

## تأثیر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بیان ژن *bapt* و بیوسنتز تاکسان‌ها در گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای فندق رقم سگورب (*Corylus avellana* L cv. 'Segorb')

رحیمه همتی گوگه<sup>۱</sup>، محمدرضا فتاحی مقدم<sup>۲\*</sup>، مجید شکرپور<sup>۳</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۲</sup> و علیداد ورشوچی<sup>۴</sup>  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران  
۴. دکتری، مدیر واحد تحقیقات و توسعه شرکت کشت و صنعت رعنا، تهران، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۳)

### چکیده

تاکسول به‌عنوان یک دارو با منشأ گیاهی در درمان سرطان‌های مختلف استفاده می‌گردد. گیاه فندق (*Corylus avellana* L.) به‌عنوان یک منبع جایگزین برای تأمین تاکسول مطرح شده و توجه زیادی را بخود معطوف کرده است. در این مطالعه، تأثیر دو الیستور متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر روی گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای فندق رقم سگورب مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی PAL، کاتالاز، PPO، SOD و نیز محتوی پراکسید هیدروژن مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین این تحقیق، با هدف ارزیابی بیان ژن‌های *txs*، *dbat* و *bapt* بیوسنتز و تولید تاکسان‌ها انجام شد. بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوی پراکسید هیدروژن حاکی از تأثیر معنی‌دار الیستورها در افزایش محتوی  $H_2O_2$  و افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در تیمارهای مؤثر بر افزایش متابولیت‌ها بود. ژن‌های *txs* و *dbat* در فندق رقم سگورب بیان نشدند. بیشترین میزان بیان ژن *bapt* به‌ترتیب در تیمار با اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در روز دوم و در تیمار با متیل جاسمونات در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در روز چهارم بود و بالاترین مقدار تاکسان‌ها به‌ترتیب در تیمار با متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار و اسید سالیسیلیک ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌مولار به‌دست آمد، به طوری که نسبت به شاهد هشت برابر افزایش نشان داد. در کل، میزان تاکسان‌ها از روز دوم تا روز ۱۶ نسبت به شاهد بیشتر بود. بیشترین مقدار 10-deacetylaxol و تاکسول مربوط به روز چهارم بعد از اعمال الیستور بود. در مجموع، هر دو الیستور متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان نسبی ژن *bapt* شدند.

واژه‌های کلیدی: الیستور، بیان ژن، تاکسول، ترکیب دارویی ضد سرطان، کشت بافت.

## Influence of methyl jasmonate and salicylic acid treatment on the antioxidant enzyme changes, expression of *bapt* and biosynthesis of taxanes in *in vitro* plantlets of hazelnut cv 'Segorb'

Rahimeh Hemati Gough<sup>1</sup>, Mohammadreza Fattahi Moghaddam<sup>2\*</sup>, Majid Shokrpour<sup>3</sup>,  
Mohammadreza Naghavi<sup>2</sup> and Alidad Varshouchi<sup>4</sup>

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Ph.D. Head of R&D, RANA Agro-Industry Corporation, Tehran, Iran

(Received: Nov. 24, 2019 - Accepted: Feb. 22, 2020)

### ABSTRACT

Taxol is a phytochemical medicine which is used as a chemotherapy medication to treat several cancers. The hazelnut has been suggested as alternative source of taxol and has gained much attention. In this study, the influence of two elicitors, methyl jasmonate and salicylic acid was applied on hazelnut cv. 'Segorb' plantlets originated from *in vitro* condition. The activation of antioxidant enzymes such as PAL, catalase, PPO, SOD as well as hydrogen peroxide content was studied. Also, this research was carried out intending to evaluate *txs*, *dbat* and *bapt* gene expression, biosynthesis and production of taxanes. The investigations of antioxidant enzyme activities and  $H_2O_2$  content were indicated the significant effects of such elicitors on increasing  $H_2O_2$  content and the subsequent rise in catalase activity. *txs* and *dbat* genes in hazelnut 'Segorb' cultivar did not express. The highest expression of *bapt* was observed during the second day of treatment with 0.1 mM of SA and 0.1 mM methyljasmonate, while the highest amount of taxanes detected was after treatment with methyljasmonate at 0.1mM, SA at 0.2 and 0.1 mM, respectively, where taxanes detection demonstrated an 8-fold increase compared to the control. Overall, the content of taxanes on the 2<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> day was higher than control. The highest amount of 10-deacetylaxol and taxol was detected on day 4 after elicitor application. In conclusion, two elicitors methyljasmonate and salicylic acid caused to increase relative gene expression of *bapt*.

**Keywords:** Anticancer phytochemical medicine, elicitor, gene expression, taxol, tissue culture.

\* Corresponding author E-mail: fattahi@ut.ac.ir

### مقدمه

فندق *Corylus avellana* L. یک گیاه دولپه‌ای از جنس *Betulaceae* و منشأ آن اوراسیا است که امروزه در سراسر دنیا گسترش یافته است. فندق دارای ارزش اقتصادی بالایی بوده و پنجمین محصول خشکبار جهان را به خود اختصاص داده است و ایران هفتمین کشور تولید کننده این محصول است (Shahi et al., 2020). واکنش رقم های فندق به تنش کم آبی توسط Shahi et al. (2020) مورد مطالعه قرار گرفته است.

تولید تاکسول در برگ‌ها و پوسته میوه فندق *C. avellana* به‌وسیله Ottaggio et al. (2008) بررسی شد و نشان دهنده تجمع سه برابری تاکسول در برگ‌های فندق بود. دسترسی محدود به درختان سرخدار، مقدار پایین ماده‌ای که می‌تواند از هر درخت به‌دست آید و همچنین نگرانی‌های زیست محیطی در مورد حفظ درختان و ممانعت از ریشه کنی آن‌ها موجب جستجوی منابع جدید جایگزین گردید (Rezaei et al., 2011a). اگرچه تولید تاکسول از منبع *Taxus* از نظر تجاری قابل قبول تر است، اما جواب‌گوی نیاز بازار نیست و پیچیدگی ساختاری مانع از سنتز شیمیایی آن می‌شود (Bemani et al., 2012). به همین دلیل منابع جایگزین از جمله درخت فندق برای تولید تاکسول مورد توجه واقع شده است. تاکسول به میزان زیادی از پوست درونی گونه‌های سرخدار *Taxus spp.* به‌دست می‌آید. تاکسول و آنالوگ‌های آن به‌وسیله تداخل با میکروتوبول‌ها و جلوگیری از تقسیم آن‌ها مانع تقسیم سلول (میتوز) شده و با ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی مرگ سلولی (Apoptosis) را القا می‌کنند (Gallego et al., 2015; Gallego et al., 2016). پاکلی تاکسل متعلق به گروه بزرگی از دی‌ترپنوئیدها می‌باشند که به تاکسان‌ها معروفند، جزو متابولیت‌های ثانویه بوده و نقش احتمالی پاکلی تاکسل در گیاه سرخدار، دفاع گیاه در مقابل پاتوژن‌ها می‌باشد (Gallego et al., 2015). تاکسول به عنوان موثرترین داروی ضد سرطان در نیم قرن اخیر مطرح بوده است و پیش‌بینی می‌شود فروش داروهای متعلق به خانواده تاکسان‌ها در سطح جهان از سال ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۵ از ۹۰ میلیون

دلار به ۱۴۰ میلیون دلار برسد و تولید آن در سال ۲۰۱۷ برابر با ۲۶۰۰ کیلوگرم بوده است (www.reportsweb; www.research & market.com). تاکسان‌ها، به ویژه تاکسول از ارزش دارویی زیادی برخوردار بوده و در درمان سرطان‌های تخمدان، سینه، سر، گردن و ریه که دارای سلول‌های کوچک یا فاقد سلول‌های کوچک باشند، سرطان پوست سارکومای کاپوزی، لنفوما، سرطان پروستات، روده، مثانه و غیره استفاده می‌شود (Malik et al., 2011). سرطان یکی از مهمترین دلایل مرگ و میر با داشتن ۲/۵ میلیون مورد مرگ در دهه‌های گذشته در سراسر جهان بوده است (Gallego et al., 2015).

از این‌رو مطالعات متعددی در زمینه شناخت مکانیسم بیوسنتز تاکسان‌ها و افزایش راندمان تولید، کشت سوسپانسیون سلولی و کشت درون شیشه‌ای در فندق صورت گرفته است. در کشت درون شیشه‌ای فندق، محیط NRM با در نظر گرفتن ترکیبات و مواد آلی در بذر فندق برای ارقام فندق هیبرید توسط Nas & Read (2004) ارائه شد. محیط HM محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) تغییر یافته می‌باشد که توسط Bacchatta et al. (2008) معرفی شده است. محیط DKW (Driver & Kuniyuki (1984) medium) توسط Reed (2013) و Jyoti (2013) در کشت درون شیشه‌ای فندق استفاده شده است. Bestoso et al. (2006) و Rezaei et al. (2010) از محیط MS، Gallego et al. (2015) از محیط MS و B5 در کشت سلولی فندق استفاده کرده‌اند.

محرک های زیستی و غیر زیستی در چرخه تولید متابولیت های ثانویه نقش مهمی داشته و از آنها در جهت افزایش متابولیت های ثانویه در غلظت های مختلف استفاده می شود (Niyazari et al., 2019). الیستورهای زیستی خارجی شامل ترکیباتی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها یا سایر پاتوژن‌ها آزاد شده یا به‌وسیله فعالیت‌های آنزیم‌های گیاهی بر روی دیواره‌های سلولی میکروبه‌ها، آنزیم‌های میکروبی، عصاره‌های مخمری و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها، تولید می‌شوند. منشأ داخلی آنها شامل پلی‌ساکاریدهایی از دیواره سلول گیاهی،

2011b) مورد مطالعه قرار گرفت. آن‌ها مشاهده کردند که افزایش تاکسان‌ها به میزان ۱/۶ و دو برابر در تیمار با اولتراسوند و افزایش هفت برابری تاکسان‌ها در تیمار با اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر شده ولی باعث افزایش محتوی فنلی نیز می‌گردد.

تأثیر میدان مغناطیسی ثابت (SMF: Static magnetic field) به میزان ۳۰ مگا هرتز، اسید سالیسیلیک در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌مولار در لیتر و اثر متقابل آن‌ها بر روی کشت سلولی فندق توسط *Rezaei et al.* (2011d) ارزیابی شده است. تأثیر میدان مغناطیسی ثابت بعد از هشت تا ۱۲ روز بعد از واکشت در دوره‌های هشت ساعت انجام شد، که باعث افزایش تاکسول بعد از قرارگیری در SMF و اثر متقابل هر دو گردیده ولی باعث کاهش رشد سلول‌ها و افزایش محتوی فنلی و فعالیت پلی‌فنل اکسیداز می‌گردد. مطالعه تنظیم سطح رونویسی در بیوسنتز تاکسول در سلول‌های القاشده با متیل جاسمونات توسط *Onrubia et al.* (2010) صورت گرفته است. آن‌ها گزارش داده‌اند که ژن‌های کدکننده آنزیم‌های اولیه مسیر بیش بیان شده (Up-regulation) و در سطح خیلی پایین‌تر رونوشت‌های آنزیم‌های آخر را بیان کرده است. در فرآیند بیوسنتز تاکسول به نظر می‌رسد الیستورهای مختلفی در مراحل متابولیک مختلف یا سطوح رونویسی فعالیت می‌کنند، اما برای تأیید نیاز به مطالعات بیشتری دارد (*Onrubia et al.*, 2010).

بیان ژن *txs* و *dbat* توسط *Onrubia et al.* (2013) در *Taxus baccata* تحت تأثیر الیستورهای وانادیل سولفات و متیل جاسمونات (۰/۱ میلی‌مولار) در چهار ساعت، ۱۲ ساعت، یک، دو، چهار، هشت، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ روز بعد از افزودن الیستور با هدف درک مکانیسم فعالیت بیوسنتز تاکسان‌ها و ارتباط آن‌ها بین بیان ژن و تولید تاکسان‌ها مطالعه شده است. از qPCR برای تعیین تغییرات در پروفایل رونوشت ژن‌های *txs* و *dbat* استفاده شده است. آنزیم TXS حلقوی شدن ژرانیل ژرانیل دی فسفات را کنترل می‌کند که مرحله اول در بیوسنتز تاکسان‌ها می‌باشد *dbat* (رمز کننده 10-deacetylbaaccatin III-10-O-

پروتئین‌های بین سلولی و مولکول‌های کوچک سنتز شده توسط سلول گیاهی در پاسخ به انواع استرس‌ها یا حمله پاتوژن‌ها، شامل هورمون‌های گیاهی از قبیل متیل جاسمونات یا اسید سالیسیلیک می‌باشند. جاسمونات‌ها به صورت موضعی و سیستمیک باعث شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه می‌شوند. جاسمونات‌ها به خصوص متیل جاسمونات‌ها نقش مهمی در فرآیندهای شروع آبشار علامت‌رسانی دارند که ژن‌های دفاعی در گیاهان را تنظیم می‌کنند (*Ramirez-Estrada et al.*, 2016). جاسمونات‌ها و 12-OPDA (12-oxo-phytodienoic acid)، تعداد زیادی از عملکردهای گیاه را کنترل می‌کنند، که از جمله آن‌ها می‌توان به تولید گرده‌ها، تنظیم رشد، تولید بازدارنده‌های پروتئینازی و سنتز آلکالوئیدها اشاره نمود. برخی نیز عملکردهایی مانند تولید تاکسول را القا می‌کنند که ارزش دارویی دارند (*Lauchli & Boland*, 2003).

*emani et al.* (2012) با کاربرد تیمار اسید بنزوئیک در سه غلظت صفر، ۰/۵ و یک میلی‌مولار و اسید سینامیک در غلظت‌های صفر، ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌مولار به محیط کشت فندق در مرحله هفت روز بعد از واکشت سلول‌ها و برداشت آن‌ها ۱۴ روز بعد از واکشت مشاهده نمودند که تاکسان‌ها تا چهار برابر نسبت به شاهد به وسیله اسید بنزوئیک افزایش نشان داد اما در تیمار با اسید سینامیک تغییری مشاهده نکردند.

*Ghanati et al.* (2015) از امواج فراصوت با قدرت پایین و امواج فراصوت پیوسته با ۲۹ کیلو هرتز در واحد W/cm به مدت ۸ تا ۴۰ دقیقه در کشت سلولی فندق استفاده کردند. زمان القای الیستور ۷ روز بعد از اعمال الیستور و برای آنالیزهای ملکولی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار و سنجش تاکسان‌ها ۱۳ روز بعد از تیمار صورت گرفت. افزایش قابل ملاحظه عملکرد سه تاکسان اصلی را زمانی که به مدت ۲۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار گرفتند، مشاهده کردند.

تأثیر اسید سالیسیلیک در دو غلظت ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌مولار و دی بوتیل فتالات در ۱۰ درصد حجمی افزودن الیستور و اعمال امواج فوق صوت در هشت و ۱۳ روز بعد از واکشت و در شروع فاز لگاریتمی رشد در کشت سلولی فندق توسط *Rezaei et al.* (2011a, )

۰/۲ میلی‌مولار) و دو تکرار استفاده شد. در هر تکرار سه شیشه که هر کدام حاوی شش گیاهچه بودند، استفاده گردید. گیاهچه‌ها بعد از تکثیر و طویل شدن در محیط DKW، جهت القاء ریشه به محیط کشت 1/2NRM دارای هورمون IBA منتقل شدند. طول متوسط گیاهچه‌ها ۷ سانتی‌متر و متوسط ریشه آن‌ها ۳/۵ سانتی‌متر بود. گیاهچه‌ها دارای ۷-۸ برگ و فاقد شاخه فرعی بودند. همچنین گیاهچه‌ها در داخل آزمایشگاه در محیط استریل قرار داشته و از نظر آلودگی‌های قارچی و باکتریایی کنترل شده، ولی از نظر عاری از ویروس بودن آزمایش نشده بودند. نحوه اعمال الیسیاتور به این ترتیب بود که ابتدا تعداد شش گیاهچه که از قبل ریشه‌زایی در آنها القاء شده بود، به تک‌شیشه‌ای که حاوی ۱۷۵ میلی‌لیتر محیط 1/2NRM فاقد هورمون و کوکوپیت اتوکلاو شده بود، منتقل شد. در طی سه هفته ریشه‌زایی در محیط کوکوپیت کنترل شد و تکمیل ریشه‌ها حدوداً سه هفته طول کشید.

بعد از اطمینان از ریشه‌زایی، الیسیاتورها و پیش ماده‌ها شامل فنیل آلانین و اسید بنزوئیک به ترتیب در غلظت ۰/۰۰۳ و یک میلی‌مولار بر طبق مطالعه Bemani و همکاران (۲۰۱۳) در ۳۰ میلی‌لیتر محیط 1/2NRM حل شده و سپس به محیط کشت و کوکوپیت در هر شیشه اضافه شد. در هر تکرار از دو گیاه نمونه‌گیری صورت گرفت. نمونه‌گیری دو، چهار و ۱۶ روز بعد از اعمال الیسیاتور جهت آنالیزهای HPLC و دو و چهار روز بعد جهت آنالیزهای بیان ژن و سنجش آنزیم‌ها صورت گرفت. همچنین مشاهده تغییرات ظاهری گیاهان به صورت چشمی همراه با یادداشت‌برداری صورت گرفت.

**اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین کل**  
برای تهیه بافر استخراج آنزیم از روش Balestrasse et al. (2001) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری که حاوی ۰/۱ گرم نمونه پودر شده برگی بود جدا کرده و داخل هر نمونه به میزان دو میلی‌لیتر بافر فسفات سرد ۵۰ mM با pH=7.6 حاوی 0.1% triton X-100 و EDTA 0.1 mM، PVP 1% اضافه شد. نمونه‌ها بعد از ۲۰ ثانیه ورتکس و قرار

مراحل میانی سنتز یعنی تبدیل acetyltransferase 10-deacetylbaaccatin به Baccatin III را کنترل می‌کنند. مرحله ضروری دیگر در بیوسنتز تاکسول استریفیکاسیون Baccatin III با زنجیره جانبی بتافنیل‌آلانوئیل کوآنزیم  $\beta$ -phenylalanoyl-CoA مشتق شده از  $\beta$ -فنیل آلانین است. واکنش توسط آنزیم BAPT انجام می‌شود. *pam* (رمزکننده phenylalanine aminomutase) و *bapt* (رمزکننده 3-amino-3-baccatinIII-phenylpropanoyltransferase) است و *dbt* (رمزکننده 3-N-benzoyl transferase) که در مراحل پایانی سنتز تاکسول دخالت دارد (Onrubia et al., 2010, 2013). مرور منابع نشان داده است که تاکنون مطالعه‌ای در مورد بیان این ژن‌ها در فندق گزارش نشده است. هدف از این تحقیق بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز تاکسان‌ها و تعیین مقادیر آن‌ها در گیاهچه‌های فندق تحت تأثیر تیمار با الیسیاتورهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بود. همچنین تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از اعمال الیسیاتورها و معرفی بهترین سطح تیماری و روز از نظر میزان تاکسان‌ها نیز از اهداف دیگر این پژوهش بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

گیاه مورد بررسی، فندق رقم سگورب بود. ریزنمونه‌ها از درختان فندق ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید. با توجه به اینکه این رقم در مرحله تهیه گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای فندق، از نظر شاخص‌های رشدی شامل پرآوری، طویل شدن و ریشه‌زایی بالاترین میانگین را داشت، برای القای الیسیاتورها مورد استفاده قرار گرفت (Hemmati Gougeh et al., 2017).

### اعمال الیسیاتورها

آزمایش فاکتوریل ۳×۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی دارای سه سطح میتل جاسمونات (صفر، ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌مولار) و سه سطح اسید سالیسیلیک (صفر، ۰/۱ و

افزوده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتیفریوژ شده، سپس ۰/۵ میلی لیتر از روشناور با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات، ۱۰ میلی مولار با pH=7 و یک میلی لیتر یدید پتاسیم (KI) یک مولار مخلوط گردید. جذب در ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوی پراکسید هیدروژن براساس منحنی استاندارد محاسبه شد (Velikova et al., 2000).

#### سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

سنجش فعالیت این آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به روش Kar & Mishra (1976) با کمی تغییر اندازه گیری شد. جهت سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز ۳۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات (pH=7.6)، پنج میکرو لیتر پیروگالول ۱۰۰ میلی مولار و ۱۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. برای سنجش این آنزیم ابتدا، ۳۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات و پنج میکرو لیتر پیروگالول با احتساب تعداد نمونه های موجود باهم مخلوط شدند. سپس ۱۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی به پلیت های ۹۶ خانه ای ریخته شد و بعد از آن به میزان ۳۰۵ میکرو لیتر مخلوط بافر فسفات و پیروگالول ۱۰۰ میلی مولار با مولتی سمپلر به عصاره آنزیمی اضافه و سه مرتبه همزده شد. سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مدت زمان چهار دقیقه با فاصله زمانی ۴۰ ثانیه توسط دستگاه پلیت ریدر قرائت شد. اجزای معادله (۱) شامل U: واحد آنزیم I: ضریب پراکسید هیدروژن (۴)، Vt: حجم مخلوط واکنش (۳۱۵)، df: فاکتور رقیق کننده (۳/۱۵)، t: مدت زمان واکنش (۲۴۰ ثانیه)، Vs: حجم نمونه، E: ضریب خاموشی ۱-۱cm-۱/۴۷mM، l: طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش است.

رابطه (۱)

$$Activity \left( \frac{U}{ml.min} \right) = \frac{\Delta A_{420} \times l \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

#### سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

جهت سنجش آنزیم SOD ابتدا نیترو بلو تترازولیموم (NBT) در غلظت ۸/۲۵ میلی مولار (۶/۷۵ mg/ml) به صورت تازه تهیه شد (Bacana et al., 1998). سپس مخلوط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار به همراه EDTA

گرفتن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتیفریوژ شدند. بعد از اتمام سانتیفریوژ، روشناور به پنج تیوب ۰/۲ میلی لیتری منتقل شده و در ۲۰- نگهداری شدند. از عصاره به دست آمده برای قرائت محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD; EC 1.15.1.1)، پلی فنل اکسیداز (PPO; EC 1.10. 3.2 or ) و آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6) استفاده شد.

#### اندازه گیری محتوای پروتئین کل

برای سنجش محتوای پروتئین کل از محلول بردفورد استفاده شد (Bradford, 1976). برای تهیه محلول بردفورد از ۰/۱ گرم کوماسی بلو، ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۰۰ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ۸۵ درصد استفاده شد. بعد از حل کردن کوماسی بلو، اتانول و کمی آب مقطر درون ارلن، اسید ارتوفسفریک به تدریج و به صورت قطره قطره اضافه شد. محلول به مدت ۴ ساعت در یخچال نگهداری شده و سپس با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسانده شد. بعد از فیلتر و فویل پیچی تا زمان استفاده، در یخچال در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تهیه محلول پایه ۵۰ میلی گرم آلبومین سرم گاوی (BSA) با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. به منظور ساخت استانداردها از محلول استوک، در ۱۵ غلظت از صفر تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر BSA تهیه و میزان جذب آن ها محاسبه و در نهایت منحنی استاندارد (بر اساس معادله خطی) به دست آمد. جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر Biotech مدل EON ساخت آمریکا اندازه گیری شد.

#### سنجش پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

برای تعیین محتوی پراکسید هیدروژن، ابتدا ۰/۱ گرم از برگ هایی که از قبل در ازت مایع و در فریزر ۸۰- نگهداری شده بودند، در هاون سرد با نیتروژن مایع به خوبی پودر شدند و به یک تیوب ۲ میلی لیتری منتقل شدند. سپس ۱/۵ میلی لیتر تری اسید کلرواستیک ۰/۱ درصد وزن به حجم در حمام آب یخ به تیوب ها

واکنش با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر HCl، شش مولار خاتمه یافت و محصول (اسید سینامیک) سه بار با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات، شستشو داده شد و بعد از شستشو تبخیر کامل صورت گرفت، در نهایت یک پودر سفید رنگ متمایل به قهوه‌ای باقی ماند که در سه میلی‌لیتر NaOH، ۰/۵ مولار حل شد و جذب آن در ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت اسید سینامیک بر اساس منحنی استاندارد جذب اسید سینامیک به دست آمد. یک واحد از فعالیت آنزیمی PAL برابر با یک میکرومولار اسید سینامیک تولید شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است (Wang et al., 2006).

#### فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم CAT با اندازه‌گیری سرعت ناپدید شدن پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Chance & Maehly (1959) سنجش شد. مخلوط واکنش دارای ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم با pH=7.4، ۰/۱ میلی‌لیتر لیتزر پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کاهش پراکسید هیدروژن با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر دنبال می‌شود. هر خوانش ۲ دقیقه طول کشیده و حداقل ۵ بار خوانش صورت گرفت. خوانش اول (Abs, initial) از خوانش آخر (Abs, final) کم شد. یک واحد فعالیت آنزیمی برابر با میزان ناپدید شدن پراکسید هیدروژن در دقیقه در یک میلی‌گرم پروتئین است (Kang & Saltveit., 2001).

رابطه ۴)

$$CAT \text{ activity } (U/ml.min) = \frac{(Abs. initial - Abs. final) * 1010.6}{[protein conc.](mg/ml - 1)}$$

استخراج RNA، سنتز cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و Real time quantitative PCR

استخراج RNA با استفاده از پروتکل Zarei et al. (2012) صورت گرفت. سپس حذف DNA ژنومی با استفاده از DNase تهیه شده از شرکت زیست فناوری رنا انجام شد و نانودراپ مجدد نمونه‌ها صورت گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Vivantis (http://www.vivanttechnologies.com) در دو مرحله صورت گرفت (جدول‌های ۱ و ۲). در مرحله اول نمونه‌ها

در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین در غلظت ۲۸۰ میلی‌مولار و ریبوفلاوین در غلظت ۰/۲۲ میلی‌مولار تهیه شد. ابتدا از مقادیر ذکر شده ۱/۹۶ میلی‌لیتر در هر چاهک پلیت ریخته شد و سپس ۶۰ میکرولیتر از هر نمونه در هر چاهک بارگذاری شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقابل منبع نوری (دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات) قرار داده شدند. فعالیت SOD و ممانعت از واکنش فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیوم در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. چاهک کنترل برای محاسبه تغییر میزان جذب در نمونه شاهد و ارزش چاهک‌ها با نمونه برای محاسبه تغییر میزان جذب نمونه‌ها استفاده شد. واحد SOD به عنوان مقدار آنزیمی که بتواند ۵۰ درصد مانع احیای نیترو بلو تترازولیوم در شرایط آزمایش شود، بیان می‌شود، که با روابط ۲ و ۳ محاسبه گردید. حجم نمونه Vol و F درجه رقت و برابر با یک در نظر گرفته شد.

رابطه ۲)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\Delta Abs_{\min(\text{control})}^{560} - \Delta Abs_{\min(\text{sample})}^{560}}{\Delta Abs_{\min(\text{control})}^{560}} \times 100$$

رابطه ۳)

$$SOD (U/ml.min) = \frac{\% \text{ inhibition}}{50 \times Vol} \times f$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (PAL)

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (Phenylalanine ammonia-lyase) بر اساس نرخ تولید اسید سینامیک تعیین شد. ۰/۱ گرم از برگ‌ها که قبلاً در نیتروژن مایع فریز و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، در هاون سرد با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl، در غلظت ۵۰ میلی‌مولار که حاوی بتا مرکاپتواتانل در غلظت ۱۵ میلی‌مولار (pH=8) بود به آن افزوده شد. عصاره حاصل در ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی برای سنجش آنزیمی جمع‌آوری گردید. برای یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گذاشته شد.

نهایی ده میکرولیتر با استفاده از پلیت‌های ۴۸ تایی با استفاده از *ampliqon sybr green 2X high ROX* و بعد از تعیین  $T_m$  آغازگرها صورت گرفت. مخلوط واکنش در جدول ۳ آورده شده است. تجزیه داده‌ها با استفاده از ژن رفرنس *18S* به‌عنوان مرجع انجام شد. به طوری که تمامی داده‌های مربوط به هر نمونه از ژن *bapt* از میانگین ژن رفرنس *18S* کم شد و به این ترتیب  $\Delta ct$  به‌دست آمد. سپس داده‌ها از میانگین مربوط به شاهد در ژن *bapt* کم شد و پس از به‌دست آوردن  $\Delta\Delta ct$ ، بیان نسبی ژن *bapt* از فرمول  $2^{-\Delta\Delta ct}$  محاسبه گردید. سپس از تکرارهای مربوط به هر نمونه میانگین گرفته شد. در نهایت انحراف معیار (STD) و خطای استاندارد (SE) به‌دست آمد.

به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت این زمان بلافاصله تیوب‌ها در روی یخ به‌مدت دو دقیقه قرار گرفتند. بعد از افزودن مقادیر موجود در جدول ۲، سنتز cDNA به‌مدت ده دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و پنج دقیقه در دمای ۸۵ صورت گرفت. جهت بیان نسبی ژن، cDNA در غلظت نهایی ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد. لازم به‌ذکر است آغازگر *18S* به‌عنوان ژن مرجع طراحی شد که شماره دسترسی آن در جدول ۴ آورده شده است. اندازه‌گیری بیان ژن به کمک Real time PCR و با استفاده از دستگاه ABI (<http://www.appliedbiosystems.com>) صورت گرفت. مخلوط واکنش Real time PCR در حجم

جدول ۱. اجزای سنتز cDNA، مرحله اول

Table 1. Components of cDNA synthesis, first step

Components of reaction	Primitive concentration	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
Total RNA or poly A(+) mRNA	300 ng/ $\mu$ l	4	120 ng/ $\mu$ l
Primer oligo d(T)	40 $\mu$ M	1	0.4 $\mu$ M
Random hexamer primer	0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l	0.1	0.00005 $\mu$ g/ $\mu$ l
INTP Mix	10 mM	1	0.04 mM
H <sub>2</sub> O (nuclease free)	-	3.9	-
Total Volume	-	10	-

جدول ۲. اجزای سنتز cDNA، مرحله دوم

Table 2. Components of cDNA synthesis, second step

Components of reaction	Primitive concentration	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
10X buffer M-Mulv	10X	2	1X
M-Mul V Reverse Transcriptas	200 U/ $\mu$ l	0.5	2 U/ $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O (nuclease free)	-	7.5	-
Total volume	-	10	-

جدول ۳. اجزای واکنش Real time PCR

Table 3. qPCR or real time PCR reaction

Component of reaction	Primitive concentration	final concentration	Volume ( $\mu$ l)
cDNA	300 ng/ $\mu$ l	30 ng/ $\mu$ l	1
Primer (Reverse)	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2
Primer (Forward)	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2
Ampliqon sybr green 2x high ROX	2X	1X	5
dH <sub>2</sub> O nuclease free	-	-	3.6
Total volume	-	-	10

جدول ۴. توالی آغازگرهای استفاده‌شده در تکثیر مکان ژنی *bapt* در فندقTable 4. The primer sequences used in amplification of *bapt* locus in hazelnut

Locus	Primer sequences	Annealing temperature of primers (C)	Length of amplified fragment (bp)	Accession No.	Reference
<i>txs</i> (F)	5' -CCGTGTACCCTACAACCAATAC-3'	57	118	AY424738.1	Nasiri <i>et al</i> , 2016
<i>txs</i> (R)	5' -TTGTTAGTCGCCAGCTCAAG-3'				
<i>dbat</i> (F)	5' -CTCTCCACCCTTGACAATCTAC-3'	57	119	KC571283.1	Nasiri <i>et al</i> , 2016
<i>dbat</i> (R)	5' -GAGAGAGCCTGCCGAATTAC-3'				
<i>bapt</i> (F)	5' -TGTGGGAGCGAATGTGTATG-3'	57	137	JQ029681.1	Nasiri <i>et al</i> , 2016
<i>bapt</i> (R)	5' -CTAGCTTACCAGTTCTCTATTCC-3'				
<i>18S</i> (F)	5' -GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC-3'	57	61	DQ478811.1	Designed by Authors
<i>18S</i> (R)	5' -CTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGG-3'				

تقریباً در کل برگ‌ها و به‌خصوص در برگ‌های پایین بیشتر دیده شد. در تیمارهای ترکیبی ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در ۰/۱۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات نیز این عارضه مشاهده شد.

**میزان پروتئین کل در گیاهچه‌های فندق تحت تیمار**  
بیشترین مقدار پروتئین کل در تیمار با اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و در سطح صفر متیل جاسمونات و برابر با ۱۱/۶ میلی‌گرم در روز دوم بعد از اعمال تیمار (شکل ۲A) و در تیمار ترکیبی ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در روز چهارم برابر با ۱۰/۳۴ میلی‌گرم بود (شکل ۲B). در سایر تیمارها نیز مقدار پروتئین کل تحت تأثیر الیستور قرار گرفته و نسبت به گیاهچه‌های شاهد، پروتئین کمتری داشته‌اند. محتوی پروتئین کل در روز دوم در برخی تیمارها کاهش نشان داده است در حالی که در روز چهارم میزان آن افزایش داشته است. *Tasgin et al.* (2006) گزارش کردند که اعمال تیمار خارجی اسید سالیسیلیک در برگ‌های گندم زمستانه می‌تواند در تحمل به سرما و در تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آپوپلاستیک (SOD، CAT و POX) دخیل باشد. *Mutlu et al.* (2013) با استفاده از الگوهای الکتروفوروتیک پروتئین‌های آپوپلاستی این تغییرات را بررسی کرده و بیان کردند که تیمار با اسید سالیسیلیک می‌تواند موجب تجمع و انباشت یا سنتز مجدد (*de novo*) برخی پروتئین‌های آپوپلاستی شود.

### عصاره‌گیری و آنالیز تاکسان‌ها به روش HPLC

عصاره‌گیری از دو نمونه گیاهی فندق در هر تیمار با استفاده از پروتکل *Han et al.* (1997)، *Fett-neto et al.* (1992) و *Hoffman & Shahidi* (2009) صورت گرفت. آنالیز HPLC با استفاده از دستگاه Waters (Tech\_comm@waters.com) انجام شد. جداسازی با یک ستون آنالیتیکال Eurosphere 100-5 C18 انجام شد. به‌دست‌آوردن داده‌ها و مقایسه آن‌ها با استفاده از نرم افزار ملابنوم ۳۲ انجام شد و ارزیابی‌های کروماتوگرافی با استفاده از سیستم reversed phase (Waters) matrix (5 μm) صورت گرفت. شستشو در سیستم گرادیانی با استونیتریل به‌عنوان فاز متحرک (solvent A) و آب دیونیزه (solvent B) با flow-rate=1 mL min<sup>-1</sup> انجام و مانیتور پیک‌ها در طول موج ۲۳۰ نانومتر صورت گرفت. حجم تزریق برابر با ۲۰ میکرولیتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

### تجزیه داده‌ها

آنالیزهای آماری با SPSS ver. 16 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از برنامه SAS ver 9.4 و آزمون دانکن صورت گرفت.

### نتایج و بحث

رقم فندق سگورب که به صورت درون‌شیشه‌ای تکثیر شده بود بعد از کامل شدن ریشه جهت اعمال تیمارها مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

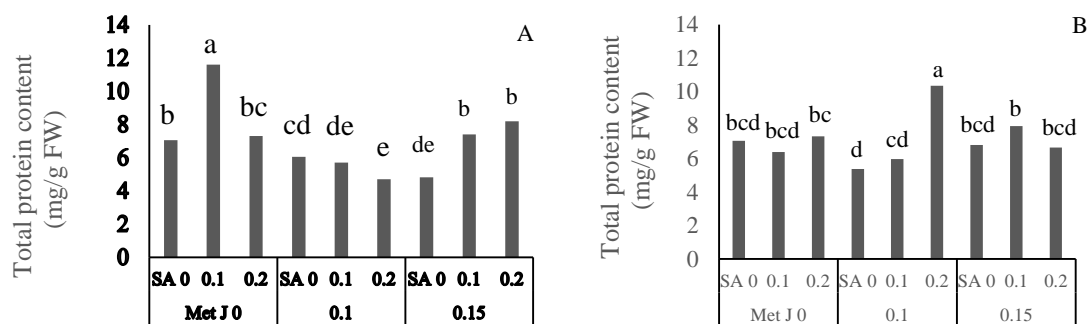
در گیاهانی که با الیستور اسید سالیسیلیک ۰/۲ میلی‌مولار و در سطح صفر متیل جاسمونات تیمار شده بودند نوک برگ‌ها از روز چهارم شروع به نکروز شدن کرده و تا روز ۱۶ این سوختگی نوک برگ‌ها



شکل ۱. گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای فندق "رقم سگورب" (a) در گلخانه، (b) در کوکوپیت

Figure 1. Hazelnut 'Segorb' cultivar plantlets originated from *in vitro*. a) in glasshouse b) in cocopeat





شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان پروتئین کل در گیاهچه‌های فندق، (B - A) به ترتیب دو و چهار روز بعد از اعمال الیسیتور.

Figure 2. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on total protein content in hazelnut plantlets A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.

شناسایی تنش‌های اکسیداتیو استفاده می‌شوند (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

پراکسید هیدروژن که به دنبال دریافت الیسیتور از طریق گیرنده‌های درون غشا تولید می‌گردد، وارد سلول شده، در ابتدا تولید ROS نموده، به دنبال آن با تولید پراکسیداسیون لیپیدی و از طریق تولید اکسی‌لیپین‌های حلقوی باعث بیان ژن‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه بیوسنتزی یا دفاعی می‌گردد. سیستم علامت‌دهی ROS به طور مستقیم یا از طریق مسیر علامت‌دهی اتیلن و مسیر مرتبط با لیپازها، در انتهای مسیر اسید جاسمونیک و با فعالیت کربوکسیل متیل ترانسفرازها، منجر به تولید متیل جاسمونات می‌گردد. در نهایت متیل جاسمونات‌ها از طریق مسیرهای واسطه بر روی فاکتورهای رونویسی اثر گذاشته و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌نمایند (Zhao *et al.*, 2005). پراکسید هیدروژن در پاسخ به انواع الیسیتورها و تحریکات تولید می‌شود و واسطه تلاقی بین مسیرهای علامت‌دهی محسوب می‌شود. (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

#### میزان فعالیت آنزیم PPO

تجزیه واریانس اثر تیمارها و روز در میزان فعالیت آنزیم PPO در جدول ۶ آورده شده است. اثر اصلی روز در فعالیت آنزیم PPO تأثیر معنی‌داری نداشت، ولی اثر متقابل سه جانبه تیمارها در روز معنی‌دار بود. بیشترین فعالیت آنزیم PPO در تیمار ترکیبی متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار و اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار در روز دوم و در روز چهارم در تیمار ترکیبی متیل

#### محتوی $H_2O_2$

تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار در روز دوم بیشترین مقدار پراکسید هیدروژن را تولید کرده و در همه تیمارها محتوی آن در روز دوم نسبت به گیاهچه شاهد بیشتر بود. در روز چهارم و در تیمار با متیل جاسمونات ۰/۱۵ میلی‌مولار بیشترین محتوی پراکسید هیدروژن را دارا بوده است. مقدار پراکسید هیدروژن در تیمارهای مورد بررسی تا حدودی از روز دوم به چهارم به جز برخی تیمارها ثابت می‌باشد، ولی نسبت به گیاهچه‌های شاهد اکثراً افزایش نشان داده‌اند (شکل ۳). پراکسید هیدروژن به‌عنوان مهمترین مولکول ROS (Reactive oxygen species) که به‌عنوان یک علامت در تنش‌های اکسیداتیو و فعال‌سازی آبشارهایی که به‌عنوان نتیجه پاسخ‌های زود هنگام گیاه به تنش زیستی می‌باشند، بکار گرفته می‌شود. این پاسخ می‌تواند با بکارگیری الیسیتورها نیز تولید شود، مولکول پایداری که فعال‌سازی آبشارهای علامت‌رسانی و مسیرهای هورمونی را القا می‌کند و مقاومت القاء شده به تنش‌های محیطی را براه می‌اندازد (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

ROSها چندین فرآیند را در گیاهان کنترل می‌کنند. در آرابیدوپسیس ۱۵۲ ژن در تنظیم میزان ROS دخالت دارند. این شبکه به‌میزان بالایی پویا و در عین حال تکراری (Redundant) است و پروتئین‌های تولیدکننده ROS و پروتئین‌های حذف‌کننده ROS را رمز می‌کنند. پراکسید هیدروژن در تنظیم چندین ژن مرتبط با تنش و ژن‌های کد کننده *pal* و *cat1* دخالت دارد، که به‌عنوان شاخص پاسخ ROS و علامت در

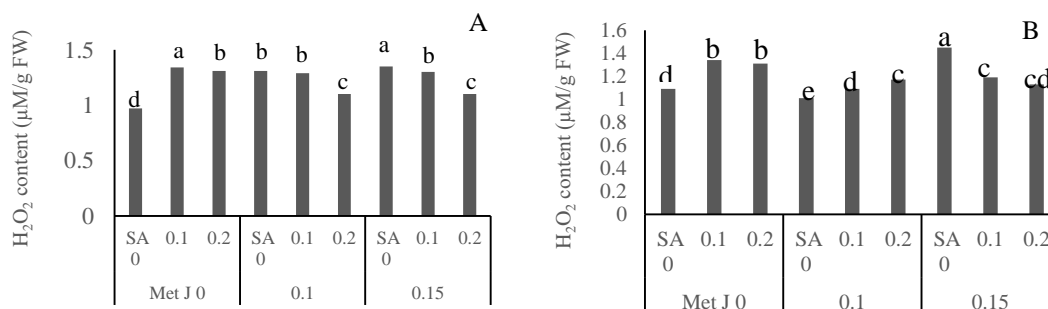
در متیل جاسمونات ۰/۱۵ میلی‌مولار و تیمار ترکیبی متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار در سطح اسید سالیسیلیک ۰/۲ میلی‌مولار در روز دوم و بالاترین فعالیت آن در روز چهارم در تیمار ترکیبی ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در سطح ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. (شکل ۵A و ۵B).

آنزیم‌های اصلی مسیر ROS-scavenging در گیاهان شامل سوپراکسید دیسموتاز SOD، آسکوربات اکسیداز APX، کاتالاز CAT، گلووتاتیون پراکسیداز GPX، پراکسی ریدوکسین PreR (Peroxiredoxin) می‌باشند. همراه با آنتی‌اکسیدانت‌های اسید آسکوربیک و گلووتاتیون، این آنزیم‌ها، سلول‌هایی با مکانیسم بسیار کارآمد برای سم‌زدایی  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  فراهم می‌آورند. تعادل بین SOD و آنزیم‌های  $H_2O_2$ -scavenging در سلول در تعیین سطح پایدار  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  حیاتی و ضروری می‌باشد. (Mittler *et al.*, 2004).

جاسمونات در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در دو سطح صفر و ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بود. (شکل ۴A و ۴B). فعالیت آنزیم PPO در روز دوم در سطح ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در سه سطح اسید سالیسیلیک روند افزایشی و در متیل جاسمونات ۰/۱۵ میلی‌مولار در سه سطح اسید سالیسیلیک روند کاهشی نشان داد. عملکرد آنزیم PPO در واکنش‌های ایمنی و مکانیسم دفاعی در پاتوزن‌های گیاهی و حشرات، بیوسنتز ترکیبات گیاهی، واکنش‌های قهوه‌ای شدن مرتبط با آنزیم‌ها و مبارزه با رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Esmaeili *et al.*, 2017).

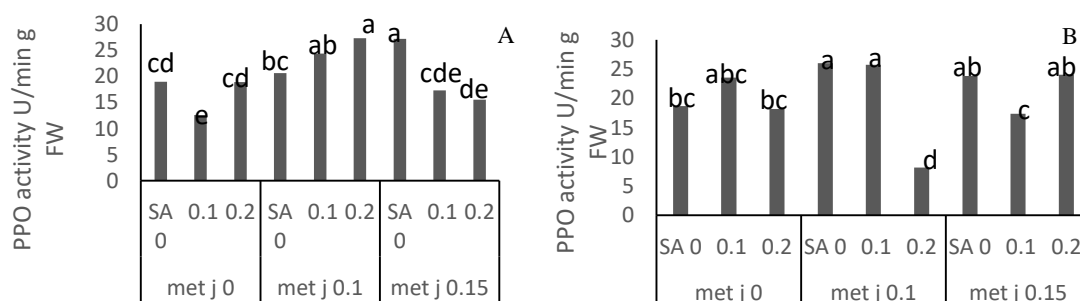
### میزان فعالیت آنزیمی SOD

نتایج سنجش فعالیت آنزیمی SOD در گیاهچه‌های کشت بافتی تحت تأثیر تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نشان‌دهنده معنی‌دار بودن آن‌ها در فعالیت آنزیم SOD بود (جدول ۶). بالاترین فعالیت آنزیم



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر محتوی پراکسید هیدروژن گیاهچه‌های فندق، به ترتیب دو و چهار روز بعد از اعمال الیسیتور. (B – A)

Figure 3. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in hazelnut plantlets A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PPO گیاهچه‌های فندق، به ترتیب دو و چهار روز بعد از اعمال الیسیتور. (B – A)

Figure 4. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on enzymatic activity of PPO in hazelnut plantlets A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.

اسید سالیسیلیک، پراکسید هیدروژن و کیتوزان با تولید پراکسید هیدروژن همبستگی داشته و احتمالاً این مولکول به عنوان سیگنال برای فعالیت این آنزیم محسوب می‌شود. آن‌ها بیشترین فعالیت آنزیم PAL را تا ۱۲ ساعت بعد از بکارگیری الیسیتورها مشاهده کردند.

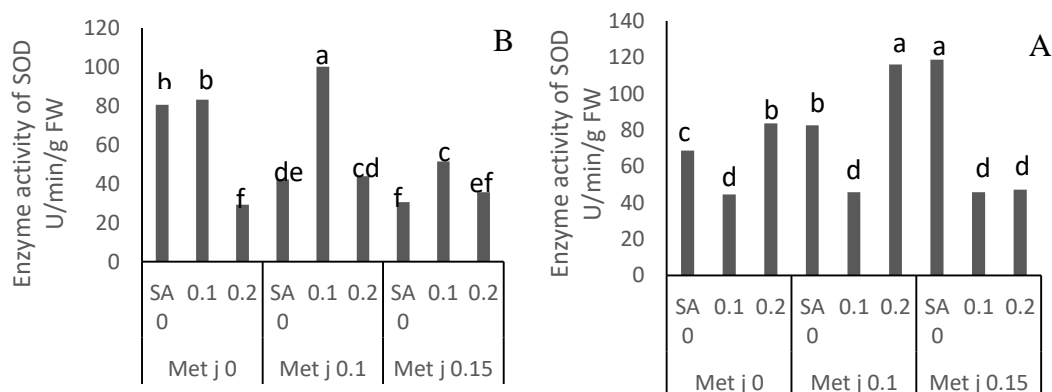
#### تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد در تیمار با اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات معنی‌دار بود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در روز دوم بعد از اعمال الیسیتور متیل جاسمونات در غلظت ۰/۱۵ میلی‌مولار مشاهده شد. در روز چهارم بالاترین میزان فعالیت آنزیم در دو تیمار ترکیبی متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار در سطح صفر اسید سالیسیلیک و سطح صفر متیل جاسمونات در سطح سوم اسید سالیسیلیک بود (شکل ۷A و ۷B). این فعالیت نیز متناسب با میزان متابولیت‌ها در این سطوح تیماری است (شکل ۸). فعالیت آنزیم در تیمار با ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سرکوب شده و ولی در تیمار با ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که با افزایش سطح الیسیتور اسید سالیسیلیک روند افزایشی در فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده می‌شود، همچنین از روز دوم به چهارم فعالیت کاتالاز در اکثر تیمارها افزایش یافته است. تجزیه واریانس اثر تیمار و روز در فعالیت آنزیم کاتالاز در جدول ۶ آورده شده است.

#### میزان فعالیت آنزیم PAL

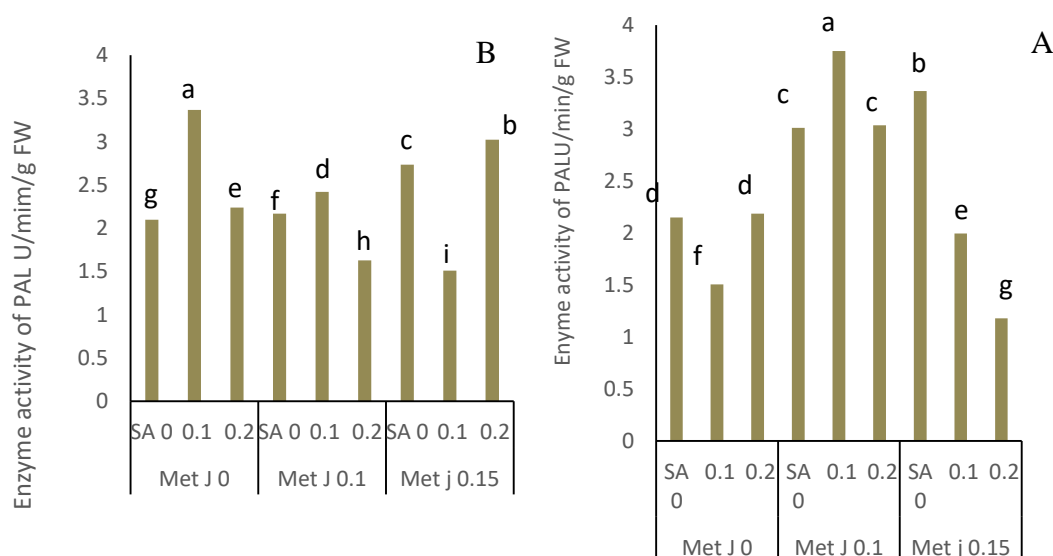
جدول تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثر تیمار و روز در سطح یک درصد در فعالیت آنزیم PAL بود (جدول ۶). بیشترین فعالیت آنزیم PAL در تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار و متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار در روز دوم و در روز چهارم در تیمار ترکیبی ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و در سطح صفر متیل جاسمونات بود. (شکل ۶A و ۶B) کمترین فعالیت آنزیم در روز دوم در تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار و در سطح صفر متیل جاسمونات و در روز چهارم در تیمار ترکیبی ۰/۱۵ میلی‌مولار و اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد.

آنزیم PAL آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانویید در گیاهان عالی می‌باشد، ROS بیان چندین ژن دفاعی و ژن‌های مربوط به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله PAL را القا می‌کند. چندین مطالعه نشان داده است که فعالیت PAL و به دنبال آن افزایش محتوی فنلی در گیاهان یک پاسخ کلی با مقاومت به بیماری در گیاه مرتبط می‌باشد. این آنزیم نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئیدها، لیگنین‌ها و سایر ترکیبات ایفاء می‌کند و احتمالاً ملکول علامت‌دهی معروف اسید سالیسیلیک را نیز القا می‌کند (Zhao *et al.*, 2005). در مطالعه Mejía-Teniente *et al.* (2013) افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PAL تا پنج روز بعد از بکارگیری الیسیتور



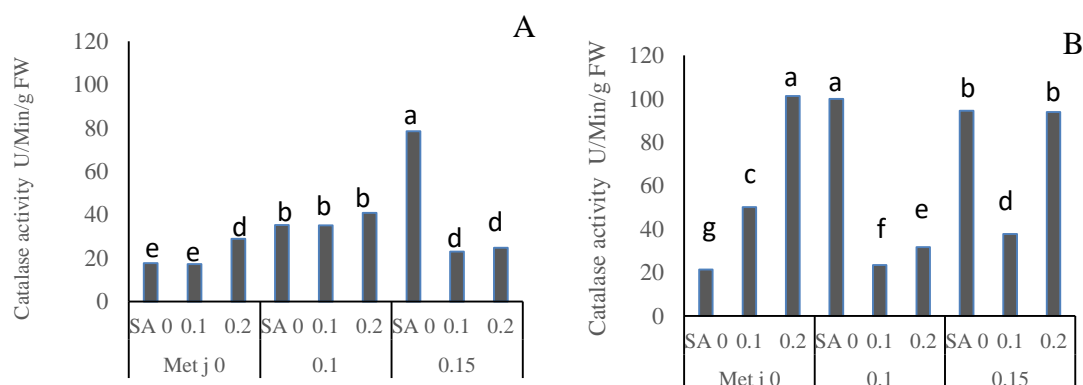
شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم SOD گیاهچه‌های فندق، (A - B) به- ترتیب دو و چهار روز بعد از اعمال الیسیتور.

Figure 5. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on enzymatic activity of SOD in hazelnut plantlets A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL گیاهچه‌های فندق، A - B) به ترتیب دو و چهار روز بعد از اعمال الیسیتورها.

Figure 6. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on enzymatic activity of PAL in hazelnut plantlets, A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه‌های فندق، A - B) به ترتیب دو و چهار روز پس از اعمال الیسیتورها.

Figure 7. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on enzymatic activity of catalase in hazelnut plantlets, A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.

حساس به سرمای جو بررسی کردند، آن‌ها در یکی از تیمارها قبل از این که رقم های حساس به سرمای جو را در معرض سرما قرار دهند با اسید سالیسیلیک تیمار کردند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها را مشاهده کردند، در حالی که قبل از آن و بدون تیمار با اسید سالیسیلیک فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد.

#### مقدار تاکسان‌ها پس از اعمال الیسیتور

تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تیمارها و

بر اساس تحقیقات *Mejía-Teniente et al.* (2013) در آنالیز بیان ژن *cat1* سطح رونوشت در برگ‌های *Capsicum annum* از طریق تنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که تشدید فعالیت کاتالاز در برگ‌های *C. annum* می‌تواند نتیجه افزایش سطح بیان *cat1* و پاکسازی پراکسید هیدورژن تولید شده در تیمار با الیسیتور باشد. لازم بذکر است که *Mutlu et al.* (2013) تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آپوپلاستیک SOD، CAT و POX را در رقم های

تیمار متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک تأثیر قابل توجهی بر تولید تاکسانها در گیاهچه‌های کشت بافتی رقم سگورب نداشته است (شکل ۸). اما در تحقیقی که توسط *Rezaei et al.* (2011b) صورت گرفته است، تیمار ترکیبی اولتراسوند و اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۳ میلی‌مولار باعث بهبود قابل توجه تولید تاکسول کل در کشت سلولی فندق شده است.

در مطالعه *Onrubia et al.* (2013) در کشت سلولی سرخدار محتوی تاکسانها با استفاده از دو الیستور متیل جاسمونات و کروناتین به یک پیک اولیه در روز چهارم می‌رسد، اما حداکثر تولید ۱۶ روز بعد از اعمال تیمار در سلول‌های تیمار شده با کروناتین بوده است.

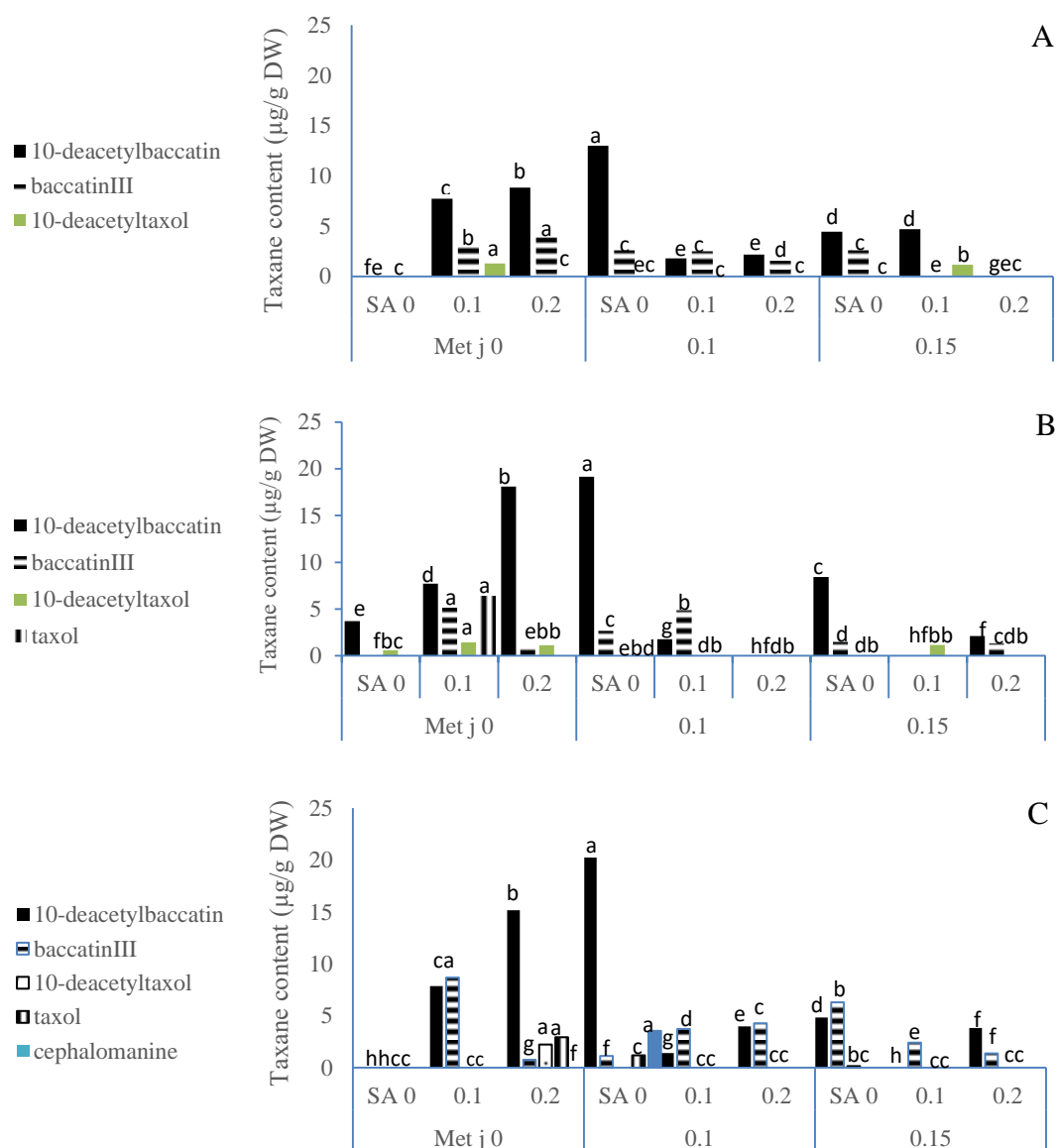
#### میزان رونوشت ژن *bapt*

بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تاکسانها در فندق ارزیابی شد. متاسفانه با تلاش‌های زیادی که در این زمینه صورت گرفت فقط ژن *bapt* در فندق تکثیر شد و سایر ژن‌ها نتیجه‌ای نداشتند. در تعیین دمای بهینه آغازگرها در فندق فقط ژن *bapt* در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد تکثیر شد، ولی سایر ژن‌ها و دماها تکثیری نداشتند. تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌دار شدن اثر متقابل تیمارها و روز بود. البته اثر متقابل سه جانبه متیل جاسمونات در اسید سالیسیلیک در روز معنی‌دار نبود (جدول ۶).

در گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای فندق رقم سگورب مقایسه بیان نسبی ژن *bapt* نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان در روز دوم در تیمارهای ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و بعد از آن در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار می‌باشد و در روز چهارم بالاترین میزان بیان ژن *bapt* در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و سپس در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک است. در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مقدار 10-*deacetyl* *baccatin* نسبت به تیمار ۰/۱ میلی‌مولار افزایش نشان داد (شکل ۹A و ۹B).

روز در تجمع تاکسانها بود (جدول ۵). نتایج HPLC نشان داد که بیشترین میزان 10-*deacetyl* *baccatin* در تیمار با سطوح ۰/۱ میلی-مولار متیل جاسمونات و سطح صفر اسید سالیسیلیک در روز ۱۶ با میانگین ۲۰/۲۳ میکروگرم و سپس به ترتیب در سطوح ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سطح صفر متیل جاسمونات برابر با ۸/۸۲۵ و ۷/۷۳ میکروگرم بود. همچنین مشاهده شد که در سطح صفر متیل جاسمونات با افزایش اسید سالیسیلیک، مقدار 10-*deacetyl* *baccatin* افزایش یافت در حالیکه در سطوح ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات با افزایش اسید سالیسیلیک، مقدار 10-*deacetyl* *baccatin* روند کاهشی داشت. این وضعیت در روزهای مختلف مورد بررسی به طور مشابهی مشاهده شد. اثر تیمارها در *Baccatin III* در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان آن در تیمار با ۰/۲ اسید سالیسیلیک در سطح صفر متیل جاسمونات در روز دوم و ۰/۱ اسید سالیسیلیک و در سطح صفر متیل جاسمونات در روز چهارم و بعد در تیمار ترکیبی ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در سطح دوم اسید سالیسیلیک (۰/۱ میلی‌مولار) و در روز ۱۶ به ترتیب بیشترین مقدار آن در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۰/۱۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات در سطح صفر اسید سالیسیلیک بود.

اثر تیمارها در تجمع تاکسول در سطح یک درصد معنی‌دار بود، بهترین تیمار در افزایش تاکسول، تیمار با ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و در روز چهارم بود. مقادیر 10-*deacetyl* *taxol* در سطح یک درصد معنی‌دار بود و بهترین تیمار آن اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار بود و بیشترین میانگین در 10-*deacetyl* *taxol*، چهار روز بعد از اعمال تیمار صورت گرفت. بیشترین مقدار سفالومانتین نیز در روز ۱۶ و برابر با ۳/۵۵ میکروگرم و در تیمار با متیل جاسمونات ۰/۱ و در سطح صفر اسید سالیسیلیک بود. همان طور که در شکل‌های ۸A، ۸B و ۸C نیز مشاهده می‌شود، ترکیب دو



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید تاکسان‌ها گیاهچه‌های فندق، (C-B-A) به- ترتیب دو، چهار و ۱۶ روز پس از اعمال الیستورها .

Figure 8. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on taxanes production in hazelnut plantlets, A-B-C) 2, 4 and 16 days after elicitor application, respectively.

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس اثر زمان، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تجمع تاکسان‌ها در گیاهچه های فندق. Table 5. Results of variance analysis effect of time, salicylic acid and methyl jasmonate on accumulation of taxanes in hazelnut plantlets.

Source of variation	df	Mean of squares				
		10- Deacetyl baaccatin	Baaccatin III	10- Deacetyl taaxol	Cephalomanine	Taaxol
Time	2	14.95**	15.684**	0.26**	0.32**	2.81**
Metyl jasmonate	2	104.32**	5.06**	2.52**	0.38**	5.69**
Salicylic acid	2	25.03**	16.74**	0.99**	0.5**	1.89**
Time*metyljasmonate	4	8.56**	1.32**	0.25**	0.378**	2.086**
Time* salicylic acid	4	36.32**	3.9**	0.996**	0.486**	4.21**
Metyljasmonate* salicylic acid	4	196.7**	34.96**	0.727**	1.007**	2.239**
Time* metyljasmonate* Salicylic acid	7	8.76**	8.4**	0.52**	0.832**	5.067**
Error	24	0.004	0.013	0.002	0.0001	0.001

\*\* : Significantly difference at 1% of probability level.

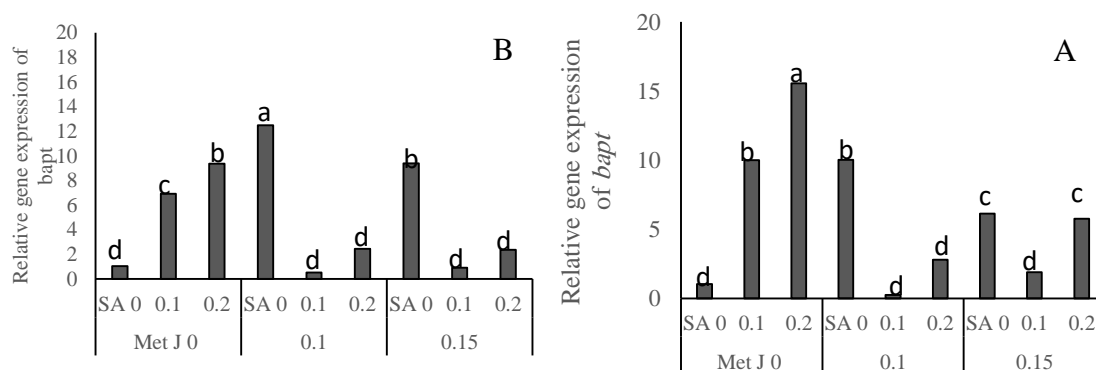
\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

Baccatin III به 10-deacetyltaxol و محصولات پایین دستی باشد. اگرچه بیان نسبی ژنهای *txs* و *dbat* اندازه گیری نشد، ولی وجود میزان بالای 10-deacetylbaccatin نشان‌دهنده افزایش رونوشت ژن *txs* بعد از اعمال الیستور می‌باشد. با افزایش 10-deacetylbaccatin احتمالاً وجود رونوشت ژن *dbat* در تیمارهای ذکر شده باعث تبدیل 10-deacetylbaccatin به Baccatin III شده است. در مطالعه *Onrubia et al.* (2013)، تجمع رونوشت *txs* بعد از تیمار متیل جاسمونات و کروناتین بعد از یک ساعت قابل شناسایی بوده، از روز اول تا روز چهارم به بالاترین مقدار خود رسیده و بعد از آن کاهش داشته است.

افزایش رونوشت ژن *bapt* در تیمارهای مذکور باعث تبدیل Baccatin III به 10-deacetyltaxol و سپس با فعالیت سیتوکروم اکسیدازهای مختلف که در این مسیر وجود دارند تبدیل این ماده به سفالومانین اتفاق افتاده و در نهایت با فعالیت *dbtmbt* تبدیل سفالومانین به تاکسول صورت می‌گیرد. زمانی که میزان Baccatin III کم است با بنزیلاسیون بیشتر در موقعیت کربن شماره ۳، Baccatin III به سفالومانین تبدیل می‌گردد (*Onrubia et al.*, 2013). میزان 10-deacetyltaxol به ترتیب در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در سطح صفر متیل جاسمونات و تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۰/۱ در ۰/۱۵ میکرومولار متیل جاسمونات نیز مشاهده شد (شکل ۹).

در تیمار با ۰/۱۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات و در سطح صفر اسید سالیسیلیک و در تیمار ترکیبی آن با سطح ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک 10-deacetylbaccatin و Baccatin III هر دو در مقادیر تقریباً بالا دیده می‌شوند، ولی با وجود بیان بالای ژن *bapt* 10-deacetyltaxol و سفالومانین و تاکسول دیده نمی‌شود (شکل ۹)، شاید میزان پایین ماده‌های انتهایی مسیر و بیان پایین ژنهای پایین دستی در این تیمارها باعث عدم شناسایی آن‌ها شده باشد.

همان‌طور که در شکل A, B, C، مشاهده می‌شود، مقدار Baccatin III در تیمار ۰/۱ اسید سالیسیلیک و در تیمار ۰/۱۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات به تدریج از روز دوم تا روز ۱۶ افزایش می‌یابد که به دلیل تبدیل پیش‌ماده 10-deacetylbaccatin به Baccatin III می‌باشد. در مطالعه‌ای توسط *Onrubia et al.* (2013) انجام شد تأثیر دو الیستور متیل جاسمونات A و کروناتین را بررسی کردند و مشاهده کردند که بیان ژن *dbat* که مسئول آنزیم تبدیل 10-deacetylbaccatin به Baccatin III است بعد از القا با متیل جاسمونات A به میزان بیشتری نسبت به الیستور کروناتین تحت تأثیر قرار می‌گیرد و سطح رونوشت آن در ۱۲ ساعت بالا رفته، سپس روند کاهشی دارد، اما در کروناتین تا روز دوم در بالاترین مقدار خود باقی می‌ماند. همچنین تنوع تاکسول، 10-deacetyltaxol و سفالومانین در دو تیمار ۰/۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات مشاهده می‌شود، که می‌تواند به دلیل تبدیل



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر متقابل اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر بیان نسبی ژن *bapt* گیاهچه‌های فندق،

به ترتیب دو و چهار روز پس از اعمال الیستورها (A - B).

Figure 9. Mean comparison interaction effect of salicylic acid and methyl jasmonate on relative gene expression of *bapt* in hazelnut plantlets, A-B) 2 and 4 days after elicitor application, respectively.

جدول ۶. نتایج تجزیه واریانس اثر زمان، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر بیان ژن، فعالیت آنزیم‌ها، تولید پراکسید هیدروژن و محتوی پروتئین گیاهچه های فندق.

Table 6. Results of variance analysis effect of time, salicylic acid and methyl jasmonate on gene expression, activity of enzymes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and protein content in hazelnut plantlets.

Source of variation	df	Mean of squares						
		Gene expression	PPO activity	SOD activity	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> content	CAT activity	Protein content	PAL activity
Time	1	7.036*	0.929 <sup>ns</sup>	2712.291**	0.009**	7104.28**	0.111 <sup>ns</sup>	0.105**
Methyl jasmonate	2	30.381**	39.682**	865.833**	0.028**	1205.5**	5.595**	0.611**
Salicylic acid	2	39.074**	45.457**	415.801**	0.017**	2481.75**	6.317**	0.419**
Time × methyl jasmonate	2	11.886**	46.368**	684.146**	0.028**	412.55**	8.921**	2.748**
Time × salicylic acid	2	20.666**	47.213**	5698.62**	0.015**	776.91**	6.639**	0.373**
Methyl jasmonate × salicylic acid	4	133.865**	41.994*	719.29**	0.093**	2254.63**	3.077**	1.037**
time × methyl jasmonate × salicylic acid	4	1.182 <sup>ns</sup>	103.666**	1699.73**	0.019**	1631.62**	8.701**	1.406**
Error	18	1.232	6.028	10.335	0.001	8.386	0.443	0.002

\*\*، \* و <sup>ns</sup>: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار. \*\*، \* and ns: Significantly difference at 1 and 5 % of probability levels and non-significantly difference, respectively.

همبستگی بالایی بین بیان ژن *bapt* و ژن‌هایی بالادستی و پایین‌دستی این مسیر وجود دارد، زیرا در تیمارهایی که بیان ژن بالاست، مقادیر 10-deacetylbaaccatin، baccatin III و همچنین محصولات پایین‌دستی 10-deacetyltaoxol، سفالومانین و تاکسول نیز بالا بوده و ناشی از این همبستگی می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، الیسیاتور متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن *bapt* گردید. همچنین با افزایش 10-deacetylbaaccatin و Baccatin III می‌تواند مواد پیش‌ساز ابتدایی مسیر را بیشتر تولید کرده، باعث افزایش تاکسان‌های انتهایی از جمله 10-deacetyltaoxol، سفالومانین و تاکسول گردد. با افزایش پراکسید هیدروژن، به‌عنوان یک مولکول در تحریک سیستم دفاعی گیاه میزبان، در تیمارهای اسید سالیسیلیک ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار و ۰/۱۵ و ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات، فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنیل آلانین آمینولیزاز افزایش نشان داده و میزان متابولیت‌ها و بیان ژن *bapt* در این تیمارها نیز افزایش داشته است. از آنجا که در این مطالعه بجز ژن *bapt* بیان سایر ژن‌های ابتدایی و انتهایی مسیر بررسی نگردید، به همین دلیل پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی بیان سایر ژن‌ها مورد توجه قرار گیرد. همچنین در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود که از روش‌های نوین بررسی ترنسکریپتوم مانند RNAseq برای شناسایی توالی ژن‌های *dbat* و *dbtmbt* در فندق استفاده گردد.

وجود مقادیر بسیار پایین 10-deacetylbaaccatin می‌تواند به دلیل سرکوب بیان *txs* باشد، که متأسفانه بیان آن ردیابی نشد. تقاطع (Cross-talk) برخی مسیرهای علامت‌دهی مختص گونه یا مختص شرایط خاص می‌باشد. اسید سالیسیلیک و ترکیبات مرتبط با آن به طور ذاتی بیوسنتز اسید جاسمونیک یا مسیر علامت‌دهی آن را سرکوب می‌کند (Zhao *et al*, 2005). در بیشتر موارد اسید سالیسیلیک مسیر علامت‌دهی اسید جاسمونیک را در تولید متابولیت‌های ثانویه سرکوب می‌نماید. در برنج ژن شبه ردوکتاز ایزو فلاون ( OsIRL: Isoflavone reductase-like gene) به‌وسیله الیسیاتورهای قارچی یا متیل‌جاسمونات A القاء شده ولی به شدت توسط اسید سالیسیلیک و ABA سرکوب می‌شود. این ارتباطات آنتاگونیستی ممکن است از طریق گروهی از فاکتورهای رونویسی رخ دهد (Zhao *et al*, 2005). در واقع مقادیر پایین پیش‌ماده‌ها در تیمارهای ترکیبی که در تصویر مربوط به تاکسان‌ها نیز ملاحظه می‌نمائید، می‌تواند تأییدی بر این مطلب باشد. آنالیز بیان ژن‌ها توسط Onrubia *et al*. (2013) بعد از اعمال الیسیاتورهای کروماتین و متیل‌جاسمونات نشان داد که ژن‌های ابتدایی مسیر از جمله *txs* (-Taxadiene 13-hydroxylase) *t13oh* (Taxane 2-hydroxylase) *t2oh* (Taxane 7-hydroxylase) و *t7oh* (Taxane 7-hydroxylase) و *pam* (CoA chain) با شدت بیشتری نسبت به ژن‌هایی که در مراحل آخر بیوسنتزی تاکسان‌ها از جمله *dbat* و *dbtmbt* را قرار دارند القا می‌شوند.

متأسفانه اگرچه ژن‌های ابتدایی و انتهایی این مسیر در فندق رقم سگورب بیان نشد، ولی می‌توان گفت



## REFERENCES

1. Balestrasse, K., Gardey, L., Gallego, SM. & Tomaro, ML. (2001). Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Functional Plant Biology*, 28(6), 497-504.
2. Bemani, E., Ghanati, F., Yousefzadeg, B. & Khatami, F. (2012). Antioxidant activity, total phenolics and taxol contents response of hazel (*Corylus avellana* L.) cells to benzoic acid and cinnamic acid. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 40(1), 69-73.
3. Bemani, E., Ghanati, F., Rezaei, A. & Jamshidi, M. (2013). Effect of phenylalanine on taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells. *Journal of Natural Medicines*, 67, 446-451.
4. Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Baldi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. & Miele, M. (2006). In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnology*, 6, 45.
5. Chance, B. & Maehly, A.C. (1955) Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 11: 764-775.
6. Driver, JA., Kuniyuki, AH. (1984). *HortScience* 19:507-509.
7. Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H. & Abdi, K. (2017). Correlation between polyphenol oxidase (PPO) activity and total phenolic contents in *Crocus sativus* L. corms during dormancy and sprouting stages. *Pharmacognosy Magazine*, 13(3), 519-524.
8. Fett-Neto, A.G., Pennington, J.J. & Di Cosmo, F. (1995). Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* and Zucc. *Journal of Plant Physiology*, 146, 584-90.
9. Gallego, A., Bonfill, M., Cusido, R. M., Pastor, M., Palazon, J. & Moyano E., (2015). Assessing factors that affect the growth of *Corylus avellana* cell suspension cultures: a statistical approach. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 51, 530-538.
10. Gallego, A., Imseng, N., Bonfill, M., Cusido, R.M., Palazon, J., Eibl, R. & Moyano, M. (2015). Development of a hazel cell culturebased paclitaxel and baccatin III production process on a benchtop scale. *Journal of Biotechnology*, 195, 93-102.
11. Ghanati, F., Safari, M. & Hajnorouzi, A. (2015). Partial clarification of signaling pathway of taxanes increase biosynthesis by low intensity ultrasound treatment in hazel (*Corylus avellana*) cells. *South African Journal of Botany*, 96, 65-70.
12. Global Paclitaxel Market Growth (2019-2024). From [www.reportsweb.com](http://www.reportsweb.com).
13. Han, M.W., Yoo J.K., Hong, D.N. 1997. Process of taxol from *taxus cuspidate*. S6066748A.
14. Hemmati Gougeh, R., Fatahi Moghadam, M., Shokrpour, M., Naghavi, M. & Varshochi, A. (2017). Response of two hazelnut cvs Segorb and Round to plant tissue culture. *Second International and Tenth National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran, PP: 1-5*
15. Hoffman, A., & Shahidi, F. (2009). Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. *Journal of Functional Foods*, 1, 33-37.
16. Jyoti. (2013). *Micropropagation of Hazelnut (Corylus Species)*. A thesis presented to The University of Guelph. 1-18.
17. Kang, H.M. & Saltveit, M.E. (2001). Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiologia Plantarum*, 113, 548-556.
18. Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319
19. Lauchli, R. & Boland, W. (2003). Indanoyl amino acid conjugates: Tunable elicitors of plant secondary metabolism. *The Chemical Record*, 3, 12-21.
20. Malik, S., Cusido, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazon, J., Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry*, 46, 23-34.
21. Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, FD., Chapa-Oliver, AM., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, MM., Ocampo-Velázquez, RV. & Guevara-González, RG. (2013). Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 10178-10196.
22. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Breusegem, V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-8.
23. Mutlu, S., Karadagoglu, O., Atici, O., Nalbantoglu, B. (2013). Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biology Plantarum*, 10535-013-0322-4.

24. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
25. Niyazari, A., Chalavi, V. & Kabirataj, S. (2019). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on production of phenol, flavonoid and pigments of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) callus. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 52, 1-10. (in Farsi).
26. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Palazon, J., Goossens, A. & Cusido, R. (2011). The relationship between *txs*, *dbat*, *bapt* and *dbtmbt* gene expression and taxane production during the development of *Taxus baccata* plantlets. *Plant Science*, 181, 282-287.
27. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M., Goossens, A. & Palazon, J. (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 170, 211-219.
28. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Exposito, O., Palazon, J. & Cusido, R.M. (2010). An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: the role of *txs* and *bapt* gene expression. *Biotechnol Engineering Journal*, 53, 104-111.
29. Ottaggio, L., Bestoso, F., Armirotti, A., Balbi, A. (2008). Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*. *Journal of Natural Products*, 71(1), 58-60
30. Ramirez-Estrada, M., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M. & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182-206.
31. Reed, B.M. (2013). Improving initiation and mineral nutrition for hazelnut (*Corylus avellana*) micropropagation. A Thesis submitted to Oregon State University, 1-123.
32. Rezaei, A., Ghanati, F. & Behmanesh, M. (2011a). Increase Taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutylphthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(7), 55-71 (in Farsi).
33. Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M. & Mokhtari-dizaji, M. (2011b). Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 37, 1938-1947.
34. Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., Safari, M. & Sharafi, Y. (2013c). Synergistic accumulative effect of salicylic acid and dibutyl phthalate on paclitaxel production in *Corylus avellana* cell culture. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9, 157-168
35. Rezaei, A., Ghanati, F. & Behmanesh, M. (2011d). Statistic magnetic field improved salicylic acid effect on taxol production in suspension- cultured hazel (*Corylus avellana*) cells. From <https://www.researchgate.net/publication/264878242>
36. Rezaei, A., Ghanati, F. & Behmanesh, M. (2011e). Methyl jasmonate-induced biosynthesis of taxol and expression of certain related genes by hazelnut (*Corylus avellana* L.) cells. *Planta Medica*, 77- 14.
37. Shahi, A., Fatahi, MR., Zamani, Z. & Maali-Amiri, R. (2020). Study of physiological and biochemical responses of some hazelnut cultivars under drought stress and re-watering conditions. *Iranian Journal of Horticultural Scienc*, 51, 229-244. (in Farsi).
38. Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B., Popova, L.P.: Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. – *Phytochemistry*, 67, 710-715, 2006.
39. The "Paclitaxel-market Analysis, Trends, and Forcasts". (2017). [http://www. Research and market.com](http://www.researchandmarket.com)
40. Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
41. Wang, JA., Zheng, LP., Wu, JY. & Tan, RX. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, 15, 351-358.
42. Zhao, J., Davis, LC. & verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.