

اثر متیل جاسمونات، IAA و BAP بر توان کالزایی، محتوای برخی ترکیبات فنلی و

ظرفیت آنتی اکسیدانی کلپوره (*Teucrium polium L.*)

زهرا محمدزاده^۱، منیره چنیانی^{۱*}، لیلا سمیعی^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

* Cheniany@um.ac.ir

چکیده:

این پژوهش باهدف بررسی اثر هورمون‌های گیاهی (IAA و BAP) و البسیتور متیل جاسمونات بر توان کالزایی ریزنمونه برگ کلپوره (*Teucrium polium L.*) و محتوای برخی ترکیبات فنلی (فنل کل، 0-دی فنل، اسیدهای فنلی، فلاونوئید و فلاون) و ظرفیت آنتی اکسیدانی آن انجام شد. ریزنمونه برگ از گیاه بالغ رشد یافته در شرایط هیدروپونیک تهیه و در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مجزا و تلفیقی IAA (0.1، 0.5 و 1 میلی گرم در لیتر) و BAP (0.5، 1 و 1.5 میلی گرم در لیتر) کشت شدند. تیمارهای دارای بیشترین درصد کالزایی و وزن تر و خشک به عنوان شرایط هورمونی بهینه، جهت بررسی تاثیر متیل جاسمونات (50، 100 و 200 میکرومولار) بر متابولیت‌های فنلی انتخاب شدند. هشت هفته پس از رشد کالوس‌ها، محتوای ترکیبات فنلی مختلف و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها (بر اساس دو آزمون DPPH و FRAP) سنجش شدند. اگرچه درصد کالزایی بالاتری در همه تیمارهای هورمونی نسبت به شاهد دیده شد، اما کالزایی صددرد در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر مشاهده شد. بیشترین وزن تر و خشک کالوس‌ها نیز در تیمارهای تلفیقی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر ثبت شد. نتایج حاصل از بخش دوم آزمایشات نشان داد که محتوای ترکیبات فنلی و همه زیرمجموعه‌های آن به جز 0-دی فنل، دارای بیشینه میزان در زمان تیمار با غلظت 50 میکرومولار متیل جاسمونات-در تمامی تیمارهای هورمونی-بودند. همچنین همبستگی قوی بین خاصیت آنتی اکسیدانی DPPH ($r^2 = -0.735$) و FRAP ($r^2 = 0.876$) با محتوای ترکیبات فنلی مشاهده شد. از این رو متیل جاسمونات به عنوان یک محرک توانمند می‌تواند موجب بالابردن سنتز ترکیبات فنلی و به طبع آن افزایش توان آنتی اکسیدانی در کالوس کلپوره گردد و این شیوه را به عنوان یک فن موثر در جهت تامین ترکیبات دارویی-فنلی در شرایط کشت کالوس معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی: *Teucrium polium*، کالزایی، گیاه دارویی، مشتقات فنلی، DPPH، FRAP.

مقدمه:

گیاهان دارویی از گذشته دور تاکنون در تمامی تمدن‌ها و فرهنگ‌ها به عنوان منبع دارویی تجدیدپذیر مورد استفاده قرار گرفته‌است (Chandra et al., 2013). به طوری که امروزه و در طب مدرن نیز، گیاهان به عنوان منابع مستقیم عوامل درمانی، برای سنتز ترکیبات دارویی جدید مورد توجه هستند (Abdul Nasim et al., 2010). ترکیبات موثره گیاهی که از سوی مصرف کنندگان به عنوان ترکیبات طبیعی و بی خطر شناخته شده‌اند، عمدتاً شامل روغن‌های ضروری، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها هستند (Amiri fard et al., 2013) که در میان آن‌ها، ترکیبات فنلی به عنوان گسترده‌ترین طبقه

از متابولیت‌های ثانوی در طبیعت، شامل فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلین‌ها، تانن‌های متراکم، لیگنین‌ها و لیگنان‌ها می‌باشند (Karaman et al., 2010). خواص آنتی‌اکسیدان، ضدآلرژیک، ضدالتهاب، ضد میکروب، اثرات محافظت قلبی و عروقی به ویژگی‌های دارویی این دسته از متابولیت‌ها نسبت داده شده است (Benavente- García et al., 1997; Samman et al., 1998; Middleton et al., 2000; Puupponen- Pimiä et al.,) (2001; Manach et al., 2004). از دیگر اعمال ترکیبات فنلی، عمل دفاع به همراه ترکیبات طبیعی مثل ویتامین C و E و کاروتنوئیدها است که با حذف رادیکال‌های آزاد و یا مهار آنزیم‌های اکسایشی مانند سیکلوکسیژناز و لپوکسیژناز و کلاته کردن آن‌ها با یون‌های آهن صورت می‌گیرد (Shi et al., 2001).

کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* L. گیاهی علفی، گل‌دار با بوته‌های چوبی و معطر است (Goulas et al., 2011). گونه‌های مختلف این جنس، در همه‌ی کشورهای مدیترانه‌ای، با گسترش به سمت جنوب غرب آسیا و اروپا می‌رویند (Feinbrun-Dothan, 1978). در ایران، بیشتر در تپه‌های خشک و سنگلاخی تا ارتفاع ۳۰۰۰ متر رشد می‌کند (Kovacevic et al., 2001; Gorgini shabankar et al., 2015). از این گیاه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مزمن معدی و نیز به‌عنوان ادرارآور، ضد فشار خون، ضد باکتری، ضد اسهال، ضد نفخ، ضد دیابت و ضد تشنج استفاده می‌شود (Ardestani et al., 2008; Hasani- Ranjbar et al., 2008). در روزگار اخیر، استفاده‌های نادرست انسان از گیاهان دارویی و من جمله کلپوره موجب افزایش نگرانی‌ها در خصوص خطر انقراض این گیاهان شده است. تولید کم بذر، خواب پیچیده و چندگانه بذور از مشکلات اصلی تکثیر مدیریت شده این گیاه می‌باشد. لذا استفاده از روش کشت بافت به‌عنوان یک روش جایگزین برای تولید و افزایش ترکیبات موثره و دارویی آن در شرایط آزمایشگاهی مورد توجه مجامع علمی است (Vanisree et al., 2004). هرچند پژوهش‌ها در مورد تاثیر هورمون‌ها بر نرخ کالزایی کلپوره توسط Javidi moghadam و همکاران (۲۰۱۶)، Hashemyan و همکاران (۲۰۱۸)، Tabarifard (۲۰۲۰) صورت گرفته است، اما مطالعه تاثیر متیل جاسمونات در شرایط کشت درون شیشه، اکثراً مربوط به سایر گیاهان می‌باشد (Ahmadi moghadam et al., 2013; Aghaei, 2014; Hashemyan et al., 2018). در این پژوهش تلاش شد ضمن بررسی اثرات محیط کشت MS غنی با تیمارهای مختلف هورمونی (BAP و IAA) بر نرخ کالزایی ریزنمونه برگ، به تاثیر الیسیاتور غیرزیستی متیل جاسمونات (MeJa) بر محتوای برخی ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس این گیاه در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها:

بررسی توان کالزایی: برای بررسی توان کالزایی کلپوره، از گیاه دوساله رشد داده شده در شرایط هیدروپونیک (نگهداری شده در اتاق رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) استفاده گردید. از آنجا که براساس مطالعات پیشین (Javidi moghadam et al., 2016)، ریزنمونه برگ به‌عنوان بهترین ریزنمونه ایجادکننده کالوس در سایر تیمارهای هورمونی شناسایی شد، لذا در تحقیق حاضر نیز از ریزنمونه مذکور استفاده گردید و برش‌های میانی برگ‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی (جدول ۱) قرار داده شد (پنج ریزنمونه در هر شیشه). نمونه‌ها به مدت چهار هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با آشکار شدن نشانه‌های کالزایی، شیشه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت دو هفته منتقل شدند. عملیات واکشت در پایان هفته ششم روی محیط‌های کشت

دارای همان غلظت‌های هورمونی انجام شد و در نهایت، صفات کالزایی شامل درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها در پایان هفته هشتم بررسی شد. عملیات کشت هر تیمار، با دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی صورت گرفت.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به کاررفته در محیط کشت MS برای بررسی القاء کالزایی.

هورمون	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)															
IAA	۰	۰	۰	۰	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱	۱	۱	۱
BAP	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۰	۰/۵	۱	۱/۵

بر اساس نتایج بیشینه درصد کالزایی و وزن خشک کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی آزمایش اول، بهترین تیمارهای هورمونی (" $IAA_{0.1}+BAP_{0.5}$ ", " $IAA_{0.1}+BAP_1$ ", " $IAA_{0.5}+BAP_{0.5}$ " و " $IAA_1+BAP_{1.5}$ " میلی‌گرم در لیتر) برای اعمال الیسیاتور متیل جاسمونات انتخاب شدند. به این نحو که مجدداً عملیات کشت ریزنمونه‌های برگ روی تیمارهای هورمونی منتخب انجام شد و کلیه مراحل و مدت زمان نگهداری ریزنمونه‌ها، مطابق آزمایش اول صورت گرفت. در پایان هفته ششم، نمونه‌ها به محیط‌های کشت MS فاقد هورمون و دارای غلظت‌های مختلف الیسیاتور متیل جاسمونات (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) منتقل شدند. در پایان روز دهم از اعمال تیمار الیسیاتور، کالوس‌ها در جهت بررسی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جمع‌آوری و در فریزر با دمای منفی ۲۰ نگهداری شدند.

عصاره‌گیری برای سنجش ترکیبات ثانوی - فنلی: پودر خشک کالوس‌ها با متانول ۸۰ درصد (w/v) با نسبت ۱ به ۱۰۰ عصاره‌گیری شدند و پس از قرارگیری به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Japan, Parsonic, 2500s) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس 28 ± 0.5 (KHz)، با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. عملیات خشک نمودن عصاره‌ها در زیر هود معمولی و در شرایط تاریکی مطلق و به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. عصاره خشک‌شده به عنوان "پودر عصاره"، وزن شد و با حل نمودن در متانول ۸۰ درصد (w/v)، برای کلیه سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید (Annegowda et al., 2012).

سنجش محتوای فنل کل: سنجش محتوای فنل کل به شیوه فولین-سیو کالچو و بر اساس روش Marinova و همکاران (۲۰۰۵) انجام گرفت. به این منظور ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد (v/v) و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (w/v) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه گردید. پس از ۱/۵ ساعت قرارگیری در شرایط تاریکی، جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. محتوای ترکیبات فنلی کل بر مبنای منحنی استاندارد گالیک اسید و معادله خط $y=0.0032x + 0.0313$ محاسبه شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه گردید.

سنجش محتوای ۰-دی فنل: محتوای ۰-دی فنل با استفاده از روش Carrasco-Pancorbo و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی حاصل از هر نمونه کالوسی، دو میلی‌لیتر متانول آبی ۵۰ درصد (v/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم مولیبدات دو آبه پنج درصد (w/v) اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت شد. محتوای ۰-دی فنل عصاره‌ها بر مبنای منحنی استاندارد گالیک اسید ($y = 0.0042x + 0.0674$) محاسبه و بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه هر کالوس ارائه گردید.

سنجش محتوای اسیدهای فنلی: آب به میزان ۱/۲۵ میلی‌لیتر، هیدروژن کلرید به میزان ۲۵۰ میکرولیتر و معرف آرنو [سدیم مولیبدات (آبی) ۱۰ درصد (w/v) و سدیم نیتريت (آبی) ۱۰ درصد (w/v)] به میزان ۲۵۰ میکرولیتر به ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری نمونه‌ها در شرایط تاریکی و در دمای محیط 25 ± 2

درجه‌سانتی‌گراد)، ۵۰۰ میکرولیتر سدیم‌هیدروکسید آبی (۵۰ درصد) به نمونه افزوده شد و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش شد. محتوای اسیدهای فنلی عصاره‌ها، بر مبنای معادله خط $y = 0.0041x + 0.0258$ منحنی استاندارد کافئیک‌اسید، بر حسب میلی‌گرم کافئیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه گردید (Matkowski, 2008).

سنجش محتوای فلاونوئید: برای ارزیابی محتوای فلاونوئید بر مبنای روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹)، ۳۰۰ میکرولیتر عصاره به ۳/۴ میلی‌لیتر متانول ۳۰ درصد (v/v)، ۱۵۰ میکرولیتر سدیم‌نیتريت ۰/۵ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۰/۳ مولار افزوده شد. پس از ۵ دقیقه مکث، ۱ میلی‌لیتر سدیم‌هیدروکسید ۱ مولار به نمونه افزوده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. محتوای فلاونوئید، بر مبنای منحنی استاندارد کاتچین و معادله خط $y = 0.0018x + 0.0106$ رسم و بر حسب میلی‌گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس محاسبه شد.

سنجش محتوای فلاون‌کل: در ارزیابی محتوای فلاون‌کل (Kosalec et al., 2004)، میزان ۲۵۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه کالوسی در لوله‌آزمایش ریخته شد و سپس به آن ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (w/v) و ۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات یک مولار افزوده شد. سپس به هر محلول، ۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) و ۱/۴ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده گردید تا حجم‌نهایی آن به ۲/۵ میلی‌لیتر برسد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در شرایط تاریکی (دمای 25 ± 2 درجه‌سانتی‌گراد)، جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فلاون عصاره‌ها، بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین (معادله خط $y = 0.0022x - 0.007$) محاسبه شد و بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه ارائه گردید.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدان به روش DPPH: این آزمون به روش De Torre و همکاران (۲۰۱۹) در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. در هر خانه از پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۲ میلی‌مولار) به آن اضافه شد. از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص به عنوان بلانک و از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH به عنوان شاهد استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت نیم‌ساعت در شرایط تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس توسط دستگاه الیزا (America, Gentaur, ST2100)، جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر ثبت شد.

شاخص آنتی‌اکسیدانی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد حذف رادیکال‌های آزاد (I\%)} = [1 - (A_S - A_B) / (A_C - A_B)] \times 100$$

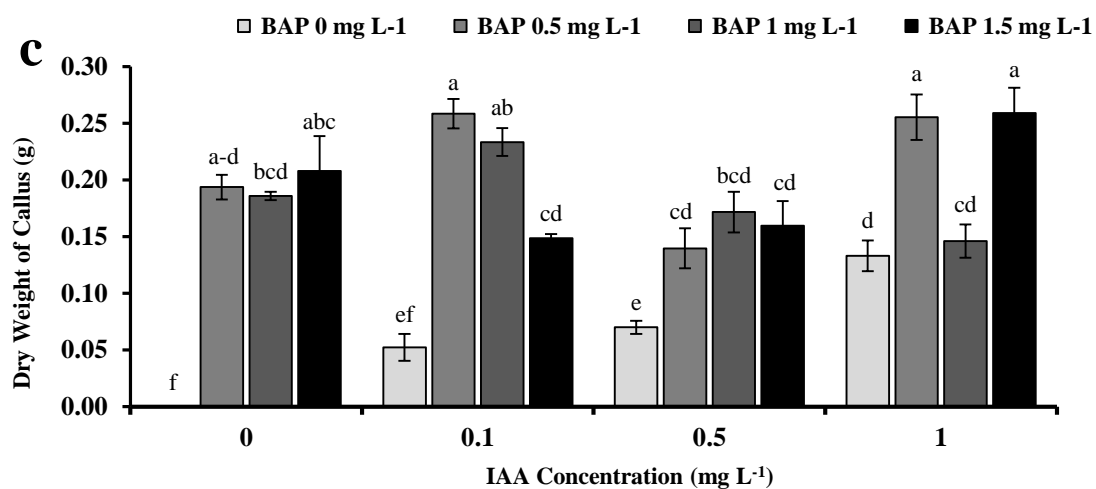
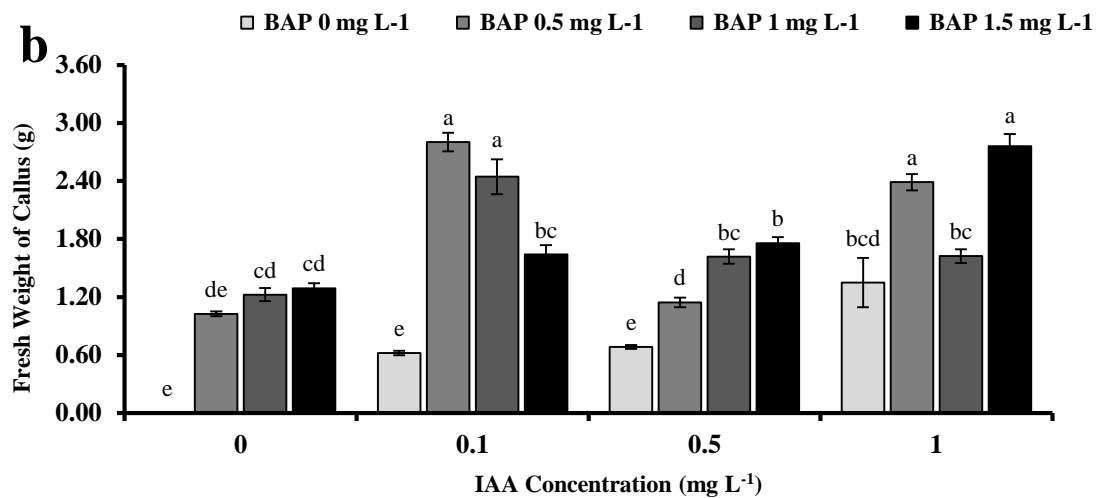
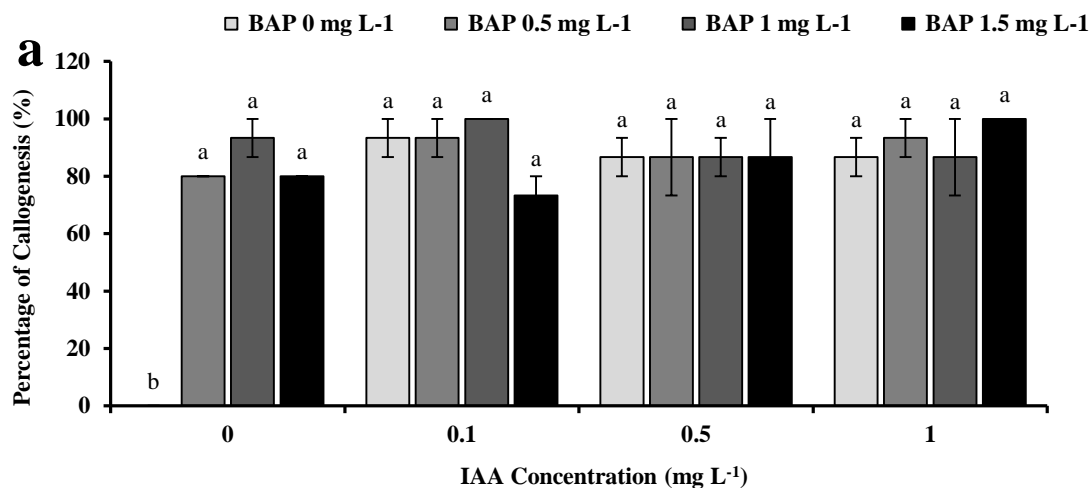
در معادله فوق A_S نشان‌دهنده جذب نمونه‌عصاره، A_B نشان‌دهنده جذب نمونه‌بلانک و A_C نشان‌دهنده جذب نمونه‌کنترل می‌باشد. میزان IC_{50} برابر با توانایی خنثی نمودن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره و قابل محاسبه از معادله ذکر شده است. ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک‌اسید به عنوان نمونه‌شاهد در نظر گرفته شد.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدان به روش احیاء یون آهن (FRAP) III: برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدان به روش احیاء یون آهن عصاره‌ها، از روش Li و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. این روش بر اساس کاهش کمپلکس فریک‌تری پیریدیل‌تری‌آزین به فرم فرس در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان است. ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۳۰ میکرولیتر محلول FRAP تازه تهیه شده (محلول ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم، محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن ۳ آبه با نسبت‌های حجمی ۱:۱:۱۰)، مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه استراحت در تاریکی، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس معادله خط $(y = 0.0165x + 1.323)$ حاصل از غلظت‌های مختلف سولفات آهن II، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها محاسبه گردید.

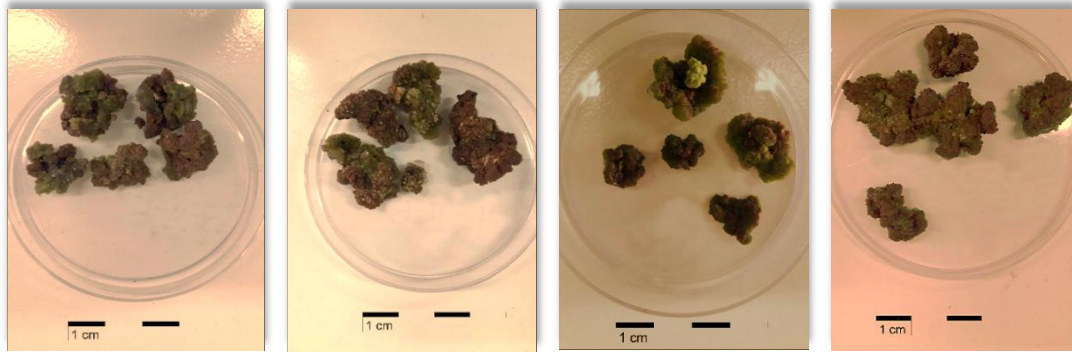
آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها، آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۵) انجام و برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ۵ درصد استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط بین صفات بیوشیمیایی اندازه گیری شده از ضریب همبستگی پیرسونی استفاده شد. کلیه نمودارهای مربوطه، به وسیله نرم‌افزار EXCEL (۲۰۱۶) رسم شدند.

نتایج و بحث:

بهینه‌سازی کالزایی: با توجه به اهمیت کشت‌بافت برای تولید سریع ارقام برتر از گیاهان مادری، تولید گیاهان عاری از بیماری و تکثیر گیاهان تراریخته حاصل از مهندسی ژنتیک (Bhojwani and Dantu, 2013)، از غلظت‌های متفاوت اکسین و سیتوکینین در جهت تولید کالوس، بافت و نمونه گیاهی در شرایط درشیشه استفاده می‌گردد (Griesbach, 1997). براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر ساده هورمون IAA و BAP و نیز اثر متقابل این هورمون‌ها تاثیر معنی داری بر درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس ریزنمونه برگ داشتند (داده‌ها نشان داده نشده است). به غیر از محیط فاقد هرگونه هورمون (نمونه شاهد)، تمامی غلظت‌های IAA و BAP (در تیمار مجزا و یا در برهمکنش با یکدیگر) موجب کالزایی ریزنمونه برگ شدند و کالزایی صددرد، در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۱a). ارزیابی داده‌های وزن تر و خشک کالوس‌ها، نتایج مشابهی را نشان داد به این نحو که بیشترین وزن‌های اندازه‌گیری شده در حضور تیمارهای تلفیقی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر به ثبت رسید (شکل ۱b و ۱c). نمایی از این کالوس‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. هرچند در مطالعات Caruso و همکاران (۲۰۰۰)، IAA در تیمار مجزا توانست موجب کالزایی برگ و جوانه انتهایی رزماری (*Rosmarinus officinalis*) گردد ولیکن بسیاری از پژوهش‌های دیگر، اشاره به موفقیت عملکرد IAA در کنار سیتوکینین‌ها بر کالزایی دارد (Chaudhry et al., 2010, Nabila et al., 2003). در زمینه اثرات موفق انواع مختلف اکسین در کنار BAP بر القاء کالوس نیز مطالعات بسیاری صورت گرفته است. القاء کالوس از ریزنمونه ساقه *Salvia canariensis* L. (Mederos, -Molina, 2004)، از برگ آویشن ایرانی (*Thymus persicus*) (Bakhtiar et al., 2016) و از برگ کلپوره (Tabarifard, 2020) در محیط MS دارای تیمار هورمونی NAA و BAP؛ همچنین کالوس‌زایی قطعات تک‌گره‌ی ساقه گیاه مریم‌گلی بنفش (*Salvia verticillata*) (Izadghabol et al., 2011) و ایجاد کالوس از ریزنمونه برگ کلپوره (Hashemyan, 2018) تیمار شده با هورمون‌های 2,4-D و BAP نمونه‌هایی از این پژوهش‌ها هستند. آنچه در فرایند کالزایی مهم و موثر است، وادار نمودن سلول‌ها به شروع و تشدید تقسیمات سلولی است، به این‌نحوه سلول‌های تمایز یافته ریزنمونه وارد مرحله تمایز دایی شوند و سپس با کسب قابلیت شبه‌مریستمی، تقسیمات سلولی را از سر گیرند. مسلم شده است که از بین هورمون‌های گیاهی، اکسین‌ها نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی برعهده دارند (Kandouz et al., 2010). انواع اکسین به موجب مدیریت القاءکننده‌های مرحله G₁، تسریع برای ورود به مرحله S چرخه سلولی (Inze and Veylder, 2006) و بازدارندگی تمایز سلولی (Zivyar et al., 2014) و سیتوکینین‌ها از طریق کنترل مهارکننده‌های چرخه سلولی (Lambardi and Rugini, 2003) و مدیریت سرعت تقسیم سلولی (Zivyar et al., 2014)، بر کالزایی موثر هستند. هرچند کسب نتایج متفاوت در کاربرد همزمان و یا مجزا اکسین و سیتوکینین بر تولید کالوس را می‌توان به تفاوت در تعداد و نوع گیرنده‌های هورمونی و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی موجود در بافت‌های مختلف کشت‌شده به‌عنوان ریزنمونه نسبت داد (Sarkheil et al., 2009).

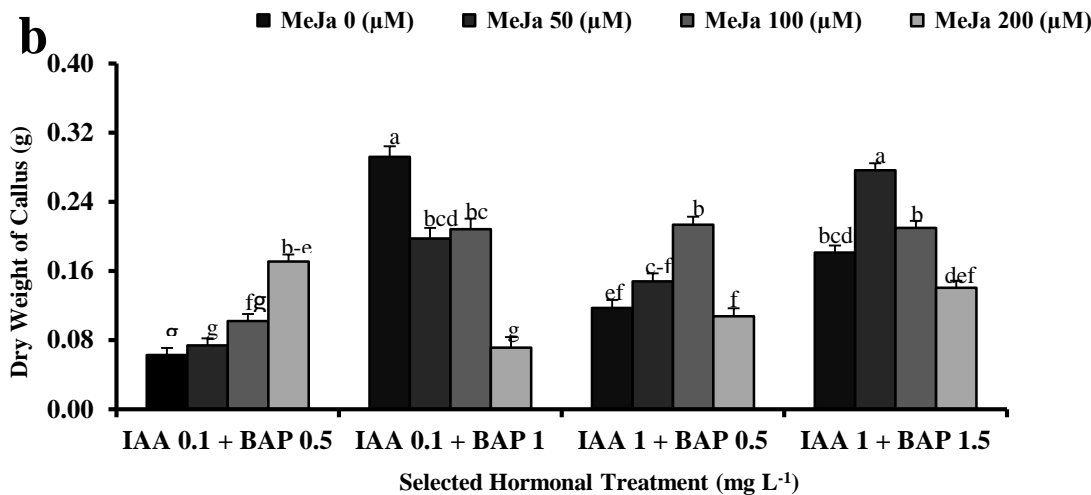
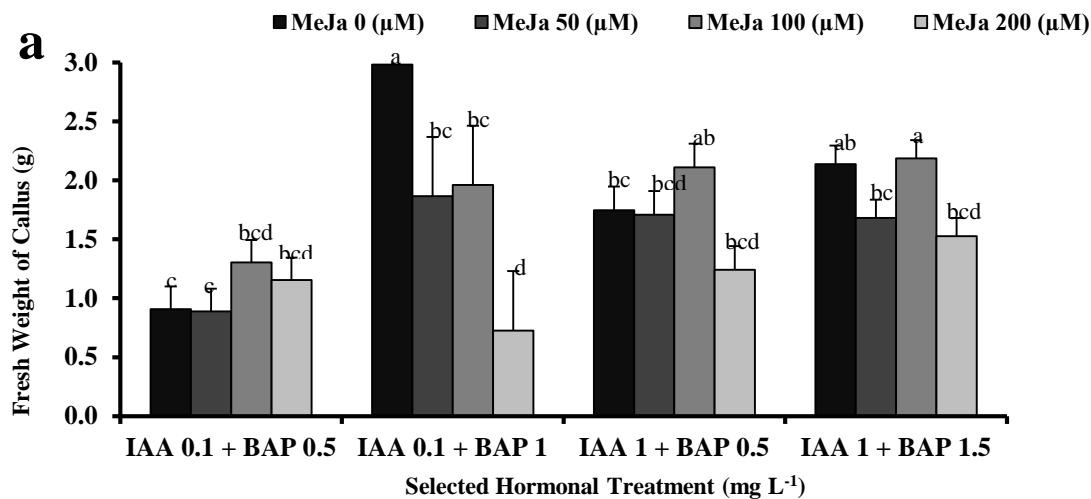


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف IAA و BAP بر صفات کالزایی ریزنمونه برگ: درصد کالزایی (a)، وزن تر کالوس (b) و وزن خشک کالوس (c). حرف یا حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای پنج درصد-بر مبنای آزمون دانکن- می‌باشد.



شکل ۲- نمایی از کالوس های دارای بیشترین وزن تر و خشک. از چپ، تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+ BAP_{0.5}" (میلی گرم در لیتر)"، (b) تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{1.5}" (میلی گرم در لیتر)"، (c) تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+ BAP₁" (میلی گرم در لیتر)" و (d): تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{0.5}" (میلی گرم در لیتر)". مقیاس ارائه شده در تصاویر معادل یک سانتی متر است.

بررسی صفات کالزایی و بیوشیمیایی متاثر از ایسیستور و هورمون: بر مبنای بیشینه درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس ها، محیط های کشت "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر به عنوان محیط های کشت بهینه انتخاب شدند و پس از کالزایی مجدد، با ایسیستور متیل جاسمونات تیماردهی شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر ساده و تلفیقی ایسیستور متیل جاسمونات و تیمارهای مختلف هورمون تاثیر معنی داری بر صفات کالزایی و محتوای ترکیبات فنلی کالوس ها داشت ($p \leq 0.05$). داده های تغییرات وزن نشان داد تاثیر که غلظت های مختلف ایسیستور بر وزن تر کالوس در شرایط هورمونی انتخاب شده اعمال می کند مشابه نیست، با این وجود غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات توانست موجب افزایش وزن تر کالوس در تمام تیمارهای هورمونی نسبت به دو غلظت دیگر متیل جاسمونات گردد (شکل ۳a). صرف نظر از محیط شاهد در شرایط هورمونی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}" میلی گرم در لیتر که دارای بالاترین وزن تر و خشک کالوس در بین تمام نمونه ها بود، غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات، به ترتیب موجب بیشینه وزن خشک کالوس ها در تیمارهای هورمونی "IAA_{0.1}+BAP_{0.5}"، "IAA_{0.1}+BAP₁"، "IAA₁+BAP_{0.5}" و "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی گرم در لیتر شدند (شکل ۳b). مطالعات Abdollahpoor و همکاران (۲۰۱۷) بیانگر تاثیر منفی تیمار متیل جاسمونات بر صفات وزنی کالوس *Hypericum perforatum* نسبت به شاهد بود به طوری که کمترین قطر و وزن تر کالوس در تیمار ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به ثبت رسید. چنین تاثیر منفی از سوی تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بر وزن تر کالوس *Taxus media var. Hatfieldii* نیز تایید شده است (Furmanowa et al., 1997). با این وجود، گزارشاتی از تاثیر مثبت تیمار با متیل جاسمونات (تا ۲۵۰ میکرومولار) بر رشد سلولی کشت سوسپانسیون نیز ارائه شده است (Walker et al., 2002). ثابت شده است که تیمار خارجی جاسمونات ها می تواند موجب تنوع بالاپاسخ های موفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان گردد (Furmanowa et al., 1997) و این تنوع عملکرد کاملا وابسته به غلظت ایسیستور و مدت زمان در معرض قرارگیری می باشد (Açıkğöz et al., 2019). با این حال، کاهش در زیست توده را به لیپوکسیداسیون غشاء در زمان تیمار با این ایسیستور نسبت داده اند (Abdollahpoor et al., 2017).



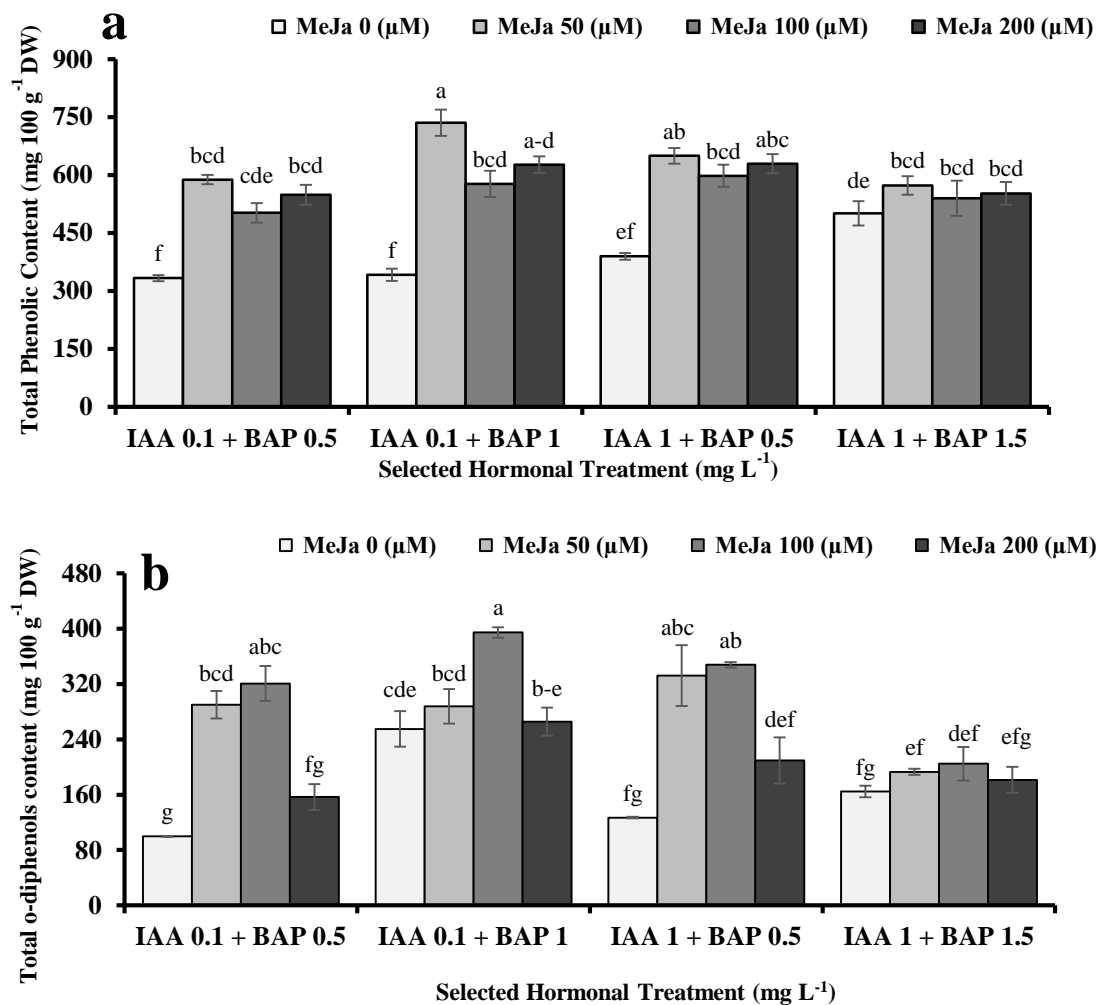
شکل ۳- برهمکنش البیسیتور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر صفات کالزایی ریزنمونه برگ: وزن تر کالوس (a) و وزن خشک کالوس (b). حرف یا حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای پنج درصد- بر مبنای آزمون دانکن- می باشد.

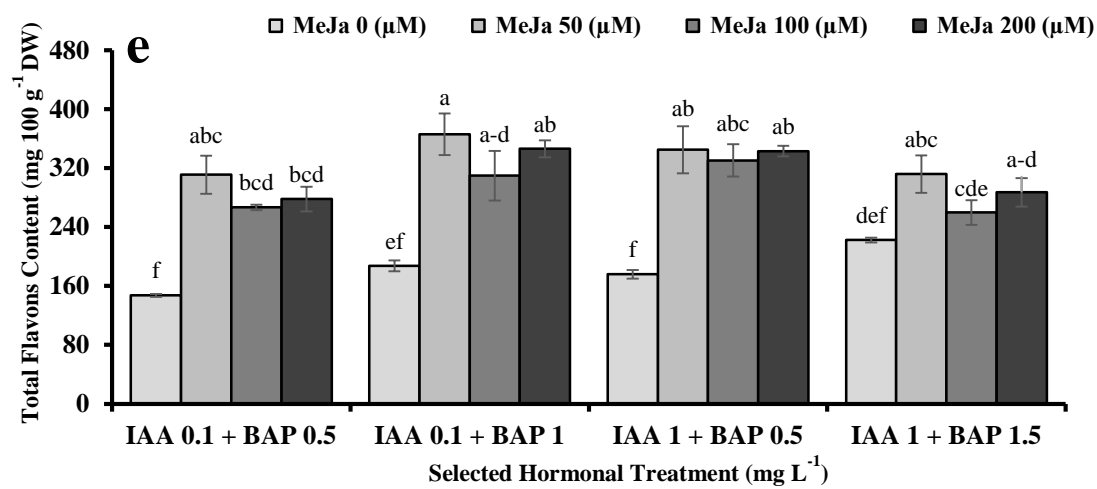
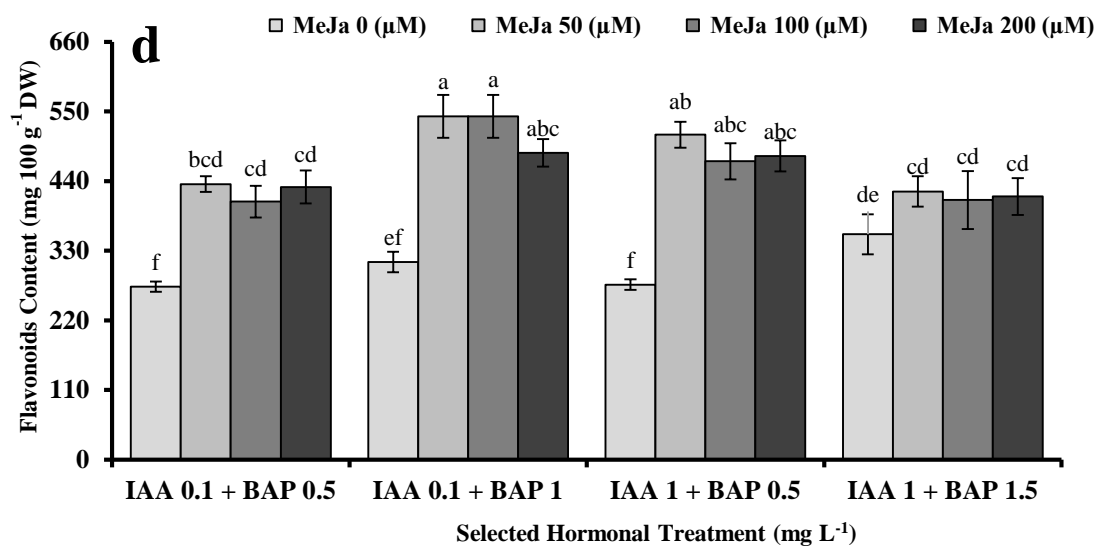
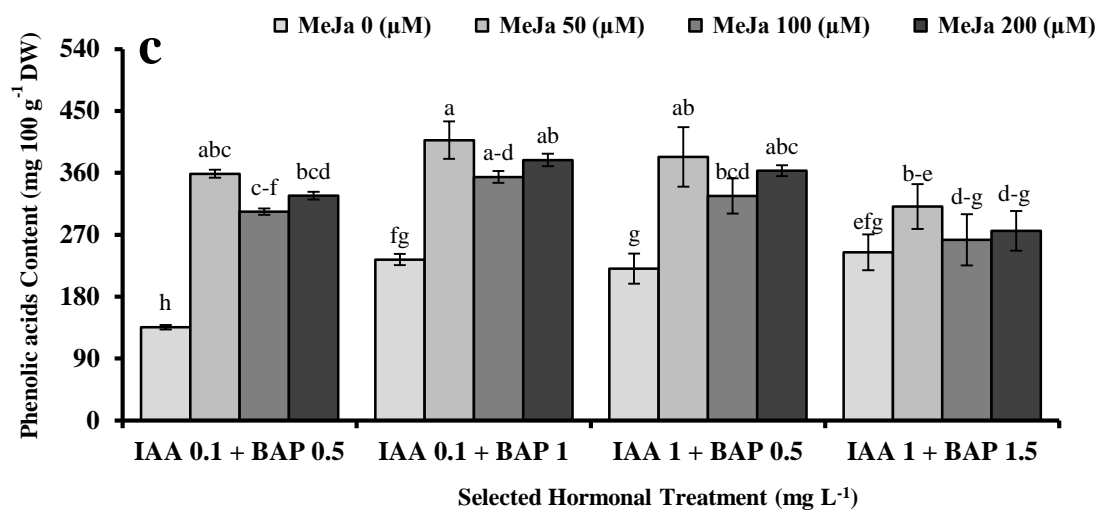
بررسی غلظت فنل کل در پژوهش حاضر نشان دهنده دامنه نوسان محتوا از غلظت ۳۳۳/۴۵ الی ۷۳۵/۱۸ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم نمونه خشک کالوس بود. به طوری که حد بیشینه غلظت فنل در زمان اعمال متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار بر تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" میلی گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴a). اعلام غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به عنوان بهترین تیمار در افزایش محتوای فنل کل کالوس کلپوره در شرایط هورمونی BAP_{1.5} میلی گرم بر لیتر (Hashemyan, 2018) و شرایط هورمونی BAP_{1.5} + NAA_{0.5} میلی گرم در لیتر (Tabarifard, 2020)، هم راستا با نتایج پژوهش حاضر می باشد. باین وجود، مطالعات Samadi و همکاران (2019) نشان داد که متیل جاسمونات تا غلظت ۲۰۰ میکرومولار هم می تواند موجب تجمع زیاد ترکیبات فنلی در کالوس استویا (*Stevia rebaudiana*) گردد و چنانچه غلظت تیمار تا ۲۵۰ میکرومولار افزایش یابد، این تاثیر منفی خواهد شد. جاسمونات ها به عنوان ترکیبات سیگنال در فرایند تحریک سازی، موجب رونویسی و ترجمه از نو (*de novo*) و به دنبال آن، بیوسنتز متابولیت های ثانوی در کشت سلول-

گیاهی می‌گردند (Açıkgöz *et al.*, 2019). به طوری که القاء و فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در تشکیل متابولیت‌های ثانوی توسط این گروه از ترکیبات تایید شده است (Yukimune *et al.*, 1996; Cheong and Choi, 2003; Singh and Dwivedi, 2018). در مطالعات Kim و همکاران (2013)، تشدید بیان ژن‌های *C4H* و *4CL*، *PAL* از مسیر فنیل‌پروپانوئیدو در راستای افزایش تولید ترکیبات فنلی در شرایط تیمار با متیل‌جاسمونات به اثبات رسیده است. هرچند پژوهش‌ها گویای این مطلب مهم نیز است که غلظت و زمان تیماردهی با الیسیتور از عوامل تعیین‌کننده بر نحوه انباشتگی متابولیت‌ها و من‌جمله ترکیبات فنلی هستند (Krzyzanowska *et al.*, 2012; Açıkgöz *et al.*, 2019).

شکل ۸b نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین محتوای *o*-دی‌فنل به ترتیب متعلق به محیط‌های کشت تیمار شده با "IAA_{0.1}+BAP_{0.5/0} μM MeJa" و "IAA_{0.1}+BAP_{1/100} μM MeJa" بود. اثر الیسیتور بر محتوا این دسته از ترکیبات نشان داد که با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار، محتوای *o*-دی‌فنل کالوس‌ها افزایش یافت ولیکن ادامه افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تیمار شده در محیط کشت، موجب کاهش محتوای *o*-دی‌فنل‌های کالوس‌های حاصل از برگ گردید. این نتایج همسو با مطالعات Hemmati و همکاران (۲۰۲۰)، و Shoja (۲۰۲۰) می‌باشد. با انجام فرایند *o*-اکسیداسیون توسط پلی‌فنل‌اکسیدازها (PPO)، مونوفنل‌ها به *o*-دی‌فنل‌ها تبدیل می‌گردند. در شرایط طبیعی سلول، این دسته از آنزیم‌ها در کلروپلاست حضور دارند در حالی که عمده جایگاه حضور فنل‌ها در واکوئل و فضای دیواره‌ای می‌باشد. لذا هر عاملی که این نظام کده‌بندی را برهم بزند، می‌تواند موجب عملکرد PPOها بر فنل‌ها گردد (Steffens *et al.*, 1994). ثابت شده است که متیل‌جاسمونات یکی از عوامل فراتنظیمی ژن‌های PPO می‌باشد (Constabel and Ryan, 1998; Flurkey and Inlow, 2008). Aziz و همکاران (۲۰۱۷) با اسپری متیل‌جاسمونات بر توتون (*Tobacco* spp.) نشان دادند که سطح رونویسی PPO (*NiPPO*) افزایش می‌یابد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، سطح mRNA به دو برابر و با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تا ۵۰۰ میکرومولار، این افزایش رونویسی همچنان ادامه یافت. از این رو، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات تیمار شده تا ۱۰۰ میکرومولار در پژوهش حاضر، ضمن اختلال احتمالی در کده‌بندی سلولی، افزایش بیان ژن‌های PPO و به دنبال آن تجمع بالا *o*-دی‌فنل‌ها را به همراه داشت. اسیدهای فنلی به عنوان دسته مهمی از ترکیبات فنلی از دو زیرگروه هیدروکسی‌بنزوئیک‌اسیدها و هیدروکسی‌سینامیک‌اسیدها تشکیل شده‌اند (Manach *et al.*, 2004). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در شکل ۸c، محتوای ۴۰۷/۶۴۸ میلی‌گرم اسیدهای فنلی در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس به‌عنوان بالاترین محتوا این نوع ترکیبات، در تیمار همزمان هورمون "IAA_{0.1}+BAP₁" و متیل‌جاسمونات ۵۰ میکرومولار حاصل شد. هرچند نحوه تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتور بر محتوای فنل کل و اسیدهای فنلی مشابه بود اما از لحاظ آماری، تفاوتی بین تاثیر غلظت ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر محتوای اسیدهای فنلی محیط‌های کشت مختلف دیده نشد (شکل ۸c). بررسی Skrzypczak-Pietraszek و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در مقایسه با تیمارهای بالاتر این الیسیتور، موجب افزایش کمیت و کیفیت اسیدهای فنلی در کشت سوسپانسیون *Exacum affine Balf. f. ex Regel* می‌گردد. به طوری که وابسته به غلظت بودن تاثیر مثبت متیل‌جاسمونات بر محتوای اسیدهای فنلی در بسیاری از پژوهش‌ها گزارش شده است (Hakim *et al.*, 2007; Mirshekar *et al.*, 2014). Yousefian و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی ارتباطات مولکولی، بیش‌بینی ژن‌های موثر بر مسیر تولید اسیدهای فنلی را عامل القاء از سوی الیسیتور متیل‌جاسمونات معرفی کردند. این مساله در مورد ارتباط سطح افزایشی اسیدهای فنلی با بیش‌بینی ژن *PAL* نیز اثبات شده است (Mandal, 2010). نکته مهم این است که

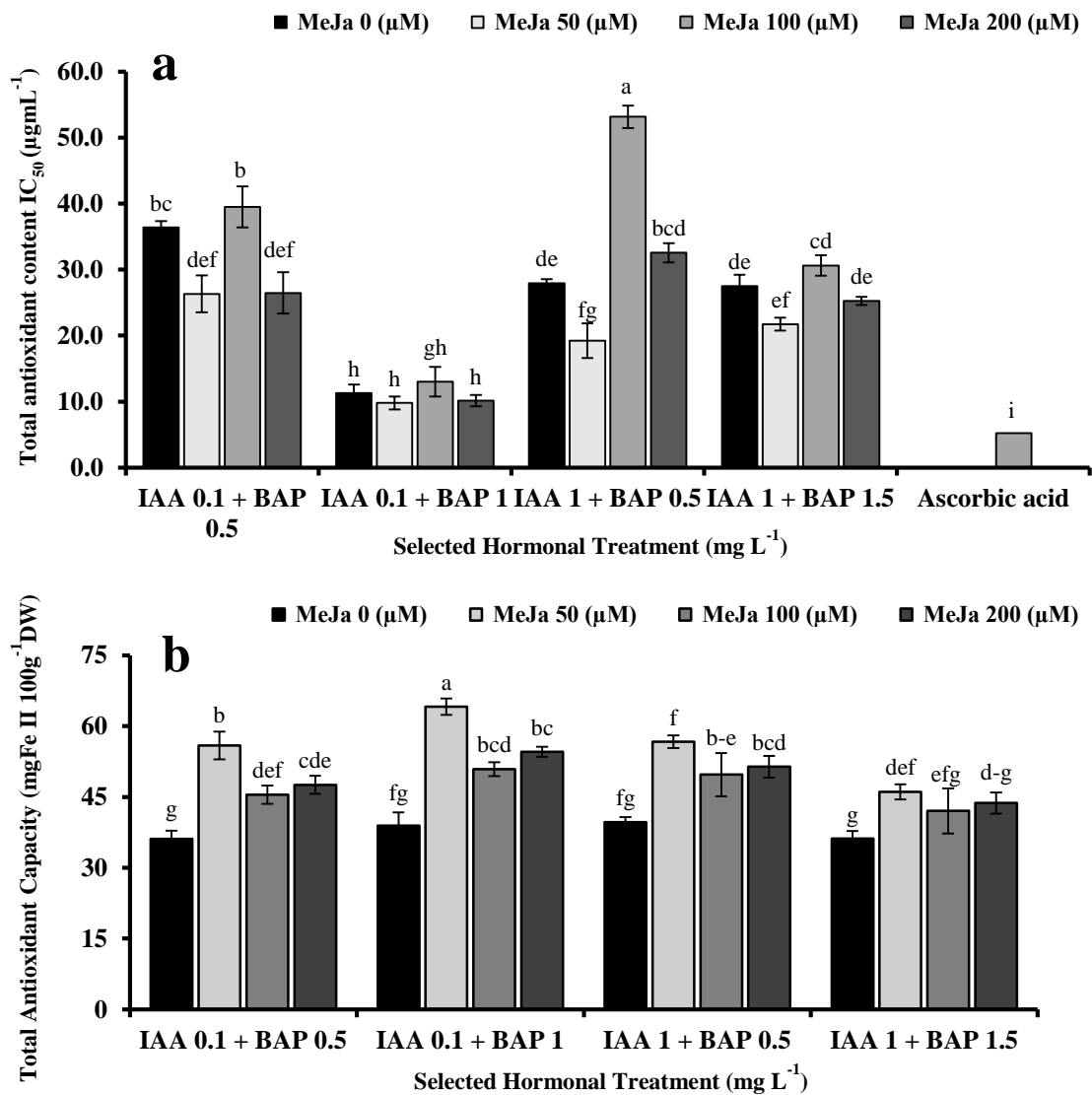
افزایش بیش از حد محرک و یا ایسیستور، نه تنها موجب افزایش متابولیت‌ها نمی‌گردد، بلکه از طریق کاهش بیان ژن *PAL* و احتمالاً سایر ژن‌های درگیر در مسیر، تولید این دسته از ترکیبات را کم و یا متوقف می‌کند (Bais *et al.*, 2004). مقایسه میانگین داده‌های فلاونوئید و فلاون کل کالوس‌های کلپوره نشان داد که بیشترین محتوای این ترکیبات در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت دارای تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁" میلی‌گرم در لیتر و ایسیستور متیل جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار" به دست آمد (به ترتیب ۵۴۲/۲۴ و ۳۶۵/۷۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس). شایان ذکر است که غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات موجب بیشینه محتوای ترکیبات فلاونوئید و فلاون در کالوس‌های همه تیمارهای هورمونی شد و از سوی دیگر، تفاوت معنی‌داری بین تاثیر تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات - در شرایط هورمونی مختلف- دیده نشد (شکل‌های ۴e و ۴d). تاثیر مثبت غلظت‌های پایین متیل جاسمونات بر محتوا فلاونوئید کشت سوسپانسیون سلولی *Pueraria tuberosa* L. (Goyal, 2008) و *Hypericum perforatum* (Wang *et al.*, 2015)، کشت بافت *Pueraria Lobata* (Thiem and Krawczyk, 2010) و کالوس کلپوره (Hashemyan, 2018) ارایه شده است. هرچند انتظار می‌رفت که سطح mRNA ژن‌های مسیر بیوسنتزی منتج به فلاونوئیدها به عنوان عاملی برای افزایش محتوای این ترکیبات گزارش گردد (Flores *et al.*, 2014)، اما در نهایت افزایش بیان ژن *PAL* به عنوان عامل اصلی گزارش شد (González-Aguilar *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).





شکل ۴- برهمکنش الیستور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر دستجات مختلف ترکیبات فنلی کالوس: فنل کل (a)، ۰-دی فنلها (b)، اسیدهای فنلی (c)، فلاونوئیدها (d) و فلاونها (e). حرف یا حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای پنج درصد-بر مبنای آزمون دانکن- می باشد.

برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی براساس آزمون DPPH، از حجم های الی ۶ میکرو لیتر عصاره ها استفاده و مشخص گردید که اثر الیستور در تیمار هورمونی، تاثیر معنی داری بر توان آنتی اکسیدانی عصاره کالوس های حاصل دارد. براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها کمترین میزان IC_{50} که بیانگر بالاترین توان آنتی اکسیدانی است، در حضور تیمار-هورمونی "IAA_{0.1}+BAP₁/ 200 μ M MeJa" و "IAA_{0.1}+BAP₁/ 50 μ M MeJa" به میزان ۹/۸۰ و ۱۰/۱۴ میکرو گرم در میلی لیتر و بیشترین محتوای IC_{50} - به منزله کمترین قدرت آنتی اکسیدانی- در حضور تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{0.5}" ۱۰۰ μ M MeJa و به میزان ۵۳/۱۷ میکرو گرم در میلی لیتر مشاهده شد (شکل ۵a). توان آنتی اکسیدانی آسکوربیک اسید معادل، ۵/۲۳ میکرو گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد. بررسی داده های آزمون FRAP - به عنوان دومین آزمون ارزیابی- کننده توان آنتی اکسیدان - نیز نشان داد که کاربرد ۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات در همه تیمارهای هورمونی، موجب بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در کالوس حاصل از برگ شد (شکل ۵b).



شکل ۵- برهمکنش الیستور متیل جاسمونات و شرایط هورمونی منتخب بر ظرفیت آنتی اکسیدان کالوس بر مبنای دو آزمون DPPH (a) و FRAP (b). حرف یا حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال خطای پنج درصد- بر مبنای آزمون دانکن- می باشد.

ارزیابی ارتباط بین ترکیبات فنلی مختلف و ظرفیت های آنتی اکسیدانی، بر اساس ضریب همبستگی پیرسون نیز انجام شد (جدول ۲). نتایج به دست آمده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره ها، همبستگی معنی دار و قوی را بین محتوای فنل کل، اسیدهای فنلی، فلاونوئید و فلاون با فعالیت آنتی اکسیدانی مذکور نشان داد. در حالی که همبستگی بین محتوای *o*-دی فنل با فعالیت آنتی اکسیدانی (بر مبنای آزمون DPPH) عصاره ها ضعیف تر بود (جدول ۲). نتایج به دست آمده از بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به روش احیاء یون آهن III (FRAP) نشان داد که همبستگی قوی و معنی داری ($P \leq 0.01$) بین محتوای فنل، *o*-دی فنل، اسیدهای فنلی و فلاونوئید وجود دارد در حالی که این همبستگی بین محتوای فلاون با فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها ضعیف ($r=0.316$) مشاهده شد. ارتباط قوی بین محتوای فنل و آزمون DPPH (Dakah et al., 2014, Javidimoghdam et al., 2016) و آزمون FRAP (He et al., 2009; Giri et al., 2012)، بارها برای نمونه های کشت شده در شرایط در شیشه گزارش شده است. آزمون DPPH بر مبنای دهندگی الکترون و یا هیدروژن است در حالی که آزمون FRAP، تنها به بررسی قدرت دهندگی الکترون می پردازد. اگرچه در سیستم های در شیشه (*in vitro*) روش های دیگری هم برای ارزیابی توان آنتی اکسیدانی ترکیبات وجود دارد، اما عموماً همبستگی چندانی با یکدیگر ندارند. اما مطالعه حاضر نشان داده است که دو آزمون به کار رفته ارتباط خوبی با یکدیگر دارند ($r^2 = 0.697$)، ($p \leq 0.01$) و گویای این مطلب است که ترکیبات فنلی به عنوان عوامل اصلی فعالیت آنتی اکسیدان و روبشگری رادیکال های آزاد در عصاره کالوس کلپوره، از طریق سیستم دهندگی الکترون عمل می کنند.

جدول ۲- نمایش همبستگی بین ظرفیت آنتی اکسیدان با محتوای فنل، *o*-دی فنل، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و فلاونها (بر اساس ضریب همبستگی پیرسون) در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط کشت MS دارنده هورمون و الیستور متیل جاسمونات.

آزمون DPPH	آزمون FRAP	محتوای فلاون	محتوای فلاونوئید	محتوای اسیدهای فنلی	محتوای <i>o</i> -دی فنل	محتوای فنل کل	صفات بیوشیمیایی
						1	محتوای فنل کل
					1	0.920 **	محتوای <i>o</i> -دی فنل
				1	0.674 **	0.521 *	محتوای اسیدهای فنلی
			1	0.945 **	0.657 **	0.968 **	محتوای فلاونوئید
		1	0.466 *	0.408 *	0.358 ns	0.463 *	محتوای فلاون
1	0.316 ns	0.895 **	0.928 **	0.628 **	0.876 **	0.876 **	آزمون FRAP
1	-0.697 **	-0.592 **	-0.690 **	-0.675 **	-0.389 ns	-0.735 **	آزمون DPPH

ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال خطای پنج درصد ($p \leq 0.05$) و یک درصد ($p \leq 0.01$) است.

نتیجه گیری کلی:

پژوهش حاضر تایید می کند که شرایط هورمونی IAA و BAP در غلظت های منتخب، در القاء کالوس از ریزنمونه برگ کلپوره موثر هستند. همچنین متیل جاسمونات به عنوان یک الیستور توانمند می تواند موجب بالابردن راندمان تولید مشتقات مختلف فنل ها و به طبع آن افزایش توان آنتی اکسیدان در کالوس کلپوره گردد و این شیوه را به عنوان یک تکنیک موثر در جهت تامین ترکیبات دارویی-فنلی در شرایط کشت کالوس معرفی نماید.

سپاسگزاری:

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با کد طرح به شماره ۳/۵۱۴۹۵) سپاس‌گزاری می‌کنند.

منابع:

- Abdollahpoor, M., Kalantari, S., Azizi, M. and Saadat, Y. (2017) Effects of methyl jasmonate and chitosan on shoot and callus growth of Iranian *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. *Journal of Medicinal Plants and By-products* 2: 165-72.
- Abdul Nasim, S., Aslam, J., Kapoor, R. and Ahmad Khan, S. (2010) Secondary metabolites production through biotechnological intervention a review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 22(33): 147-161.
- Çakırgöz M. A., Kara Ş. M., Aygün A., Özcan M. M. and 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(3): 351-359.
- Aghaei, K., Taei, N., Kanaani, M. and Yazdani, M. (2014) Salinity stress effect on physiological and biochemical traits of two species of *Salvia*. *Plant Process and Function* 3(9): 86-96.
- Ahmadi moghadam, Y., Piri, Kh, Bahramnejad, B., Habibi, P. (2013) Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *portulaca oleracea* (Purslan). *Bulletin of Environment. Pharmacology and Life Sciences* 2 (6): 89- 94.
- Amiri fard, R., Ostadian, S., Mohtasham, R. and Rostami, A. K. (2013) Study of the therapeutic properties of *Teucrium polium* and *Juniperus communis* in traditional medicine. The First National Conference of Medical Herbs and Stable Agriculture.
- Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A. and 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(4): 510-514.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. and Jamshid, S. (2008) Therapeutic effects of *Teucrium polium* extracts on oxidative stress in pancreas of Streptozotocin-induced diabetes rats. *Journal of Medical Food* 11: 525-532.
- Aziz, E., Akhtar, W., Ilyas, M., Rehman, Sh., Koiwa, H., K. Shinwari, Z. and Mahmood, T. (2017) Response of *Tobacco* polyphenol oxidase gene to wounding, abscisic acid (aba) and methyl jasmonate (mej). *Pakistan Journal of Botany* 49(2): 499-502.
- Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9: 26-32.
- Bakhtiar, Z., Mirjalili, M. and Sonboli, A. (2016) In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16(1): 48-5.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A. and Del Río, J. A. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(12): 4505-4515.
- Bhojwani, S. S. and Dantu, P. K. (2013) *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer Publications.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T. and 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): 818-825.
- Caruso, J. L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. and Wingetm G. D. (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Reports* 19(5):500-503.
- Castellano, G., Tena, J. and Torrens, F. (2012) Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia Oceanica*. *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry* 67: 231- 250.
- Chandra, K., Nautiyal, B. P. and Nautiyal, M. C. (2013) Herbal-based traditional medicinal knowledge of local inhabitants in Rudraprayag district of Uttarakhand. *Ethnobotany Research and Applications* 11: 299-313.
- Chaudhry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H. and Anjum, M.A. (2010) Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. moneymaker. *Pakistan Journal of Botany* 42(1): 155-163.

- Cheong, J. J. and Choi, Y. D. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409-413.
- Constabel, C. P. and Ryan, C. A. (1998) A survey of wound- and methyl jasmonate induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47: 507–511.
- Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S. and Wink, M. (2014) In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity, *Saudi Journal of Biological Sciences* 21: 317-323.
- De Torre, M. P., Cavero, R. Y., Calvo, M. and Vizmanos, J. (2019) A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants* 8(5): 142-153.
- Feinbrun-Dothan, N. (1978) *Flora palaestina: Alismataceae to orchidaceae*. Israel Academy of Sciences and Humanitie 3: 101- 106.
- Flores, G. and del Castillo, M. L. R. (2014) Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. *Postharvest Biology and Technology* 97: 77–82.
- Flurkey, W. H. and Inlow, J. K. (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102(12): 2160-2170.
- Furmanowa, M., Glowniak, K., Sklowska-baranek, K., Zgorka, G. and Jozefczyk A. (1997) Effects of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus × media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 75-79.
- Giri, L., Dhyania, P., Rawata, S., Bhatta, I. D., Nandia, S. K., Rawala, R. S. and Pande, V. (2012) In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crop and Products* 39: 1-6.
- Gorgini Shabankare, H., Asgharipour, M. R. and Fakheri, B. (2015) Morpho-chemical Diversity among Iranian *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) Populations in Fars Province. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17: 705-716.
- Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerathanassis, I. P., Segura-Carretero, A. and Gutiérrez, A. F. (2011) Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical scavenging activity detection. *LWT-Food Science and Technology* 46:104-109.
- Goyal, S. H. (2008) Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum* 30(6): 849 – 853.
- Griesbach, R. J. (1997) Flavonoids in *Saintpulia ionantha* expressing the fantasy mutation. *Phytochemistry* 48: 829-831.
- Hasani-Ranjbar, S., Larijani, B. and Abdollahi, M. (2008). A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. *Archives of Medical Science* 4(3): 285- 292.
- Hakim, R. S., Blackburn, M. B., Corti, P., Gelman, D. B., Goodman, C., Elsen, K., Loeb, M. J., Lynn, D., Soin, T. and Smaghe, G. (2007) Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. *Achives of Insect Biochemistry and Physiology* 64: 63-73.
- Hashemyan, M. (2018) Investigating the effect of some abiotic elicitors on the content of phenolic compounds and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. in in vitro. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Hemmati, N., Cheniany, M. and 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.
- Inze, D. and Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40 77–105.
- Javidimoghadam, M., Cheniany, M., Ganjeali, A. and 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.
- Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chehna, F., Yasmeen, A. and Moustafa, A. E. A. (2010) *Teucrium 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.
- Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K. and Apak, R. (2010) Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry* 120: 1201-9.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Choi, J. H. (2006) Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *Journal Agriculture Food Chemistry* 54: 7263–7269.

- Kim, Y. B., Kim, J. K., Uddin, M. R., Xu, H., Park, W. T., Tuan, P. A., Li, X., Chung, E., Lee, J. H. and Park, S. U. (2013) Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PloS One* 8(5): 64199.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. and Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004) Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica-Zagreb* 54(1): 65-72.
- Kovacevic, N. N., Lakusic, B. S. and Ristic M. S. (2001) Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research* 2: 110-115.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A. and Oleszek, W. (2012) The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 73-81.
- Lambardi, M. and Rugini, E. (2003) Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In *Micropropagation of Woody Trees and Fruits* 621-646.
- Li, T., Elhadi, D. and Chen, G. Q. (2017) Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic Engineering* 43: 29-36.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.
- Mandal, S. (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology* 9: 8038-8047.
- Marinova, D., Ribarova, F. and 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: 548-560.
- Mederos-Molina, S. (2004) In vitro callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canarensis* L. *Plant Tissue Culture* 14(2): 167-172.
- Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52(4): 673-751.
- Mirshekar, A., Honarvar, M., Mohammadi, F. and Alizadeh, A. (2014) Optimization of Tissue Culture of *Thymus daenensis* Celak. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 14 (9): 949-953.
- Nabila, S. K., Fawzia, M. J., Naser, A. A. and Rida, A. S. (2003) Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticose*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 117-121.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A. and Oksman-Caldentey, K. M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90(4): 494-507.
- Samadi S., Ghasemnezhad A. and Alizade M. (2019) Fresh weigh, Total phenol, Total flavonoids, Antioxidant and PAL enzyme activity of stevia callus variation affected by salicylic acid and methyl jasmonate. *Journal of Plant Process and Function* 8(32): 325-337.
- Samman, S., Lyons Wall, P. M. and Cook, N. C. (1998) Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives.
- Sarkheil, P., Omid, M., Peyghambari, S.A. and 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.
- Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E. (2001) Flavonoids and other polyphenols. *Methods Enzymology* 335: 157-166.
- Shoja, A. A. (2020) Effect of Nano titanium dioxide -TiO₂- on the production rate of phenolic compounds in *Salvia tebesana* Bunge in in vitro condition. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Singh, A. and Dwivedi, P. (2018) Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 750-757.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J. and 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.
- Steffens, J. C., Harel, E. and Hunt, M. D. (1994) Polyphenol oxidase. In BE Ellis, ed, *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Plenum Press, New York 275-312.

- Tabarifard, M. (2020) Effect of Methyl Jasmonate on the Production of Phenolic Compounds in *Teucrium polium* L. in Tissue Culture. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Thiem, B. and Krawczyk, A. (2010) Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated in vitro cultures of kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi). *Herba Polonica* 56(1): 48-56.
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. and Tsay, H. S. (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanica Bulletin Academia Sinia* 45: 1-22.
- Walker, T. S., Bais, H. P. and Vivanco, J. M. (2002) Jasmonic acid induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. Johns wort). *Phytochemistry* 60: 289-293.
- Wang, B., Sun, W., Li, Q., Li, Y., Luo, H., Song, J., Sun, C., Qian, J., Zhu, Y., Hayward, A., Xu, H. and Chen, S. (2015) Genome-wide identification of phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza*. *Planta* 241(3): 711-725.
- Yousefian, S., Lohrasebi, T., Farhadpour, M. and 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. and Hara, Y. (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology* 14: 1129-1132.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4): 555-559.
- Zivyar, S., Miri, S. M. and 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*.

Effect of methyl jasmonate, IAA and BAP on callogenesis potential, content of some phenolic compounds and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L.

Zahra Mohammadzadeh ¹, Monireh Cheniany ^{1*}, Leila Samiei ²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Research Center of Plant Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* *Cheniany@um.ac.ir*

Abstract

This study was conducted with the aim of investigating the effect of plant hormones (IAA and BAP) and methyl jasmonate elicitor on callogenesis potential of *Teucrium polium* leaf explants and the content of some phenolic compounds (total phenols, o-diphenols, phenolic acids, flavonoids, and flavones) and its antioxidant capacity. Leaf explants prepared from hydroponically-grown plants were cultured on MS medium with separate and combined concentrations of IAA (0.1, 0.5 and 1 mg L⁻¹) and BAP (0.5, 1 and 1.5 mg L⁻¹). The treatments with the highest percentage of callogenesis and fresh and dry weight were selected as the best hormonal conditions to evaluate the effect of methyl jasmonate (50, 100 and 200 μM) on phenolic derivatives. Eight weeks after callus growth, the content of various phenolic compounds and the antioxidant capacity of the extracts (based on DPPH and FRAP assays) were measured. Although a higher percentage of callogenesis was observed in all hormonal treatments than the control, conditions "IAA_{0.1} + BAP₁" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹ were with 100% callus induction. The highest fresh and dry weight of calli were in the combined treatments "IAA_{0.1} + BAP_{0.5}", "IAA_{0.1} + BAP₁", "IAA₁ + BAP_{0.5}" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹. The results of the second part of the experiment showed that the highest amount of phenolic compound and all its derivatives except o-diphenol was seen under the treatment of 50 μM methyl-jasmonate- in all hormonal treatments. A strong correlation was also observed between the antioxidant potentials DPPH (r² = -0.735) and FRAP (r² = 0.876) with the content of phenolic compounds. Therefore, methyl jasmonate as a potent elicitor can increase the synthesis of phenolic derivatives and the antioxidant capacity in *Teucrium* callus. So this method would be an effective technique for the supply of medicinal-phenolic compounds.

Keywords: *Teucrium polium*, Medicine plant, Callogenesis, Phenol derivatives, DPPH, FRAP.