسین**

**مقدمه**

پژوهش در عرصه گیاهان دارویی ایران از نظر مواد مؤثره و کارایی فارماکولوژیکی برای پیدا کردن اکوتیپ‌های غنی از لحاظ دارویی، ضروری به‌نظر می‌رسد. ژنتیک، محیط و اثرات متقابل آن‌ها از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی است (Yavari and Shahgolzari, 2016).

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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

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، ایزوکوئرستین، 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 فلوروگلوسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) است (Cui *et al*., 2010; Victor *et al*., 2014; Shakya *et al*., 2017).

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، ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدویروسی بالایی دارد (Bertoli *et al*., 2011).

به‌طورکلی استفاده از الیسیتورها 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 الیسیتور 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 الیسیتور دما در مدت زمان‌های مختلف بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه گل راعی از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی، 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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

بذرها با آب‌مقطر 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 آب‌مقطر 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 آب‌مقطر، 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 ۱±۲۵ 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 ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور شیکردار نگه‌داری شدند.

محیط‌های کشت آماده‌شده پس از مدت ۲۱ روز از شروع رشد جهت اعمال الیسیتور 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 آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند و در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و جهت انجام آنالیز HPLC آماده گردیدند.

**سنجش هایپریسین:** نمونه‌ها در داخل آون به‌مدت 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 به‌مدت یک ساعت داخل دستگاه التراسونیک مدل BANDELIN SONOREX قرار داده شد و سپس داخل سانتریفیوژ به‌مدت 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مجدداً در مدت زمان ۵ دقیقه و دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (مدل Eppendorf) گردید. محلول رویی به محلول سری اول اضافه و دو مرتبه سانتریفوژ 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 (Anyoewska *et al.*, 2010). دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مدل SYKAM با ستون µ۵m، C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۰/۴۶ میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. از غلظت‌های استاندارد صفر، ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هایپرسین جهت اندازه‌گیری استفاده گردید. سرعت جریان در دستگاه ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. آشکارساز فلورسنس مدل SYKAM به‌کار رفت و از پمپ مدل SYKAMs731 REAGENT ORGANIZER و ثبات 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 آب‌مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر فولین‌سیوکالتو 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 به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، سپس میزان جذب در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده 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=۲/۲۰۵۲ x- ۰/۱۴۴۱ (x: نمونه خوانده شده) برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت (Folin and Ciocalteu, 1927).

**سنجش فلاونوئید:** بدین منظور ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

متانولی ریشه به‌همراه ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۷۵ میکرولیتر سدیم نیترات ۵ درصد (w/v) در تیوپ ۲ میلی‌لیتری مخلوط شدند. سپس ۰/۱۵ میلی‌لیتر آمونیم کلراید ۱۰ درصد (w/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم بر گرم ماده خشک گزارش گردید (Wu *et al.*, 2006). در این آزمایش کوئرستین به‌عنوان استاندارد و در دامنه ۰/۵۱۵– ۰/۰۰۴ و با استفاده از رابطه y= /۵۳۲۷ x–/۰۰۵۴ (x: نمونه خوانده شده) برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت و نتایج برحسب میلی‌گرم کوئرستین در اکی والان بر گرم ماده خشک بیان شد.

**سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی:** فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد توسط DPPH (۲،۲ دی فنیل ۱پیکریل هیدرازیل) ارزیابی شد. در این روش ۱/۶ میلی‌لیتر DPPH، ۰/۲ میلی‌مولار به ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره متانولی ریشه در محیط تاریک اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برحسب درصد DPPH با استفاده از (رابطه ۱) محاسبه شد (Cui *et al.*, 2010). ۱/۶ میلی‌لیتر DPPH ۰/۲ میلی‌مولار به‌همراه ۰/۴ میلی‌لیتر متانول به‌عنوان محلول شاهد در نظر گرفته شد.

رابطه ۱)

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: [(میزان جذب محلول شاهد – میزان جذب عصاره) / میزان جذب محلول شاهد] × ۱۰۰

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از پژوهش با نرم‌افزار 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 هایپریسین، فلاونوئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدان، فنل و وزن خشک در گیاه گل راعی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

**محتوای هایپریسین**: نتایج نشان داد با افزایش دما و کاهش مدت زمان القا تیمار، محتوای هایپریسین در گیاه گل راعی کاهش معنی‌داری را نشان داد. به‌طوری‌که بیشترین میزان هایپریسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به‌ترتیب با میزان ۰/۵۹ و ۰/۵۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک نشان داده شد. کمترین میزان نیز در دماهای ۱۶ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محدوده بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۸ میکروگرم بر گرم ماده خشک حاصل شد و در این دماها مدت زمان‌های القا تیمار تفاوت معنی‌داری را در تولید هایپریسین 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 معنی‌دار شد (جدول ۱). با توجه به نتایج، اعمال دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته سبب افزایش میزان فلاونوئید گیاه گل راعی به میزان ۰/۹۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک گردید. نمونه‌های تحت تیمار دمایی ۱۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته و ۲۴ ساعت کمترین میزان فلاونوئید را به‌ترتیب با ۰/۳۸ و ۰/۴۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک نشان دادند (شکل ۲).

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

**محتوای فنل**: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌دار 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

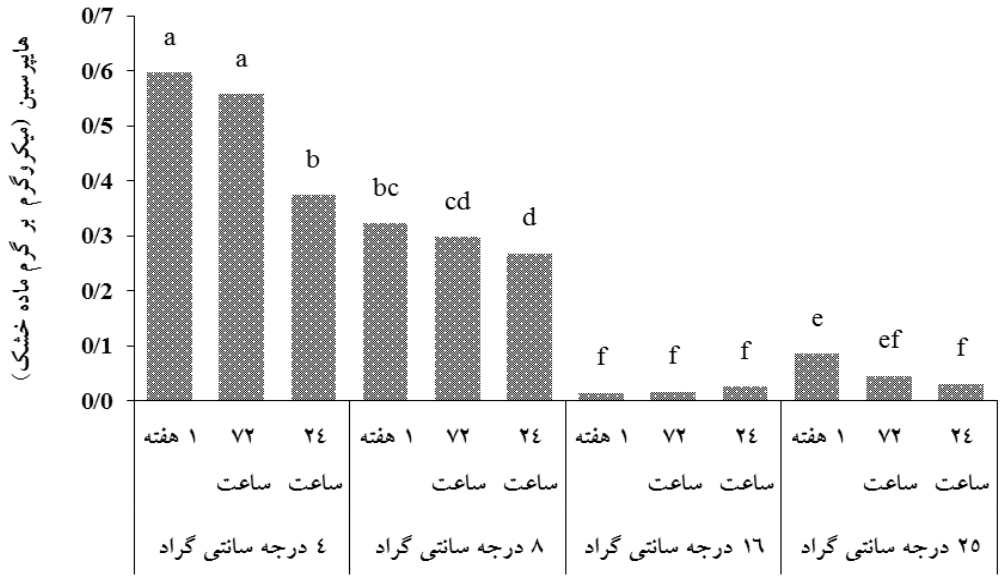
[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

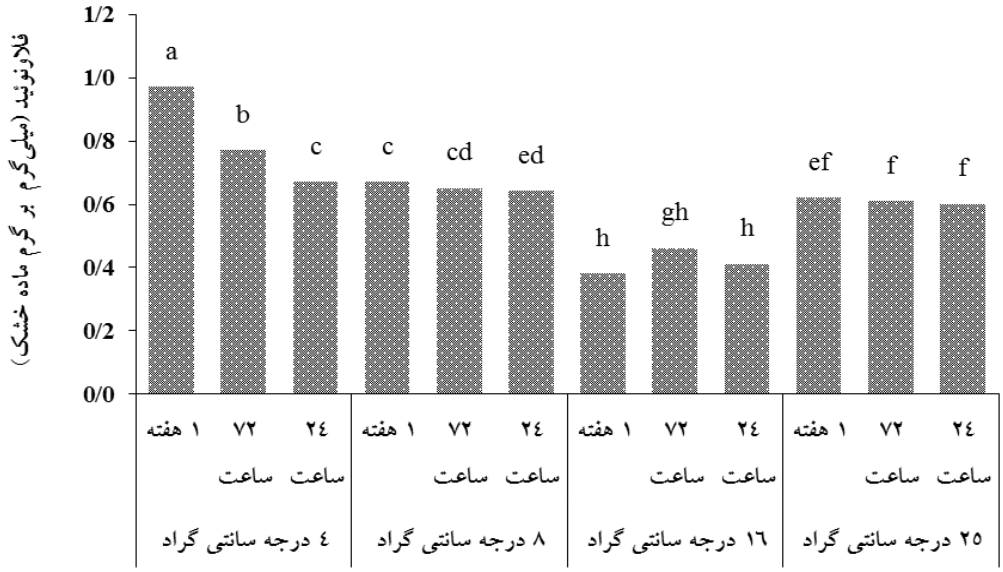
**جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دما و مدت زمان بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه گل راعی**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | هایپریسین | 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



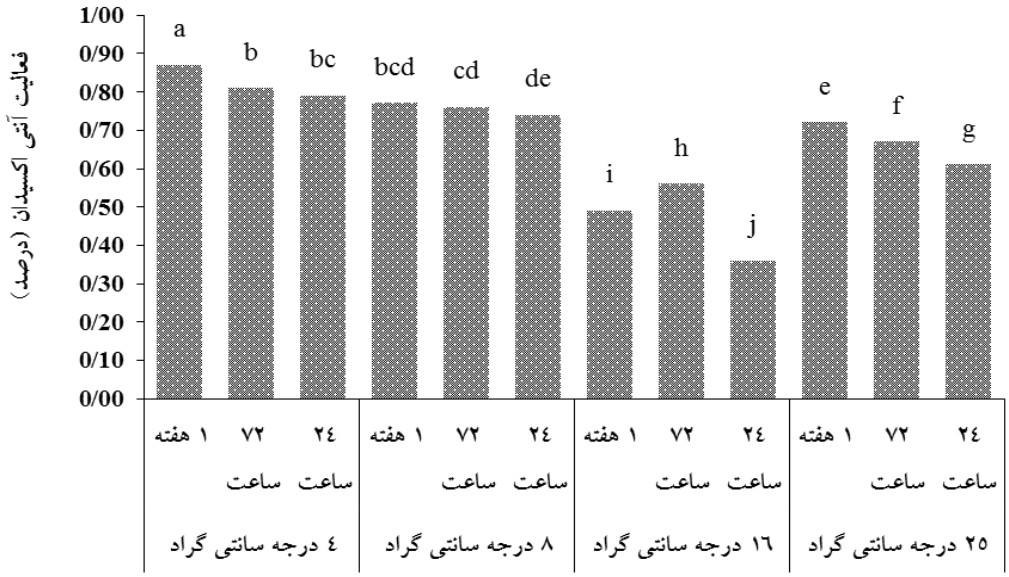

**شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان هایپرسین**



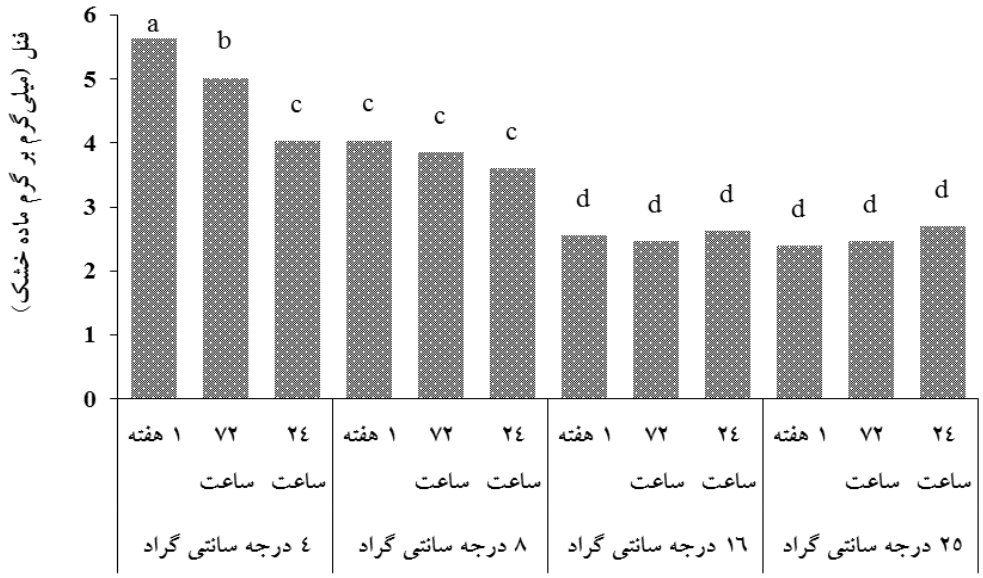

**شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فلاونوئید**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]




**شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی**

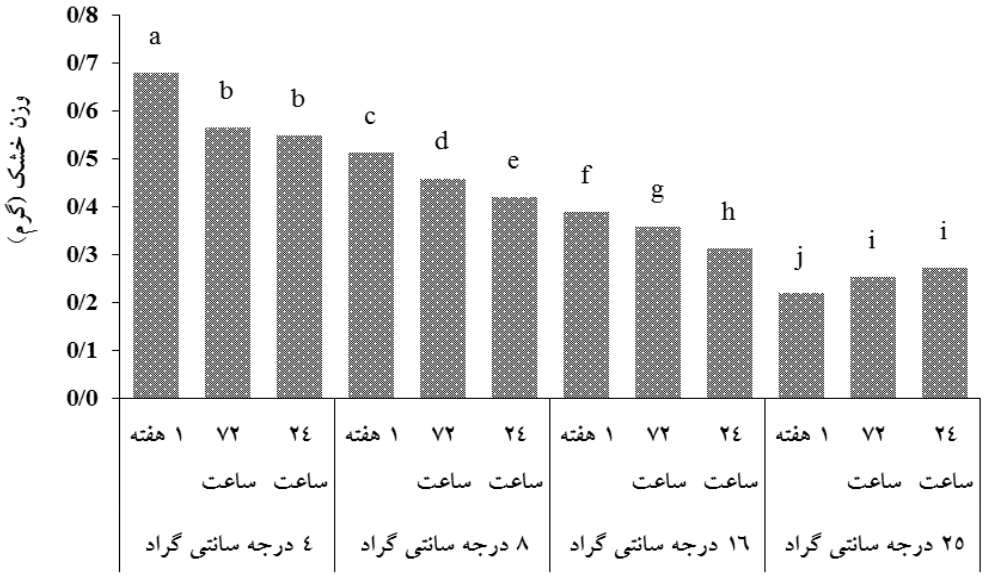



**شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل دما و مدت زمان بر میزان فنل**

فنل در نمونه‌های گیاهی تحت تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت به‌ترتیب با میزان ۵/۶۵ و ۵/۰۳ 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 فنل در تیمار ۴ درجه سلیسوس به‌مدت یک هفته و ۷۲ ساعت است که در مقایسه با تیمار ۸ درجه سلیسوس در مدت زمان‌های متفاوت (۲۴ و ۷۲ ساعت 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 معنی‌دار شد (جدول ۱). بررسی نتایج حاکی از آن است که با افزایش دما و کاهش مدت زمان تیمار، وزن خشک گیاه گل راعی کاهش معنی‌داری را نشان داد، به‌طوری‌که نمونه‌های گیاهی تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته بیشترین میزان وزن خشک را با

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]




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

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 الیسیتورها، محیط‌های غرقابی و کم نمک در گیاهان می‌تواند به بهبود عوامل رشد و کاهش اثرات ناشی از تنش و درنتیجه 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 الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به‌عنوان روشی کارآمد برای بهبود تولید ترکیبات با ارزش مانند متابولیت‌های ثانویه تأیید شده است (Verma *et al*., 2014). تغییر در عوامل محیطی مانند تنش‌های محیطی می‌توانند باعث تغییر در نحوه رشد و میزان مواد ثانویه در گیاهان دارویی شوند. بر پایه تحقیقات انجام‌گرفته مشخص شده است تنش‌ها به‌عنوان الیسیتورهای 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 گل راعی در شرایط الیسیتور دمای کم (۴ درجه سانتی‌گراد) و به‌مدت زیاد (۱ هفته و ۷۲ ساعت)، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند.

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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

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 مورفوژنتیکی 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، به‌طوری‌که 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 هایپرسین (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 (۰/۸۷ درصد) بود که به مقدار قابل توجهی بیشتر از شرایط دمای محیطی (۲۵ درجه سانتی‌گراد) گردیده است. تأثیرگذاری الیسیتور دمای کم بر سنتز متابولیت‌های ثانویه ممکن است به این دلیل باشد که الیسیتور 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 الیسیتورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که می‌تواند آنزیم‌ها و درنهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی نموده و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شود. گزارش شده در مسیر بیوسنتز هایپریسین 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 هایپریسین 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 هایپرسین (PKS و Hyp-1) تحت تأثیر دمای پایین افزایش یافته و باعث افزایش و تجمع میزات هایپرسین و ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیکی می‌گردد. علاوه بر آن، الیسیتورها 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 هایپرسین 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 هایپرسین تحت دمای پایین افزایش یابد (Crocoll, 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. الیسیتور 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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

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 آمونیالیاز 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 به-عنوان 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 آمونیالیاز 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 (Tesfay *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 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 آرابیدوپسیس (*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 الیسیتورها 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.

## منابع

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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

Anyoewska, M., Kowalczuk, A., Lozak, A., JablczySka, 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 Fakultat der Friedrich-Schiller-Universitat 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 aquatical* L. Jornal of Acta physiolplant 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. Jornal 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. Jornal of Plant Cell Tissue and Organ

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

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 flavaonoid 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.
Sheteiwy, 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 elicitations 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 biosyntesis. 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 inflate* 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.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]

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

**Farahnaz Tavakoli[1], Mohammad Rafieiolhossaini[1], Rudabeh Ravash[2]*, Morteza Ebrahimi[3]**

**[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 µg / 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

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-09-22 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.1.7 ]