The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

# Induction of Secondary Metabolites Contents and Antioxidant Capacity of *Teucrium polium* Callus under Treatment with Naphthalene Acetic Acid, Benzylaminopurine, and Methyl Jasmonate

**Mahshid Tabarifard[1], Monireh Cheniany[2]✉, Ali Ganjeali[3]**

1. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: tabarifard62@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: cheniany@um.ac.ir
3. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: ganjeali@um.ac.ir

**Article Info**

**Article type:**

Research Article

**Article history:**

Received: 20 June 2018

Received in revised form: 14 April 2019

Accepted: 10 June 2019

Published online: 23 September 2023

**Keywords**:

*Antioxidant,*

*Elicitor,*

*Flavonoid,*

*Rosmarinic acid,*

*Teucrium polium.*

**ABSTRACT**

One of the most important factors for the preservation of plants, medicinal plants in particular, is the use of biotechnological methods for increasing the production of secondary metabolites. This study was performed with the aims of evaluating and enhancing the secondary metabolites contents of *Teucrium polium* under in vitro culture by application of methyl jasmonate as elicitor. For callus induction, immature leaf explants were obtained from the plants grown under hydroponic condition and were cultured on MS medium supplied with various concentrations of Benzylaminopurine (BAP) (0, 0.5, 1, and 1.5 mg/L) in combination with Naphthalene acetic acid (NAA) (0, 0.5, and 1 mg/L). Regarding the highest percentage of callus induction frequency and mean of calli dry weight, the selected cultures were treated with methyl jasmonate (50, 100, and 200 µM). The content of different groups of phenolic compounds and antioxidant capacity were evaluated. The highest percentage of callus induction (100%) was achieved in the medium supplemented by BAP individually as well as in combination with NAA. The maximum fresh and dry weights of calli were achieved at 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 1.5 mg/L BAP, and 1 mg/L BAP. The calli treated with 50 µM methyl jasmonate yielded the maximum contents of phenolic compounds, flavonoids, flavones, O-diphenol, phenolic acids, and rosmarinic acid that differed significantly from calli obtained from other methyl jasmonate concentrations. The highest antioxidant activity with IC50 of 2.066 ± 0.24 µg/mL using DPPH assay, and 383.79 ± 33.61 mg Fe+ 100g-1 DW using FRAP were in 50 µM methyl jasmonate and 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA treatment. Based on the results, methyl jasmonate in optimal concentration can play a promotive role in increasing the effective pharmacological compounds of *T. polium* and can be considered as a stimulus for the synthesis of phenolic compounds and further increase of the antioxidant power in callus.

**Cite this article:** Tabarifard, M., Cheniany, M. & Ganjeali, A. (2023). Induction of Secondary Metabolites Contents and Antioxidant Capacity of *Teucrium polium* Callus under Treatment with Naphthalene Acetic Acid, Benzylaminopurine, and Methyl Jasmonate. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 54 (3), 493-512. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.344839.2042

© The Author(s).

**Publisher:** The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.344839.2042

## Extended Abstract

### Introduction

One of the most important factors for the preservation of plants, in particular medicinal ones, is the use of biotechnological methods for increasing the production of secondary metabolites. The main medicinal compounds of *Teucrium polium* are divided into several groups based on their origin, among which phenolic compounds, flavonoids and phenolic acids have a major contribution. It has been reported that any factor affecting the gene expression level and activity of phenylalanine ammonia-lyase can affect the synthesis of phenolic compounds. Methyl jasmonate is one of the most important abiotic elicitors, which plays a key role to induce a large number of genes related to the defense pathway. It has been reported that these esters can

promote the biosynthesis of several kinds of secondary metabolites including indole alkaloids, sesquiterpenes and phenolic compounds. The present study was conducted with the aim of investigating the effect of exogenous application of benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) on callus induction of *Teucrium polium* leaf explants, and the effect of methyl jasmonate elicitation on the phenolic compounds and antioxidant activity in calli under the same conditions

**Material and Methods**

Immature leaf of the *T. polium* grown under hydroponic condition were cultured on MS medium supplied with various concentrations of BAP (0, 0.5, 1, and 1.5 mg/L) in combination with NAA (0, 0.5, and 1 mg/L). Regarding the highest callus induction frequency and mean weight of dry calli, the selected cultures were treated with different concentrations of methyl jasmonate (50, 100, and 200 μM). Explants without methyl jasmonate treatment were considered as controls. The methyl jasmonate treated calli were collected, air dried and extracted at room temperature. The content of phenolic compounds, flavonoids, flavones, O-diphenol, phenolic acids, and rosmarinic acid as well as antioxidant capacity (measured by both DPPH Free Radical Inhibition and Ferric Reducing Antioxidant Power assays) were evaluated.

**Results**

The highest percentage of callus induction (100%) from the leaf explants was achieved from the medium supplemented by BAP individually as well as in combination with NAA. The maximum fresh and dry weights of calli were achieved in three combinations of growth regulators, i.e., (i) 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, (ii) 1.5 mg/L BAP, and (iii) 1 mg/L BAP. The maximum contents of phenolic compounds, flavonoids, flavones, O-diphenol, phenolic acids, and rosmarinic acid were measured at pretreatment of the callus with 50 μM methyl jasmonate, with statistically significant differences with other methyl jasmonate concentrations. The highest antioxidant activity with an IC50 of 2.066 ± 0.24 μg/mL using DPPH assay, and 383.79 ± 33.61 mg Fe+ 100g-1 DW using FRAP was in 50 μM methyl jasmonate and 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA treatment.

**Discussion**

It has been confirmed that jasmonates increase the expression of genes and transcription factors related to secondary metabolite biosynthesis in cell culture. The increase in the activity of phenylpropanoid pathway-related enzymes (PAL, C4H, 4CL, CAD, POD, and PPO) and their gene expression is a result of this class of elicitors, which are important factors in the synthesis of phenolic compounds. The results of the present study also showed the role of jasmonate in increasing most of the studied metabolites. However, high concentrations of methyl-jasmonate with excessive accumulation of reactive oxygen species lead to oxidation of macromolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids, which ultimately leads to cell death.

**Conclusion**

The results of the present research showed that the application of methyl jasmonate in optimal concentration can play an effective role in increasing the active pharmacological compounds of *T. polium*. Also, the use of methyl jasmonate in combination with growth regulators had positive effects on the synthesis of phenolic compounds and further increase of the antioxidant power in calli.

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۴، شماره ۳

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

# ترغیب محتوای متابولیت‌های ثانوی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس کلپوره در شرایط تیمار با بنزیل‌آمینو پورین، نفتالن‌استیک‌اسید و متیل‌جاسمونات

مهشید طبری‌فرد[۱] | منیره چنیانی[۲]✉ | علی گنجعلی[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌علوم، دانشگاه‌فردوسی‌مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: tabarifard62@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: cheniany@um.ac.ir

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌علوم، دانشگاه‌فردوسی‌مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: ganjeali@um.ac.ir

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**

مقالهٔ پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۴/۱۸

**تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۱/۱۷

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۳/۱۷

**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

**کلیدواژه‌ها:**

*آنتی‌اکسیدان، الیسیتور، فلاونوئید، رزمارینیک‌اسید، کلپوره.*

**چکیده**

یکی از مهمترین عوامل حفظ گیاهان و به‌ویژه گیاهان دارویی استفاده از روش‌های زیست‌فناوری درجهت تولید و افزایش متابولیت‌های دارویی است. این پژوهش با هدف بررسی محتوای متابولیت‌های ثانوی گیاه کلپوره و افزایش آن‌ها در نتیجه تیمار با الیسیتورمتیل‌جاسمونات در شرایط کشت درشیشه به‌جای استفاده مستقیم از گیاه دارویی انجام شد. جهت تولید کالوس، ریزنمونه برگ از گیاه رشدیافته در شرایط هیدروپونیک تهیه شد و در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم درلیتر)، به صورت مجزا و تلفیقی کشت شد. نمونه کالوس‌های منتخب با بیشترین درصدکالزایی و وزن‌خشک، تحت تیمار با الیسیتور متیل‌جاسمونات (۰، ۵۰ ، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار) قرار گرفتند. محتوای دستجات مختلف ترکیبات‌فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های تیمارشده ارزیابی شد. کالزایی صد درصد درشرایط هورمونی تیمار مجزا بنزیل‌آمینوپورین و همچنین تلفیق آن با هورمون نفتالن‌استیک‌اسید مشاهده شد. بیشترین وزن‌تر و خشک کالوس‌ها نیزدر تیمارهای یک و ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و تلفیق بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم در لیتر) ثبت شد. حداکثر محتوای کل ترکیبات فنلی، فلاونوئید، فلاون، O-دی فنل، اسیدهای‌فنلی و رزمارینیک‌اسید در تیمار با متیل‌جاسمونات ۵۰ میکرومولار مشاهده شد که نسبت به دیگر غلظت‌های به‌کار رفته، دارای تفاوت‌های معنی‌داری بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و FRAP نیز به‌ترتیب دارای بیشینه ۰/۲۴ ± ۲/۰۶۶ میلی گرم درلیتر و ۳۳/۶۱ ± ۳۸۳/۷۹ میلی‌گرم آهن بر صدگرم ماده خشک، در تیمار ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات و در تیمار تلفیق بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم در لیتر) بودند. برمبنای نتایج، الیسیتور متیل‌جاسمونات در غلظت بهینه می‌تواند نقش ترغیبی در افزایش ترکیبات موثره‌دارویی کلپوره داشته باشد و محرکی برای سنتز ترکیبات‌فنلی و در ادامه افزایش توان آنتی‌اکسیدانی کالوس آن باشد.

**استناد:** طبری فرد، مهشید؛ چنیانی، منیره؛ و گنجعلی، علی (۱۴۰۲). ترغیب محتوای متابولیت‌های ثانوی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس کلپوره در شرایط تیمار با بنزیل‌آمینو پورین، نفتالن‌استیک‌اسید و متیل‌جاسمونات. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۴ (۳)، ۵۱۲-۴۹۳. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.344839.2042

**ناشر:** مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.344839.2042

## مقدمه

گیاهان‌معطر و دارویی، دارای اهمیت بسزایی در بحث سلامت و بهداشت جهانی هستند (Duke *et al*., 2002). در دهه‌های اخیر، به منظور کشف داروهای جدید و توسعه آن‌ها برای درمان بیماری‌های مختلف، توجه زیادی به متابولیت‌های ثانوی و ترکیبات فعال موجود در گیاهان شده است (Park *et al*., 2009) تا بتوان از آن‌ها در صنایع آرایشی، بهداشتی، غذایی و به‌ویژه داروسازی و درمان آسان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها بهره برد (Oksman-Caldentey, 2004). سنتز ترکیبات‌ثانوی‌گیاهی بر پایه روش‌های شیمیایی بسیار پرهزینه است و از این رو، روش‌های زیست‌فناوری کشت‌سلول و بافت به‌عنوان یک روش جایگزین در تولید ترکیبات بیوشیمیایی موردتوجه قرار گرفته است (Rao & Ravishankar, 2002). چنین پیشرفت‌های تکنولوژیکی منجر به تولید تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانوی با ارزش با منشاء گیاهان درمعرض خطر انقراض شده است (Abdulhafiz, 2022). استفاده از کشت درشیشه به‌عنوان روشی مفید برای تولید متابولیت‌های ثانوی گزارش شده است ( Zaker *et al*., 2015). به‌نحوی‌که استفاده از محرک‌ها و الیسیتورهای مختلف مانند متیل‌جاسمونات (MeJA) در عملکردی وابسته به غلظت، برای ترویج تولید و تجمع ترکیبات فنلی در فرآیند کشت توصیه می‌شود (Bahreini *et al*. 2015). در شرایط درشیشه، استفاده از اکسین‌های مصنوعی از جمله نفتالن استیک اسید (NAA) اغلب برای ایجاد و حفظ کالوس به کار می‌رود ( Seyed Tabatabae *et al*., 2011). از میان هورمون‌های سیتوکنین، بنزیل آمینوپورین (BAP) بیشترین تاثیر را بر افزایش تقسیم سلول و کالوس‌زایی ریزنمونه دارد (Echeverrigaray *et al*., 2010). البته میزان مناسب هورمون بنزیل‌آمینوپورین برای کالزایی بستگی به سطح سیتوکنین‌های درونی گونه‌های مختلف گیاهی و نوع ریزنمونه دارد (Modarres *et al*., 2018).

کلپوره گیاهی علفی است که یکی از [1]رویشگاه‌های آن، جنوب‌غربی آسیا، به‌خصوص خاورمیانه و ایران است ( Koocheki *et al*., 2009). عمده ارزش‌دارویی این گیاه منتسب به مقوی‌بودن، نیرودهنده، ضدتشنج، ضددرد، کاهش‌دهنده چربی و قندخون است (Rabbaa *et al*., 2012). سایر بررسی‌ها بر خواص‌دارویی کلپوره نشان داده است که این گیاه خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز دارد (Goulas *et al*., 2012). متابولیت‌های ثانوی گیاهی براساس منشاء به چند گروه تقسیم می‌شوند که در میان آن‌ها ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی سهم عمده‌ای دارند (Crozier *et al*., 2007). این دسته از ترکیبات طبیعی در فرایندهای متنوع و مهم مانند جذب‌موادغذایی، سنتز پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و روبشگری اکسیدان‌ها [2] شرکت دارند (Goleniowski *et al*., 2013). از مهمترین زیرمجموعه‌های ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها می‌باشند که دارای دو عملکرد ۱) به‌عنوان سیستم‌دفاعی، وظیفه حفاظت سلول‌ها در برابر خسارت اکسیداتیو و عوامل بیماریزا و ۲) افزایش بازه جذب موادغذایی گیاهان در زمان پیری می‌باشند (Field *et al*., 2001). فلاونوئیدها با توانایی روبندگی رادیکال‌های آزاد، دهندگی هیدروژن، خاموش‌کردن آنیون‌سوپراکسید، کلات‌کردن یون‌های فلزی و همکاری با آنزیم پراکسیداز، نقش مهمی در گیاهان دارند ( Chu *et al*., 2000). اسیدهای‌فنلی، از مهمترین مجموعه ترکیبات پلی‌فنلی هستند که عمدتا ازسینامیک اسیدها مشتق می شوند. این گروه نیز به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده‌اند. نکته آن‌که عامل اصلی خواص دارویی گیاهان تیره نعناع نیز به علت اسانس‌ها و اسیدهای‌فنلی آن‌ها بیان شده است (Mattila & Hellstrom, 2007). هرچند ترکیبات فنلی، ممکن است در شرایط عادی سلول‌ها سنتز شوند، اما تاثیر قابل‌توجه انواع تنش‌ها بر مقدار آن‌ها در سلول‌های گیاهی محرز شده است ( Kliebenstein, 2004). در شرایط کشت درشیشه، نوع ریزنمونه، شرایط فیزیکی، استفاده از القاگرهای زنده و غیرزنده، افزایش نفوذپذیری سلول و انتخاب سلول‌هایی با کارآیی بالا، از عوامل موثر در افزایش تولید متابولیت‌های‌ثانوی است (Omidi & Farzin, 2012). گزارش شده است که هر عاملی که بر میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) اثر بگذارد، بر مسیر سنتز ترکیبات فنلی نیز اثرگذار خواهد بود (Ruiz & Romero, 2001). در این پژوهش و در ادامه پژوهش‌های قبلی این گروه تحقیقاتی (Mohammadzadeh *et al*., 2021)، ضمن بررسی تاثیر تیمارهای مجزا و تلفیقی هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و

---

1*Teucrium polium* L.
2Oxidants scavenging

نفتالن استیک‌اسید بر نرخ‌کالزایی ریزنمونه برگ کلپوره، تاثیر الیسیتور متیل‌جاسمونات بر محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کالوس، در شرایط درشیشه نیز ارزیابی گردید.

## پیشینه پژوهش

تحقیقاتی در رابطه با کشت درشیشه و نرخ کال‌زایی کلپوره در جهت بهینه‌سازی محیط‌کشت (Javidi Moghadam *et al.*, 2016) و نیز افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی صورت گرفته است و محیط‌های کشت بهینه MS با تغییرات جزئی نیز معرفی شده است (Sahoo *et al.*, 1997). تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش دارویی در شرایط درشیشه به علت کنترل دقیق عوامل مختلف در شرایط آزمایشگاهی سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند (Gerth *et al*., 2006). بررسی تجمع و ترغیب تولید ترکیبات‌فنلی و فلاونوئیدی، در بستر درشیشه و کالوس گونه‌های مختلف گیاهی مانند مریم‌گلی (Ghorbanpour, 2015)، سالویا طبسانا (Hemmati *et al.*, 2020; Shoja *et al*., 2022)، کلپوره (Khodayari *et al.*, 2014; Javidi Moghadam *et al.*, 2016) و آلوئه ورا (Raei *et al.*, 2016) مورد بررسی قرار گرفته است. دست‌ورزی محیط‌های کشت گیاهی با استفاده از الیسیتورها یکی از راهکارهای مهم جهت القاء تولید متابولیسم‌های ثانوی می باشد. الیسیتورها از طریق فعال‌کردن مکانسیم‌های دفاعی باعث القاء تشکیل متابولیت‌های ثانوی و پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول‌های گیاهی نظیر افزایش جریانات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید گونه‌های کنشگراکسیژن[1] ، فعال‌سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و سنتز و تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شوند (Zhoa *et al*., 2005). متیل‌جاسمونات از مهمترین الیسیتورهای غیرزیستی است که باعث القاء تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به مسیر دفاع می‌شود (Furden *et al*., 2005). گزارش شده است که این الیستور می‌تواند بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانوی از جمله اندول آلکالوئیدها، سزکوئی‌ترپن‌ها و فنل‌ها را تحریک کند (Matkowski, 2008; Hashemyan *et al*., 2020). مطالعه اثر الیسیتور مذکور بر مشتقات فنلی گیاهان کلپوره (Mohammadzedeh *et al*., 2020)، کنگرفرنگی[2] (Samadi *et al*., 2014)، مریم‌گلی‌ترکه‌ای[3] (Dowom *et al*., 2017)، نوروزک[4] (Ghasimi Hagh *et al*., 2018) و بنفشه ایرانی[5] (Skrzypczak-Pietraszek *et al*., 2014) صورت گرفته است.

## روش‌شناسی پژوهش

بذر گیاه کلپوره از مرکز تحقیقات جهادکشاورزی مشهد تهیه شد. برای از بین بردن خواب بذر از تیمارهای مختلف، در شرایط دمایی متفاوت و در نور و تاریکی استفاده گردید (Koocheki *et al*., 2009) و درنهایت بذرهای جوانه زده (به کمک هورمون جیبرلیک‌اسید) به مدت یک هفته در نور ۲۰۰۰ لوکس ، دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط مرطوب قرار گرفتند و پس از سبزشدن اندام هوایی و افزایش طول ریشه‌اولیه به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) انتقال یافتند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. ریزنمونه برگ که در بررسی‌های قبلی به‌عنوان بهترین ریزنمونه کالوس‌دهنده معرفی شده بود (Javidi Moghadam *et al*., 2016)، از این گیاهان تهیه گردید. قطعات برگ پس از جداسازی از گیاه مادری با آب‌مقطر شستشو و سپس ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (حجم/حجم) و به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانل ۷۰ درصد (حجم/حجم) غوطه‌ور شدند و

1 Reactive oxygen species
2 *Cynara scolymus* L.
3 *Salvia virgate* Jacq.
4 *Salvia lerrifolia* Benth
5 *Exacum affine* Balf. f. ex Regel

در نهایت پس از شستشوی نهایی با آب‌مقطر سترون، روی محیط‌های کشت MS دارای تیمار مجزا و ترکیبی دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین ( ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر) و نفتالن استیک‌اسید ( ۰، ۰/۵و ۱ میلی‌گرم درلیتر) نگه‌داری شدند. در پایان هفته هشتم، نرخ‌کالزایی و وزن‌تر و خشک کالوس‌ها ارزیابی شد و بر اساس همین صفات، بهترین محیط‌های کشت برای گام دوم آزمایشات –اعمال تیمار الیستور– انتخاب شدند. کشت و تهیه محیط‌های کشت منتخب مجددا صورت گرفت و کالوس‌های حاصل در پایان هفته ششم به محیط‌کشت MS حاوی الیسیتور متیل‌جاسمونات (غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) منتقل شدند. بعد از گذشت ده روز از اعمال تیمار، وزن‌تر کالوس‌ها با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. کالوس‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و وزن‌خشک آن‌ها مجددا با ترازو ثبت گردید. کالوس‌های خشک شده در هاون چینی پودر شدند و جهت بررسی‌های بیوشیمیایی، آماده عصاره‌گیری گردیدند.

## عصاره‌گیری و سنجش مشتقات فنلی

به منظور عصاره‌گیری، ۰/۵ گرم از پودرخشک کالوس با متانول ۸۰ درصد (v/v) مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۵٪ ± ۲۸ (KHz) در دستگاه اولتراسونیک (مدل 2500s ، پارسونیک، ساخت کشور ژاپن ) قرار گرفت. سپس عصاره با کاغذواتمن شماره یک صاف و به‌منظور حذف حلال متانول، زیر هود (شیمی‌طوس، ایران) در شرایط کاملا تاریک قرار گرفت. با حل نمودن پودر حاصل در متانول ۸۰ درصد (حجم/حجم)، سنجش‌های ترکیبات بیوشیمیایی آن صورت گرفت (Annegowda *et al.*, 2012).

* میزان فنل‌کل براساس رنگ‌سنجی فولین سیوکالچو و با استفاده از گالیک‌اسید (GA) به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Marinova *et al.*, 2005). به‌طورخلاصه، حجم مناسب از عصاره متانولی هر نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالچو ۱۰ درصد (حجم/حجم) مخلوط و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد (وزن/حجم) به آن اضافه شد. خوانش جذب در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر صورت گرفت و محتوای فنل تام برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر صدگرم ماده خشک محاسبه و ارائه شد.

* محتوای ترکیبات فلاونوئید به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلراید و با استفاده از کاتچین (CAT) به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Zhishen *et al.*, 1999). بدین منظور به حجم مناسب ازعصاره متانولی نمونه‌ها، ۳/۴ میلی‌لیتر متانول ۳۰ درصد (حجم/حجم)، ۱۵۰ میکرولیتر سدیم‌نیتریت ۰/۵ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم‌کلرید ۰/۳ مولار و درنهایت ۱ میلی‌لیترسدیم-هیدروکسید ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. محتوای این ترکیبات برحسب میلی‌گرم کاتچین بر صدگرم ماده خشک ارزیابی شد.

* سنجش محتوای فلاون با استفاده روش Kosalec *et al.*(2004) و برمبنای استاندارد کوئرستین (QU) صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم‌کلرید۱۰ درصد (وزن/حجم) و ۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات ۱ مولار به عصاره متانولی افزوده شد و سپس به مخلوط آماده ۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد (حجم/حجم) و ۱/۴ میلی‌لیتر آب‌مقطر اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه، خوانش جذب در ۴۱۵ نانومتر انجام و محتوا برمبنای میلی‌گرم کوئرستین بر صدگرم ماده خشک بدست آمد.

* به منظور بررسی محتوای ترکیبات *O*–دی‌فنل، عصاره متانولی با دو میلی‌لیتر متانول آبی ۵۰ درصد (حجم/حجم) و ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم‌مولیبدات دو آبه ۵ درصد (وزن/حجم) مخلوط و پس از ۱۵دقیقه، جذب نوری، در طول‌موج ۳۷۰نانومتر قرائت شد. محتوای *O*–دی فنل‌کل نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید و برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر صدگرم ماده خشک بدست آمد (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005).

* به منظور سنجش محتوای اسیدهای‌فنلی (Matkowski, 2008)، به حجم مناسب عصاره متانولی، ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر کلریدریک‌اسید و در ادامه ۲۵۰ میکرولیتر معرف آرنو افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه مکث، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر

سدیم‌هیدروکسید به همراه ۲۵۰ میکرولیتر آب‌مقطر افزوده شد و جذب در ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. محتوای اسید فنلی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کافئیک‌اسید (CA) و برحسب میلی‌گرم کافئیک‌اسید بر صدگرم ماده خشک بدست آمد.

* برای سنجش محتوای رزمارینیک‌اسید (RA)، برمبنای روش Öztürk *et al.* (2010) ، یک میلی‌گرم عصاره خشک در یک میلی‌لیتر متانول خالص حل شد. مقدار۹۲۰ میکرولیتر از اتانول خالص با ۴۰ میکرولیتر عصاره و ۴۰ میکرولیتر زیرکونیوم‌کلراید ۰/۵ مولار مخلوط گردید. پس از گذشت ۵ دقیقه، جذب نمونه در طول‌موج ۳۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای رزمارینیک‌اسید نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد و برمبنای میلی‌گرم رزمارینیک‌اسید بر صدگرم ماده خشک بدست آمد.

## بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH متانولی(۰/۲ میلی‌مولار) به‌عنوان نمونه استفاده شد. نمونه شاهد و نمونه کنترل فاقد عصاره متانولی بودند. پلیت ۹۶ خانه به مدت نیم‌ساعت در تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت وسپس جذب در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر، در دستگاه ELISA Reader (مدل Gentaur,ST2100 , ساخت کشور امریکا) ثبت شد و در نهایت برمبنای رابطه زیر، میزان به دام‌اندازی رادیکال های DPPH اندازه‌گیری شد.

$$\% = [1- (A_{sample} - A_{blank}) / (A_{sample} - A_{blank})] \times 100$$

در این فرمول $A_{blank}$ و $A_{sample}$ به ترتیب میزان جذب نوری کنترل منفی (فاقد عصاره) و عصاره را بیان میکند. مقدار $IC_{50}$ برابر با توانایی خنثی‌نمودن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره است که به‌صورت درصد بازدارندگی برحسب میلی‌گرم درلیتر عصاره تعیین گردید (de Torre *et al.*, 2019).

برای ارزیابی توان‌آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش احیاء یون آهن، از روش Li *et al.*(2017) استفاده شد. به طور خلاصه وپس از تهیه محلول FRAP، ۱۳۰ میکرولیتر از آن با۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی FRAP در پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند و پس از ۳۰ دقیقه، جذب در ۶۳۰ نانومتر و توسط دستگاه الایزا ثبت شد. محتوای آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم آهن بر صدگرم ماده خشک ارزیابی شد.

## آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی، با حداقل سه تکرار انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال خطا یک و پنج درصد ($p \leq ۰/۰۱$ و $p \leq ۰/۰۵$) استفاده شد و نمودارهای مربوطه، به‌وسیله نرم‌افزار اکسل رسم شدند.

## یافته های پژوهش

### ارزیابی تاثیرسطوح مختلف تیمار هورمونی برصفات کال‌زایی ریزنمونه برگ کلپوره

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بخش کال‌زایی نشان داد که اثر ساده هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید و نیز اثر متقابل آن‌ها تاثیر معنی‌داری بر نرخ کال‌زایی، وزن‌تر و خشک کالوس ریزنمونه برگ داشتند (جدول ۱). بررسی میانگین داده‌های کال‌زایی نشان داد که بیشترین درصدکال‌زایی (۱۰۰درصد) مربوط به محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مجزا بنزیل‌آمینوپورین و محیط‌های کشت دارای تیمار همزمان دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید

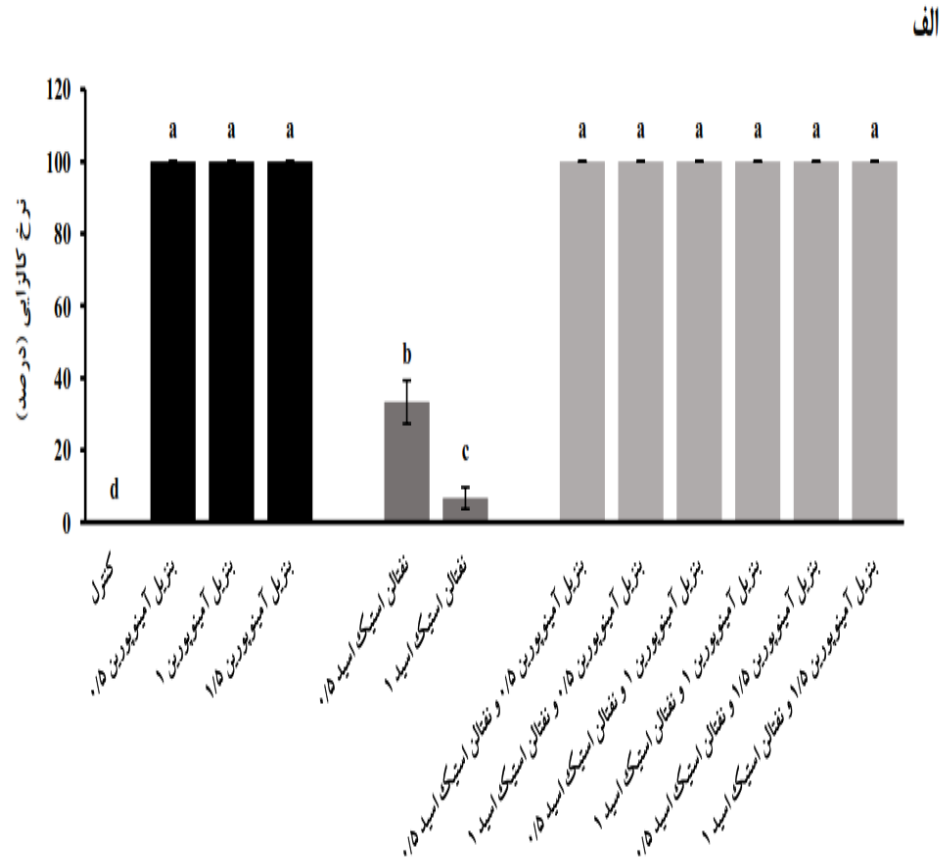
1Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

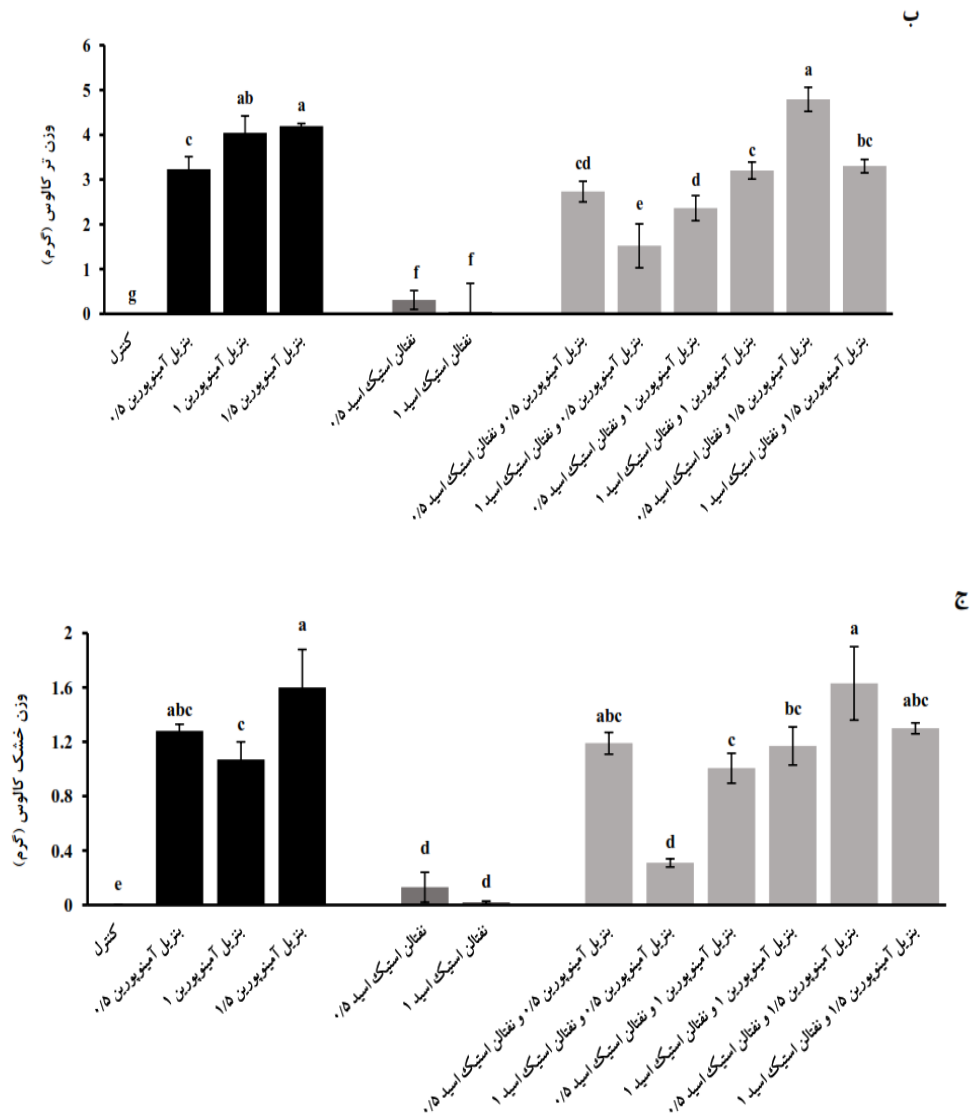
بوده است درحالی‌که کمترین درصدکال‌زایی (صفر) در محیط‌کشت فاقد هرگونه هورمون (نمونه شاهد) مشاهده شد. کال‌زایی در محیط‌کشت دارای نفتالن‌استیک‌اسید نیز بسیار ضعیف و محدود بود (شکل ۱–الف). بیشترین وزن‌تر (۰/۲۷ ± ۴/۷۹ میلی‌گرم) و خشک (۰/۲۷ ± ۱/۶۳ میلی‌گرم) کالوس‌ها نیز در حضور تیمار تلفیقی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید به ثبت رسید و تیمارهای مجزا ۰/۵ و یک میلی‌گرم درلیتر بنزیل آمینو پورین در مقام‌های بعدی قرار گرفتند (شکل‌های ۱–ب و ۱–ج).

**جدول۱.** تجزیه واریانس اثرات دو هورمون بنزیل آمینوپورین و نفتالن استیک‌اسید بر نرخ‌کالزایی، وزن‌تر و وزن‌خشک کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | وزن‌خشک کالوس | وزن‌تر کالوس | درصدکال‌زایی |
| تیمار بنزیل‌آمینوپورین | ۳ | ۳/۴۰۳** | ۲۶/۰۶۱** | ۱۸۶۷۷/۷۸** |
| تیمار نفتالن‌استیک‌اسید | ۲ | ۰/۳۳۶** | ۲/۱۸۹* | ۷۷/۷۸** |
| تیمار تلفیقی | ۶ | ۰/۲۵۵** | ۱/۳۳۹* | ۷۷/۷۸** |
| خطا | ۲۴ | ۰/۰۵۹ | ۰/۲۰ | ۱۱/۱۱ |
| ضریب تغییرات (٪) | - | ۱/۱ | .۴/۱ | ۲/۱ |

*و ** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد است. (منبع: یافته های تحقیق)

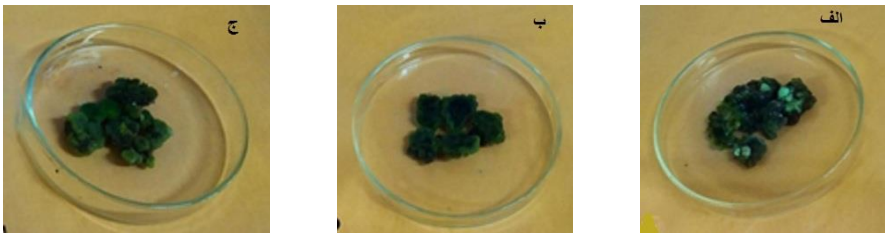





**شـــکل ۱.** تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌اســتیک‌اســید (به‌صــورت مجزا و تلفیقی) بر نرخ‌کالزایی (الف)، وزن‌تر (ب) و وزن‌خشک (ج) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است. (منبع: یافته های تحقیق)

## تغییرات محتوای دستجات مختلف ترکیبات فنلی متاثر از هورمون و الیسیتور

محیط‌های کشت دارای تیمارهای یک و ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و تلفیق بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم درلیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم درلیتر) برمبنای صفات کال‌زایی (بیشینه نرخ‌کال‌زایی، وزن‌خشک و درنهایت وزن-ترکالوس‌ها) به‌عنوان محیط‌های کشت منتخب درنظر گرفته شدند و پس از مراحل مجدد کشت در محیط MS، با غلظت‌های مختلف الیسیتور متیل‌جاسمونات تیماردهی شدند. نمایی از کالوس‌های متاثر از الیسیتور، با بیشترین تغییرات وزن در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج حاصل ازآنالیز واریانس داده‌های بخش دوم آزمایش نشان داد که نوع هورمون به‌کاربرده شده، تیمار متیل‌جاسمونات و برهمکنش این دو عامل، تاثیر معنی داری ($p \leq 0.05$ و $p \leq 0.01$) بر صفات بیوشیمیایی بررسی‌شده داشت (جدول ۲).




**شکل۲.** کالوس‌های دارای بیشترین تغییرات وزن؛ حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط‌کشت MS حاصل از تاثیر متقابل هورمون و الیسیتور. (الف): تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین و ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، (ب): تیمار تلفیق بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم در لیتر) به همراه ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، (ج): تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین و ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات. مقیاس ارائه شده در تصویر معادل یک سانتی‌متر است. (منبع: یافته های تحقیق)

**جدول۲.** تجزیه واریانس اثرات دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر محتوا کل فنل، فلاونوئید، فلاون، *O*–دی فنل، اسیدهای فنلی، رزمارینیک اسید و توان آنتی اکسیدانی (DPPH و FRAP) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | فنل‌کل | فلاونوئید | فلاون | *o*- دی فنل | اسیدفنلی | رزمارینیک-اسید | DPPH | FRAP |
| هورمون | ۲ | ۲۷۷۲۲۱/۴۹** | ۵۱۱۳۷۳/۰۴** | ۳۸۴۳۹/۶۷** | ۵۱۰۲۵۳/۶۴** | ۷۵۲۷۸/۸۷** | ۱۲/۵۵۱** | ۷/۳۵۸** | ۲۸۴۷۲/۱۳** |
| متیل-جاسمونات | ۳ | ۱۹۶۹۱۶۳/۳۱** | ۲۲۷۵۵۴۳/۲۸** | ۳۷۹۹۵۹/۱۷** | ۹۸۵۲۲۹/۷۵** | ۲۶۵۷۴۶/۲۴** | ۵۵/۸۱۲** | ۱/۰۶۵** | ۴۶۰۵/۵۹** |
| هورمون در متیل-جاسمونات | ۶ | ۵۲۵۳۶۹/۲۹** | ۳۸۷۶۱۶/۷۳** | ۴۶۵۶۱/۳۱** | ۲۸۳۵۱۰/۳۹** | ۱۰۶۴۵۹/۶۹** | ۹/۵۰۷** | ۰/۶۶۹** | ۱۸۹۲۵/۵۶** |
| خطا | ۲۴ | ۱۴۴۶/۴۱ | ۴۰۷۷۱/۴۲ | ۱۲۶۲۳/۰۳ | ۲۷۸۸۶/۸۳ | ۱۰۵۶۰/۶۹ | ۶/۱۸ | ۰/۱۳۱ | ۹۶۱/۱۴ |
| ضریب تغییرات (٪) | - | ۶/۸۳ | ۶/۷۴ | ۵/۲۱ | ۴/۶ | ۸/۳۲ | ۷/۶۵ | ۶/۷۷ | ۵/۲۵ |

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد. (منبع: یافته های تحقیق)

بررسی میانگین داده‌های فنل‌کل در پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین محتوای این دسته از ترکیبات متعلق به تیمار تلفیقی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید است به‌طوری‌که تیمار با الیسیتور غیرزیستی متیل‌جاسمونات ۵۰ میکرومولار موجب بیشینه محت کل به میزان ۱۱/۲۷ ± ۲۰۷۳/۴۸ میلی‌گرم گالیک اسید بر صدگرم ماده خشک شد. نکته قابل‌توجه آن‌که در تمام تیمارهای هورمونی منتخب، افزایش تا غلظت ۵۰ میکرومولار متیل-جاسمونات موجب افزایش محتوا فنل‌کل کالوس شد و پس از آن، اثر کاهشی الیسیتور بر کمیت فنل مشاهده گردید (جدول ۳).

داده‌های میانگین صفات مورد بررسی در جدول ۳ نشان دهنده بیشینه محتوای فلاونوئید (۲۰۲۹/۸۲ میلی‌گرم کاتچین بر صدگرم ماده خشک) و فلاون‌کل (۷۳۶/۱۸ میلی‌گرم کوئرستین بر صدگرم ماده خشک) کالوس‌های‌کلپوره در محیط‌کشت دارای تیمار ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید و الیسیتور متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار می‌باشد که به‌ترتیب افزایش ۶/۷ و ۱۱/۶ برابری را نسبت به کمترین اثر القایی متیل‌جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار در محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم درلیتر بنزیل آمینو پورین) بر این دسته از ترکیبات نشان دادند. بررسی محتوای *O*– دی فنل کالوس‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین محتوای این دسته از ترکیبات فنلی به‌ترتیب متعلق به محیط‌های‌کشت

تیمارشده با ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید و الیسیتور متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار و تیمار یک میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و الیسیتور متیل‌جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار است.

**جدول۳.** مقایسه میانگین تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف دو هورمون بنزیل آمینوپورین و نفتالن استیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر محتوا کل فنل، فلاونوئید، فلاون، *O*–دی فنل، اسیدهای فنلی و رزمارینیک اسید کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.

| شرایط هورمونی (میلی‌گرم درلیتر) | الیسیتور (میکرومولار) | فنل کل (میلی گرم گالیک اسید برصدگرم ماده خشک) | فلاونوئید (میلی گرم کاتچین برصدگرم ماده خشک) | فلاون (میلی گرم کوئرستین برصدگرم ماده خشک) | *O*- دی فنل (میلی گرم گالیک‌اسید برصدگرم ماده خشک) | اسیدهای فنلی (میلی گرم کافئیک‌اسید برصدگرم ماده خشک) | رزمارینیک اسید (میلی گرم رزمارینیک-اسید برصدگرم ماده خشک) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BAP1 | شاهد | g۸۹۱/۷۵ | de۵۱۸/۳۹ | de۱۹۸/۱۵ | fg ۵۳۱/۲ | d۲۸۸/۵۵ | ۱۱/۴۴۱ |
| | متیل جاسمونات) ۵۰ µM) | d۱۴۹۱/۰۲ | c۱۱۹۸/۹۹ | ۲۲۹/۲۸cd | ۱۱۱۶/۴۴c | ab۶۳۵/۲۴ | e ۲۰/۱۱ |
| | متیل جاسمونات) ۱۰۰ µM) | ۳۱۹/۲۲j | e۲۹۹/۵۵ | ۶۳/۱۶de | ۳۶۱/۵۵g | e ۸۹/۲۴ | f ۱۷/۵۷ |
| | متیل جاسمونات) ۲۰۰ µM) | i۶۲۴/۳۹ | de۵۸۹/۲۶ | ۲۴۰/۵۴c | g ۳۸۹/۳۱ | d۲۶۶/۵۴ | g ۱۶/۲۱ |
| BAP1.5 | شاهد | g۹۰۷/۱۱ | d۶۹۰/۴۰ | ۲۸۹/۲۸cd | ۷۶۵/۷۷ def | cd ۴۴۱/۷۹ | k ۱۲/۵۱ |
| | متیل جاسمونات) ۵۰ µM) | ۱۳۹۷/۳۲e | ۱۳۲۱/۸۱c | ۵۲۴/۶۴b | ۱۲۲۹/۴۶ bc | bc ۵۳۱/۴۵ | b ۲۵/۱۹ |
| | متیل جاسمونات) ۱۰۰ µM) | ۶۹۶/۸۶h | de۴۷۸/۳۱ | ۲۵۳/۳۹de | fg ۴۸۵/۵۴ | d ۳۰۱/۴۷ | d ۲۰/۵۶ |
| | متیل جاسمونات) ۲۰۰ µM) | ۶۸۲/۶۹hi | de۵۷۰/۱۷ | de۲۵۳/۶۶ | ۵۵۶ /۳۷efg | d ۳۴۵/۱۶ | h ۱۴/۲۰ |
| BAP1.5 + NAA0.5 | شاهد | f۱۲۴۱/۸۱ | c۱۱۰۳/۵۳ | bc۴۸۷/۶۷ | ۱۰۲۸/۵۴c | ab ۶۵۰/۵۲ | j ۱۳/۳۴ |
| | متیل جاسمونات) ۵۰ µM) | a۲۰۷۳/۴۸ | a۲۰۲۹/۸۲ | a۷۳۶/۱۸ | ۱۵۱۴ /۹۳a | a ۷۶۲/۵۳ | a ۳۳/۴۱ |
| | متیل جاسمونات) ۱۰۰ µM) | c۱۶۹۵/۶۷ | bc۱۴۶۲/۶۵ | ab۶۰۹/۹۵ | c۱۱۶۸ /۶۵ | ab ۷۰۷/۶۸ | c ۲۳/۱۱ |
| | متیل جاسمونات) ۲۰۰ µM) | ۱۸۷۶/۰۲b | ۱۷۶۶/۳۰ab | ab۶۷۵/۳۴ | ۱۴۲۸/۹۰ ab | ab ۷۱۴/۵۰ | i ۱۳/۴۰ |

* در هرستون، حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده نبود تفاوت معنی دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

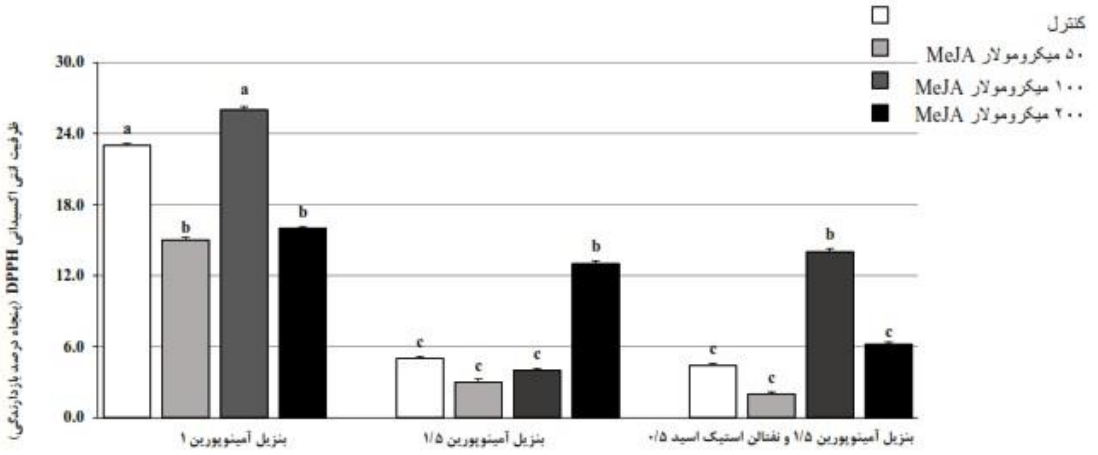
برهمکنش هر سه غلظت متیل‌جاسمونات و محیط‌کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید موجب افزایش ده درصدی محتوای اسیدهای فنلی نسبت به شرایط کنترل( شاهد) همان تیمار هورمونی شدند. این اثر افزایشی متیل‌جاسمونات بر محتوا این دسته از ترکیبات فنلی، برای سایر محیط های هورمونی منتخب نیز مشاهده شد. در سنجش رزمارینیک‌اسید نیز مشخص شد که مانند دیگر بررسی‌های بیوشیمیایی، بیشترین میزان رزمارینیک‌اسید متعلق به تیمار تلفیقی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید به همراه ۵۰ میکرو مولار متیل‌جاسمونات می‌باشد (جدول ۳). نتایج این بررسی نشان داد که کم‌ترین غلظت الیسیتور غیرزیستی به کار برده شده، دارای بیشترین اثر افزایشی بر محتوای دستجات مختلف ترکیبات فنلی نسبت به نمونه شاهد بود.

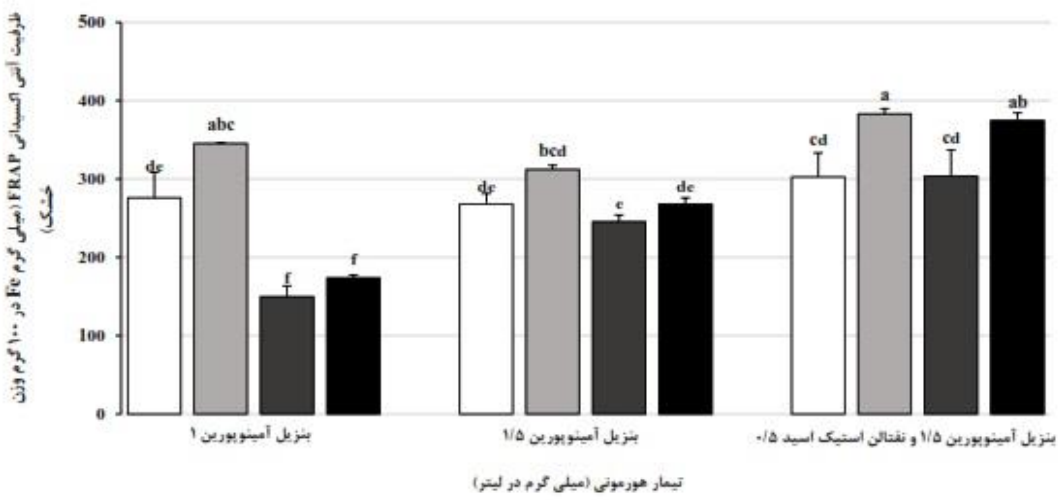
## تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی متاثر از هورمون و الیسیتور

برای ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی از دو آزمون DPPH و FRAP استفاده گردید. در آزمونDPPH، محلول DPPH با آنتی‌اکسیدان های موجود در عصاره گیاهی واکنش می‌دهد و به فرم غیررادیکالی خود در می‌آیدکه ماحصل آن، تغییر رنگ بنفش به رنگ زرد روشن خواهد بود و به این ترتیب، میزان جذب نمونه ها کاهش می‌یابد. بنابراین هرچه جذب DPPH

باقی‌مانده در نمونه‌ها بیشتر باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در حذف رادیکال های آزاد کم‌تر است. براساس نتایج حاصل از مقایسه‌میانگین داده‌ها، کمترین میزان $IC_{50}$ که بیانگر بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی است، در حضور تیمار تلفیقی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید و الیسیتور متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار و به میزان ۰/۲۴±۲/۰۱ میکروگرم درمیلی‌لیتر حاصل شد. این درحالی بود که بیشینه محتوا $IC_{50}$ که نمادی از کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون DPPH است، در محیط‌کشت دارای هورمون یک میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و تیماردهی با ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به دست آمد (شکل ۳-الف). برای ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی، نمونه‌های موردبررسی با بوتیلیتد هیدروکسی‌تولوئن به عنوان شاهد مثبت مقایسه شد که $IC_{50}$ آن معادل ۰/۰۶ ± ۱/۰۳ میکروگرم درمیلی‌لیتر بود و در مقایسه با کمترین میزان $IC_{50}$ در تیمارتلفیقی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید ، توان آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نشان داد.

ارزیابی تجزیه واریانس داده‌های آزمونFRAP مشخص نمود که اثرات هورمون و الیسیتورغیرزیستی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره معنی‌دار است (جدول ۲). در این بررسی، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس‌ها در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید به همراه کمترین غلظت الیسیتور متیل‌جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) با توان آنتی‌اکسیدانی ۳۸۳/۷۹ میلی‌گرم آهن بر صدگرم ماده خشک به ثبت رسید(شکل ۳-ب).






**شکل۳**. تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی DPPH (الف) و FRAP (ب) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است. (منبع: یافته های تحقیق)

همچنین نتایج نشان داد که، محتوای دستجات مختلف فنل‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها رابطه مستقیم و معنی‌داری (سطح $p \leq ۰/۰۵$ و سطح $p \leq ۰/۰۱$) دارند به‌طوری‌که قوی‌ترین همبستگی‌ها (برمبنای ضریب همبستگی پیرسون) بین محتویات فنل‌کل ($R^2$=۰/۸۲۷) با آزمون DPPH و محتویات فنل‌کل ($R^2$=۰/۸۹۸)، فلاونوئید ($R^2$=۰/۸۲۰) و *O*– دی‌فنل ($R^2$=۰/۸۴۷) با آزمون FRAP به ثبت رسید (جدول ۴).

**جدول ۴**. نتایج رابطه بین توان آنتی‌اکسیدان با دستجات مختلف ترکیبات فنلی (براساس ضریب‌همبستگی‌پیرسون) در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره.

| | FRAP | DPPH | رزمارینیک اسید | اسید فنلی | *O*– دی فنل | فلاون | فلاونوئید | فنل‌کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| فنل‌کل | ۰/۸۹۸** | −۰/۸۲۷** | ۰/۷۲۰** | ۰/۸۹۷** | ۰/۹۲۷** | ۰/۸۴۵** | ۰/۹۳۸** | ۱ |
| فلاونوئید | ۰/۸۲۰** | −۰/۶۴۱* | ۰/۷۱۰** | ۰/۹۲۷** | ۰/۹۷۴** | ۰/۹۱۴** | ۱ | ۰/۹۳۸** |
| فلاون | ۰/۷۰۹** | −۰/۶۴۵* | ۰/۵۴۲* | ۰/۸۸۲** | ۰/۸۸۵** | ۱ | ۰/۹۱۴** | ۰/۸۴۵** |
| *O*– دی‌فنل | ۰/۸۴۷** | −۰/۷۲۴** | ۰/۷۷۲** | ۰/۹۴۶** | ۱ | ۰/۸۸۵** | ۰/۹۷۴** | ۰/۹۲۷** |
| اسیدفنلی | ۰/۸۱۴** | −۰/۷۷۴** | ۰/۸۹۷* | ۱ | ۰/۹۴۶** | ۰/۸۸۲** | ۰/۹۲۷** | ۰/۸۹۷** |
| رزمارینیک‌اسید | ۰/۷۷۳** | −۰/۷۵۸** | ۱ | ۰/۸۹۷* | ۰/۷۷۲** | ۰/۵۴۲* | ۰/۷۱۰** | ۰/۷۲۰** |
| DPPH | ۰/۸۰۰** | ۱ | −۰/۷۵۸** | −۰/۷۷۴** | −۰/۷۲۴** | −۰/۶۴۵* | −۰/۶۴۱* | −۰/۸۲۷** |
| FRAP | ۱ | ۰/۸۰۰** | ۰/۷۷۳** | ۰/۸۱۴** | ۰/۸۴۷** | ۰/۷۰۹** | ۰/۸۲۰** | ۰/۸۹۸** |

* و ** به‌ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال پنج‌درصد ($p \leq ۰/۰۵$) و یک‌درصد ($p \leq ۰/۰۱$) است. (منبع: یافته های تحقیق)

## بحث

غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکنین کاربردی ترین ترکیبات در جهت القاء و تولید کالوس در شرایط کشت درشیشه است (Bhojwani & Dantu, 2013). غلظت بهینه این ترکیبات برای گونه‌های گیاهی و ریزنمونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد.

نتایج حاصل از نرخ‌کال‌زایی و سایر صفات ظاهری کالوس درپژوهش حاضر نشان داد که کاربرد همزمان هورمون‌های بنزیل-آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید و یا بنزیل‌آمینوپورین به تنهایی می‌تواند تاثیر مثبت و قابل‌توجهی بر القاء کالوس از ریزنمونه برگ کلپوره داشته باشد. هم‌راستا با نتایج این تحقیق، پژوهش‌های متعددی اشاره به تاثیربیشینه تیمار همزمان اکسین نفتالن-استیک‌اسید و سیتوکنین بنزیل‌آمینوپورین بر بهینه کال‌زایی داشته اند (Dronne *et al*., 1999، Soltanipool *et al*., 2011، Elyasi *et al*., 2017). بیشترین نرخ‌کالزایی آویشن ایرانی متعلق به محیط‌کشت حاوی بنزیل‌آمینوپورین (۲ میلی‌گرم درلیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (یک میلی‌گرم درلیتر) بوده است (Bakhtiar *et al*. 2016). شایان ذکر است که نتایج متفاوتی نیز از کاربرد همزمان تیمارهای هورمونی بر بیشینه کال‌زایی وجود دارد که در نتیجه تفاوت در نوع گیرنده‌های هورمونی ریزنمونه‌های مختلف گیاهی حاصل می‌شود (Sarkheill *et al*., 2009). افزایش بیش از اندازه غلظت هورمون‌ها در تیمارهای موردمطالعه، اثر ممانعت‌کننده بر هورمون‌های داخلی ریزنمونه داشته و در نهایت سبب کاهش درصدکال زایی شده است (Dixon *et al*., 1983). آنچه در کالزایی اهمیت دارد، تمایززدایی سلول‌های تمایزیافته و به دنبال آن تشدید تقسیمات سلولی در ریزنمونه‌ها است. در بین هورمون‌ها، اکسین‌ها به جهت تسریع مراحل چرخه سلولی (Kandouz *et al*., 2010) و سیتوکینین‌ها از طریق اثر بر مهارکننده‌های چرخه سلولی نقش مهمی در کنترل تقسیمات سلولی دارند (Zivyar *et al*., 2014). در این میان، هورمون بنزیل‌آمینوپورین نقش موثری در افزایش تقسیمات سلولی و ترغیب فرایند نموسلول برعهده دارد که علت آن را از دید مولکولی، به افزایش بیان ژن‌های متعلق به سایکلین‌های نوع D و تجمع پورین‌های موردنیاز برای تقسیم سلولی نسبت می‌دهند (Ikeuchi *et al*., 2013). در بررسی‌های انجام شده برروی گیاهان مختلف مشخص شده است که علاوه بر نوع و غلظت هورمون‌ها، تیمار با الیسیتور نیز بر کال‌زایی و فرایندهای متابولیسمی از جمله متابولیت‌های ثانوی کالوس‌ها موثر است (Serrano *et al*., 2007). محققان بیان داشتند که تیمار خارجی جاسمونات‌ها باعث افزایش پاسخ‌های فیزیولوژیکی در گیاهان می‌شود و گوناگونی پاسخ‌ها به غلظت و زمان اثر الیسیتور وابسته است (Acikgoz *et al*., 2019).

ارزیابی اثر متیل‌جاسمونات بر مشتقات فنلی شامل فنل کل، فلاونوئید و فلاون، *O*- دی‌فنل، اسیدهای فنلی و رزمارینیک-اسید نشان داد که تمام تیمارهای‌های هورمونی مورد استفاده تلفیق شده با متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار، موجب بیشینه محتوا داخلی این دسته از ترکیبات در عصاره کالوس‌های حاصل شد درحالی‌که، ادامه افزایش غلظت متیل‌جاسمونات، محتوا مشتقات فنلی داخلی را کاهش داد. تایید شده است که جاسمونات‌ها با افزایش رونویسی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در کشت سلولی را افزایش می‌دهند (Yukimune *et al*., 1996). در این میان، افزایش بیان ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئید در نتیجه اثر این دسته از الیسیتورها که از عوامل مهم در سنتز ترکیبات فنلی هستند به اثبات رسیده است (Acikgoz *et al*., 2019). در پژوهش‌های پیشین نیز مشخص شد کاربرد مقادیر بهینه متیل‌جاسمونات باعث افزایش محتوای فنل و فلاونوئیدکل کشت بافت کنگرفرنگی می‌شود (Sămadi *et al*., 2014). بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات در کشت بافت مریم‌گلی‌ترکه‌ای نشان داده است که بیشترین محتوای ترکیبات فنلی در کمترین غلظت متیل‌جاسمونات حاصل می‌گردد و افزایش غلظت الیسیتور، کاهش محتوا ترکیبات فنلی را در پی خواهد داشت (Dowom *et al*., 2017). کاربرد الیسیتورها با فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان همراه است که می‌تواند باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان شود. متیل‌جاسمونات به‌عنوان یک الیسیتور شاخص، تولید گونه‌های کنشگر اکسیژن را افزایش می‌دهد، لذا مقادیر بالای آن ها می‌تواند باعث آسیب به سلول گیاهی شود (Zhang & Xing, 2008). غلظت‌های بالای الیسیتور متیل‌جاسمونات با تجمع بیش از اندازه گونه‌های کنشگر اکسیژن، باعث غیر فعال شدن پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA می‌شود که در نهایت مرگ سلولی را در پی خواهد داشت (Nakashima *et al*., 2008).

1*Thymus persicus* F.
2*Cynara scolymus* L.
3*Salvia virgate* Jacq.

فلاونوئیدها به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی بالا در گیاهان از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. در بررسی نتایج این پژوهش، در پی افزایش محتوای فنل کل، شاهد افزایش بیشینه محتوای فلاونوئید و فلاون در تیمار تلفیقی بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم در لیتر) و در کمترین غلظت متیل‌جاسمونات (۵۰ میکرومولار) بودیم. هم راستا با نتایج بیان شده، تاثیر مثبت متیل‌جاسمونات بر میزان فلاونوئید کشت سوسپانسیون‌سلولی *Pueraria tuberosa* L. (Goyal & Ramawat, 2008)، کشت‌بافت *Pueraria lobata* L. (Thiem & Krawczyk, 2010) و کشت-کالوس کلپوره (Hashemyan *et al.*, 2020) ارائه شده است که علت اصلی آن‌را اثر بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و افزایش مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و در نهایت افزایش سنتز فلاونوئیدها و فلاون‌ها می‌دانند (Bais *et al*., 2004).

بررسی محتوا *O*– دی فنل نشان داد که با اعمال تیمار متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار، محتوا این گروه افزایش یافت که بیانگر تاثیر عامل غلظت بر بیشینه محتوا قابل اندازه‌گیری است. نتایج این بخش پژوهش با مطالعات Shoja *et al.* (2022) مبنی بر سطح ایده ال غلظت الیسیتور بر تحریک محتوا *O*– دی فنل همسو می‌باشد. علاوه بر تاثیر متیل‌جاسمونات بر مسیر فنیل‌پروپانوئید، مشخص شده است که تنش ها و تحریکات زیستی و غیرزیستی می‌توانند باعث فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز شوند که در اکسیداسیون مونوفنل‌ها به *O*– دی فنل‌ها و در نهایت افزایش محتوای داخلی این متابولیت‌های فنلی موثر باشند (Ruiz & Romero, 2001). این موضوع برای متیل‌جاسمونات نیز تایید شده است (Flurkey & Inlow, 2008).

در بررسی نتایج مربوط به اسیدهای فنلی مشخص شد که بیشترین تاثیرمثبت مربوط به کالوس محیط‌های کشت دارای بالاترین غلظت هورمونی بنزیل‌آمینوپورین، به همراه کم‌ترین غلظت نفتالن استیک‌اسید، در کنار متیل‌جاسمونات ۵۰ میکرومولار است. اثر افزایشی متیل‌جاسمونات بر محتوای اسیدهای فنلی در گیاه نوروزک (Ghasimi Hagh *et al.*,2018) و بنفشه ایرانی (Skrzypczak-Pietraszek *et al.*, 2014) نیز مشاهده شده است. میزان اثر بخشی متیل‌جاسمونات بر محتوای اسیدهای‌فنلی وابسته به غلظت است(Hakim *et al.*, 2007) . هم‌چنین، بیان ژن‌های موثر بر مسیر تولید اسیدهای‌فنلی در مواجه با الیسیتور متیل‌جاسمونات نشان داده شده است (Yousefian *et al.*, 2020).

توان آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در کاهش اختلالات حاصل از افزایش رادیکال های‌آزاد در گیاهان دارد. به‌عبارت دیگر، وجود تعادل بین اکسیدکننده و آنتی‌اکسیدان ها موجب حفظ شرایط فیزیولوژیکی مناسب برای گیاه می‌گردد (Saleh Abadi *et al.*, 2015). ترکیبات فنلی جزیی ازسیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی هستند و اندازه‌گیری میزان توان آنتی‌اکسیدانی آن‌ها از اهمیت ویژه ای برای مصارف مختلف داوریی برخوردار است. روش‌های متنوعی برای ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی وجود دارد که اکثریت آن‌ها به علت قرارگیری در دما، نور و شرایط اکسیداسیون مختلف ممکن است نتایج متفاوتی را بیان کنند. بنابراین بهتر است از چند روش متفاوت برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده کرد (Kosalec *et al*., 2004).

بر پایه نتایج پیش رو، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هر دو آزمون DPPH و FRAP در غلظت ۵۰ میکرومولار متیل-جاسمونات مشاهده شد که نشانه‌ی ارتباط بین ظرفیت آنتی‌اکسیدان با میزان ترکیبات‌فنلی می‌باشد. به این نحو که با افزایش محتوا ترکیبات فنلی، شاهد افزایش توان آنتی‌اکسیدانی در حداقل غلظت الیسیتور غیرزیستی بودیم. گزارش‌های زیادی مبنی بر رابطه بین محتوای فنلی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ها وجود دارد (Hashemyan *et al*., 2020; Ghasemzadeh *et al*., 2016; Dong *et al*., 2010; Siddharthan *et al*., 2007). رابطه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدان نمونه‌های گیاهی را می توان به خاصیت الکترون‌دهی ترکیبات فنلی و خنثی‌کردن گونه‌های کنشگر اکسیژن نسبت داد (Sadeghi & Gholamhoseinpoor , 2015).

1*Salvia lerrifolia* Benth
2*Exacum affine* Balf. f. ex Regel

## نتیجه گیری

مجموع نتایج پژوهش حاضر تاکید می‌کند که القاء بهینه کالوس کلپوره در غلظت‌های منتخب بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن-استیک‌اسید [تیمارهای یک و ۱/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و تلفیق بنزیل‌آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (۰/۵ میلی گرم در لیتر)] امکان‌پذیر است. الیسیتور متیل‌جاسمونات در غلظت کم (۵۰ میکرومولار) توانست بیشینه افزایش مشتقات مختلف فنلی در کالوس‌های حاصل را به همراه داشته باشد که ماحصل آن، بالارفتن ظرفیت آنتی-اکسیدانی عصاره کالوس آن ها بوده است.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت تامین هزینه‌های این پژوهش (کد ۳/۴۹۵۷۰) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

الیاسی، لیلا؛ مهرابی، علی اشرف؛ صیدی، مهدی و صفری، زینب (۱۳۹۵) تأثیر منشأ ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* L.). *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۳۲(۶)، ۹۹۸-۱۰۰۹.

خدایاری، مهدیه؛ امیدی، منصور؛ شاه نجات بوشهری، علی اکبر؛ یزدانی، داراب؛ نقوی، محمدرضا و کدخدا، زهره (۱۳۹۳) اثر الیسیتور زیستی و نانوالیسیتور بر افزایش تولید برخی آلکالوئیدها در گیاه خشخاش *Papaver somniferum* L. *مجله علوم باغبانی ایران*، ۳(۴۵)، ۲۹۵-۲۸۷.

جاویدی مقدم، مریم؛ چنیانی، منیره؛ گنجعلی، علی و لاهوتی، مهرداد (۱۳۹۵). بررسی کالوس زایی و توان آنتی اکسیدانی عصاره متانولی حاصل از ریزنمونه های مختلف گیاه *Teucrium polium*. *مجله زیست شناسی گیاهی ایران*، ۸(۲۹)، ۳۷-۵۲.

سرخیل، پانته‌آ؛ امیدی، منصور؛ پیغمبری، سیدعلی و دوازده امامی، سعید (۱۳۸۸) تأثیر هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی در رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill). *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۲۵(۳)، ۳۶۴-۳۷۵.

قسیمی حق، زیبا؛ جوکار، سمیه؛ بداقی، حجت اله و مدرس، معصومه (۱۳۹۷) تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت کالوس نوروزک (*Salvia lerrifolia* Benth). *زیست شناسی گیاهی ایران*، ۱۰(۱)، ۶۷-۸۰.

کوچکی، علیرضا؛ نصیری محلاتی، مهدی؛ عزیزی، کلثومه و خزایی، حمید رضا (۱۳۸۷). بررسی نیازهای آگرواکولوژیک گیاه کلپوره. *مجله پژوهش‌های زراعی ایران*، ۶(۲)، ۳۹۵-۴۰۴.

محمدزاده، زهرا؛ چنیانی، منیره و سمیعی، لیلا (۱۴۰۰). اثر متیل جاسمونات، IAA ، BAP بر توان کالزایی، محتوای برخی ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کلپوره (*Teucrium polium* L.). *مجله فرآیند و کارکرد گیاهی*، ۱۰(۴۵)، ۲۶۷-۲۸۴.

هاشمیان، ملیحه؛ گنجعلی، علی و چنیانی، منیره (۱۳۹۹). تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان تولید متابولیت های ثانویه و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه کلپوره. *مجله زیست شناسی گیاهی ایران*، ۱۲(۴۴)، ۶۱-۷۶.

**REFRENCES**

Abdulhafiz, F. (2022). Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. *Arabian Journal of Chemistry*, 15, 104161.

Acıkgoz, M. A., Kara, S. M., Aygun, A., Ozcan, M. M. & Ay, E. B. (2019). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of camphor and phenolic compounds in cell suspension culture of endemic Turkish yarrow (*Achillea gypsicola*) species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43, 351-359.

Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A., & Mansor, S. M. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits.

*Journal of Food Science and Technology*, 49, 510-514.

Bahreini, M., Omidi, M., Bondarian, F., & Gholibaygian, M. (2015). Metabolites screening of nano elicited in vitro Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*). *American Journal of Biology and Life Sciences*, 3(5), 194-198.

Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, 9(1), 26-32.

Bakhtiar, Z., Mirjalili, M. H., & Sonboli, A. (2016). In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, 48-54.

Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. London, Springer Publications.

Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T. & Fernandez-Gutierrez, A. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8918-8925.

Chu, Y. H., Chang, C. L. & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.

Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2007). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Angewandte Chemie International Edition

de Torre, M. P., Cavero, R. Y., Calvo, M. I. & Vizmanos, J. L. (2019). A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants*, 8(5), 142.

Dixon, R. A., Dey, P. M. & Lamb, C. J. (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 55(1), 69.

Dong, J., Wan, G. & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*, 148, 99-104.

Dowom, S. A., Abrishamchi, P., Radjabian, T. & Salami, S. A. (2017). Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with $Ag^{+}$ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, 103, 81-88.

Dronne, S., Jullien, F., Caissard, J.C. & Faure, O. (1999). A simple and efficient method for in vitro shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula intermedia* Emeric *ex* Loiseleur). *Plant Cell Reports*, 18, 429–433.

Duke, J., Bogenschuts, J. & Cellier, D. (2002). Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(10), 1348-1353.

Echeverrigaray, S., Zacaria, J. & Beltrão, R. (2010). Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The American Phytopathological Society*, 100(2), 199-203.

Elyasi, L., Mehrabi, A. A., Seyedi, M. & Safari, Z. (2017). Effect of explant origin and different concentrations of growth regulators on optimization of cell suspension in *Satureja bachtiarica* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(6), 998-1009. (In Persian).

Field, T. S., Lee, D. W. & Holbrook, N. M. (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology*, 127(2), 566-574.

Flurkey, W. H. & Inlow, J. K. (2008). Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102: 2160-2170.

Furden, B., Humburg, A. & Fuss, E. (2005). Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxy podophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 24, 312–317.

Gerth, A., Schmidt, D. & Wilken, D. (2006). The production of plant secondary metabolites using bioreactors. In XXVII International Horticultural Congress-IHC2006*: International*

*Symposium on Plant Biotechnology*, 764: 95-104.
Ghasemzadeh, M. R., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S. J. & Hosseinzadeh, H. (2016). Effect of alcoholic extract of aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L. on pain, inflammation and apoptosis induced by chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 117-130.
Ghasimi Hagh, Z., Jokar, S., Bodaghi, H. & Modarres, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *lerrifolia* Benth. *Iranian Journal of Plant Biology*, 10(1), 67-80. (In Persian).
Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20, 249-256.
Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. & Palazón, J. (2013). Phenolic Acids. In Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds.) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg.
Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerothanassis, I. P., Segura-Carretero, A. & Gutiérrez, A. F. (2012). Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *Food Science and Technology*, 46, 104-109.
Goyal, SH. & Ramawat, K. G. (2008). Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(6), 849 – 853.
Hakim, F. L., Shankar, C. G. & Girija, S. (2007). Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9109–17.
Hashemyan, M., Ganjeali, A. & Cheniany, M. (2020). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the production of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. in-vitro. *Iranian Journal of Plant Biology*, 12(2), 61-76. (In Persian).
Hemmati, N., Cheniany, M., & Ganjeali, A. (2020). Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*, 44(2), 163-173.
Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil. Circular*. California agricultural experiment station, circular 347.
Ikeuchi, M., Sugimoto, K. & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25, 3159-3173.
Javidi Moghadam, M., Cheniany, M., Ganjeali, A. & Lahouti, M. (2016). An investigation on callogenesis and antioxidant capacity of different explants of *Teucrium polium*. *Iranian Journal of Plant Biology*, 8(29), 37-52. (In Persian).
Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chehna, F., Yasmeen, A. & Moustafa, A. E. A. (2010). *Teuricum polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cell via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 410-415.
Khodayari, M., Omidi, M., & Shahnejat Bushehri, A. (2014). Effect of a biotic elicitor and nano elicitor on some alkaloids production in *Papaver somniferum* L. *Iranian Journal of Horticulture*, 7,(3),287-295. (In Persian)
Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*, 27(6), 675-684.
Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Azizi, G. & Khazaei, H.R. (2009). Feasibility study for domestication of *Teucrium polium* L. based on ecological agriculture. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 2(6), 395-404. (In Persian).
Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 54(1), 65-72.
Li, T., Elhadi, D. & Chen, G. Q. (2017). Co-production of microbial poly hydroxyl alkanoates with

other chemicals. *Metabolic Engineering*, 43, 29-36.
Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-26.
Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548-560.
Mattila, P. & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal Food Composition Analysis*, 20, 152-160.
Modarres, M., Bahabadi, S. E. & Yazdi, M. (2018). Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. *Cytotechnology*, 70, 741-750.
Mohammadzadeh, Z., Cheniany, M. & Samiei, L. (2021). Effect of methyl jasmonate, IAA and BAP on callogenesis potential, content of some phenolic compounds and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. *Journal of Plant Process and Function*, 10 (45), 267-284. (In Persian).
Nakashima, A., Chen, L., Thao, N. P., Fujiwara, M., Wong, H. L., Kuwano, M. & Shimamoto, K. (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *The Plant Cell*, 20(8), 2265-2279.
Oksman-Caldentey, K. M. & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
Omidi, M., Farzin, N. (2012). Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. *Modern Genetics Journal*, 7, 203-234.
Öztürk, M., Duru, ME., İnce, B., Harmandar, M. & Topçu, G. (2010). A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chemistry*, 123, 1352-1356.
Park, E.J., Zhao, Y.Z., Kim, Y.C. & Sohn, D.H. (2009). Preventive effects of a purified extract isolated from *Salvia miltiorrhiza* enriched with tanshinone I, tanshinone IIA and cryptotanshinone on hepatocyte injury *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2742-8.
Rabbaa, M. M., Shibli, R. & Shatnawi, M. (2012). Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot tips by vitrification and encapsulation dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 371-382.
Raei, M., Esna-Ashari, M., & Khodayari, M. (2016). Abiotic elicitors and medicinal plants biotechnology. *Journal of Cell and Tissue* 7, 333-342.
Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
Ruiz, J. M. & Romero, L. (2001). Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 25, 651-681.
Sadeghi, B. & Gholamhoseinpoor, F. (2015). A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 310-315.
Sahoo, Y., Pattnaik, S. K. & Chand, P. K. (1997). *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33(4), 293-296.
Saleh Abadi, S. & Mehraban Sang Atash, M. (2015). Evaluation of the antioxidant activity and total phenols, flavonoids in methanolic, dichloromethane and ethyl acetate extracts of aerial parts of *Rubia florida*. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 7(1), 101-112.
Samadi, S., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Plant Products Research Journal*, 21 (4), 135-148.
Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, S. A. & Davazdahemami, S. (2009). The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in

*Foeniculum vulgare* Mill. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 364-375. (In Persian).

Seyed Tabatabae, B. E. & Omidi, M. (2011). *Plant cell and tissue culture*. University of Tehran Press.Tehran. (In Persian).

Serrano, J., Goñi, I. & Saura-Calixto, F. (2007). Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, 40(1), 15-21.

Shoja, A. A., Çirak, C., Ganjeali, A. & Cheniany, M. (2022). Stimulation of phenolic compounds accumulation and antioxidant activity in in vitro culture of *Salvia tebesana* Bunge in response to nano-$TiO_2$ and methyl jasmonate elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149(1), 423-440.

Siddharthan, S., Yi-Zhong, C., Harold, C. & Mei, S. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102, 938–953.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J. & Pietraszek, J. (2014). The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. *ex* Regel. shoot culture. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1), 47-53.

Soltanipool, M. M., Mohamadi, A., Rahnama, H. & AbbasZadeh, B. (2011). Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 7(1), 45-54.

Thiem, B. & Krawczyk, A. (2010). Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated *in vitro* cultures of kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi). *Herba Polonica*, 56, 48-56.

Yousefian, S., Lohrasebi, T., Farhadpour, M. & Haghbeen, K. (2020). Effects of methyl jasmonate on phenolic acids accumulation and the expression profile of their biosynthesis-related genes in *Mentha spicata* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142, 285-297.

Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. & Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology*, 14, 1129-1132.

Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S. H., & Wawrosch, C. (2015). Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products*, 67, 97-102.

Zhang, L. & Xing, D. (2008). Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1092-1111.

Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.

Zivyar, S., Miri, S. M. & Rahimi Meydani, A. (2014). *The effect of plant growth regulator of BAP and NAA on callus formation from corm explants of gladiolus*. The first National Congress of Flower and Ornamental Plants of Iran, Karj. Alborz, Iran.