

## Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Elicitors on the Production of Secondary Metabolites and Antioxidant Capacity of *Teucrium polium* L. *in-vitro*

Maliheh Hashemyan<sup>1</sup>, Ali Ganjeali<sup>1\*</sup>, Monireh Cheniany<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

### Abstract

*Teucrium polium*, from *Lamiaceae* family, is a medicinal plant. Due to overexploitation, low distribution and habitat destruction, this plant, is facing extinction. Plant biotechnology and tissue culture is an alternative method for plant secondary metabolites production. The present study aimed to enhance the production of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. using methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. Leaf explants from hydroponically cultured 4-month-old plants were inoculated on Murashige and Skoog medium (MS) containing 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) in concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5 mg/L alone or in combination with benzyl aminopurin (BAP) at, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L concentrations. According to the results, the best callus induction (100%) was achieved at MS medium containing 1.5 and 2 mg/L BAP. Calli obtained from this treatment were subsequently treated with Methyl Jasmonate or Salicylic Acid at 0, 50 and 100 µg/L concentrations. After 40 days, the content of phenolics, flavonoid compounds and total antioxidant capacity were evaluated in a completely randomized design with three replications. Based on biochemical assays, the greatest total phenol content, flavonoids and total antioxidant capacity belong to calli treated with 100 µg/L acid salicylic (SA) and after that to calli treated with 50 µg/L methyl jasmonate (MeJa), while the difference between them was significant. The results of means comparison showed applying 100 µg/L SA on calli in medium with 1.5 mg/L BAP had the greatest effect on total flavonoid content. Therefore, the use of appropriate concentrations of these elicitors can play an effective role in enhancing the medicinal compounds in *Teucrium polium*.

**Keywords:** *Teucrium polium*, Antioxidant, Salicylic acid, Elicitor, Flavonoid, Phenole, Methyl jasmonate

\* Corresponding Author: ganjeali@um.ac.ir

## تأثیر الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) در شرایط *in vitro*

ملیحه هاشمیان<sup>۱</sup>، علی گنجعلی<sup>۱\*</sup>، منیره چنیانی<sup>۱</sup>  
<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

### چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاهی دارویی و متعلق به خانوادهٔ نعناعیان است. بهره‌برداری بی‌رویهٔ انسان از ریشگاه‌های طبیعی برای مصارف دارویی و پراکنش کم، این گیاه را در معرض خطر انقراض قرار داده است؛ در این راستا، استفاده از روش‌های زیست‌فناوری به‌شکل روش جایگزین در تولید متابولیت‌های دارویی مطرح است. در پژوهش حاضر، آزمایشی با هدف افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره با استفاده از الیستورهای متیل جاسمونات (MeJa) و سالیسیلیک‌اسید (SA) انجام شد. ریزنمونه‌های برگ از گیاهان چهارماههٔ رشدیافته در شرایط هیدروپونیک تهیه و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های ۲ و ۴-دی کلروفنوکیسی استیک‌اسید (2,4-D) و غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) به‌طور مجزا و ترکیبی کشت شدند. کالوس‌های منتخب که دارای بیشترین درصد (۱۰۰ درصد) کالوس‌زایی بودند (محیط کشت‌های MS حاوی غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP) تحت تأثیر تیمارهای مجزای غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید قرار گرفتند. پس از ۴۰ روز، محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار ارزیابی شد؛ در این آزمایش، بیشترین محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر الیستور سالیسیلیک‌اسید و پس از آن، در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر الیستور متیل جاسمونات مشاهده شد که تفاوت معناداری نسبت با یکدیگر داشتند. در این آزمایش، مصرف ۱۰۰ میکروگرم در لیتر سالیسیلیک‌اسید در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تأثیر را بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌ها داشت؛ بنابراین، کاربرد غلظت‌های مناسب این الیستورها نقش مؤثری در افزایش ترکیبات مؤثرهٔ دارویی گیاه کلپوره دارد.

**واژه‌های کلیدی:** کلپوره، آنتی‌اکسیدان، سالیسیلیک‌اسید، الیستور، فلاونوئید، فنل، متیل جاسمونات

\* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ganjeali@um.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۵۳۰۵۷۶۴۵

## مقدمه

گیاهان دارویی نقش بسزایی در سلامت افراد و جوامع بشری دارند. اهمیت دارویی این دسته از گیاهان در تولید ترکیبات ثانویه‌ای است که فرایندهای فیزیولوژیکی خاصی را در بدن انسان فعال می‌کنند (Padulosi and Hadj-Hassan, 1998). استفاده از متابولیت‌های گیاهی در صنعت داروسازی به درمان آسان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها کمک می‌کند و مانع خروج بخشی از سرمایه کشورهای برای وارد کردن این گونه ترکیبات می‌شود (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). برداشت مستمر گیاهان دارویی برای استخراج ترکیبات ارزشمند موجود در آنها، علاوه بر آسیب به گیاهان، تأثیر سوئی بر جوامع گیاهی و زیستگاه آنها دارد؛ از سویی، این ترکیبات ساختار پیچیده‌ای دارند و سنتز آنها با استفاده از روش‌های شیمیایی پرهزینه و مشکل است (Toivonen, 1993)؛ به‌همین علت، استفاده از روش‌های زیست‌فناوری کشت سلول و بافت گیاهی می‌تواند روش جایگزینی برای تولید این ترکیبات باشد (Rao and Ravishankar, 2002). از دیگر مزایای تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت این است که نمونه گیاهی در آزمایشگاه تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر اقلیم، آفت‌ها، بیماری‌های میکروبی، تنش‌های فصلی و جغرافیایی قرار نمی‌گیرد و می‌توان رشد سلول‌ها را در این شرایط کنترل و محصولات خالص‌تر و مفیدتری تولید و به بازار عرضه کرد (Bourgau et al., 2002; Rao and Ravishankar, 2002).

کلپوره (*Teucrium polium* L.)، گیاهی علفی، گل‌دار، چندساله (پایا)، خودرو و متعلق به خانوادهٔ نعنائیان (Lamiaceae) است که از اواسط تیرماه تا اواسط شهریورماه در مناطق فقیر از مواد غذایی و مواد آلی، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زار نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب‌غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (Koocheki et al., 2009; Mashreghi and Niknia, 2012). این گیاه دارای طبیعت گرم است و سرشاخه‌های گل‌دار آن به‌شکل داروی ضدتشنج با فعالیت‌های ضدانقباضی، ضدعفونی‌کنندگی و ترمیم‌کنندگی زخم در طب سنتی ایران استفاده می‌شوند (Nadimi et al., 2013)؛ همچنین ویژگی‌های ادرارآوری، تعریق‌آوری، ضد فشار خون، ضد درد و کاهندگی چربی و قند خون این گیاه در پژوهش‌ها اثبات شده‌اند (Moghtader, 2009).

فنل‌ها بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی و ترکیبات دهندهٔ هیدروژن هستند که آثار و فواید زیستی گسترده‌ای به‌شکل آنتی‌اکسیدان ایده‌آل در زمینهٔ مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی برای انسان دارند (Golluce et al., 2007; Raghavendra et al., 2010). فلاونوئیدها زیرمجموعه‌ای از فنل‌ها هستند که انتشار وسیعی در گیاهان دارند و با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، نقش بسزایی در نمو و سیستم دفاعی گیاهان و محافظت آنها در برابر عوامل خارجی از جمله اشعهٔ ماوراءبنفش، عوامل بیماری‌زا و کرم‌های گیاهی ایفا می‌کنند (Lev-Yadun, 2001; Myung-Min et al., 2009). فنل‌ها و فلاونوئیدها سازوکارهای متعددی برای ایفای نقش آنتی‌اکسیدانی خود دارند

و استفاده از الیستورهای زیستی و غیرزیستی اشاره کرد (Sayed-Tabatabae and Omid, 2011). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که در سنتز متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سلول-بافت نقش دارند، ولی غلظت بهینه و نسبت کاربردی آنها برای قطعه‌های مختلف جداکشت یک گونه و از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (Bagheri and Saffari, 2008). استفاده از الیستورهای زیستی و غیرزیستی مانند اشعه ماوراءبنفش، نمک فلزات سنگین، برخی از ترکیبات شیمیایی مانند جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، نترات و همچنین کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت از جمله روش‌های بهینه‌سازی شرایط کشت برای افزایش تولید متابولیت‌های گیاهی هستند (Box, 1945; Rao and Ravishankar, 2002; Matkowski, 2008). ثابت شده است متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید از مؤثرترین الیستورهای شیمیایی هستند که با مسیر علامت‌رسانی اختصاصی سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و در نتیجه، فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئیدی می‌شوند که پیامد آن، افزایش محتوای درونی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است (Shabani and Ehsanpour, 2010; Mehrabani et al., 2013). در بررسی توان کالزایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی حاصل از کالوس‌های کلپوره، بیشترین وزن تر کالوس را در ریزنمونه برگ گیاه کلپوره و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم برلیت-۲ و ۴-دی کلروفنو کسی استیک اسید (2,4-D) گزارش

که از جمله می‌توان به پاکروبی رادیکال‌های آزاد، دهندگی هیدروژن، خاموش کردن آنیون سوپراکسید، کلات کردن یون‌های فلزی، همکاری با پراکسیدازها، جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن در جهت روبندگی گونه‌های کنشگر اکسیژن (ROS) اشاره کرد (Chu et al., 2000; Kovacik et al., 2009).

مطالعه‌ها در زمینه گیاه کلپوره نشان داده‌اند ترکیبات مهم عصاره قطبی (عصاره‌گیری با حلال‌های قطبی مانند آب یا اتانول) آن به گروه گلیکوزیدهای فنیل پروپانوئید تعلق دارند و فلاونوئیدها (به شکل مشتقات متوکسی) و ترکیبات آروماتیک به وفور در آن یافت می‌شوند (Alcazar et al., 1992; Bedir et al., 1999). محتوای زیاد فنل و فلاونوئید گیاه کلپوره موجب شده است عصاره آن به شکل افزودنی غذایی جایگزین آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده شود (Goulas et al., 2012).

پژوهش‌های اندکی در زمینه کشت بافت گیاه کلپوره به منظور تولید متابولیت‌های دارویی و اسانسی انجام شده‌اند. Al-Qudah و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی‌های خود موفق به باززایی گیاه کلپوره در شرایط *in vitro* شدند؛ در این آزمایش، گیاهان باززایی شده در محیط MS حاوی ۶-بنزیل آدنین و ۱-نفتالین استات محتوای اسانسی بیشتری نسبت به گیاهان رشد یافته در محیط بدون هورمون داشتند.

عوامل بسیاری بر افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارند که از جمله آنها می‌توان به مواد تنظیم‌کننده رشد، ریزنمونه، افزودن پیش‌سازها

کردند؛ در این آزمایش، ریزنمونهٔ برگ در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود.

متأسفانه بهره‌برداری بی‌رویهٔ انسان از گیاه کلپوره، چرای مفرط دام و تبدیل شدن مراتع به بوم‌نظام‌های زراعی، این گیاه را در معرض خطر انقراض قرار داده است؛ این موضوع نه‌تنها حفظ و تکثیر این گیاه در عرصه‌های طبیعی را بااهمیت می‌کند، بررسی روش‌های زراعی کردن آن را نیز اجتناب‌ناپذیر می‌کند (Koocheki et al., 2009). با توجه به اهمیت دارویی و غذایی گیاه کلپوره و از آنجا که بررسی‌های اندکی در زمینهٔ کشت *in vitro* این گیاه وجود دارند، پژوهش حاضر با تکیه بر شیوهٔ کشت *in vitro* و با هدف بررسی تأثیر الیستورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر ظرفیت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ این گیاه انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی مواد گیاهی و عملیات کشت:** بذر گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) در آبان‌ماه ۱۳۹۵ از منطقهٔ سد طرق، ابتدای روستای عارفی، استان خراسان رضوی (ارتفاع ۱۳۴۴ متر، طول جغرافیایی "۳۲۰ ۷۱۱" °۵۹ و عرض جغرافیایی ۳۶°۸۰'۸۴۲) جمع‌آوری و پس از اینکه متخصصان پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد آن را شناسایی کردند و با شمارهٔ هرباریومی (FUMH) ۲۰۹۵۵ ثبت شد، به‌منظور استفاده در پژوهش حاضر نگهداری شد. به‌منظور از بین بردن خواب بذر، مناسب‌ترین تیمار شامل خراش و هورمون

جیرلیک‌اسید (غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت شش روز استفاده شد (Javidi Moghadam et al., 2016)؛ سپس بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه، درون پتری‌دیش‌های استریل دارای کاغذ صافی شمارهٔ ۱ قرار گرفتند و در اتاق کشت (شرایط تاریکی با دمای  $25 \pm 2$  درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شدند. پس از ظاهر شدن ریشهٔ اولیه و محور زیرپله، دانه‌رست‌های کلپوره به مدت دو روز در نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای  $25 \pm 2$  درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط کاملاً مرطوب قرار گرفتند. پس از سبز شدن اندام هوایی و افزایش طول ریشهٔ اولیه، دانه‌رست‌ها به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند (Arnon and Hoagland, 1940) منتقل و در اتاقک رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاه رشد یافته در محیط یادشده به شکل گیاه مادری برای تهیهٔ ریزنمونه استفاده شد.

**بررسی تأثیر الیستورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس:** از آنجا که بررسی‌های پیش، برگ را بهترین ریزنمونهٔ کالوس‌دهنده معرفی کرده‌اند (Javidi moghadam et al., 2016)، در پژوهش حاضر از ریزنمونهٔ برگ (جداکشت اولیه) برای تولید کالوس استفاده شد. ریزنمونهٔ برگ در محیط‌های کشت MS دارای تیمار مجزا و ترکیبی دو هورمون 2,4-D (غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل‌آمینوپورین (BAP)

غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) قرار گرفت؛ به این منظور، قطعه‌های برگ بخش‌های رأسی ساقه پس از جداسازی از گیاه مادری به مدت ۵ دقیقه با آب شستشو و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) غوطه‌ور شدند و در نهایت، ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو و استریل شدند؛ در ادامه، ریزنمونه‌ها به قطعه‌های ۰/۵ سانتی متری برش داده شدند و روی محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی یادشده قرار گرفتند و در اتاقک رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در پایان روز چهارم و باتوجه به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و میزان کالزایی در هر تیمار، کالوس‌های سبز حاصل از محیط‌های کشت حاوی ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند. کالوس‌های منتخب به محیط‌های کشت MS حاوی الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) منتقل شدند. پس از پایان روز بیستم، وزن خشک کالوس‌ها (معیار رشد) اندازه‌گیری و کالوس‌ها با دستگاه فریز درایر (مدل Christ Alfa 1.2 LD Plus، آلمان) طی ۲۴ ساعت کاملاً خشک شدند.

غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) قرار گرفت؛ به این منظور، قطعه‌های برگ بخش‌های رأسی ساقه پس از جداسازی از گیاه مادری به مدت ۵ دقیقه با آب شستشو و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) غوطه‌ور شدند و در نهایت، ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو و استریل شدند؛ در ادامه، ریزنمونه‌ها به قطعه‌های ۰/۵ سانتی متری برش داده شدند و روی محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی یادشده قرار گرفتند و در اتاقک رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در پایان روز چهارم و باتوجه به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و میزان کالزایی در هر تیمار، کالوس‌های سبز حاصل از محیط‌های کشت حاوی ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند. کالوس‌های منتخب به محیط‌های کشت MS حاوی الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) منتقل شدند. پس از پایان روز بیستم، وزن خشک کالوس‌ها (معیار رشد) اندازه‌گیری و کالوس‌ها با دستگاه فریز درایر (مدل Christ Alfa 1.2 LD Plus، آلمان) طی ۲۴ ساعت کاملاً خشک شدند.

**بورسی محتوای فنل کل:** محتوای ترکیبات فنلی کل به روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) بررسی شد؛ به این منظور، مقدار ۱۰۰ میکروگرم در لیتر عصاره متانولی تهیه‌شده از هر نمونه با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر محلول فولین سیو کالچو مخلوط و پس از ۳ دقیقه استراحت، مقدار ۱ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (وزنی/حجمی) به آن افزوده و پس از ۴۵ دقیقه گرماگذاری در شرایط تاریکی، جذب نوری مخلوط در ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فنل کل بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه به کمک منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) گالیک اسید تعیین شد.

**بورسی محتوای فلاونوئید کل:** محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل بر اساس اندازه‌گیری کالریمتری آلومینیوم کلرید (Zhishen et al., 1999) بررسی شد؛ به این منظور، مقدار ۱ میلی لیتر عصاره متانولی تهیه‌شده از هر نمونه با ۴ میلی لیتر آب مقطر و ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۵ درصد  $\text{NaNO}_2$  (وزنی/حجمی) مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه استراحت، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد  $\text{AlCl}_3$  (وزنی/حجمی)، ۲ میکرولیتر محلول ۱ مولار NaOH و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه و پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در تاریکی، جذب آن در ۵۱۰ نانومتر

**عصاره‌گیری ترکیبات فنلی:** مقدار ۰/۱ گرم از پودر خشک هر نمونه با ۲ میلی لیتر حلال متانول ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) مخلوط و به مدت ۳۶ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (مدل Parsonic 2600 s، ایران) در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفت و در نهایت، نمونه‌های با

حاصل از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محلول سولفات آهن II رسم شد.

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۶ انجام و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Excel (Office 2013) رسم شدند.

### نتایج

**ارزیابی سنجش سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-D و BAP در میزان کال‌زایی:** تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد کاربرد هورمون‌های 2,4-D و BAP بر درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ گیاه کلپوره معنادار ( $P \leq 0.01$ ) است (جدول ۱). بر اساس نتایج، بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) به محیط کشت بدون هورمون 2,4-D و دارای غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تعلق دارد (شکل ۱) و کمترین درصد کال‌زایی (۸/۳ درصد) به ترکیب تیماری ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مربوط است (شکل ۲).

خوانده شد. محتوای فلاونوئید کل نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم کاتچین در گرم وزن خشک نمونه به کمک منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کاتچین محاسبه شد.

**بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش احیای یون آهن III (FRAP):** به منظور اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) استفاده شد که مبتنی بر کاهش کمپلکس فریک تری پیریدیل تری آزین (TPTZ) به شکل فروس در مجاورت آنتی‌اکسیدان‌هاست (Shahwar *et al.*, 2012; Chaouche *et al.*, 2013)؛ به این منظور، پس از تهیه محلول‌های ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم، ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در ۴۰ میلی‌مولار HCl و ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن سه‌آبه، عمل مخلوط کردن آنها برای تهیه محلول FRAP به نسبت‌های حجمی ۱:۱:۱۰ انجام شد. به منظور سنجش، مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول FRAP تازه تهیه شده ترکیب و پس از ۴ دقیقه استراحت، جذب محلول در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محتوای آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم محلول سولفات آهن II در گرم وزن خشک نمونه به کمک منحنی استاندارد

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ گیاه کلپوره در محیط کشت MS در سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-

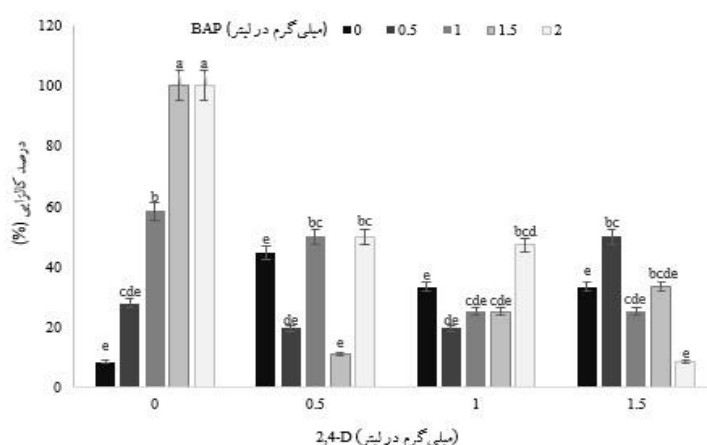
#### BAP و D

F	میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	منبع تغییرات (S.O.V)
۱۳/۸۳**	۲۸۶۲/۴۳	۳	۸۵۸۷/۲۹	2,4-D
۴/۹۹**	۱۰۳۱/۸۶	۴	۴۱۲۷/۴۲	BAP
۹/۹۸**	۲۰۶۶/۴۹۱	۱۲	۲۴۷۹۷/۸۹	BAP × 2, 4-D
-	۸۸/۲۰۶	۴۰	۱/۸۲۷۵	خطا
-	-	۵۹	۴۵۷۸۷/۷۰	کل

\*\* بیان‌کننده معناداری در سطح احتمال خطای ۱ درصد ( $P \leq 0.01$ ) است.



شکل ۱- نمایی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ گیاه کلپوره در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP (الف) و ۲ میلی‌گرم درلیتر BAP (ب) چهل روز پس از کشت

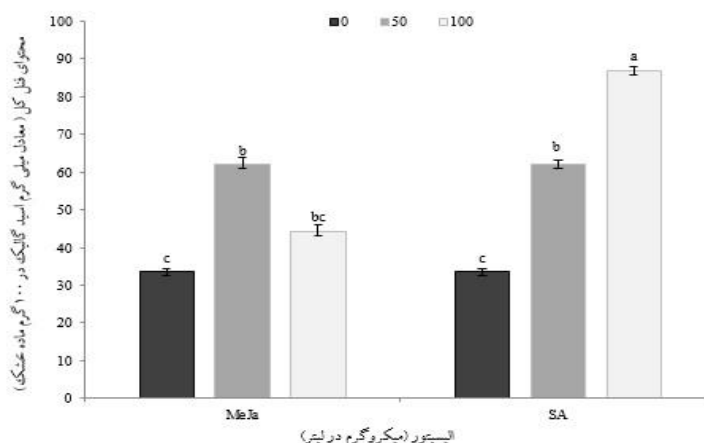


شکل ۲- مقایسه میانگین درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ گیاه کلپوره در محیط کشت MS در کاربرد هم‌زمان سطوح مختلف هورمون‌های BAP و 2,4-D. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.01$  را نشان می‌دهند.

الیستور) (۳۳/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) است. در کاربرد الیستور متیل جاسمونات، تیمار ۵۰ میکروگرم درلیتر سبب افزایش حدود ۱/۹ برابری محتوای فنل کل کالوس (۶۱/۹۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) نسبت به نمونه بدون الیستور (۳۳/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) شد و پس از آن، محتوای فنل کل کالوس کاهش یافت (شکل ۳).

**نتایج بررسی تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی متأثر از سطوح مختلف متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید:**  
تجزیه واریانس داده‌های فنل کل نشان داد تنها اثر عامل الیستور (متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید) بر محتوای این دسته از ترکیبات معنادار ( $P \leq 0.01$ ) است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد غلظت ۱۰۰ میکروگرم درلیتر سالیسیلیک اسید سبب تولید بیشترین محتوای فنل کل (۸۶/۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) در کالوس‌های حاصل می‌شود که ۲/۵ برابر نمونه شاهد (بدون





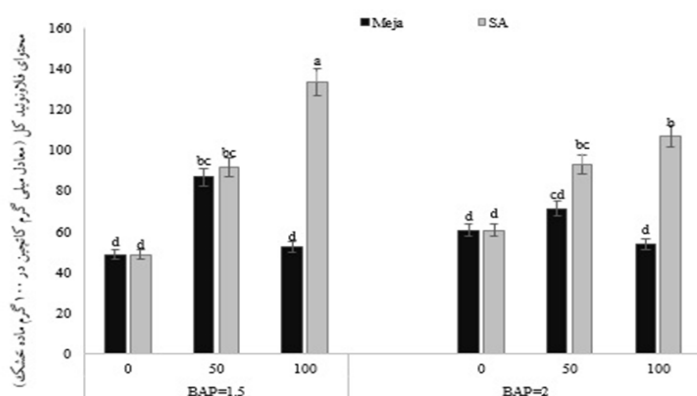
شکل ۳- مقایسه میانگین محتوای فنل کل در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ گیاه کلپوره در محیط MS در سطوح مختلف الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (میکروگرم در لیتر). مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.05$  را نشان می‌دهند.

دادند تنها آثار ساده هورمون BAP و الیسیتور بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل کالوس معنادار ( $P \leq 0.05$ ) است. بر اساس نتایج، غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌طور معناداری سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (۱۳/۸۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در مقایسه با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۱۰/۷۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) می‌شود (شکل ۵). کاربرد غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر سالیسیلیک اسید (۲۵/۴۶ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) به‌طور معناداری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نسبت به تیمار بدون الیسیتور (۵/۸۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) افزایش داد (افزایش ۴/۳ برابری نسبت به تیمار شاهد). در کاربرد متیل جاسمونات، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس (۱۳/۹۴ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر این الیسیتور مشاهده شد (شکل ۶).

تجزیه واریانس داده‌ها در ارزیابی محتوای فلاونوئید کل نشان داد اثر متقابل BAP و الیسیتور بر محتوای فلاونوئید کل کالوس معنادار ( $P \leq 0.05$ ) است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان دادند غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر سالیسیلیک اسید دارای بیشترین تأثیر (۱۳۳/۷۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌های رشد یافته در محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP است و تفاوت آن با تیمار شاهد (۴۸/۵۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) معنادار است (افزایش حدود ۲/۷ برابری نسبت به تیمار شاهد) (شکل ۴). مقایسه تأثیر دو الیسیتور بر کالوس‌های تولید شده روی محیط BAP نشان داد اثر القایی الیسیتور سالیسیلیک اسید بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌ها بیشتر از اثر القایی متیل جاسمونات در محیط‌های یاد شده است (شکل ۴).

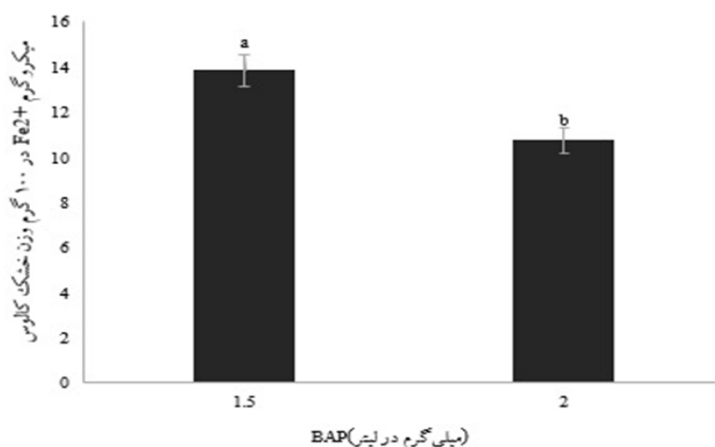
**ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل:** نتایج تجزیه واریانس

داده‌ها در ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان

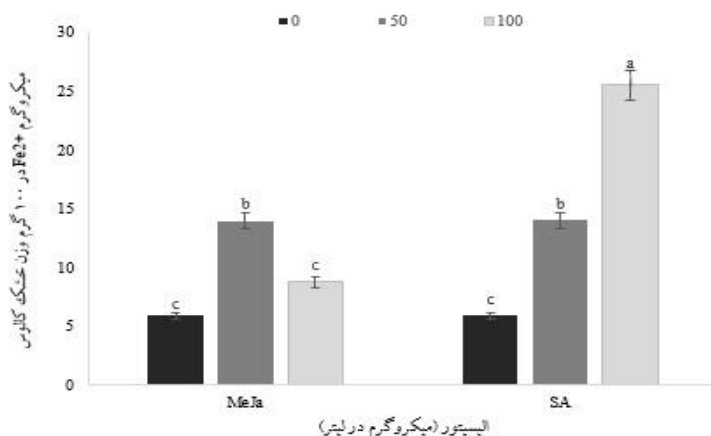


برهم‌کنش هورمون در ایستور

شکل ۴- مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS حاصل از تأثیر متقابل هورمون BAP و ایستورها. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.01$  را نشان می‌دهند.



شکل ۵- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS در سطوح مختلف هورمون BAP. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.01$  را نشان می‌دهند.



شکل ۶- مقایسه میانگین آثار ساده ایستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.01$  را نشان می‌دهند.

## بحث

نتایج بررسی درصد کال‌زایی نشان دادند در محیط‌های کشت بدون هورمون 2,4-D و دارای روند افزایشی غلظت هورمون BAP، درصد کال‌زایی ریزنمونه‌ها افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که بیشترین غلظت‌های به‌کاررفته BAP (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر)، مؤثرترین نتیجه را بر درصد کال‌زایی دارند. سیتو‌کینین‌ها تشدیدکننده تقسیم‌های سلولی و ترغیب‌کننده فرایند نمو سلول‌های حاصل هستند که فرایند اول از طریق افزایش بیان ژن‌های متعلق به سیکلین‌های نوع D (Ikeuchi *et al.*, 2013) و فرایند دوم با افزایش و تجمع پورین‌های ضروری برای تقسیم‌های سلولی و سنتز پروتئین‌ها انجام می‌شود (Kumar Verma *et al.*, 2016). کاربرد هم‌زمان دو هورمون نه تنها تأثیر مثبتی بر میزان کال‌زایی ریزنمونه‌ها نداشت، محیط‌های کشت دارای غلظت‌های زیاد این دو هورمون (۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D) سبب کاهش درصد کال‌زایی شدند؛ این یافته با نتایج پژوهش Mirshekar و همکاران (۲۰۱۴) در زمینه گیاه آویشن (*Thymus daenensis*) مطابقت دارد. اگرچه مطالعه‌های بسیاری به القای کالوس در تیمار هم‌زمان دو هورمون اکسین و سیتو‌کینین اشاره دارند (Dronne *et al.*, 1999; Soltanipool *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012; Sahraroo *et al.*, 2014)، نتایج متفاوت و حتی کاهش‌ی کاربرد هم‌زمان تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتو‌کینین بر تولید کالوس ممکن است به‌علت تفاوت در تعداد و نوع گیرنده‌های هورمونی یا محتوای متفاوت هریک از

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجود در بافت‌های مختلف کشت شده (ریزنمونه) باشد (Sarkheill *et al.*, 2009)؛ به‌طوری‌که افزایش غلظت هورمون‌ها بیشتر از میزان بهینه در محیط کشت دارای اثر ممانعت‌کننده بر هورمون‌های داخلی ریزنمونه است و کاهش میزان تولید کالوس را در پی دارد (Dixon and Gonzales, 1996; Afshari poor, 1993).

نتایج بررسی متابولیت‌های ثانویه فنل و فلاونوئید کل نشان دادند اگرچه تیمار غلظت ۵۰ میکروگرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات تأثیر افزایشی بر محتوای این ترکیبات شیمیایی کالوس‌ها دارد، تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر این الیسیاتور سبب کاهش محتوای فنل و فلاونوئید کل می‌شود؛ در تأیید این یافته، Goyal و Ramawat (۲۰۰۸) نتیجه گرفته‌اند تیمار با غلظت‌های کمتر متیل‌جاسمونات (۴۰ میکرومولار) در مقایسه با سایر تیمارها (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) در کشت سوسپانسیون سلول گونه *Tuberosa pueraria* تأثیر بیشتری بر افزایش تولید ایزوفلاونوئیدها دارد. بر اساس پژوهش Thiem و Krawczyk (۲۰۱۰)، تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در مقایسه با غلظت ۲۰۰ میکرومولار آن دارای اثر افزایشی بر محتوای ایزوفلاونوئیدهای کشت سوسپانسیون سلول گیاه کودزو (*Pueraria tuberosa*) است.

پژوهش‌های Samadi و همکاران (۲۰۱۴) در زمینه گیاه کنگر فرنگی (*ynara scolymus L.*) نشان داده‌اند کاربرد مقادیر زیاد متیل‌جاسمونات نه تنها افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل کالوس را در پی ندارد، تولید این ترکیبات را کم یا

نقش دارد. از آنجا که مسیر سنتز سالیسیلیک اسید (ترکیب فنلی طبیعی) با سایر ترکیبات فنلی مشترک است و این ترکیب نقش مهمی در بیوسنتز سایر ترکیبات فنلی دارد، افزایش آن در محیط کشت یکی از دلایل مقدماتی افزایش سنتز ترکیبات مسیر فنیل پروپانوئیدی در کالوس تلقی می‌شود (Dixon and Paiva, 1995; Mahdavian *et al.*, 2008; Shabani and Ehsanpour, 2010)؛ با وجود این، پژوهش‌ها نشان داده‌اند سالیسیلیک اسید همانند متیل جاسمونات می‌تواند در غلظت‌های زیاد وضعیت اکسایشی گیاه را بیش از حد توان آن تحت تأثیر قرار دهد و سبب مرگ گیاه شود؛ اما این تأثیر به عواملی نظیر گونه گیاهی، مرحله نمو گیاه، شیوه اعمال تیمار و در نهایت، غلظت و مدت زمان اعمال تیمار سالیسیلیک اسید وابسته است (Kovacic *et al.*, 2009). به موازات تغییرات بیشینه محتوای فنل و فلاونوئید کل کالوس‌ها، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نتیجه کاربرد غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات به غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر متیل جاسمونات و در نتیجه کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید به غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر سالیسیلیک اسید تعلق داشت که ارتباط تنگاتنگ تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با تجمع ترکیبات فنلی را نشان می‌دهد. گزارش‌های متعددی مبنی بر رابطه مستقیم محتوای فنلی عصاره‌های گیاهان رزماری (*Rosmarinas officinalis*)، نعناع (Elmasta *et al.*, 2006)، زنجبیل (*Mentha Spicata L.*) (Swetie *et al.*, 2007) و مریم گلی (*Salvia miltorhiza*) (et al., 2010)

متوقف می‌کند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند استفاده از ایستورها سبب افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در شرایط *in vitro* می‌شود که اغلب از طریق فعال‌سازی سازوکار دفاعی در برابر آن ایستور است (Mewis *et al.*, 2011). متیل جاسمونات از جمله ایستورهای زیستی است و می‌تواند تولید ROS را القا کند (Zhang and Xing, 2008) و اگرچه این ترکیبات در نقش پیامبر ثانویه در پاسخ‌های سلولی شرکت دارند، مقادیر زیاد آنها سبب آسیب شدید به سلول می‌شود (Mittler *et al.*, 2011)؛ به این ترتیب که رادیکال‌های آزاد تولید شده در غلظت‌های زیاد ایستور در واکنش با پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA سبب تغییر فعالیت یا غیرفعال شدن آنها می‌شوند و در نهایت، مرگ سلولی را القا می‌کنند (Chen *et al.*, 2008).

محتوای فنل و فلاونوئید کل در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید افزایش یافت؛ به طوری که رابطه مستقیمی بین افزایش محتوای این دسته از ترکیبات و روند افزایشی غلظت ایستور یاد شده مشاهده شد. در پژوهش Samadi و همکاران (۲۰۱۴) روی گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus*) مشخص شد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۱۰۰ میکروگرم در لیتر، تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مشاهده می‌شود. مشخص شده است سالیسیلیک اسید با ایجاد تنش کاذب سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL) می‌شود که در مسیر تولید ترکیبات محافظتی قوی مانند فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و دیگر ترکیبات فنلی

کاهش آنها را نیز در پی دارد؛ بنابراین، گذشته از نقش مفیدی که الیسیتورهای یادشده در تولید ترکیبات مؤثر دارویی این گونه گیاهان دارند، توجه به غلظت آنها مهم و ضروری است و کاربرد مقادیر بهینه ترکیبات یادشده در راستای بیش تولید متابولیت‌های دارویی اجتناب‌ناپذیر است و بایستی به آن توجه شود.

### سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با شماره کد طرح ۳/۴۰۴۳۰) سپاسگزاری می‌کنند.

### References

- Afshari poor, S. (1993) Principles of plant tissue culture. Isfahan University of Medical Sciences Press, Isfahan (in Persian).
- Alcazar, R., Delatorre, M., Rodriguez, B., Bruno, M. and Arnold, N. A. (1992) Neo-clerodane diterpenoids from three species of *Teucrium*. *Phytochemistry* 31(11): 3957-3960.
- Al-Qudah, T. S., Shibli, R. A., and Alali, F. Q. (2011) *In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47: 496-505.
- Arnon, D. and Hoagland, D. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Journal of Soil Science* 50: 463-485.
- Bagheri, A. and Saffari, M. (2008) Basis of plant tissue culture. Fourth edition. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad (in Persian).

(Dong *et al.*, 2010) با توان آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارند. Siddharthan و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی محتویات فنلی کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۳۳ گونه گیاه دارویی (از ۶۴ خانواده در هند) به رابطهٔ مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی کل این گیاهان اذعان داشته‌اند. پژوهش‌های Swetie و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده‌اند فعالیت آنتی‌اکسیدانی با محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاهان رابطهٔ مستقیم دارد. بررسی Kim و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده است افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های فنلی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در پی تیمار با متیل‌جاسمونات رخ می‌دهد؛ دلیل این ارتباط به ویژگی الکترون‌دهی فنل‌ها و تمایل به خنثی‌سازی ROSها نسبت داده می‌شود (Sadeghi *et al.*, 2015).

### نتیجه‌گیری

کلپوره، گیاهی ارزشمند از نظر ویژگی‌های دارویی است و هر روشی که با ایجاد کمترین آسیب و تغییر سبب تولید ترکیبات مفید دارویی آن شود، کارآمد و درخور توجه است. پژوهش حاضر نشان داد الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید می‌توانند موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ این گیاه در محیط کشت شوند؛ باوجوداین، افزایش غلظت این الیسیتورها تا غلظت بهینه می‌تواند تولید ترکیبات ثانویه را تحریک کند و کاربرد غلظت‌های بیشتر آن به دلایل مختلف از جمله کاهش توانایی سلول‌ها در پاسخ به افزایش غلظت الیسیتور و اثر تخریبی ناشی از آن، نه تنها سبب افزایش این ترکیبات نمی‌شود،

- Bedir, A., Arik, N., Adam, B., Kılınç, K., Gumus, T. and Guner, E. (1999) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. *Ace Genotype in Turkish Hypertensives* 12(10): 1038-1043.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Bourgaud, F., Grivot, A. and Goniter, E. (2002) Production of plant secondary metabolites. *Plant Science* 161: 839-851.
- Box, G. E. P. (1945) The exploration and exploitation of response surfaces: Some general considerations and examples. *Biometrics* 10: 16-60.
- Chaouche, T. M., Haddouchi, F. and Ksouri, R. (2013) Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium Majus* L. *Free Radical Antioxidant Journal* 3: 43-46.
- Chen, B., Huang, J., Wang, J. and Huang, L. (2008) Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16: 88- 92.
- Chu, Y. H., Chang, C. L. and Hsu, H. F. (2000) Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 561-566.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1085-1097.
- Dixon, R. N. and Gonzales, R. A. (1996) *Plant cell culture: A practical approach*. Oxford University Press. Oxford.
- Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in *Salvia miltorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148: 99-104.
- Dronne, S., Jullien, F., Caissard, J. C. and 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.
- Elmasta, M., Drietas, I., Isildak, O. and Aboul-Enein, H. Y. (2006) Antioxidant activity of S-Carone isolated from Spearmint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 29(10): 1465-1475.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K. and Hu, Y. (2012) Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cellular Research* 22: 1169-1180.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2010) Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 15(6): 4324-4333.
- Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. and Ozken, H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. longifolia. *Food Chemistry* 103: 1449-1456.
- Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerothanassis, I. P., Segura-Carretero, A. and 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, S. H. and Ramawat, (2008) Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum* 30(6): 849-853.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25: 3159-3173.

- Javidi Moghadam, 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 (in Persian).
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N. C. (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 54(6): 2327-2332.
- Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Azizi, G. and 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).
- Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repečak, M. (2009) Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report 28: 135-143.
- Kumar Verma, S., Kumar Das, A., Cingoz, G. S. and Usla, E. (2016) Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. Biotechnology Reports 10: 66-74.
- Lev-Yadun, S. (2001) Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. Journal of Theoretical Biology 210(3): 385-388.
- Mahdavian, K., Kalantari, K. M., Ghorbanli, M. and Torkzade, M. (2008) The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. Biologia Plantarum 52(1): 170-172.
- Mashreghi, M. and Niknia, S. (2012) The effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* alcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* O157. Jundishapur Journal of Microbiology 5(3): 511-515.
- Matkowski, A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. A review. Biotechnology Advances 26: 548-560.
- Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, K. (2013) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koochi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. Journal of Agricultural Biotechnology 4(2): 77-88 (in Persian).
- Mewis, I., Smetanska, I. M., Müller, C. T. and Ulrichs, C. (2011) Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. Cv. Gamay Fréaux. App. Biochemistry and Biotechnology 164: 148-161.
- Mirshekar, A., Honarvar, M., Mohammadi, F. and Alizadeh, A. (2014) Optimization of tissue culture of *Thymus daenensis* Celak. American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science 14(9): 949-953.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: The new wave? Trends Plant Science 16: 300-309.
- Moghtader, M. (2009) Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 5(6): 843-846.
- Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009) Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology 166: 180-191.
- Nadimi, M., Zia, M. and Madani, M. (2013) The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Teucrium polium* on *Candida albicans* and two species of *Malassezia*. Zahedan Journal of Research in Medical Science 15(8): 34-38.
- Oksman-Caldentey, K. M. and Inzé, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce

- designer secondary metabolites. Trends Plant Science 9(9): 433-440.
- Padulosi, S. and Hadj-Hassan, A. (1998) Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia: genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. In Report of the IPGRI Workshop, 14-17 December, Irbid, Jordan.
- Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A. (2010) *In vitro* antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts. Chiang Mai Journal of Science 37(3): 489-497.
- Rao, S. R. and Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.
- Sadeghi, Z., Valizadeh, J. and Azizian Sharme, O. (2015) Evaluation of total phenol, flavonoid and antioxidant activity of Pistacia atlantica Gum from Saravan, Sistan and Baluchestan Province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants 10(3): 18-26 (in Persian).
- Sahraroo, A., Babalar, M. and Hessein, M. (2014) *In vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iran Journal Pharamaceutical Research 13(2): 1447-1456.
- Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and 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 (in Persian).
- Sarkheill, 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.
- Sayed-Tabatabae, B. E. and Omid, M. (2011) Plant cell and tissue culture. Tehran University Press, Tehran.
- Shabani, L. and Ehsanpour, A. A. (2010) Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in in vitro culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Biology 22(4): 691-703 (in Persian).
- Shahwar, D., Asam Raza, M., Bukhari, S. and Bukhari, G. (2012) Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from Eucalyptus and Curcuma species. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(3): 1633-1636.
- Siddharthan, S., Yi-Zhong, C., Harold, C. and Mei, S. (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry 102: 938-953.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.
- Soltanipoor, M. M., Mohamadi, A., Rahnama, H. and Abbaszadeh, B. (2011) Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Journal of Agronomy and Plant Breeding 7(1): 45-54.
- Swetie, R., Raesh, Ch. and Arun, S. (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiation processed lamb meat. Food Chemistry 100(2): 451-458.
- 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.
- Toivonen, L. (1993) Utilization of hairy root culture for production of secondary metabolites. Biotechnology Progress 9: 12-29.
- Zhang, L. and 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 Cell Physiology* 49(7): 1092-1111.

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: 555-559.