**Iranian Journal of Horticultural Science**
Vol 49, No 4, Winter 2019 (915-923)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.227429.1182

**علوم باغبانی ایران**
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۹۲۳-۹۱۵)

# اثر سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر تولید هایپریسین در کشت کالوس گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) رقم Topas

**محمد زمانی[۱]، حسین مرادی[۲*]، ویدا چالوی[۲] و سید کمال کاظمی تبار[۳]**

**۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری**

**۲ و ۳. استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری**

**(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۱)**

## چکیده

**در این تحقیق اثر سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جازمونات بر تولید هایپریسین در کشت کالوس گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) رقمTopas بررسی گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل سالیسیلیک‌اسید در چهار سطح (۰،۷۵،۱۵۰،۲۲۵ میکرومولار) و متیل‌جاسمونات در سه سطح (۰،۷۵،۱۵۰ میکرومولار) با سه تکرار در آزمایشگاه گروه پژوهشی علوم‌باغبانی دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع‌طبیعی ساری انجام گرفت. فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده شامل هایپریسین، فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) بود. در مقایسه میانگین اثرات ساده تیمارها، اثر متیل‌جازمونات بر فلاونوئید کل معنی‌دار شد. اثر متقابل تیمارها برای هایپریسین، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها معنی‌دار شد. در مجموع، در میان نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، بیشترین میزان هایپریسین تولیدشده از اثر ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید و همین‌طور اثر متقابل ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید (SA) در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات (MJ) در مدت زمان ۲۱ روز (سه هفته) به‌دست آمد.**

**واژه‌های کلیدی:** **علف چای، محرک، متابولیت ثانویه، نفتودی‌آنترون.**

# Effect of Salicylic Asid and Methyle Jasmonat Elicitors on Hypericin production in stJohn's wort (*Hypericum perforatum* L.) cv. Topas Callus culture

**Mohammad Zamani[1], Hossein Moradi[2*], Vida Chalavi[2] and Seyyed Kamal Kazemitabar[3]**

1. M.Sc. Student of Horticultureal Science, Faculty of Agricultural Science, Sari Agricultural sciences and Natural Resources University, Iran

2, 3. Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agricultural Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Iran

(Received: Feb. 11, 2017 - Accepted: Nov. 12, 2017)

## ABSTRACT

Effects of salicylic acid and methyl Jasmonate on Hypericin production in callus culture of *Hypericum perforatum* L. cv Topas were investigated. This factorial experiment was carried out in a completely randomized design with two factors including the four levels of salicylic acid (225,150,75,0 µM) and methyl Jasmonate in three levels (150,75,0 µM) with three replications at the research lab Group of Sari University of Agricultural Sciences and natural resources, deprtment of Horticultural Science. Analysis of variance showed significant differences among treatments. Effect of treatments on total flavonoid Methyl Jasmonate effect was significant. Interaction effect was significant for Hypericin, flavonoids and anthocyanins. According to the results of this study in cell cultures of *H. perforatum*, low concentration (100 micromolar and lower) of both salicylic acid and methyl Jasmonate elicitors were effective for production of Hypericin. The results of this experiment showed that the highest amount of Hypericin produced from 150 µM salicylic acid (SA) and 225 µM salicylic acid in combination with 75 µM methyl Jasmonate (MJ) after 21 days.

**Keywords:** Elicitor, Naphtodianthrones, Secondary metabolites, StJohn's Wort.

* Corresponding author E-mail: moradiho@yahoo.com

## مقدمه

در حال حاضر پژوهش‌های زیادی در گیاهان دارویی انجام گرفته است؛ به‌طوری‌که حدود یک سوم داروهای موجود در جهان را داروهایی با منشأ گیاهی تشکیل می‌دهند (Omidbeigi, 2009). گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. گیاهی است علفی و چندساله با ساقه‌های منشعب و بدون کرک که طول آن از ۱۰ تا ۱۱۰ سانتی‌متر متفاوت می‌باشد. گل راعی در مناطق مختلفی از جهان مانند شرق اروپا، خاورمیانه و آمریکای شمالی رویش می‌کند. در ایران به‌نام‌های گل راعی، علف چای، هوفاریقون، گل شهناز و گل هزاران‌چشم شناخته می‌شود و نام رایج جهانی آن st John s wort می‌باشد (Mozafarian, 2012). این گیاه به‌دلیل ویژگی‌های دارویی مهمی مانند خواص ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد میگرن و ضد افسردگی، آرام‌بخش بودن و درمان زخم‌ها مورد توجه می‌باشد (Barns *et al*., 2007). برای به‌دست آوردن محصولات این گیاه، روش‌های مختلفی شامل جمع‌آوری از طبیعت، کشت مزرعه‌ای و کشت گلخانه‌ای وجود دارد. کشت سلول/ بافت/ اندام به‌علت قیمت بالای نیروی کار، مواد شیمیایی و تجهیزات گران‌ترین روش است، اما در عوض مزیت‌هایی مانند ایجاد تغییر ژنتیکی و ریز ازدیادی در سطح وسیع می‌باشد که در هیچ مزرعه‌ای ممکن نیست. کشت بافت و سلول به‌دلیل توانایی تولید محصول در سراسر سال و عدم وابستگی به شرایط آب و هوایی همچنین حفظ محیط زیست از طریق بی‌نیازی به جمع‌آوری گیاهان از طبیعت، بر خلاف هزینه بالا نسبت به دیگر روش‌های ذکرشده برتری دارد. اما مهم‌ترین مشکل پیش رو در کشت درون شیشه‌ای، مقدار تولید پایین مواد مؤثره در واحد سطح است. به‌همین دلیل استفاده از محرک‌ها (Elicitor) در کشت درون‌شیشه‌ای به‌وجود آمده است. محرک‌ها به عواملی گفته می‌شود که می‌تواند سلول‌های کشت‌شده را به تولید مواد ثانوی تحریک کنند. محرک‌ها به دو دسته زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند. محرک‌های زیستی شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها و یا عصاره دیواره قارچی می‌باشند؛ محرک‌های غیرزیستی نیز شامل هورمون‌ها (سالیسیلیک‌اسید، جاسمونات‌ها) و عوامل فیزیکی مثل پرتو فرا بنفش و غیره اشند. مهم‌ترین متابولیت‌های ثانوی در گل راعی، رنگیزه‌های دی‌آنترون یعنی هایپریسین و سودوهایپریسین هستند (Naik *et al*., 2016). هایپریسین‌ها ترکیباتی با فعالیت‌های ضد ویروسی هستند. به‌نظر می‌رسد که در فعالیت ضد ویروسی، هایپریسین از سودوهایپریسین بسیار مؤثرتر باشند. هایپریسین و سودوهایپریسین اثر زیادی بر درمان هپاتیت C دارند. اگر چه، دیگر مواد شیمیایی هم نقش‌های مهمی در فعالیت ضد افسردگی دارند. به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت درون‌شیشه‌ای گل راعی و استفاده از محرک‌های مختلف مطالعات زیادی انجام گرفته است.

در مورد مقایسه میزان هایپریسین در گونه‌های مختلف جنس *Hypericum*، (Jaimand *et al*., 2007) میزان ترکیب هایپریسین در برگ و گل ۸ گونه *Hypericum* را اندازه گرفتند که بالاترین میزان هایپریسین در گونه *Perforatum* با ppm ۱۹۰۰ وگونه *Triquetrifolium* با ppm ۱۴۶۰ وجود داشت. در مورد استفاده از محرک‌های زیستی، اثر پلی‌ساکاریدهای کیتین، پکتین و دکستران را بر تولید متابولیت‌های ثانوی گل راعی مطالعه گردید و نشان داده شد که پکتین و دکستران تجمع نفتودی‌آنترون‌ها به‌ویژه هایپریسین را در ۲۱ روز پس از کاربرد افزایش دادند و افزایش این ترکیبات رابطه مستقیمی با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در شاخه‌های تیمارشده داشت و کیتین و پکتین فعالیت پراکسیداز را افزایش دادند (Gadzovska *et al*., 2014). در پژوهشی تأثیر مانان و پکتین بر تولید هایپریسین در کشت درون‌شیشه‌ای دانهال *Hypericum adenotricum* مورد آزمایش قرار گرفت (Yamaner *et al*., 2013). مانان تولید هایپریسین را ۱/۷ و سودو هایپریسین را ۲/۷ برابر افزایش داد. پکتین تولید هایپریسین را ۲/۷ و سودو هایپریسین را ۴/۸ برابر افزایش داد (Gadzovska *et al*., 2013). تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر کشت شاخه، کالوس و سوسپانسیون سلولی در تولید نفتودی‌آنترون‌ها و فنیل‌پروپانوئیدهای گل راعی مطالعه نمودند. بیشترین هایپریسین و سودو

هایپریسین در کشت سلولی وجود داشت (دو برابر کنترل) ولی در کشت شاخه و کالوس این افزایش دیده نشد. تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر مقدار هایپریسین به نوع ریز نمونه، غلظت سالیسیلیک‌اسید و مدت زمان پس از تیمار بستگی دارد (Wang *et al*., 2015). اثر متیل‌جاسمونات را بر افزایش تولید فلاوونوئید در کشت سوسپانسیون سلولی *Hypericum perforatum* آزمایش نمودند. در این آزمایش ۱۰۰میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌مدت ۵ روز mg/l280 فلاونوئید تولید کرد که ۲/۷ برابر کنترل بود (Coste *et al*., 2011). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و سالیسیلیک‌اسید را بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت شاخه *Hypericum maculatum* و *Hypericum hirsutum* آزمایش کردند. در حضور ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در گونه ماکولاتوم هایپرسین به ۷/۹۸ برابر و مقدار سودوهایپریسین به ۱۳/۵۸ برابر نسبت به کنترل رسید. بنابراین در این پژوهش جهت تولید ماده مؤثره از طریق کشت درون‌شیشه‌ای، تعیین مناسب‌ترین محرک تولید هایپریسین در گیاه گل راعی و تعیین بهترین غلظت محرک تولید هایپریسین در گیاه گل راعی، اثر سطوح مختلف سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر مقدار هایپریسین، در کشت کالوس گل راعی رقم توپاز مطالعه شد.

## مواد و روش‌ها

بذرهای گل راعی رقم توپاز از شرکت pharmasaat تهیه گردید. برای ضدعفونی بذرها ابتدا آنها با یک تا یک و نیم میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. سپس یک تا یک و نیم میلی‌لیتر سدیم‌هیپوکلرید ۵٪ به نمونه‌ها افزوده گردید. پس از ده دقیقه سدیم‌هیپوکلرید از درون تیوب‌ها حذف شده و بذور سه دفعه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. آبکشی مرتبه سوم ۱۵ دقیقه به طول انجامید. سپس بذرها در چهار عدد شیشه کشت حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت موراشیگی و اسکوگ در دمای معمولی و فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به‌مدت چهار هفته نگه‌داری شدند. پس از ۴ هفته نوک شاخه‌های دانهال‌ها به طول حدود ۱ سانتی‌متر جدا شده و در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین کشت شده و به‌مدت ۷ هفته در دمای عادی و شرایط تاریکی جهت القای کالوس نگهداری شدند. سپس کالوس‌ها به محیط حاوی محرک‌ها منتقل گردیدند. تیمارهای محرک در این آزمایش فاکتوریل شامل دو فاکتور سالیسیلیک‌اسید در چهار سطح (۲۲۵، ۱۵۰، ۷۵، ۰ میکرومولار) و متیل‌جاسمونات در سه سطح (۱۵۰، ۷۵، ۰ میکرومولار) با سه تکرار بود که در آزمایشگاه گروه پژوهشی علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت.

کالوس‌های برداشت‌شده با استفاده از ازت‌مایع پودر شده و درون ورقه آلومینیومی در فریزر نگهداری شد. برای تهیه عصاره متانولی از روش Namli *et al*. (2014) با کمی تغییر استفاده شد. ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر گیاهی (کالوس پودرشده) وزن شده و درون لوله آزمایش ریخته شد. ۲ میلی‌لیتر کلروفورم به آن اضافه شده و به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در هوای آزاد قرار گرفت تا کلروفورم تبخیر شود. پس از تبخیر کلروفورم ۳ میلی‌لیتر متانول به لوله‌های آزمایش اضافه شده و ۵ دقیقه تحت اموج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ۲۴ ساعت در هوای آزاد برای تبخیر متانول قرار گرفت. این عمل یک بار تکرار شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و ۱ میلی‌لیتر محلول رویی نمونه‌ها برداشته و در میکروتیوب با یک میلی‌لیتر متانول خالص ترکیب شده و به‌عنوان عصاره متانولی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تعیین مقدار هایپریسین عصاره متانولی، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۹ نانومتر برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک استفاده شد (Namli *et al*., 2014). فنل کل به‌روش فولین‌سیوکالتو (Morshedloo *et al*., 2011) اندازه‌گیری شد و قرائت مقدار فنل کل در نمونه‌ها (میلی‌گرم در اکی‌والانت گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل از روش آلومینیوم‌کلرید برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک

(Wang *et al.*, 2015) اندازه‌گیری گردید و جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای سنجش میزان آنتوسیانین کل مقدار ۰/۰۲گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر متانول کلریدریک‌اسید با نسبت ۱:۹۹ در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. بخش رویی را برداشته و جذب محلول‌ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از ۴ میلی‌لیتر محلول اسیدکلریدریک ۱٪ متانول به‌عنوان شاهد استفاده شد. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه مقابل محاسبه گردید (Mohammadi *et al.*, 2014)

$$A = A_{530} - (0.25 \times A_{657})$$

A (جذب محلول)، اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شد.

سنجش آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز طبق روش ساندرس و مسلور(۱۹۷۴) انجام شد. محتویات سنجش آنزیم شامل۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی, ۲۵۰ میکرولیتر بافر بورات‌سدیم، ۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به اضافه ۲۵۰ میکرولیتر بافر سوبسترای فنیل‌آلانین. در این روش نمونه‌ها در میکروتیوب آماده می‌شوند. جذب اولیه و جذب نهایی به‌ترتیب قبل و بعد از نگهداری در حمام بن‌ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود (قبل از قرائت، واکنش با اضافه‌کردن ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۳ نرمال متوقف می‌شود). محاسبه فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی (۹۶۳۰) بر اساس غلظت ترانس‌سینامیک‌اسید µMol/g FW.min انجام می‌گیرد (Hamedani *et al.*, 2014).

c=A/9630 مقدار جذب در اسپکتروفتومتر

A=9630c, A

C: غلظت ترانس‌سینامیک‌اسید

**تجزیه آماری**

مقادیر به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری‌ها وارد نرم‌افزار SAS 9.1 شده و عملیات تجزیه واریانس و همین‌طور مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ بر اساس نوع طرح (فاکتوریل ۳×۴) انجام گردید و میانگین مربعات، مقایسه میانگین اثر ساده تیمارها و مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها به‌دست آمد.

## نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس تأثیر متیل‌جاسمونات بر فلاونوئید کل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم PAL و اثر سالیسیلیک‌اسید بر هایپریسین معنی‌دار گردید. همچنین اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر مقدار هایپریسین معنی‌دار شد. بر طبق نتایج مقایسه میانگین اختلاف بین تیمارها در اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر مقدار هایپریسین، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها معنی‌دار بود. بیشترین مقدار هایپریسین در غلظت‌های صفر و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید به‌دست آمد. تغییر میزان فنل‌ها تحت اثر سالیسیلیک‌اسید نبود. بیشترین مقدار فنل کل در غلظت صفر و کمترین در غلظت ۲۲۵ میکرومولار به‌دست آمد؛ مقدار این ماده در تیمارهای ۷۵ و ۱۵۰ تقریباً مساوی بود. تأثیر سالیسیلیک‌اسید مقدار فلاونوئید کل معنی‌دار شد به‌طوری‌که بیشترین مقدار فنل در تیمار ۷۵ سالیسیلیک‌اسید تولید شد. بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار ۱۵۰ میکرومولار به‌دست آمد؛ درحالی‌که در بقیه تیمارها، این مقدار تقریبا با هم برابر بود. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید تا غلظت ۱۵۰ میکرومولار روند افزایشی داشته و در غلظت ۲۲۵ از مقدار فعالیت آن کاسته شد (جدول۱).

**اثر متیل‌جاسمونات بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده**

براساس نتایج به‌دست‌آمده مقایسه میانگین اثر متیل‌جاسمونات بر مقدار هایپریسین معنی‌دار نشد. در تیمار شاهد و ۷۵ میکرومولار مقدار هایپریسین با هم برابر بوده و در تیمار۱۵۰ مقدار هایپریسین کاهش یافت. اثر این هورمون بر مقدار فنل معنی‌دار نشد ولی بیشترین مقدار فنل در تیمار ۱۵۰ و پس از آن در شاهد مشاهده شد. مقدار فلاونوئید تحت تأثیر تیمار

متیل‌جاسمونات نبود ولی کمترین مقدار فلاونوئید در تیمار ۷۵ میکرومولار دیده شد. مقدار آنتوسیانین کل در هر سه غلظت مورد استفاده تقریباً با هم برابر شد. بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز از تیمار ۱۵۰ میکرومولار به‌دست آمد و مقدار فعالیت این آنزیم در تیمارهای شاهد و ۷۵ میکرومولار تقریباً با هم برابر بود هر چند که این مقدار در شاهد بیشتر بود (جدول۲).

**اثر متقابل تیمارها بر صفات اندازه‌گیری شده**

براساس جدول مقایسه میانگین اثر متقابل، اثر متقابل تیمارها بر مقدار هایپریسین معنی‌دار بود. برای فنل کل اختلاف معنی‌دار میان تیمارها به‌وجود آمد و بهترین تیمار برای فنل تیمار ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک‌اسید بدون حضور تیمار متیل‌جاسمونات بود. اختلاف بین میانگین‌های آنتوسیانین نیز معنی‌دار شده و بهترین تیمار، تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بدون حضور متیل‌جاسمونات بود. اثر متقابل تیمارها در دیگر صفات اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول۳).

**اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ) بر مقدار هایپریسین**

در تیمار صفر سالیسیلیک‌اسید، مقدار هایپریسین در غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات تفاوتی نداشت. در تیمار۷۵ سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار هایپریسین مربوط به غلظت ۷۵ متیل‌جاسمونات و کمترین مقدار مربوط به تیمار ۱۵۰ متیل‌جاسمونات بود. در تیمار ۱۵۰ سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقادیر هایپریسین به‌ترتیب مربوط به تیمارهای صفر، ۱۵۰ و۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید به‌همراه تیمار ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بیشترین مقدار هایپریسین به‌دست آمد و پس از آن تیمارهای صفر (شاهد) و ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات قرار داشتند. در مجموع بیشترین مقدار هایپریسین در تیمارهای۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با صفر میکرومولار متیل‌جاسمونات و همین‌طور تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد (جدول۳).

**اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر فنل کل**

در تیمار شاهد سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار فنل کل مربوط به ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بود. در تیمار ۷۵ سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار، مربوط به ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات بود. مقدار فنل کل تولیدشده در اثر متقابل ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید و صفر متیل‌جاسمونات در بین کل تیمارها بیشترین بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بیشترین فنل کل در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. به‌جز تیمار شاهد سالیسیلیک‌اسید در بقیه تیمارها کمترین میزان فنل کل مربوط به تیمارهای ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بود. بیشترین فنل کل در ۱۵۰ سالیسیلیک‌اسید در غیاب متیل‌جاسمونات و پس از آن در تیمار ۲۲۵ سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۱۵۰ متیل‌جاسمونات به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۱. اثر سالیسیلیک‌اسید بر تغییر صفات اندازه‌گیری‌شده در کالوس گل راعی *Hypericum perforatum* L.

Table 1. Effect of Salycilic asid on secondary metabolite in *Hypericum perforatum* L.

| PAL | TA | TF | TP | HYP | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4.069 | 14.143 | 4.736 | 11.486 | 2.121 | Control |
| 8.888 | 15.282 | 6.312 | 8.632 | 1.746 | 75 |
| 9.760 | 25.892 | 3.967 | 7.120 | 1.665 | 150 |
| 15.323 | 16.458 | 6.707 | 6.073 | 1.990 | 225 |

Hyp: هایپریسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل (میلی‌گرم در اکی‌والانت گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (میکرومول ترانس‌سینامیک‌اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin (µg/g DW), TP: Total Phenolics (meqw.g Galic acid/g DW), TF: Total Flavonoids (mg/g DW), TA: Total Anthocyanin (mg/g DW), PAL: Phenylalanyn Amonia lyase (µMol trans cinnamic acid/g FW.min)

جدول ۲. اثر متیل‌جاسمونات بر صفات اندازه‌گیری شده در کالوس گل راعی .*Hypericum perforatum* L

Table 2. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolite in *Hypericum perforatum* L.

| PAL | TA | TF | TP | HYP | |
|---|---|---|---|---|---|
| 8.373 | 18.305 | 5.406 | 8.055 | 1.998 | Control |
| 7.242 | 18.167 | 4.856 | 5.736 | 2.130 | 75 |
| 12.212 | 17.861 | 5.788 | 11.379 | 1.530 | 150 |

Hyp: هایپریسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل(میلی‌گرم در اکی‌والانت گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل(میلی گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (میکرومول ترانس‌سینامیک‌اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin (µg/g DW), TP: Total Phenolics (mequiv.g Galic acid/g DW), TF: Total Flavonoids (mg/g DW), TA: Total Anthocyanin (mg/g DW), PAL: Phenylalanyn Amonia lyase (µMol trans cinnamic acid/g FW.min).

جدول ۳. اثر متقابل SA و MJ بر مقدار متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنزیمی در گل راعی .*Hypericum perforatum* L

Table 3. Interaction of SA and MJ on Secondary Methabolites in stJohns Wort *Hypericum perforatum* L.

| SA | MJ | PAL | TA | TF | TP | HYP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | $4.05^{a}$ | $13.00^{ab}$ | $7.7^{a}$ | $9.16^{a}$ | $2.56^{ab}$ |
| | 75 | $4.77^{a}$ | $16^{ab}$ | $4.87^{b}$ | $11.66^{a}$ | $2.45^{ab}$ |
| | 150 | $2.33^{a}$ | $18.13^{ab}$ | $3.54^{b}$ | $9.37^{a}$ | $2.42^{ab}$ |
| 75 | 0 | $2.59^{a}$ | $21.75^{ab}$ | $4.8^{b}$ | $9.58^{a}$ | $1.54^{ab}$ |
| | 75 | $2.44^{a}$ | $5.00^{b}$ | $7.46^{ab}$ | $8.95^{a}$ | $2.15^{ab}$ |
| | 150 | $1.87^{a}$ | $20.75^{ab}$ | $5.71^{ab}$ | $15.14^{a}$ | $0.44^{b}$ |
| 150 | 0 | $2.5^{a}$ | $42.75^{a}$ | $6.10^{ab}$ | $22.91^{a}$ | $3.03^{a}$ |
| | 75 | $0.27^{a}$ | $27.67^{ab}$ | $4.00^{b}$ | $2.21^{a}$ | $1.54^{ab}$ |
| | 150 | $2.7^{a}$ | $20.13^{ab}$ | $4.61^{b}$ | $6.87^{a}$ | $2.36^{ab}$ |
| 225 | 0 | $1.99^{a}$ | $14.38^{ab}$ | $6.62^{ab}$ | $3.85^{a}$ | $2.10^{ab}$ |
| | 75 | $0.72^{a}$ | $14.25^{ab}$ | $2.66^{b}$ | $1.66^{a}$ | $3.08^{a}$ |
| | 150 | $2.38^{a}$ | $11.5^{ab}$ | $12.01^{a}$ | $15.83^{a}$ | $0.82^{ab}$ |

Hyp: هایپریسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل (میلی‌گرم در اکی‌والانت گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (میکرومول ترانس‌سینامیک‌اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin (µg/g DW), TP: Total Phenolics (mequiv.g Galic acid/g DW), TF: Total Flavonoids (mg/g DW), TA: Total Anthocyanin (mg/g DW), PAL: Phenylalanyn Amonia lyase (µMol trans cinnamic acid/g FW.min).

**اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر مقدار فلاونوئید**

در تیمار شاهد سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار فلاونوئید به‌ترتیب در تیمارهای صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بیشترین و کمترین مقدار فلاونوئید کل به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ۷۵ و صفر متیل‌جاسمونات بود. در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید میزان تولید فلاونوئید در غلظت شاهد متیل‌جاسمونات بیشترین و در غلظت ۷۵ متیل‌جاسمونات کمترین بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار در غلظت ۱۵۰ و کمترین مقدار فلاونوئید کل در غلظت ۷۵ متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. بیشترین مقدار فلاونوئید در تأثیر متقابل سالیسیلیک‌اسید در غلظت ۲۲۵ میکرومولار و متیل‌جاسمونات در غلظت ۱۵۰ میکرومولار به‌دست آمد (جدول۳).

**اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات برمقدار آنتوسیانین**

مقدار آنتوسیانین در اثر متقابل تیمار صفر سالیسیلیک‌اسید و تیمارهای مختلف متیل‌جاسمونات معنی‌دار نشد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بیشترین مقدار آنتوسیانین کل در غلظت‌های صفر و ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید بیشترین میزان تولید آنتوسیانین کل مربوط به غلظت شاهد و پس از آن ۷۵ میکرومولار و کمترین میزان مربوط به غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات بود. تأثیر متقابل سالیسیلیک‌اسید در غلظت ۲۲۵ میکرومولار در ترکیب با غلظت‌های متیل‌جاسمونات اثر معنی‌داری بر تولید آنتوسیانین کل نداشت ولی با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات مقدار آنتوسیانین کل کاهش یافت. در مجموع بیشترین مقدار تولید آنتوسیانین کل در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با تیمار

صفر متیل‌جاسمونات به‌دست آمد و پس از آن ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بیشترین مقدار آنتوسیانین کل را تولید کرد (جدول۳).

**اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم PAL**

براساس نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین، اثر متقابل تیمارها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بی‌تأثیر بود. میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار صفر میکرومولار سالیسیلیک‌اسید با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات از صفر به ۷۵ میکرومولار افزایش داشته است ولی با افزایش غلظت به ۱۵۰ میکرومولار از فعالیت آنزیم به‌طور قابل‌توجهی کاسته شد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید افزایش غلظت متیل‌جاسمونات کاهش فعالیت آنزیم را به‌همراه داشت. تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات میزان فعالیت آنزیمی به کمترین حد رسید. ولی فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد و ۱۵۰ متیل‌جاسمونات با هم برابر بود. میان تیمارهای مختلف متیل‌جاسمونات در ترکیب با تیمار۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید هم کمترین فعالیت آنزیم در تیمار ۷۵ متیل‌جاسمونات مشاهده شد. در مجموع تیمار ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ترکیب با صفر سالیسیلیک‌اسید و پس از آن تیمار شاهد متیل‌جاسمونات در ترکیب با تیمار شاهد سالیسیلیک‌اسید بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز (برحسب ترانس‌سینامیک‌اسید) را تولید کرد. همچنین کمترین مقدار فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای ۱۵۰ سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ متیل‌جاسمونات و تیمار ۲۲۵ سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ متیل‌جاسمونات به‌دست آمد (جدول۳).

سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات به‌عنوان ترکیبات القاکننده تنش، مسیر سیگنالینگ را فعال نموده و با افزایش رونویسی mRNA آنزیم PAL سبب افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌گردد (Samadi *et al*., 2014). سالیسیلیک‌اسید یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های گیاهی است که ژن‌های دفاعی را فعال می‌کند. مطالعه Walker *et al*. (2002) نشان داد که جازمونیک‌اسید تولید هایپریسین را افزایش داد. جاسمونیک‌اسید یک الیسیتور مؤثر برای تولید هایپریسین در کشت سلولی گل راعی است (Coste *et al*., 2011). اثر سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید را بر تولید متابولیت‌های ثانوی در گونه‌های *Hypericum hirsutum* و *Hypericum maculatum* بررسی کردند. تیمار با جاسمونیک‌اسید (حداکثر۲۵۰ میکرومولار) تجمع هایپریسین و سودوهایپریسیین را در هر دو گونه افزایش داد ولی باعث کاهش مقدار هایپرفورین در گونه *H.hirsutum* شد. اثر بازدارندگی متیل‌جاسمونات بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی در گیاهان نشان داده شده است. جاسمونیک‌اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانندسازی را در کالوس توتون متوقف کرده و سلول را در مرحله رشد G1 نگه می‌دارد (Rezaei *et al*., 2011). بیوسنتز نفتودی‌آنترون‌ها از مسیر پلی‌کتید و با دخالت آنزیم پلی‌کتیدسنتاز انجام می‌شود (Rajabi *et al*., 2016). اثر محرک‌های شیمیایی متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید در محیط کشت پایه MS بر تحریک تولید هایپریسین در یک دوره ۴۲ روزه مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که غلظت ۱۰۰میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به سایر غلظت‌ها بیشترین میزان هایپرسین (۶۶/۳۴٪) را تولید می‌کند. همچنین نیز استفاده از غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید باعث از بین‌رفتن نمونه‌های کشت بافتی گیاه گل راعی شد. همچنین در یک پژوهش مشخص شد که سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های بالا باعث ازبین‌رفتن گیاهان بابونه آلمانی شد (Zarinkamar *et al*., 2013). فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز اولین آنزیم در بیوسنتز فنیل‌پروپانوئید در گیاهان است که با دآمیناسیون فنیل‌آلانین با آزادکردن آمونیوم، تولید ترانس‌سینامیک‌اسید می‌کند (Rajaeian *et al*., 2015) و نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئید، لیگنین و ترکیبات دیگر دارد. مقدار فلاونوئید با بیشترشدن غلظت هر دو محرک افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز پس از تیمار اغلب در کشت سلولی باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Wang *et al*., 2015). در یک تحقیق مقدار نفتودی‌آنترون‌ها و

فنیل‌پروپانوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه علف چای پس از تحریک با جاسمونیک‌اسید افزایش یافت (Gadzavska *et al*., 2007). اثر سالیسیلیک‌اسید در گیاه به‌صورت تحریک پاسخ‌های دفاعی با تحریک تولید کمپلکس‌های پروتئینی مربوط به دفاع گیاهی می‌باشد. سیستم‌های کشت تمایزنیافته شامل کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی، با افزایش سطوح نفتودی‌آنترون‌ها به تیمار سالیسیلیک‌اسید پاسخ می‌دهند. به‌نظر می‌رسد بهترین مدت زمان قرار گرفتن ریزنمونه در معرض محرک‌های سالیسیلیک‌اسید یک تا دو هفته باشد. (Gadzovska *et al*., 2013) نتیجه گرفتند که در کشت شاخه گل راعی هیچ‌کدام از غلظت‌های کم و زیاد (۵۰ و۲۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک‌اسید بر روی نمو اثری نداشت. اگر چه سلول‌ها، کالوس‌ها و شاخه‌ها شامل هایپریسین و سودوهایپریسین می‌باشند، ولی فقط در کالوس و سوسپانسیون‌های سلولی مقدار متابولیت‌ها در اثر استفاده از سالیسیلیک‌اسید افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت؛ ولی در تحقیق Gadzovska *et al*. (2007) Gadzovska *et al*. و همین‌طور Gadzovka *et al*. (2013) مقدار هایپریسین تا چهار روز و دیگر فاکتورها تا حداکثر هفت روز افزایش نشان می‌دادند؛ اما پس از آن افزایش نداشته و حتی کاهش نیز داشته‌اند.

## نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج به‌دست‌آمده، در کشت‌های سلولی گیاه گل راعی، غلظت‌های پایین (حدود ۱۰۰میکرومولار) هر دو محرک به‌ویژه سالیسیلیک‌اسید برای تولید هایپریسین مؤثر می‌باشد. در این تحقیق همه نمونه‌ها در شرایط نوری و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در میان نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، بیشترین میزان هایپریسین تولیدشده از اثر متقابل ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات و همین‌طور اثر ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید به‌دست آمد. مقدار فلاونوئید با بیشترشدن غلظت هر دو محرک افزایش یافت. مقدار آنتوسیانین در ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ترکیب با همه غلظت‌های سالیسیلیک‌اسید کمترین بود؛ اما بیشترین مقدار آن در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در غیاب متیل‌جاسمونات و همین‌طور ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد.

در تیمارهای صفر و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات فعالیت آنزیم PAL کاهش یافت. اما غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ترکیب با ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات باعث بیشترین فعالیت آنزیمی شد. در نتیجه این تحقیق مشخص شد که تیمار کالوس‌های گل راعی رقم توپاز تحت تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید و صفر تا ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بهترین نتیجه را در پی داشت. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده مدت زمان اعمال تیمار، کاهش یافته و به‌منظور اندازه‌گیری مقادیر هایپریسین، از کروماتوگرافی مایع استفاده شود. همچنین ازآنجاکه در این تحقیق اثر سالیسیلیک‌اسید بیشتر بود پیشنهاد می‌گردد که در استفاده از الیسیتور هورمونی، اثر این هورمون بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

## REFERENCES


1. Barnes, J., Anderson, L. A. & Phillipson, J. D. (2007). *Herbal Medicin* (3rd Ed). Pharmaceutical Press. London.UK, 710 pp.
2. Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. & 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* (PCTOC), 106, 279-288.
3. Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C. & Hagège, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 89, 1-13.
4. Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagege, D., Courtois, D. & Joseph, C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthronesand phenylpropanoids in *Hypericum perforatum L. Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 113, 25-39.

5. Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C. & Hagège, D. (2014). Effects of Poly saccharide Elicitors on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Response in *Hypericum perforatum* L. Shoot Cultures. *Hindawi Publishing Corporatione Scientific World Journal*, 1-10.
6. Hamedani, M., Moradi, H. & Ghanbari, A. (2014). Effect of harvesting time and durability age on quality of blod orange (*Citrus sinensis* L.) cv Moro fruits. *Journal of Iranian horticultural sciences* (IJSH), 28(2), 252-259. (in Farsi)
7. Jaimand, K., Rezaei, M., Mozafarian, V., Azadi, R., Naderihajibagherkendy, M., Moshkizadeh, M. & Golipour. (2007). determination of Hypericin content in leaf and Flower in 8 speies of *Hypericum*. *Journal of Medicinal plants (JMP)*, 25, 49-55. (in Farsi)
8. Mohammadi, M., Kazemitabar, K., Asili, J. & Kamali, H. (2014). Study of the antioxidant and antibac terial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 1, 161-167. (in Farsi)
9. Morshedloo, M., Ebadi, A., Fatahimoghadam, M. & Yazdani, D. (2011). Study of parts of Essence, phenolic content and antioxidant activity in stGohns wort (*Hypericum perforatum* L.) Extract collecting from north of Iran. *Journal of Medicinal Plant*, 11(8), 218-226. (in Farsi)
10. Mozafarian, V. (2012). Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang e moaser Press. (in Farsi)
11. Naik, P. M. & Al HKhairy, J. M. (2016). *Abiotic and Biotic Elicitors Role in Secondary MetabolitesProduction through In Vitro Culture of Medicinal Plants*, (pp. 247-277.) Intech.
12. Namli, S., Isikalan, C., Akbas, F., Toker, Z. & Tilkat, E. (2014). Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under in vitro conditions. *Taylor&Francis*, 28(24), 2286-2292.
13. Omidbeigy, R. (2009). *Production and Process of Medicinal Plant*. (Volum 2). 5th Publishing. Behnashr Press (Astan-e-Ghods-e-Razavi). (in Farsi)
14. Rajabi, A., Abaspoor, H. & Masood sinki, J. (2016). Effect of Methyl Jasmonate and salicylic acid Elicitors in stimulate the production of on the Hypericin in (*Hypericum perforatum* L.). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(22), 41-50. (in Farsi)
15. Rajaeian, S., Ehsanpour, A. & Toghyani, M. (2015). Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of Nicotiana rustica triggered by ethanolamine pretreatment under in vitro salt stress condition. Iranian Journal of Plant Biology, 7(26), 1-13. (in Farsi)
16. Rezaei, A., Ghanati, F. & Behmanesh, M. (2011). Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Journal of Plant Biology*, 7, 55-72. (in Farsi)
17. Samadi, S., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Investigation on phenylalanine ammonialyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions.*journal of plant production*, 21(4), 135-148. (in Farsi)
18. Saunders, J. A. & Mcclure, J. W. (1974). The suitability of a quantitive spectrophotometric assay for phenyl alanine ammonia lyase activity in barely, buckwheat and pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 54, 412-413.
19. Walker, T., Bais, H. & Vivanco, J. (2002). Jasmonic acid induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60, 289-293.
20. Wang, J., Qian, J., Yao, L. & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(5), 1-9.
21. Yamaner, O., Erdag, B. & Gokbulut, C. (2013). Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish journal of botany*, 37, 153-159.
22. Zarinkamar, F., Abdollahzadeh Zaviehjak, A., Sharifi, M. & Behmanesh, M. (2013). Effect of salicylic acid on flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Matricaria chamomilla* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 17, 67-74. (in Farsi)