بررسی اثر برخی ایلیسیتورها و پیش‌سازهای متابولیتی بر فعالیت آنزیمی کالوس دو گونه سرخدار در شرایط درون شیشه‌ای

مژده باقری نسب[1]،عظیم قاسم نژاد[2*]،خدایارهمتی[3]،علیرضا صادقی پور[4]

1-دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، ایران

2-دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.* نویسنده مسئول، ایمیل ghasemnezhad@gau.ac.ir

3-دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

4-دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، ایران

چکیده

سرخدار به دلیل داشتن ترکیب ارزشمند پاکلی‌تاکسل از ارزش دارویی بالایی برخوردار است؛ با این وجود، رشدکند این گیاه و مقادیر بسیار پایین این ترکیب دارویی و خطر انقراض گیاه، استخراج تاکسل از گیاه هزینه بردار بوده و تولید آن نیازمند روش‌های جایگزین است. بهینه‌سازی محیط کشت اعم از محیط کشت زی توده و متابولیت از اهداف اصلی درون شیشه‌ای کشت این گیاه محسوب می‌شود. تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر برخی از ایلیسیتورها بر میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پاکلی‌تاکسل با هدف بهینه‌سازی تولید این ترکیب در شرایط درون شیشه انجام شد. به منظور تولید کالوس ریزنمونه‌های گونه *T.baccata* و *T.brevifoli* در محیط B5 حاوی NAA (2 mg/l)، 2,4-D (0/2mg/l)، kin (0/2mg/l) کشت شد. کالوس به دست آمده در محیط حاوی ایلیسیتورهایی چون اسیدسالیسیلیک (80 میلی‌گرم در لیتر)، متیل‌جاسمونات (100میکرومولار)، اسیدسینامیک (0/25 مولار)، و ترکیب آن‌ها کشت شد. همچنین اثر فنیل‌آلانین (0/1 میلی‌مولار) به عنوان پیش ماده فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نیز مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در نهایت اثر تیمارهای ذکر شده بر فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز کالوس‌های تیمار شده ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که کاربرد تیمارهای آزمایشی و همچنین اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه موثر بود. نتایج نشان داد که متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پلی‌فنل‌اکسیداز شد. همچنین در ترکیب متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیشترین مقدار نسبت به شاهد بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های مطالعه شده بدون در نظر گرفتن اثر تیمار تحت تاثیر گونه متفاوت بود.

واژه کلیدی: سرخدار،تاکسول، فنیل آلانین آمونیالیاز، پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز

مقدمه

گیاهان یکی از مهمترین اجزای طبیعت در تامین نیازهای انسان هستند. علاوه بر تامین نیازهای ضروری، گیاهان با داشتن مواد موثره ویژه (متابولیت‌های ثانویه) از دیرباز جایگاه ویژه‌ای در تامین داروهای موردنیاز بشر داشتند. در طی دهه 60 انستیتو ملی سرطان (NCI) تحقیقاتی را روی اثرات ضد سرطانی گیاهان شروع کرد و درنهایت Taxol کشف شد (Itokawa and Lee, 2003). مهمترین منبع طبیعی تامین تاکسل، گونه‌های مختلف جنس سرخدار می‌باشد. در مقایسه یا سایر منابع، گیاهان سرخدار دارای غلظت بیشتری از تاکسوئیدها می‌باشند. سرخدار از خانواده تاکساسه، درختی همیشه سبز با دیرزیستی طولانی و دوره بذردهی نامنظم است میزان تاکسل در گیاه بسیار اندک است به‌طوری‌که نسبت وزن تاکسل تولیدی به وزن پوست گیاه برابر با 6700:1 می‌باشد. به همین دلیل برای استخراج یک کیلوگرم تاکسل خالص لازم است 6/7 تن پوست درخت فراهم شود که به این منظور 2000-3000 درخت موردنیاز است. جداسازی پوست این درختان سبب آسیب جدی و درنهایت نابودی آن‌ها می‌شود (Guo and Tang, 2006). کشت بافت گیاهی یکی از شاخه‌های علم بیوتکنولوژی است که می‌توان با استفاده از کشت سلول، بافت یا اندام گیاهی در شرایط درون شیشه امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و همچنین تولید مواد موثره را فراهم ساخت. در این راستا تولید ترکیبات ضد سرطان توسط کشت بافت شماری از گیاهان به اثبات رسیده است (Wickremesinhe and Arteea, 1993). بنابراین نخستین گام برای تولید پاکلی‌تاکسل می‌تواند کشت بافت سرخدار باشد (Agrawal et al., 2005 and Hien et al., 2004). کشت‌های سلولی میزان کمی از فراورده مطلوب را تولید می‌کنند و برای رسیدن به عملکرد تجاری بایستی راندمان تولید را به میزان زیادی افزایش داد (wilson et al 2018). استفاده از پیش‌سازها و الیسیتورها در محیط کشت گیاه یکی از مهمترین روش‌های افزایش بازده تولید محسوب می‌شود. الیسیتورها، محرک تولید متابولیت‌های ثانویه با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که در کشت‌بافت گیاهی مورداستفاده قرار می‌گیرند (Twaij et al., 2019). کاربرد الیسیتورها در محیط رشد گیاه تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند و الیسیتورها با انتقال پیام به گیرنده‌های غشای سلول‌ها باعث ایجاد پاسخ دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شوند (Sarmadi et al., 2018). محرک‌های به‌کاررفته بسیار متنوع‌اند و روی مسیرهای مختلفی از بیوسنتز تاکسل دخالت دارند. (Yuan et al., 2002). اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات، اسید سینامیک جز الیسیتورهای غیر زیستی هستند که علاوه بر داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان ملکول پیام رسان باعث القا پاسخ دفاعی گیاه می‌شوند (Singh and Dwivedi, 2018) و (Shilpa and Lakshmi, 2019). همچنین فنیل‌آلانین که از پیش‌سازهای تولید تاکسول و ترکیبات فنلی گیاه است می‌تواند به عنوان محرک به کار برده شود (Wang et al., 2016). متیل جاسمونات (MeJA) عمدتا در گیاهان وجود دارد و نقش مهمی در رشد و نمو گیاه ، تنظیم سوخت و ساز بدن و القای بیان ژن مرتبط با دفاع دارد. گیاهان در شرایط استرس بیوتیکی افزایش قابل توجهی در محتوای اسید جاسمونیک درون زا دارند. علاوه بر این، استفاده از متیل جاسمونات خارجی می تواند مقاومت سیستمیک گیاه را در برابر بیماری‌ها و توانایی تحمل استرس‌ها را افزایش دهد. به عنوان مثال، متیل جاسمونات مقاومت اکالیپتوس در بیماری سفیدک پوستی (Guo et al., 2018) کیوی در برابر پوسیدگی نرم درپس از برداشت محصول (پن و همکاران، 2019) و گندم به زنگ زدگی (یو و همکاران، 2016) گزارش شده است. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و پلی فنل اکسیداز، از آنزیم‌هایی هستند که در پاسخ دفاعی فعال می‌شوند (Mishra and Sharma, 2019). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با رادیکال‌های آزاد حاصل از تنش مقابله می‌کند و بدین طریق از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کند (Sarmadi et al., 2018). آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)، آنزیم

کلیدی در پاسخ به تنش‌های محیطی است و در تولید زنجیره جانبی تاکسان نقش دارد (Rahpeyma et al., 2017). همچنین امکان تبدیل اسیدآمینه فنیل‌آلانین به ترانس اسیدسینامیک (که پیش ماده اصلی تولید ترکیبات فلاونوئیدی و لیگنین‌ها است) را فراهم می‌کند (Achnine et al.,2004). بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب در دسترس قرارگیری بیشتر زنجیره جانبی برای تولید تاکسل و افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوئیدی می‌گردد (Bagal et al., 2012). اضافه کردن اسیدسینامیک به محیط کشت باعث کاهش فعالیت آنزیم PAL می‌شود (Brincat et al., 2002) در نتیجه فنیل‌آلانین بیشتری در دسترس خواهد بود، فنیل‌آلانین از ترکیبات پیش‌ساز موثر در مسیر بیوسنتز تاکسل است که در ترکیب با باکاتین III تولید N-debenzoyltaxol می‌کند (Kusari et al.,2014) و (Malik et al., 2011). فنیل‌آلانین توسط آنزیم فنیل‌آلانین‌آمینوموتاز (PAM) به N-debenzoyltaxol تبدیل می‌شود (Brincat et al., 2002). در نتیجه اسیدسینامیک موجب کاهش فعالیت PAL و پیشرفت فنیل‌آلانین توسط آنزیم فنیل‌آلانین‌آمینوموتاز در جهت تولید تاکسل می‌شود.

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم های باارزشی چون پلی فنیل آمونیالیاز، پلی فنول اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در *T.baccata* و *T.brevifolia* طراحی و اجرا شد.

مواد و روش:

در این تحقیق از محیط کشت B5 و زغال فعال و هورمون 2,4-D و کینتین به منظور کالوس‌زایی، و محیط ذکرشده همراه با محرک‌های اسیدسالیسیک، متیل جاسمونات، فنیل‌آلانین، اسیدسینامیک به منظور بررسی فعالیت آنزیمی استفاده شد.

سترون‌سازی ریزنمونه

از شاخه‌های جوان دو گونه باکاتا و بریویفولیا نمونه تهیه شد. گونه باکاتا از باغ گیاهشناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گونه بریویفولیا از باغ گیاهشناسی ملی نوشهر جمع‌آوری شد. پس از تهیه و به منظور ضدعفونی کردن، ریزنمونه‌ها در آب معمولی حاوی مایع ظرفشویی به مدت ده دقیقه قرارداده شده و سپس با آب روان شسته شدند. ریز نمونه‌ها با الکل ٪70 به مدت15 ثانیه و هیپوکلرید سدیم 5٪ کلر فعال با یک قطره مایع به مدت 25 دقیقه ضدعفونی شد. بعد از الکل یک‌مرتبه ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل و بعد از هیپوکلرید سدیم ریزنمونه‌ها 5 مرتبه به مدت 2، 3 و 5 دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در نهایت از اندام‌های گیاهی ضدعفونی شده ریز نمونه‌هایی به‌اندازه یک سانتیمتر تهیه و در محیط کشت B5 با هورمون غلظت یکمیلی‌گرم در لیتر اکسین (2,4-D)[1] در ترکیب با غلظت‌های 0/2 میلی‌گرم در لیتر کنیتین و 3 تکرار با رعایت شرایط استریل کشت شده و به اتاق رشد با دمای 26-24 و شرایط نوری 8-16 تاریکی –روشنایی منتقل شدند.

اعمال تیمار

محیط B5 که در القای کالوس به‌کاربرده شد، همراه با هورمون‌های 2,4-D و کینتین با همان غلظت استفاده شده تهیه شده و در ارلن‌های جداگانه توزیع و هرکدام از تیمارهای آزمایش شامل محرک‌های متیل جاسمونات (100 µmol/l)، اسید سالیسیلیک (80 mg/l)، که این میزان بهینه برای هر کدام از محرک‌ها بیان شده است (Zhang et al., 2011)، و اسیدسینامیک (0/25mM) (Brincat et al., 2002) و فنیل آلانین (0/1mM) (Khosroushahi et al., 2006) به صورت 1) اسید سالیسیک 80 میلی‌گرم در لیتر، 2) متیل جاسمونات 100 میکرو گرم در لیتر،3) سینامیک اسید 0/25میلی مولار، 4) فنیل آلانین 0/1میلی مولار، 5) اسیدسالیسیلیک 80 میلی‌گرم در لیتر همراه با متیل جاسمونات 100 میکروگرم در لیتر، 6) اسیدسالیسیلیک80 میلی‌گرم در لیتر همراه با سینامیک-اسید 0/25میلی‌مولار 7) اسیدسالیسیلیک 80 میلی‌گرم در لیتر همراه با فنیل‌آلانین 0/1 میلی مولار، 8) متیل

[1] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

جاسمونات 100 میکروگرم بر لیتر همراه با اسیدسینامیک میلی مولار، 9) متیل‌جاسمونات 100میکروگرم برلیتر همراه با فنیل‌آلانین 0/1میلی مولار ، 10) اسیدسینامیک 0/25میلی‌مولار همراه با 0/1 میلی مولار فنیل‌آلانین و 11) اسیدسالیسیک 80 میلی گرم در لیتر× متیل‌جاسمونات 100 میکرو گرم در لیتر× اسیدسینامیک 0/25میلی مولار × فنیل‌آلانین0/1 میلی مولار 12)کنترل در 3 تکرار که درهر تکرار تعداد یک ریزنمونه بود.

اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز 0/3 گرم از کالوس تازه با 6/5 ml از بافر تریس-اسید هیدروکلریدریک (50 mM) با PH=8/ 8 شامل 15mM از بتا-مرکاپتواتانول درون هاون چینی روی یخ ساییده شده تا همگن شود. نمونه در سانتریفیوژ یخچال دار دور 50000 g به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و فاز بالایی به‌عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش آنزیم PAL مورداستفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم شامل 600 میکرولیتر بافر تریس 50 میلی‌مولار با اسیدیته 8/8، 900 میکرولیتر فنیل‌آلانین 2 میلی‌مولار و 800 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصل در مدت‌زمان 10 و 20 دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد و سپس واکنش تولید اسیدسینامیک حاصل از فنیل‌آلانین با اضافه کردن 100 میکرولیتر اسیدکلریدریک 2 نرمال متوقف شد. در مرحله بعد 2 میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت 30 ثانیه ورتکس گردید و مخلوط حاصل در 5000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب بخش شفاف بالایی که حاوی ترانس اسیدسینامیک است، در طول‌موج 290 نانومتر بوسیله اسپکتوفتومتر خوانده شد. ضریب خاموشی ترانس اسیدسینامیک 2000 لیتر برمیلی‌مول بر سانتی‌متر است و مقدار فعالیت آنزیم بر اساس مقدار اسیدسینامیک تولید شده در 10 و 20 دقیقه محاسبه شد (وتن و سدروف 1992).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

جهت استخراج آنزیم سوپراکسیددیسموتاز 0/2 گرم کالوس تازه با 2 میلی‌لیتر بافرفسفات مونوسدیم 50 میلی‌مولار (pH=7) در هاون سرد کاملا کوبیده شد. عصاره حاصل در سانتریفیوژ با دورrcm 15000 در دقیقه و دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. از فاز شفاف بالایی بدست آمده جهت سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

مواد و محلول‌ها :

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD; EC 1.15.1.1) بر اساس میزان مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم توسط ریبوفلاوین اندازه‌گیری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). مخلوط واکنش در حجم نهایی 3 میلی‌لیتر حاوی 2/250 میلی-لیتر بافر 50 میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH 7.8)، 200 میکرولیتر EDTA (0/66 میلی‌مولار)، 300 میکرولیتر متیونین (10 میلی‌مولار)، 150 میکرولیتر NBT (66 میکرومولار)، 50 میکرولیتر ریبوفلاوین (3/35 میکرومولار) و50 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش در کووت‌های شیشه‌ای شفاف در دمای 25 درجه سانتیگراد و تحت تابش نور سفید با شدت یکسان برای کلیه نمونه‌ها انجام شد. کووت ویژه‌ای برای هر نمونه به عنوان بلانک (شاهد زمان صفر واکنش) در تاریکی قرار گرفت. بعد از تابانیدن نور به مدت 15 دقیقه، جذب نور در طول موج 560 نانومتر خوانده شد و اختلاف جذب زمان صفر و 15 دقیقه تعیین گردید. قابلیت مهارکنندگی احیای نوری نیتروبلوتترازولیم توسط عصاره آنزیمی هر نمونه در مقایسه با اختلاف جذب نور زمان صفر و 15 دقیقه واکنش شاهد (فاقد آنزیم) مطابق فرمول زیر تعیین گردید. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز معادل با 50 درصد مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم به فورامازون تعریف شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس واحد سوپراکسیددیسموتاز بر دقیقه بر گرم وزن تر گزارش شد.

$$(\text{Unit})/_{\text{min}} = 2\left(1 - \frac{\Delta A \text{ واکنش هر نمونه}}{\Delta A \text{ واکنش شاهد}}\right)$$

استخراج عصاره‌ی آنزیمی پلی‌فنل‌اکسیداز

مقدار 0/1 گرم کالوس با 2 میلی‌لیتر بافر فسفات مونو سدیم 0/2 مولار (pH=6.2) حاوی پلی‌وینیل‌پلی-پریلیدون 2/5 درصد وزنی/حجمی (PVPP) و 2 درصد حجمی/حجمی تریتون (TritonX-100) در هاون چینی سرد و در ظرف یخ کاملاً سائیده شد. بافت استخراج شده-ی حاصل به مدت 15 دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت 14000g دور در دقیقه و دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ فاز بالایی بعنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Kar and Mishra, 1976).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ابتدا 3 میلی‌لیتر مخلوط واکنش که شامل 2800 میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH 7)، 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی کالوس و 100 میکرولیتر پیروگالل است، تهیه گردید. به این منظور واکنش با اضافه کردن پیروگالل آغاز می‌گردد. مخلوط واکنش شاهد، شامل 2900 میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH 7) و 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی است (غلظت نهایی پیروگالل در مخلوط واکنش برابر 0/01 میلی‌مولار می‌باشد). تغییرات جذب نور در طول موج 420 نانومتر اندازه‌گیری شد (Kar and Mishra, 1976). تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز براساس تولید پورپوروگالین از پیروگالل با ضریب خاموشی 2/47 لیتر بر میلی‌مول بر سانتیمتر محاسبه گردید (Resend et al., 2002).

اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

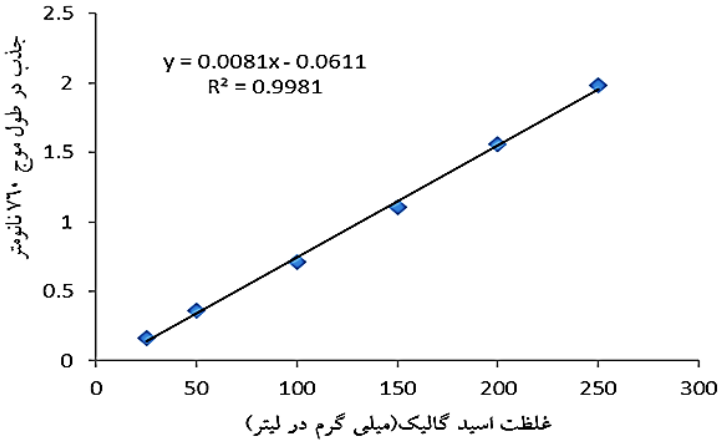
در این آزمایش، از روش درصد مهار رادیکال‌های دی پی پی اچ (DPPH) استفاده شد (میلیوسکاس و همکاران، 2004) ابتدا 1 میلی‌لیتر از DPPH با غلظت 0/1 میلی‌مولار (2 میلی‌گرم DPPH به 50 میلی‌لیتر متانول) به لوله‌آزمایش اضافه و سپس 1 میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه‌شده به آن افزوده شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت 30 دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. بعد از پایان واکنش، جذب نمونه‌ها بی‌درنگ با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS 2800) در طول‌موج 517 نانومتر قرائت و از متانول به‌عنوان بلانک استفاده شد. افزون بر نمونه‌های مذکور، یک لوله‌آزمایش به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که تنها حاوی 2 میلی‌لیتر DPPH و 2 میلی‌لیتر متانول بود. فعالیت مهار رادیکال DPPH از فرمول درصد فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال محاسبه شد:

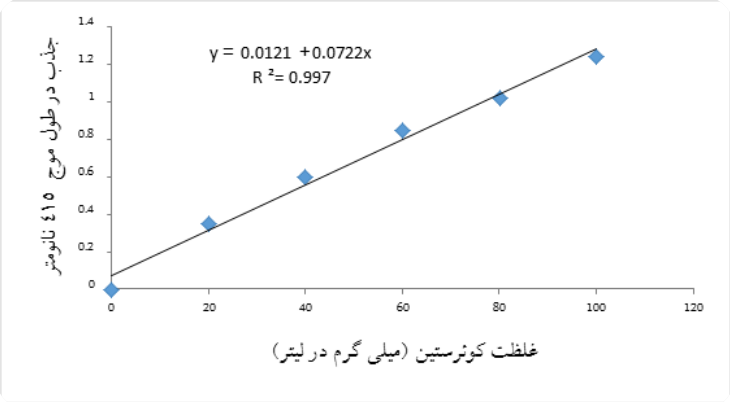
$$\text{DPPH} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد (اسلینکارد و همکاران، 1977). بدین منظور 20 میکرولیتر از عصاره متانولی (0/25 گرم در 2/5 میلی‌لیتر متانول 80٪) با 100 میکرولیتر فولین‌سیوکالتیو[1] و 1/16 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و پس از 5 الی 8 دقیقه استراحت، 300 میکرولیتر کربنات سدیم[2] یک مولار (10/6 گرم در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت 30 دقیقه در تاریکی و حمام بخار 40 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درنهایت نمونه‌ها در طول‌موج 765 نانومتر قرائت شدند. در نمونه شاهد نیز به‌جای عصاره، از متانول 80 درصد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد اسید گالیک[3] (5، 10، 20، 50، 100، 200 و 250 میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. سپس با استفاده از معادله خط نشان داده شده درشکل 1 با قرار دادن عدد جذب نمونه به‌جای y میزان فنل (x) برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن‌تر بدست آمد.

[1] Folin-Ciocalteu
[2] Sodium carbonate
[3] Gallic acid





شکل(1) بالا، منحنی استاندارد اسید گالیک و پایین، منحنی استاندارد کوئرستین

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش آلومینیوم کلراید[1] استفاده شد (چانگ و همکاران، 2002). بدین‌جهت ابتدا 0/5 میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با 1/5 میلی‌لیتر متانول، 0/1 میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید 10٪ در اتانول (10 گرم آلومینیوم کلرید در 100 میلی-لیتر اتانول و آب مقطر)، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم[2] یک مولار (2/41 گرم در 10 میلی‌لیتر آب مقطر) و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نمونه شاهد به‌جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد. مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد و سپس بلافاصله در طول موج 415 نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد کوئرستین (0، 5، 10، 20، 50، 100، 200 میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. با استفاده از معادله خط حاصل از آن با قرار دادن عدد جذب نمونه به جای y میزان فلاونوئید (x) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر بدست آمد (نمودار2).

نتایج و بحث

اثر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم‌سوپراکسیددیسموتاز کالوس سرخدار

همان‌طور که در شکل (2) نشان داده است، بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در

[1] Alominium chloride

[2] Potassium acetat

تیمار متیل‌جاسمونات همراه با اسیدسالیسیلیک و کمترین به‌تنهایی، اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین، اسیدسالیسیلیک ومتیل‌جاسمونات) به‌جز اسیدسالیسیلیک و اسیدسینامیک فعالیت آنزیم نتایج مشابه داشت.

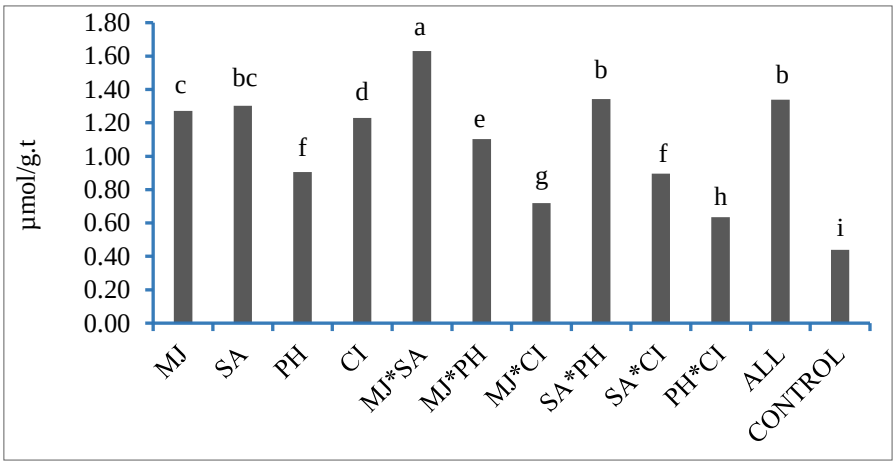
همچنین در بین محرک‌ها، کمترین میزان افزایش نسبت به شاهد در تیمار فنیل آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد. اولین پاسخ دفاعی مهم گیاه در برابر تیمار با محرک‌ها (الیسیتورها)، ایجاد تنش اکسیداتیو است (Wei et al., 2020). استرس اکسیداتیو منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) می‌شود (Sarmadi et al., 2018). این گونه‌ها می‌توانند منجر به ایجاد میزان آن در نمونه شاهد مشاهده شد. در تیمارهایی که رادیکال‌های آزاد مضر شوند که سبب پراکسیداسیون لیپید و دناتوره‌شدن (denaturing) پروتئین می‌شوند (Mitler, 2002). هنگامی که گیاه در برابر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیددیسموتاز و یا افزایش ترکیبات مشخص سبب کاهش H_2O_2 و گونه‌های فعال اکسیژن(ROS) حاصل از تنش اکسیداتیو شده، و اینگونه از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کند (Alscher et al.,2002) و(Karimi and Souri, 2016) .

جدول 1: تجزیه واریانس اثرساده تیمار و گونه و اثر متقابل تیمار و گونه برفعالیت آنزیم SOD، PPO و PAL

منابع تغییر	Df	SOD	POP	PAL
		مقدار F	مقدار F	مقدار F
تیمار	11	707/148**	6631/00**	11220/00**
گونه	1	189/594**	33860/00**	4/059**
تیمار×گونه	10	76/065**	340/869**	117/829**

ns،*،**ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح 5٪ و 1٪ را نشان می‌دهد.

تاثیر استفاده از محرک‌ها بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مریم‌گلی (Dong et al., 2010) آرابیدوپسیس (Jung, 2004) و ژنوتیپ‌های گندم (Agarwal et al., 2005) و توت‌فرنگی (wang, 1999) گزارش شده است.



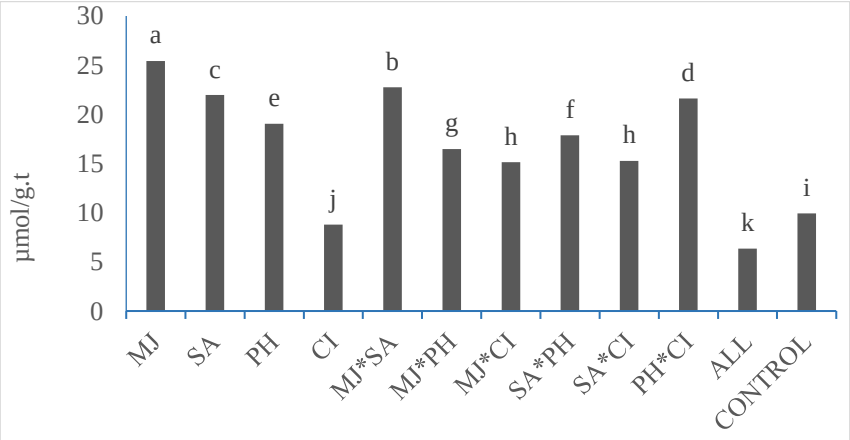
شکل2-تاثیر محرک‌ها بر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز.

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA* CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH* CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، Control: شاهد

تاثیر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

باتوجه به شکل3، همه محرک‌های بکار برده شده اثر معنی‌داری در تحریک فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نسبت به شاهد نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار متیل‌جاسمونات و کمترین میزان آن در تیمار ترکیبی متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک و در نهایت اسیدسینامیک اتفاق افتاد. اسیدسینامیک باعث کاهش فعالیت پلی-فنل‌اکسیداز نسبت به شاهد به میزان 1.137µmol/g.t شد. اما استفاده از آن در ترکیب با متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک حدودا 5.34 µmol/g.t و همچنین همراه با فنیل‌آلانین بیش از دوبرابر نسبت به شاهد فعالیت PPO را افزایش داد. استفاده از متیل‌جاسمونات به تنهایی اثر بیشتری نسبت به استفاده همزمان متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک داشت که می‌تواند ناشی از همبستگی منفی این دو تیمار باهم نسبت به استفاده به تنهایی از متیل‌جاسمونات باشد. با توجه به نتایج، اسیدسالیسیلیک در ترکیب با متیل‌جاسمونات نسبت به حالتی که به‌تنهایی به کار برده شد اثر افزایشی بیشتری بر فعالیت PPO داشت. در مقابل در ترکیب با فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک افزایش کمتری نشان داد (شکل3).

استفاده از ترکیب تیماری متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل آلانین و اسیدسینامیک همبستگی منفی نسبت به شاهد نشان داد. همچنین در بین نمونه-هایی که دو تیمار باهم به کار برده شد، تیمار متیل‌جاسمونات همراه با اسیدسالیسیلیک بیشترین افزایش را نشان داد. متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک باعث تحریک ژن درگیر در بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، فنیل پروپانوئید و آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) که در پاسخ دفاعی نقش دارد، می‌شود (Sarmadi et al., 2018). همچنین استفاده از فنیل‌آلانین که از پیش ماده‌های اصلی مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی بوده که باعث افزایش فعالیت PPO می‌شود (Edahiro et al., 2005). اسیدهای فنلیک، شامل اسیدسینامیک و مشتقات آن، که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند به عنوان بازدارنده‌های کارآمد در فرآیند قهوه‌ای شدن بوده و در نتیجه باعث مهار فعالیت PAL که فرآیند قهوه‌ای شدن را در گیاه کاتالیز می‌کند، می‌شود. تاثیر محرک‌ها بر فعالیت PPO در سرخدار (Jalalpour et al., 2014) و (Sarmadi et al., 2018) سیب (Gacche et al., 2004) مریم‌گلی (Dong, 2010) قبلا گزارش شده است.



شکل3-تاثیر محرک‌ها بر فعالیت پلی فنل اکسیداز.

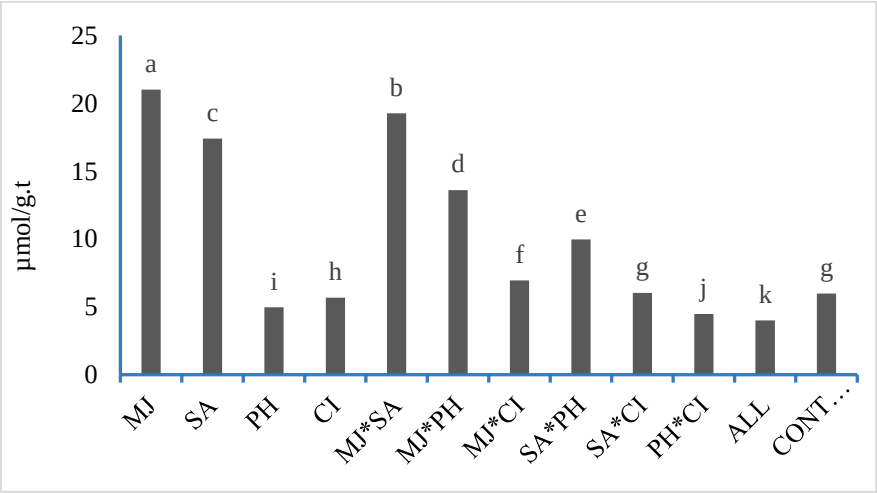
MJ :متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل جاسمونات*فنیل آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر محرک بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) تحت تاثیر تیمارها معنی‌دار شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در نمونه‌های کالوس تیمار شده با متیل‌جاسمونات مشاهده شد. به‌طوری‌که فعالیت 3/3 برابری در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل4). همچنین از تیمارهای ترکیبی، تیماری همزمان متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک اثر بیشتری بر فعالیت آنزیم PAL داشت.

کمترین میزان فعالیت PAL در تیمار تلفیقی متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد (شکل 4). فنیل آلانین به میزان µmol/g.t 1.025 واسیدسینامیک µmol/g.t 0.301 و کاربرد همزمان فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک µmol/g.t 1.503 موجب کاهش فعالیت PAL نسبت به شاهد شد .مقدار این کاهش تحت تاثیر کاربرد فنیل‌آلانین به تنهایی بیشتر بود. کاربرد فنیل‌آلانین همراه با متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک به ترتیب افزایش بیشتر فعالیت PAL را به همراه داشت. همچنین در مقایسه با شاهد، استفاده توام اسید سینامیک، اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت PAL شد. PAL آنزیم کلیدی در تشکیل ترکیبات فنلی در مسیر فنیل پروپانوئید و همچنین پاسخ دفاعی گیاه می‌باشد (Zhang, and Liu, 2015) و (Wang et al., 2006). نشان داده شد که تحریک سلول گیاهی با متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک، سبب القاء تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت PAL می‌شود (Wang et al., 2007) و (صمدی و همکاران، 2015). فنیل‌آلانین از پیش ماده‌های مهم دو مسیر جدا از هم شامل مسیر بیوسنتز تاکسل و همچنین بیوسنتز ترکیبات فنلی است. چون فنیل‌آلانین هردو زنجیره جانبی فنیل ایزوسرین در مسیر فنیل پروپانوئید و بخش بنزویل در کربن شماره2 تاکسل را فراهم می‌کند (Edahiro et al., 2005) و (Steele et al., 2005) ، انسداد مسیر فنیل پروپانوئید می‌تواند فنیل‌آلانین را به سمت تولید تاکسل پیش ببرد (Cusido et al., 1999). فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز اولین آنزیم درگیر در مسیر فنیل پروپانوئید است که فنیل‌آلانین را به اسیدسینامیک تبدیل می‌کند (Baranek et al., 2012). اضافه کردن مهارکننده‌های این آنزیم می‌تواند نقطه کنترل برای تبدیل فنیل‌آلانین به اسیدسینامیک باشد. اسیدسینامیک به عنوان مهارکننده فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، فعالیت آنزیم را 40-50٪ کاهش می‌دهد (Brincat et al., 2002). با افزایش حضور فنیل‌آلانین در محیط کشت رقابت به سمت تولید تاکسل پیش می‌رود در نتیجه از فعالیت PAL کاسته می‌شود (Cusido et al., 1999) و (Brincat et al., 2002). در بررسی حاضر استفاده همزمان فنیل‌آلانین و سینامیک نسبت به حالتی که هرکدام از تیمارها به‌تنهایی به کار برده شدند، تاثیر بیشتری درکاهش فعالیت PAL نشان داد (شکل4). این امر می‌تواند به همبستگی مثبت این دو تیمار در جهت مهار فعالیت PAL باشد (Brincat et al., 2002). همچنین ترکیب متیل‌جاسمونات × اسیدسالیسیلیک × فنیل‌آلانین × اسید سینامیک باعث مهار فعالیت PAL شده که می‌تواند ناشی از اثر آنتاگونیستی این تیمارها نسبت به هم باشد. گاهی موارد یک توده سلولی مجزا ممکن است به دلیل ضعیف بودن سیستم آنزیمی و یا بیان ناکافی ژن‌های بیوسنتز کننده مرتبط و یا فقدان محرک‌های محیطی، فرایند بیوسنتز تکمیل نشود. بنابر این بیان حداقلی ژنهای مرتبط به آنزیم‌های بیوسنتز کننده در بخشی از مسیر ممکن است با تغذیه خارجی سلول‌ها تقویت شده و در نهایت متابولوم مورد نظر تشکیل شود (Matkoweski, 2008). حتی در برخی مواقع می تواند با حذف کانال متابولیکی منحرف

کننده پیش‌سازها مفید باشد (Edahiro et al., 2005). گزارش در مورد سرخدار (Cusido et al., 1999) ، (Sarmadi et al., 2018) ، (Wu and Lin, 2003) ، (Zhang et al., 2002) (Yuan et al., 2001) ، (Wang et al., 2006) و (Brincat et al., 2002). نتایج همسو را گزارش نمودند.

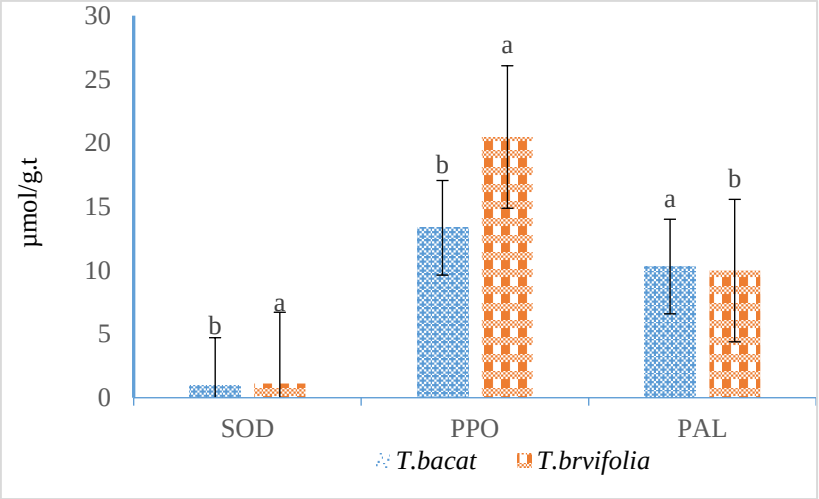


شکل 4-اثر محرک‌ها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI:اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL:اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر نوع گونه بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز

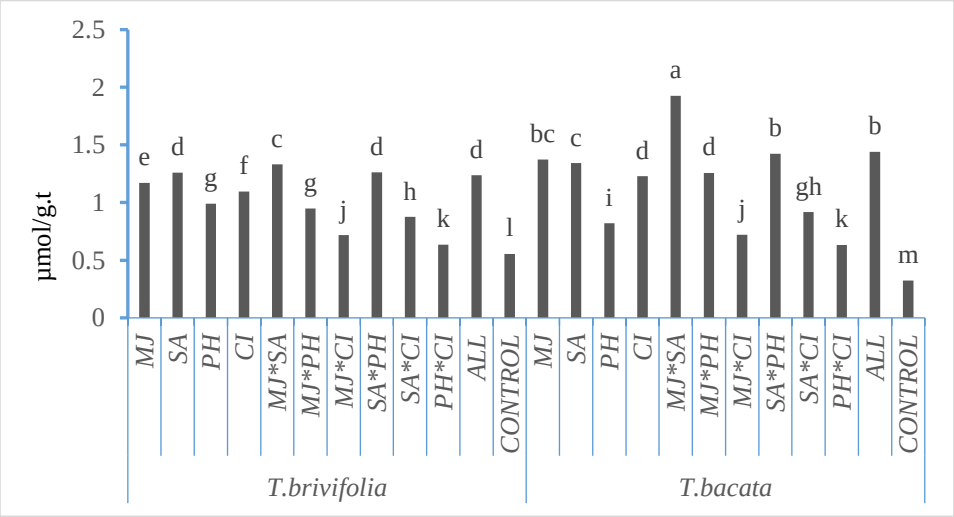
فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) تحت تاثیر نوع گونه تفاوت معنی‌داری داشت(شکل 5). به طوری‌که میزان فعالیت SOD و PPO در گونه بریویفولیا نسبت به گونه باکاتا بیشتر بود. در مقابل فعالیت PAL در گونه باکاتا نسبت به بریویفولیا بیشتر بود.. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، آنزیم PAL در تشکیل زنجیره جانبی تاکسل نقش دارد و افزایش بیان آن می‌تواند تکمیل ساختار تاکسل از طریق افزایش زنجیره جانبی برای تولید این ترکیب با ارزش تلقی شود (Wang et al., 2006). از شکل4 مشخص است که فعالیت آنزیم PPO درگونه بریویفولیا افزایش قابل توجه‌ای نسبت به آنزیم PAL و PPO در دو گونه داشت. با این وجود نشان داده شده است که در سرخدار گونه *Chinensis* (Wang et al., 2007) ، (Yuan et al., 2001) ، (Wu and Lin, 2003) ، *yunnanensis* (Wang et al., 2006) ، گونه *baccata* (Jalalpour et al., 2014) ، (Sarmadi et al., 2018) (Cusido et al., 1999) وگونه *brevifolia* (Zhang et al., 2002) روند تغییرات آنزیمی مشابه بوده است.



شکل 5- مقایسه دو گونه سرخدار از نقطه نظر فعالیت آنزیمی

اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول 1)، اثر متقابل گونه و تیمار معنی‌دار شد. با توجه به شکل (5) بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار توام متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک در گونه باکاتا مشاهده شد. به‌طور کلی محرک‌های استفاده شده به میزان بیشتری گونه باکاتا را در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به گونه بریویفولیا تحت تاثیر قرار دادند (شکل6). مقایسه نمونه شاهد هر دو گونه نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم در گونه بریویفولیا بدون تاثیر محرک‌ها بیشتر بوده که بیانگر توانمندی ژنتیکی بالاتر گونه باکاتا در پاسخ به محرک‌ها، که به‌نوعی پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو است، می‌باشد. پایین بودن میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه شاهد کالوس گونه باکاتا بیانگر این مطلب است. بنابراین تیمار سلول‌های کالوس با محرک‌هایی چون اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات و پیش سازهایی متابولیتی فنیل آلانین و اسید سینامیک، به دلیل پدیده انتقال زیستی، تاثیر مثبتی بر فعالیت آنزیم-های کلیدی آنتی‌اکسیدانی مطالعه شده و آنزیم مهم PAL دارد.



شکل 6-اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز.

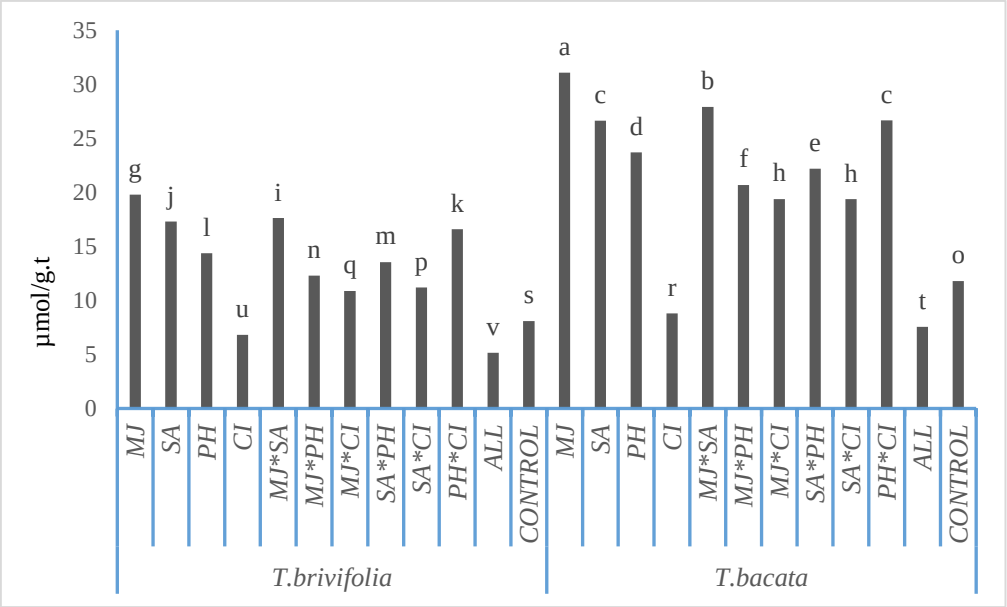
MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH:اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز

اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول2). بیشترین میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در تیمار متیل‌جاسمونات در گونه باکاتا مشاهده شد. کمترین میزان آن در ترکیب متیل‌جاسمونات×اسیدسالیسیلیک×فنیل‌آلانین×اسیدسینامیک در کالوس بریویفولیا اندازه‌گیری شد. به طور کلی محرک‌های استفاده شده در محیط رشد کالوس باکاتا نسبت به بریویفولیا، فعالیت آنزیم ppo را به میزان بیشتری افزایش دادند (شکل 6). با مقایسه شاهد در دو گونه باکاتا و بریویفولیا مشخص شد که گونه باکاتا نسبت به بریویفولیا میزان فعالیت طبیعی آنزیم ppo بالاتری دارد (شکل7) در هر دو گونه بیشترین تاثیر پذیری در میزان فعالیت آنزیم ppo از تیمار متیل‌جاسمونات مشاهده شد که نشان دهنده اثر بالای این ترکیب شبه هورمونی در القاءتنش کاذب در سلول و افزایش فعالیت آنزیم ppo است. تا جاییکه روند تاثیر آن در هر دو گونه مشابه بود. در خصوص نقش و اهمیت متیل جاسمونات تحقیقات زیادی صورت گرفته است. افزایش محتوای پلی فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی در سنبل الطیب (Rawat et al., 2020) و افزایش محتوای فنل، فلاونوئید کل و رزمارینیک اسید در مریم گلی (Hagh et al., 2018) همچنین افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز دراستویا (Salmalian et al., 2019) با کاربرد متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس گزارش شد. نکته جالب اینکه تحت تاثیر اثر متقابل تیمارها، زمانیکه تیمار ترکیبی متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک استفاده شد، در هر دو گونه بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز مشاهده شد که بیانگر اثر همسوی این دو ترکیب هورمونی در القاء تنش کاذب است. در بررسی‌های انجام گرفته توسط سایر محققین نشان داده شد که متیل جاسمونات می تواند تولید مشتقات فنل را در کالوس سرخدار گونه باکاتا تحریک کنند. به موازات القای تولید ترکیبات فنولی در سلول، نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم ppo در سلول‌های تاکسوس به طور قابل توجهی در پاسخ به متیل جاسمونات افزایش یافت (Jalalpour et al., 2014).

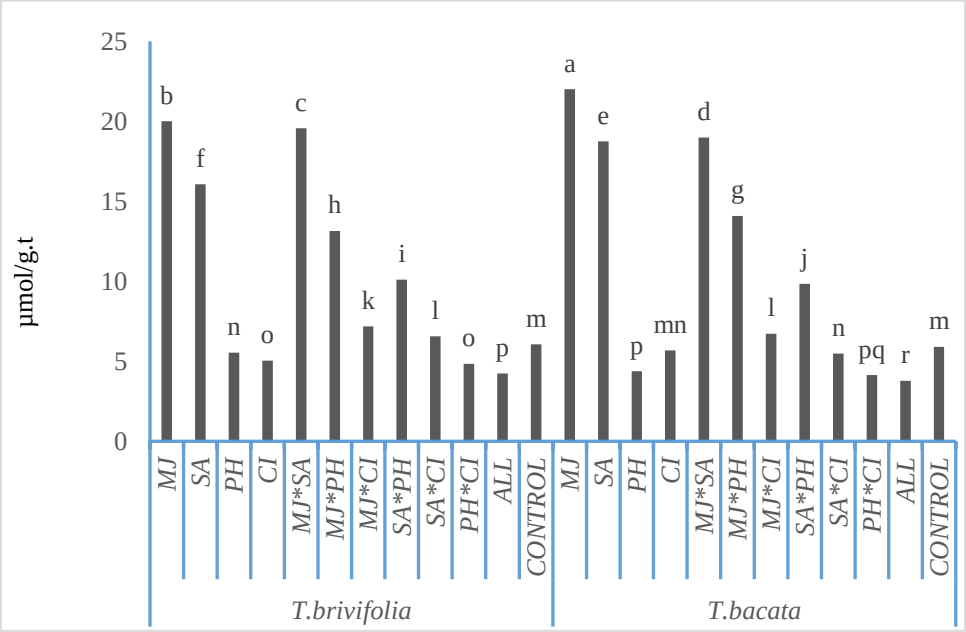
اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

با توجه به جدول تجزیه واریانس (1) فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز تحت تاثیر اثر متقابل گونه و تیمار تفاوت معنی داری داشت. بیشترین میزان افزایش در فعالیت PAL با تیمار کالوس گونه باکاتا و کمترین آن در ترکیب متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل‌آلانین، و اسیدسینامیک ایجاد شد. در هر دو گونه مورد بررسی در این تحقیق بیشترین میزان فعالیت PAL در تیمار متیل‌جاسمونات مشاهده شد (شکل 8). در که در هر دو گونه باکاتا و بریویفولیا میزان تاثیری پذیری بالایی از محرک‌ها بر فعالیت PAL مشاهده شد. مقایسه نمونه شاهد دو گونه مورد بررسی نشان داد که میزان فعالیت PAL در دو گونه تفاوت معنی‌داری نداشت. این در حالی است که تحت تاثیر تیمارها فعالیت آنزیم PAL در گونه باکاتا نسبت به بریویفولیا افزایش معنی‌داری داشت (شکل 8).هنگامی که کالوس دو گونه سرخدار با فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک، که از مهار کننده‌های فعالیت PAL هستند (Cusido et al., 1999) و (Brincat et al., 2002) تغذیه شدند، کالوس باکاتا کاهش بیشتری در فعالیت PAL داشت. این در حالی است‌که در مقایسه تیمارهای ترکیبی بیشترین افزایش در کاربرد همزمان متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک مشاهده شد.



شکل7-اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز.

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH:اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد



شکل8-اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

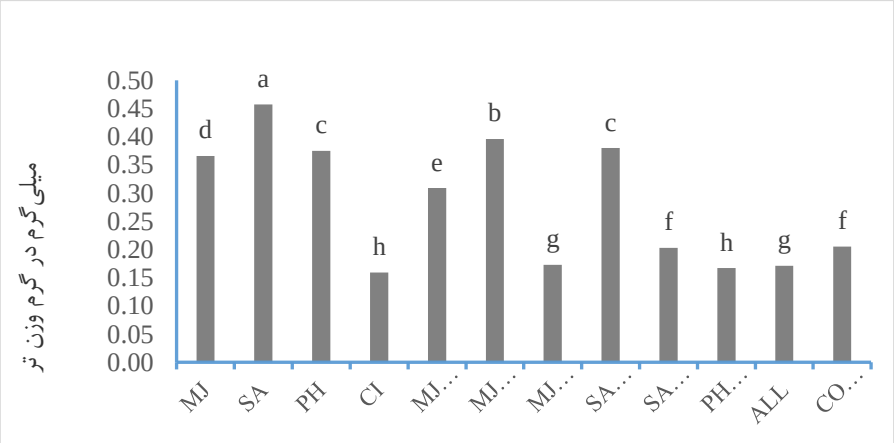
جدول2-تجزیه واریانس اثرساده تیمار و گونه و اثر متقابل تیمار وگونه برمیزان فنل ، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

منابع تغییر	درجه آزادی (DF)	فنل	فلاونوئید	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
		مقدار F	مقدار F	مقدار F
تیمار	11	178/1**	186/166**	269/367**
گونه	1	1115/00**	1053/00**	1650/654**
تیمار*گونه	10	24/606**	22/568**	24/942**

ns، *،** ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح 5٪ و 1٪ را نشان می‌دهد

اثر تیمارها بر میزان فنل کل

با توجه به جدول تجزیه واریانس(2) اثر محرک‌های استفاده شده در تحقیق حاضر بر میزان فنل کل نمونه‌های کالوس معنی‌دار بود. به طوری که در تیمار اسیدسالیسیلیک بیشترین میزان فنل و کمترین میزان آن در تیمار فنیل‌آلانین× اسیدسینامیک مشاهده شد. همچنی اثر متقابل اغلب تیمارها سبب افزایش میزان فنل نسبت به شاهد شد(شکل 9). که ناشی از توانایی فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک در بازدارندگی القاء بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز برای ساخت این ترکیبات است (Brincat et al., 2002). نکته جالب اینکه اعمال ترکیبی محرک‌های ذکر شده همزمان (اسیدسالیسیلیک×متیل‌جاسمونات×فنیل‌آلانین× اسیدسینامیک) سبب کاهش تجمع فنل حتی نسبت به نمونه شاهد شده است(شکل9). در حالیکه اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در ترکیب باهم و سایر محرک‌های به کار برده شده سبب افزایش تجمع فنل نسبت به شاهد شدند. متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک از محرکهای مهم در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که در تحقیقات متعددی تاثیر آن ها ثابت شده است (Salmalian et al., 2019) ، (Matkoweski, 2008) و گروب و همکاران،2004). محتوای فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم PAL در استویا (Salmalian et al., 2019) و اسید رزمارینیک و اسید کافئیک در مریم گلی (Hagh et al., 2018) که در شرایط درون شیشه تولید می‌شوند، می‌تواند توسط واسطه‌های واکنش استرسی (متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک) در سلول تحریک شده و افزایش یابد (Matkoweski, 2008). در تیمار فنیل‌آلانین و متیل‌جاسمونات × فنیل‌آلانین که سطح بالایی از میزان فنل را نشان می‌دهد، بیش بیان شدن PAL منجر به تولید بیشتر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌شود. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های (Pérez at el., 2011) کلم‌بروکلی (Kabiri at el., 2014) شیرین‌بیان (صمدی و همکاران، 1393(کنگرفرنگی) نتایج همسو گزارش کردند.

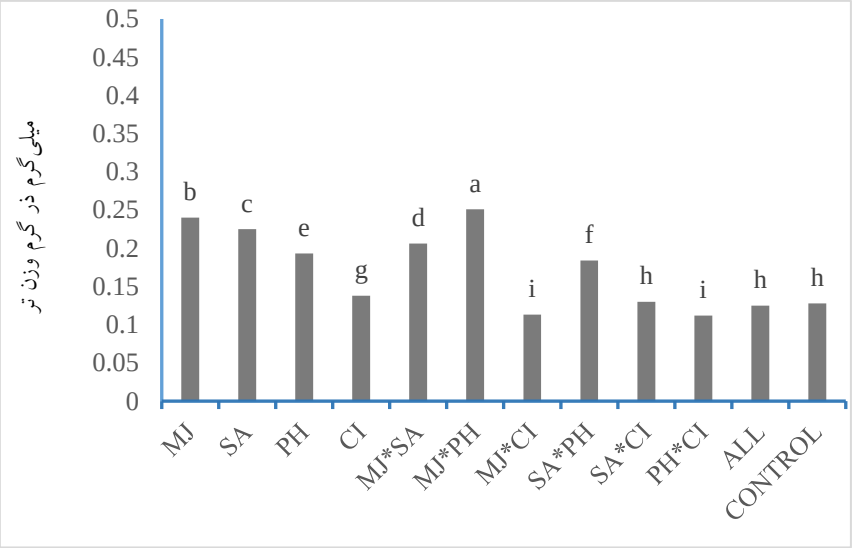


شکل9- اثر محرک بر میزان فنل کل.

MJ : متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI : اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL:اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر محرک‌ها بر میزان فلاونوئید کل

با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر محرک بر میزان فلاونوئید معنی دار شد. باتوجه به شکل 9 استفاده از ترکیب جاسمونات×فنیل‌آلانین در محیط کشت بیشترین تاثیر را در افزایش ترکیبات فلاونوئیدی نسبت به نمونه شاهد داشت. ترکیب متیل‌جاسمونات×اسیدسالیسیلیک×فنیل‌آلانین×اسیدسینامیک و ترکیب اسیدسالیسیلیک×اسیدسینامیک نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. در بین تیمارهای به کار برده شده استفاده از محرک‌ها به تنهایی در محیط کشت نسبت به حالت ترکیب افزایش بیشتری داشت. کمترین میزان تولید فلاونوئید در تیمار متیل‌جاسمونات×اسیدسینامیک و فنیل‌آلانین×اسیدسینامیک مشاهده شد که باتوجه به افزایش بیشتر در مورد کاربرد متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین به تنهایی، این کاهش می‌تواند به دلیل اثر سینرژیستی منفی اسیدسینامیک بر متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین باشد. گل راعی (Wang et al., 2015) کنگرفرنگی (صمدی و همکاران، 2015) گوجه‌فرنگی (Ehsanpour and Maleki, 2018) نتایج همسو گزارش کردند.



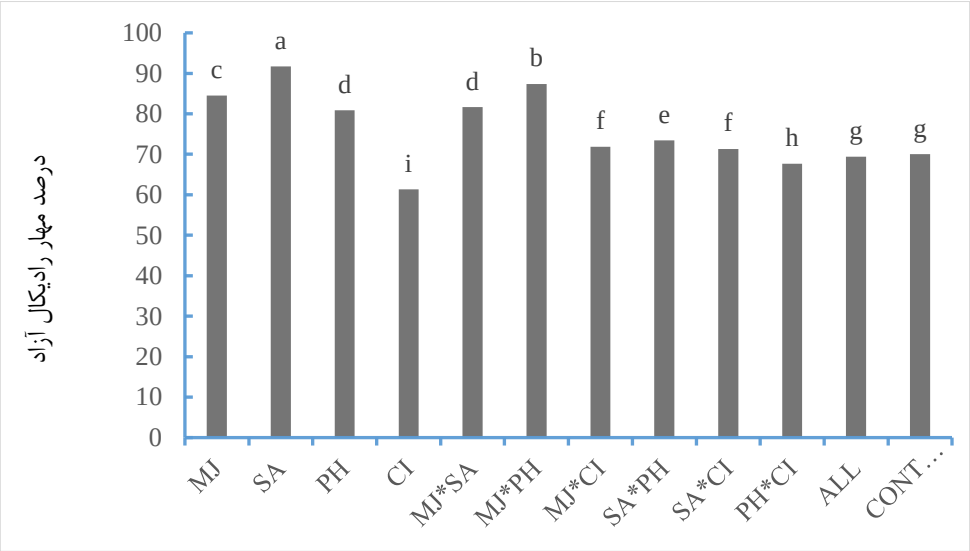
شکل9-اثر محرک بر میزان فلاونوئید کل.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر محرک‌ها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

با توجه به جدول تجزیه واریانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پینه‌های تیمار شده با محرک‌ها اثرات معنی داری را نشان داد همانطور که در شکل (7-4) نشان داده شده است بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار اسیدسالیسیلیک و کمترین آن در اسیدسینامیک

اندازه‌گیری شد. علاوه بر تیمار اسیدسینامیک ترکیب فنیل‌آلانین×اسیدسینامیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به شاهدکاهش داد. طی بررسی‌های انجام شده در این تحقیق بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل در تیمار اسیدسالیسیلیک اتفاق افتاد. به طور کلی میزان فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار اسیدسالیسیلیک و ترکیب متیل‌جاسمونات×فنیل‌آلانین در بیشترین مقدار قرار داشت و کمترین مقدار در ترکیب فنیل‌آلانین×اسیدسینامیک مشاهده شد که میزان آن نسبت به شاهد نیز در هر سه مولفه اندازه‌گیری شده کمتر بود. اسیدسالیسلیک با انتقال پیام از طریق فعال کردن مسیر بیوسنتزی اتیلن و تغییر در بیان ژن‌ها، بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پلی‌فنل‌اکسیداز اثر می‌گذارد و از این طریق باعث مقاومت به تنش می‌شود. همچنین اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات از طریق فعال نمودن آنزیم‌های دیگری چون فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و یا بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی سبب القا ترکیبات ثانویه فنیل پروپانوئیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می شوند. گزارشات نعناع فلفلی (Shabrangi and Mehrabi, 2014)، نخود (بوکرا و همکاران، 2014) و گل بنفشه (قربانی و همکاران، 1390) با نتایج ما همسو بود.

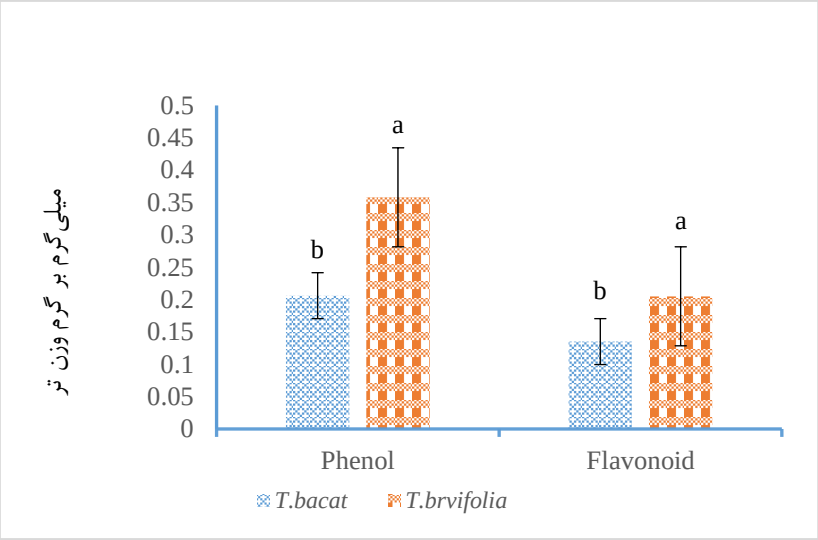


شکل10- تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل جاسمونات*فنیل آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

مقایسه میزان فنل و فلاونوئید کل در دو گونه *brevifolia* و *baccata* سرخدار

آن‌طور که از جدول تجزیه واریانس برمی‌آید، گونه بر میزان فنل و فلاونوئید تاثیر معنی‌دار داشت. گونه بریویفولیا میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به گونه باکاتا نشان داد (شکل 11). ثابت شده است که گونه باکاتا توانمندی ژنتیکی بیشتری در تولید ماده مؤثره تاکسل نسبت به گونه بریویفولیا دارد (Khosroushahi et al., 2006)، (Cusido et al., 2014) ، و (Nasiri et al., 2015) از اینرو فنیل‌آلانین که از پیش ماده‌های اصلی هر دو مسیر فنیل پروپانوئیدی در جهت ساخت ترکیبات فنولی و مسیر بیوسنتز تاکسل می‌باشد در گونه باکاتا رقابت کمتری در جهت تولید ترکیبات فنلی می‌باشد (Cusido et al., 2002).

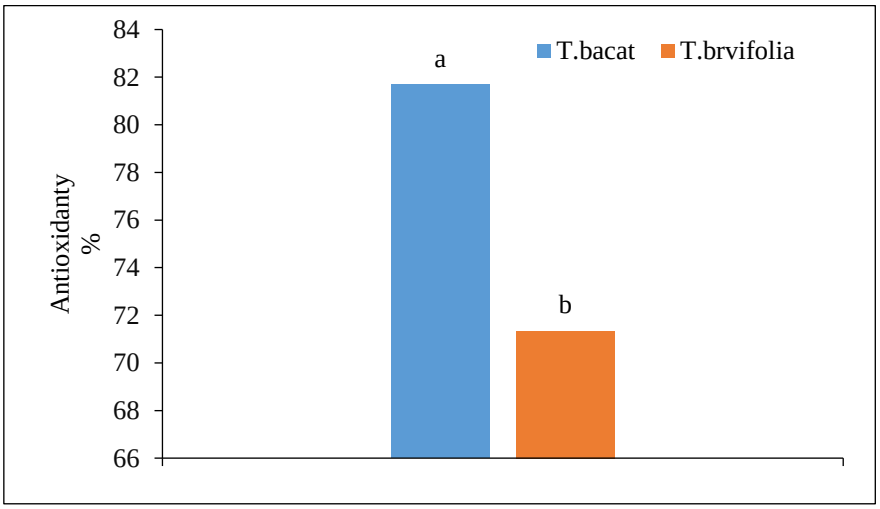


شکل11- مقایسه میزان فنل و فلاونوئید کل در دو گونه *brevifolia* و *baccata* سرخدار.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل جاسمونات*فنیل آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل جاسمونات*فنیل آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس دو گونه *brevifolia* و *baccata* سرخدار

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول2) گونه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرخدار تفاوت معنی‌داری داشت. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس گونه باکاتا از گونه بریویفولیا بالاتر است، به ترتیب (شکل 12).

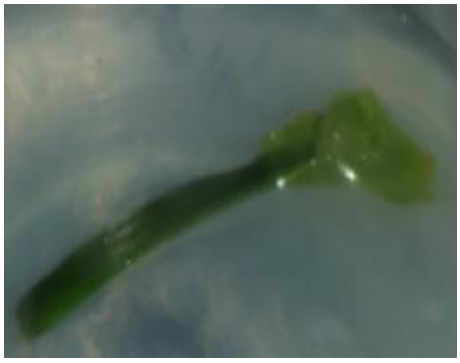


شکل12- اثر دو گونه *brevifolia* و *baccata* سرخدار بر میزان فعالیت آنتی‌کسیدانی

Mj: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل جاسمونات*فنیل آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

تغییرات وزن کالوس تحت تاثیر اثر متقابل تیمار و گونه گیاهی

با توجه به نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس(جدول2) استفاده از محرک به تنهایی و ترکیبی اثر معنی‌داری بر وزن کالوس نداشت. همچنین اثر متقابل گونه و محرک تفاوت معنی‌داری در این صفت نشان نداد. به نظر می‌رسد که در هر دو گونه سرخدار رشد کالوس تحت تاثیر محرک‌ها قرار ندارد. در مقابل مقایسه میانگین بین دو گونه نشان داد که کالوس‌های گونه باکاتا نسبت به بریویفولیا وزن تر بیشتری داشتند(شکل 13 و 14) که می‌تواند ناشی از توانمندی ژنتیکی گونه باکاتا در تولید بیشتر بیومس باشد. ساقه جوان گونه بریویفولیا که از آن ریز نمونه تهیه شد نسبت به گونه باکاتا بافت متراکم و مستحکم‌تری داشت. همچنین تعداد روزهای مورد نیاز از کشت نمونه تا ظهور کالوس در گونه بریویفولیا نسبت به باکاتا طولانی تر بود (7-9 روز) که می تواند از دلایل اصلی این تفاوت مشاهده شده باشد(Bagheri and Saffari, . 2011)

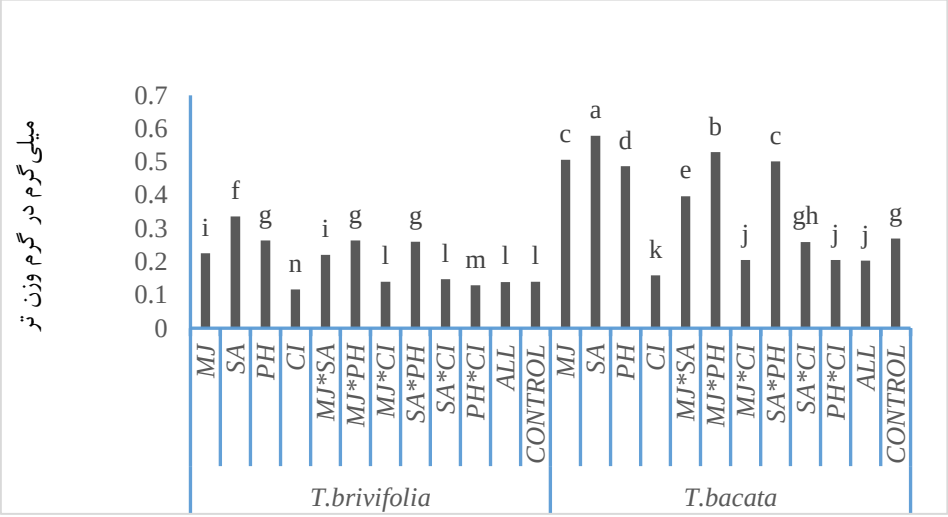


شکل13.شکل بالا.کالوس گونه باکاتا و شکل پایین. کالوس گونه بریویفولیا

اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فنل کل

میزان فنل کل کالوس تحت تاثیر نوع تیمار و گونه گیاهی تفاوت معنی‌داری داشت (شکل 13). بیشترین(0.578 میلی‌گرم در گرم وزن تر) میزان فنل در گونه باکاتا و تحت تاثیر تیمار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. در مقابل کمترین آن (0.117میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار اسیدسینامیک گونه بریویفولیا بود. به طور کلی میزان فنل در گونه باکاتا در همه تیمارهای به کار برده شده نسبت به گونه بریویفولیا بیشتر بود. مقایسه میزان فنل در نمونه شاهد دو گونه نشان می‌دهد که توانمندی ژنتیکی گونه باکاتا در تولید ترکیبات فنلی بیشتر است (شکل13). افزون بر این گونه باکاتا به محرک واکنش بیشتری نشان داد که می‌تواند ناشی از فعالیت بالاتر ژنهای مرتبط به آنزیم PAL و دیگر آنزیم های مسیر فنیل پروپانوئیدی مرتبط به واکنش‌های دفاعی باشد (شکل 5).استفاده همزمان متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک و همچنین فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک در گونه باکاتا، وتیمار فنیل‌آلانین، اسیدسینامیک و همچنین اسیدسینامیک به تنهایی در گونه بریویفولیا سبب کاهش تجمع فنل شد. به طوری که تجمع فنل تحت تاثیر تیمارهای ذکر شده از نمونه شاهد نیز کمتر بود (شکل13). در هر دو گونه استفاده از اسیدسالیسیلیک تجمع فنل را در کالوس افزایش داد.به طوریکه روند افزایش فنل تحت تاثیر اسید سالیسیلیک در هر دو گونه مشابه بود(شکل 13). بیشترین میزان تولید فنل و فلاونوئید در تیمارهای سالیسیلیک اسید(100mM) + شوری (50mM) در

محیط کشت جامد کالوس استویا گزارش شد (Salmalian et al., 2019)).

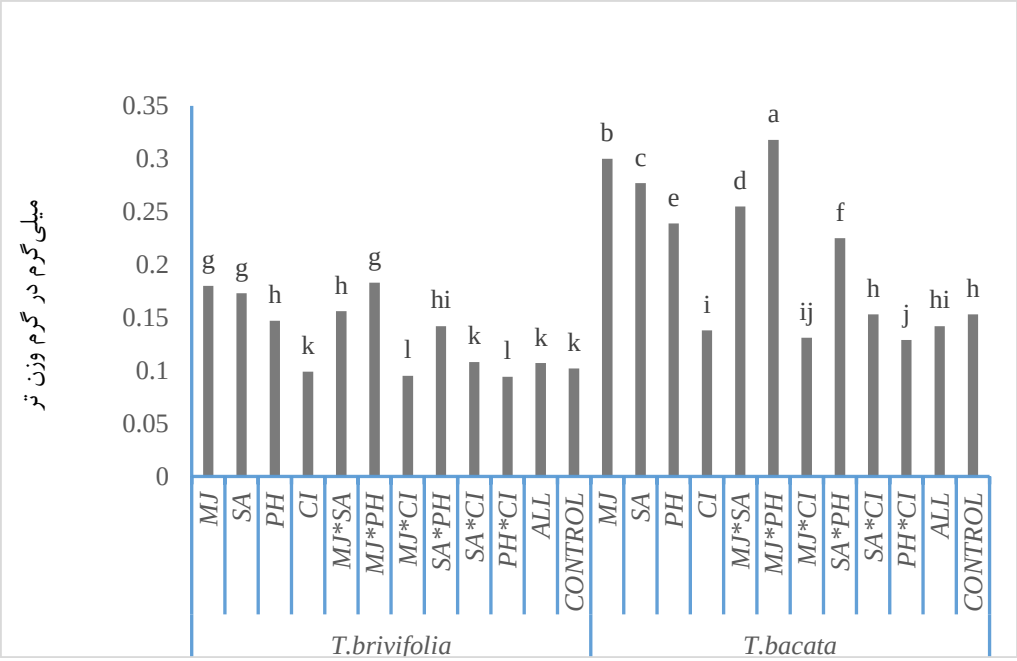


شکل13- اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فنل.

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل

با توجه به نتایج (جدول2)، اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل تفات معنی‌داری داشت. بیشترین میزان فلاونوئید در کالوس رشد کرده در محیط کشت حاوی متیل‌جاسمونات× فنیل‌آلانین و کمترین آن در تیمار ترکیبی فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد (شکل 13). در بررسی حاضر مشخص شد که میزان فلاونوئید در گونه باکاتا هم در شاهد و هم در تیمارهای به کاربرده شده نسبت به گونه‌ی بریویفولیا بیشتر بود که می تواند ناشی از توانمندی بیشتر این گونه در فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی و تحریک پذیری بیشتر سلول‌های گونه باکاتا نسبت به بریوفولیا در فرآیند الیسیت شدن و تنش باشد. نکته‌ای که در بررسی Tabata (2004) نشان داده شد پس از استفاده از متیل جاسمونات در محیط کشت *T.baccata* ، *T.brevifolia* و *T.x media* بیشترین میزان تاکسول در گونه باکاتا وجود داشت که نشان دهنده تاثیر پذیری بیشتر گونه باکاتا از محرک است. در گونه باکاتا بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی در ترکیب متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین مشاهده شد (0.3میلی گرم در گرم وزن تر). این در حالی است که در گونه بریوفولیا بیشترین میزان تجمع فلاونوئید در دو تیمار متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک و همچنین متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین مشاهده شد. تیمارهایی که تفاوت معنیداری در این صفت گونه باکاتا نداشتند (شکل14).

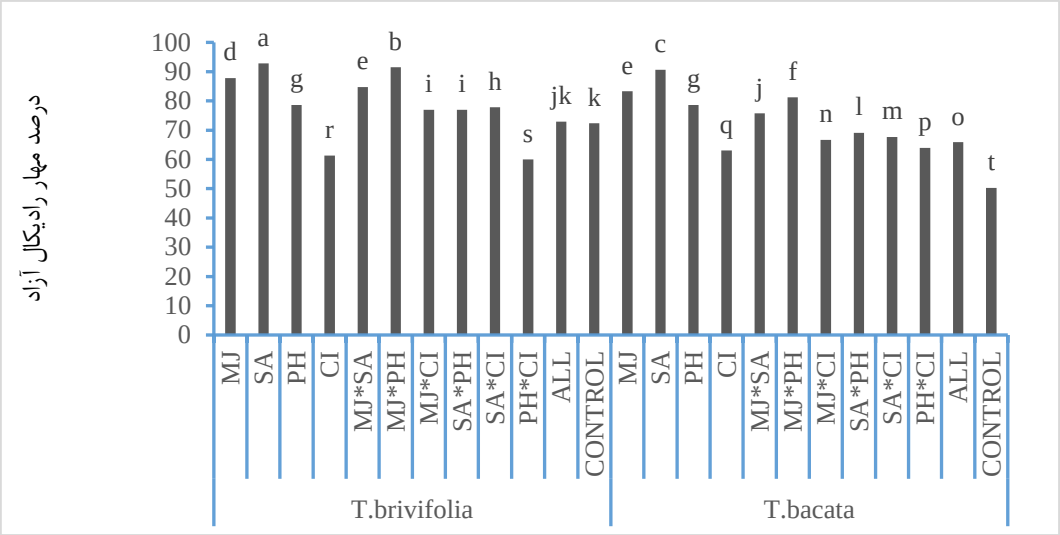


شکل14-اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل جاسمونات*فنیل آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل جاسمونات*فنیل آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول2)، اثرمتقابل گونه و تیمار بر توانمندی آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس معنی‌دار بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه بریویفولیا تحت تاثیر اسیدسالیسیلیک در بیشترین مقدار(93درصدمهار رادیکال آزاد) قرار داشت. در مقابل کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (50 درصد مهار رادیکال آزاد)در نمونه شاهد گونه باکاتا مشاهده شد. تفاوت در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی دو گونه را می‌توان به تفاوت در خصوصیات ژنتیکی و همچنین شرایط زیستگاه گیاه مرتبط دانست. نشان داده شده است که توانمندی آنتی-اکسیدانی کالوس متاثر از پارامترهای مختلف از جمله نور، گرما و دما، سطح و کیفیت کالوس قرار می‌دهد (ماندو، 2009). به طور کلی محرک‌های به کار برده شده در هر دو گونه نسبت به نمونه شاهد به یک میزان تغییر نشان دادند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هردو گونه روند مشابهی داشت. تیمار اسیدسینامیک در گونه بریویفولیا نسبت به شاهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری داشت. حضور اسیدسینامیک در محیط کشت بازدارنده فعالیت آنزیم PAL و سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی است (Brincat et al., 2002). اسید سینامیک به عنوان محصول نهایی دخیل در فعالیت آنزیم PAL نقش مهمی در فرایند تولید ترکیبات فنیل پروپانوئید دارد (Matkoweski, 2008).



شکل15- اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی.

MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ*SA: متیل‌جاسمونات*اسیدسالیسیلیک، MJ*PH: متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین، MJ*CI: متیل‌جاسمونات*اسیدسینامیک، SA*PH: اسیدسالیسیلیک*فنیل‌آلانین، SA*CI: اسیدسالیسیلیک*اسیدسینامیک، PH*CI: فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک*متیل‌جاسمونات*فنیل‌آلانین*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش میتوان گفت استفاده از محرک متیل‌جاسمونات برای آنزیم‌های PAL و PPO و استفاده از متیل جاسمونات در ترکیب با سالیسیلیک برای آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بیشترین تاثیرگذاری را در کالوس سرخدار دارد. بر اساس نتایج این تحقیق و گزارشات قبلی می‌توان بیان کرد که اسیدسینامیک و فنیل‌آلانین که از بازدارنده‌های فعالیت PAL محسوب می‌شوند، برای آنزیم PPO نیز اسیدسینامیک موجب کاهش فعالیت می‌شود. همچنین استفاده از تیمار متیل‌جاسمونات×فنیل‌آلانین می‌تواند بهترین تیمار جهت افزایش تولید فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیان شود. با توجه به نتایج مقایسه میانگین دو گونه می‌توان بیان داشت که گونه باکاتا تاثیرپذیری بیشتری را نسبت به گونه بریوفولیا در استفاده خارجی پیش سازها و محرک‌ها در شرایط درون شیشه دارد. بادرنظر گرفتن نتایج بدست آمده از پژوهش کنونی و مطالعات پیشین در راستای بیش بیان آنزیم‌های درگیر در پاسخ دفاعی سرخدار می‌توان بیان نمود که گیاه سرخدار تحت تاثیر محرک‌ها قرار می گیرد. با توجه به دخیل بودن این آنزیم‌ها در ساخت ترکیبات با ارزش ثانویه، مهندسی متابولیک برای جهت دهی تولید ترکیب یا ترکیبات خاص و افزایش پاسخ‌های دفاعی، می‌توان از آنها در مدیریت تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد. همچنین با توجه به اثر مهارکنندگی برخی محرک‌ها بر فعالیت آنزیمی، بوسیله مهندسی متابولیک می‌توان رقابت را در جهت تولید ترکیبات موردنظر کاهش داد.

منابع

1. صمدی، ص.، قاسم نژاد، ع. و علیزاده، م. (2015). تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.)تحت تاثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در شرایط درون شیشه‌ای .مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، 21(4)، 135-148.
2. قربانی، ا. و بخشی، د. (1390). ارزیابی مقدار کلروژنیک اسید، فلاونوئیدها و ظرفیت آنتی اکسیدانی 13 رقم ایرانی و خارجی سیب، مجله فن آوری تولیدات گیاهی، (2)11: 62-53.
3. Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. and Dixon, R.A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, *16*(11), pp.3098-3109.
4. Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. and Meena, R.C. (2005). Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, *49*(4), pp.541-550.
5. Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1331-1341.
6. Bagal, U.R., Leebens-Mack, J.H., Lorenz, W.W. and Dean, J.F. (2012). The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. In *BMC genomics* (Vol. 13, No. S3, p. S1). BioMed Central.
7. Bagheri, A. and Saffari, M. (2011). In vitro culture of higher plants, Ferdowsi University of Mashhad press, 406p (In Persian).
8. Brincat, M.C., Gibson, D.M. and Shuler, M.L. (2002). Alterations in taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway. *Biotechnology progress*, *18*(6), pp.1149-1156.
9. Cusido, R. M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A. B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., ... & Palazon, J. (2014). A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of Taxus spp. *Biotechnology advances*, *32*(6), 1157-1167.
10. Cusidó, R.M., Palazón, J., Navia-Osorio, A., Mallol, A., Bonfill, M., Morales, C. and Piñol, M.T. (1999). Production of Taxol® and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science*, *146*(2), pp.101-107.
11. Cusido, RM., Palazon, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., and Pinol, MT. (2002). Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol Prog, 18: 418–423 .
12. Dong, J., Wan, G. and 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*(2-3), pp.99-104.
13. Edahiro, J.I., Nakamura, M., Seki, M. and Furusaki, S. (2005). Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, *99*(1), pp.43-47.
14. Ehsanpour, A. A., & Maleki, M. S. (2018). Effect of salicylic acid on total phenol, flavonoid, anthocyanin and PAL and TAL enzymes in tomato (Solanum lycopersicum Mill) plants. *Iranian Journal of Plant Biology*, *9*(4), 55-68.
15. Gacche, R. N., Warangkar, S. C., & Ghole, V. S. (2004). Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of polyphenol oxidase in apple juice. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19(2), 175-179.
16. Guo, B. H., Kai, G. Y., Jin, H. B., & Tang, K. X. (2006). Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*, *5*(1), 15-20.
17. Guo, Y. Y., Yu, H. Y., Yang, M. M., Kong, D. S., & Zhang, Y. J. (2018). Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of Lycium ruthenicum Murr. seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, *65*(2), 244-250.
18. Hagh, Z. G., 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 Salvia lerrifolia Benth. *Iranian Journal of Plant Biology*, *10*(1).

Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms, pp.53-88.
30. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), pp.405-410.
31. Nasiri, J., Naghavi, M. R., Alizadeh, H., Moghadam, M. R. F., Motamedi, E., & Mashouf, A. (2015). Magnetic solid phase extraction coupled with HPLC towards removal of pigments and impurities from leaf-derived paclitaxel extractions of Taxus baccata and optimization via response surface methodology. *Chromatographia*, *78*(17), 1143-1157.
32. Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A. and García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, *129*(1), pp.35-44.
33. Rahpeyma, S.A., Moieni, A. and Jalali-Javaran, M. (2017). Enhancement of paclitaxel content in induced tetraploid Corylus avellana L. cell suspension culture with regulating the expression of genes in paclitaxel biosynthetic pathway. *Acta Physiologiae Plantarum*, *39*(10), p.241.
34. Rawat, V., Ghildiyal, A., Singh, L., Jugran, A. K., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., & Pande, V. (2020). Methyl jasmonate induced polyphenols and antioxidant production in callus suspension culture of *Nardostachys jatamansi*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 154(6), 851-859.
35. Salmalian, M., Ghasemnezhad, A., & Mashayekhi, K. (2019). The effect of salicylic acid, methyl jasmonate and NaCl stimulants on biochemical compounds of stevia's callus in solid and liquid media. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 35(5), 731-744.
36. Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A. and Mirjalili, M.H. (2018). The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, *132*, pp.271-280.
37. Shabrangi, A., & Mehrabi, L. (2014). Evaluation of Antioxidant Activity and Secondary Metabolites of Mentha piperitaL. Under Effect of Acetylsalicylic Acid and Methyl Jasmonate. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, *8*(3), 337-340.
38. Shilpa, K. and Lakshmi, B.S. (2019). Influence of exogenous cinnamic acid on the production of chlorogenic acid in Cichorium intybus L cell culture. *South African Journal of Botany*, *125*, pp.527-532.
19. Hien, N. T. T., Khiem, D. V., Vu, N. H., Don, N. T., & Nhut, D. T. (2004). Primary study on the induction and growth of callus of Taxus wallichiana Zucc., a valuable medicinal plant in lam dong province. *J. Agri. Sci. and Technol*, *4*, 79-85.
20. Itokawa, H., & Lee, K. H. (Eds.). (2003). *Taxus: the genus Taxus*. CRC Press.
21. Jalalpour, Z., Shabani, L., Afghani, L., Sharifi-Tehrani, M. and AMINI, S.A. (2014). Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalestatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture of yew. *Turkish Journal of Biology*, *38*(1), pp.76-82.
22. Jung, S. (2004). Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(3), pp.225-231.
23. Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. (2014). Effect of Exogenous Salicylic Acid on Some Physiological Parameters and Alleviation of Drought Stress in *Nigella sativa* Plant under Hydroponic Culture. *Plant Protection Science*, *50*(1).
24. Karimi, N., & Souri, Z. (2016). Antioxidant enzymes and compounds complement each other during arsenic detoxification in shoots of Isatis cappadocica Desv. *Chemistry and Ecology*, *32*(10), 937-951.
25. Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R., & Omidi, Y. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of Taxus baccata. *Cell Biology International*, *30*(3), 262-269.
26. Kusari, S., Singh, S., & Jayabaskaran, C. (2014). Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in biotechnology*, *32*(6), 304-311.
27. Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazón, J., & Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in Taxus baccata suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, *46*(1), 23-34.
28. Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review. *Biotechnology advances*, *26*(6), pp.548-560.
29. Mishra, P. and Sharma, P. (2019). Superoxide Dismutases (SODs) and Their Role in Regulating Abiotic Stress induced Oxidative Stress in Plants. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur*

49. Wang, S.Y. (1999). Methyl jasmonate reduces water stress in Strawberry. *Journal of plant growth regulation*, *18*(3), pp.127-134.
50. Wang, Y.D., Wu, J.C. and Yuan, Y.J. (2007). Salicylic acid induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis var. mairei*. *Cell biology international*, *31*(10), pp.1179-1183.
51. Wei, L., Zhang, J., Wang, C., & Liao, W. (2020). Recent progress in the knowledge on the alleviating effect of nitric oxide on heavy metal stress in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 147, 161-171.
52. Wickremesinhe, E. R., & Arteea, R. N. (1993). Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35(2), 181-193.
53. Wilson, S.A., Keen, P., McKee, M.C., Raia, N., Van Eck, J. and Roberts, S.C. (2018). Development of an Agrobacterium-mediated transformation method for Taxus suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *54*(1), pp.36-44.
54. Wu, J. and Lin, L. (2003). Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Applied microbiology and biotechnology*, *62*(2-3), pp.151-155.
55. Yuan, Y.J., Li, C., Hu, Z.D. and Wu, J.C. (2001). Signal transduction pathway for oxidative burst and taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis var. mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum*. *Enzyme and microbial technology*, *29*(6-7), pp.372-379.
56. Yuan, Y.J., Wei, Z.J., Miao, Z.Q. and Wu, J.C. (2002). Acting paths of elicitors on Taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. *Biochemical engineering journal*, *10*(2), pp.77-83.
57. Zhang, C. H., Wu, J. Y., & He, G. Y. (2002). Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated Taxus yunnanensis cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, *60*(4), 396-402.
58. Zhang, X., & Liu, C. J. (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant*, *8*(1), 17-27.
39. Singh, A. and Dwivedi, P. (2018). Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem*, *7*(1), pp.750-757.
40. Steele, C. L., Chen, Y., Dougherty, B. A., Li, W., Hofstead, S., Lam, K. S., ... & Chiang, S. J. (2005). Purification, cloning, and functional expression of phenylalanine aminomutase: the first committed step in taxol side-chain biosynthesis. Archives of biochemistry and biophysics, 438(1), 1-10.
41. Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., ... & Chinou, I. (2012). Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of Arnebia euchroma (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *48*(5), 555-564.
42. Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Biomanufacturing*, 1-23.
43. Twaij, B.M., Jazar, Z.H. and Hasan, M.N. (2019).
44. The effects of elicitors and precursor on in-vitro cultures of Trifolium resupinatum for sustainable metabolite accumulation and antioxidant activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *22*, p.101337.
45. Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide, 15(4), 351-358.
46. Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, *2*(1), p.5.
47. Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y. and Tan, R.X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, *15*(4), pp.351-358.
48. Wang, S., Li, C., Wang, H., Zhong, X., Zhao, J., Tong, Y. and Zhou, Y. (2016). Effect of elicitors, precursors and metabolic inhibitors on paclitaxel production by Taxus cuspidata cell culture. *Journal of forestry research*, *27*(6), pp.1257-1263.

Evaluation of the effect of elicitors and metabolite precursors on the enzymatic activity of callus of two yew species in vitro

Mozhdeh Bagherinasab[1], Azim Ghasemnezhad*[2], Khodayar Hemmati[3], Alireza Sadeghipour[4]

1-Graduate of Medicinal Plants, Spices and Beverages, Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

2- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. Corresponding Author, Email ghasemnezhad@gau.ac.ir

3-Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

4-Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Golestan University

Abstract

Yew is valuable medicinal plant because of the paclitaxel. However, due to the slow growth of endangered yew plant and low amounts of paclitaxel, the extraction of taxol from the plant is expensive and need appropriate substitute. Optimization of both biomass and metabolite culture media, is one of the main goals of invitro culture of yew plant. The present study was conducted to investigate the effect of some elicitors on the activity of enzymes involved in paclitaxel biosynthesis with the aim of optimizing the production of this compound in vitro conditions. In order to produce callus, explants of *T. baccata* and *T. brevifolia* were cultured in B5 medium containing NAA (2 mg / l), 2,4-D (0.2 mg / l), kin (0.2 mg / l). The callus was cultured in media containing elicitors including salicylic acid (80 mg / L), methyl jasmonate (100 µM), cinnamic acid (0.25 M), and a combination of them. The effect of phenylalanine (0.1 mM) as a precursor of phenylalanine-ammonialase was also investigated. The experiment was performed in a completely randomized design with three replications. Finally, the effect of the mentioned treatments on the activity of polyphenol oxidase, superoxide dismutase and phenylalanine ammonialyase enzymes of the treated calli was evaluated. Results showed that the application of experimental treatments as well as their interaction significantly affect the activity of the studied enzymes. The results showed that methyl jasmonate increased the activity of phenylalanine ammonialyase and polyphenol oxidase. Also, in the interaction of methyl jasmonate and salicylic acid, the activity of superoxide dismutase was higher than the control. Also, the activity of the studied enzymes was different without considering the effect of the treatment under the influence of the species.

Keywords: yew, taxol, phenylalanine ammonialyase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase