

## بررسی اثر برخی ایلوسیستورها و پیش‌سازهای متابولیتی بر فعالیت آنزیمی کالوس دو گونه سرخدار در

### شرایط درون شیشه‌ای

مژده باقری نسب<sup>۱</sup>، عظیم قاسم نژاد<sup>۲\*</sup>، خدایار همتی<sup>۳</sup>، علیرضا صادقی پور<sup>۴</sup>

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

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. \* نویسنده مسئول، ایمیل

[ghasemnezhad@gau.ac.ir](mailto:ghasemnezhad@gau.ac.ir)

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

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

### چکیده

سرخدار به دلیل داشتن ترکیب ارزشمند پاکلی تاکسل از ارزش دارویی بالایی برخوردار است؛ با این وجود، رشد کند 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 به منظور بررسی اثر برخی از ایلوسیستورها بر میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پاکلی تاکسل 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 (۲ mg/l)، 2,4-D (۰/۲ mg/l)، kin (۰/۲ mg/l) کشت شد. کالوس به دست آمده در محیط حاوی ایلوسیستورهایی چون اسیدسالیسیلیک (۸۰ میلی‌گرم در لیتر)، متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار)، اسیدسینامیک (۰/۲۵ مولار)، و ترکیب آن‌ها کشت شد. همچنین اثر فنیل‌آلانین (۰/۱ میلی‌مولار) به عنوان پیش ماده فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز نیز مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در نهایت اثر تیمارهای ذکر شده بر فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز 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 متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز و پلی‌فنل اکسیداز شد. همچنین در ترکیب متیل جاسمونات 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، تاکسل، فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز، پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز

## مقدمه

الیسیتورها، محرک تولید متابولیت‌های ثانویه با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که در کشت بافت گیاهی مورد استفاده 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 دخال 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) عمدتاً 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 درون‌زا دارند. علاوه بر این، استفاده از متیل جاسمونات خارجی می‌تواند 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، ۲۰۱۹) و گندم به زنگ زدگی (یو و همکاران، ۲۰۱۶) 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 فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیاز (PAL)، آنزیم

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 مورد نیاز بشر داشتند. در طی دهه ۶۰ انستیتو ملی سرطان (NCI) تحقیقاتی را روی اثرات ضد سرطانی گیاهان شروع کرد و در نهایت Taxol کشف شد (Itokawa and Lee, 2003). مهمترین منبع طبیعی تامین تاکسل، گونه‌های مختلف جنس سرخدار می‌باشد. در مقایسه با 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 به طوری که نسبت وزن تاکسل تولیدی به وزن پوست گیاه برابر با ۱:۶۷۰۰ می‌باشد. به همین دلیل برای استخراج یک کیلوگرم تاکسل خالص لازم است ۶/۷ تن پوست درخت فراهم شود که به این منظور ۲۰۰۰-۳۰۰۰ درخت مورد نیاز است. جداسازی پوست این درختان سبب آسیب جدی و در نهایت 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 (Wickremesinha and Arteea, 1993). بنابراین نخستین گام برای تولید پاکلی تاکسل 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.

منظور ضدعفونی کردن، ریزنمونه‌ها در آب معمولی حاوی مایع ظرفشویی به مدت ده دقیقه قرار داده شده و سپس با آب روان شسته شدند. ریز نمونه‌ها با الکل ۷۰٪ به مدت ۱۵ ثانیه و هیپوکلرید سدیم ۵٪ کلر فعال با یک قطره مایع به مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی شد. بعد از الکل یک‌مرته ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل و بعد از هیپوکلرید سدیم ریزنمونه‌ها ۵ مرتبه به مدت ۲، ۳ و ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در نهایت از اندام‌های گیاهی ضدعفونی شده ریز نمونه‌هایی به اندازه یک سانتیمتر تهیه و در محیط کشت B5 با هورمون غلظت یک میلی‌گرم در لیتر اکسین (2,4-D)<sup>۱</sup> در ترکیب با غلظت‌های ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کنیتین و ۳ تکرار با رعایت شرایط استریل کشت شده و به اتاق رشد با دمای ۲۴-۲۶ و شرایط نوری ۸-۱۶ تاریکی -روشنایی منتقل شدند.

#### اعمال تیمار

محیط B5 که در القای کالوس به کار برده شد، همراه با هورمون‌های 2,4-D و کنیتین با همان غلظت استفاده شده تهیه شده و در ارلن‌های جداگانه توزیع و هر کدام از تیمارهای آزمایش شامل محرک‌های متیل جاسمونات (۱۰۰ μmol/l)، اسید سالیسیلیک (۸۰ mg/l)، که این میزان بهینه برای هر کدام از محرک‌ها بیان شده است (Zhang et al., 2011)، و اسیدسینامیک (۰/۲۵mM) (Brincat et al., 2002) و فنیل آلانین (۰/۱mM) (Khosroushahi et al., 2006) به صورت (۱) اسید سالیسیک ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، (۲) متیل جاسمونات ۱۰۰ میکروگرم در لیتر، (۳) سینامیک اسید ۰/۲۵ میلی مولار، (۴) فنیل آلانین ۰/۱ میلی مولار، (۵) اسیدسالیسیلیک ۸۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرو-گرم در لیتر، (۶) اسیدسالیسیلیک ۸۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با سینامیک اسید ۰/۲۵ میلی مولار (۷) اسیدسالیسیلیک ۸۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با فنیل آلانین (۰/۱ میلی مولار، (۸) متیل جاسمونات ۱۰۰ میکروگرم

کلیدی در پاسخ به تنش‌های محیطی است و در تولید زنجیره جانبی تاکسان نقش دارد (Rahpeyma et al., 2017). همچنین امکان تبدیل اسیدآمینه فنیل آلانین 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 فنیل آلانین بیشتری در دسترس خواهد بود، فنیل آلانین 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). فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمینوموتاز (PAM) به N-debenzoyltaxol تبدیل می‌شود (Brincat et al., 2002). در نتیجه اسیدسینامیک موجب کاهش فعالیت PAL و پیشرفت فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمینوموتاز در جهت تولید تاکسل می‌شود. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های باارزشی چون پلی فنیل آمونیاک‌ها، 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 کنیتین به منظور کالوس‌زایی، و محیط ذکر شده همراه با محرک‌های اسیدسالیسیک، متیل جاسمونات، فنیل آلانین، اسیدسینامیک به منظور بررسی فعالیت آنزیمی استفاده شد.

#### سترون‌سازی ریزنمونه

از شاخه‌های جوان دو گونه باکاتا و بریوفولیا نمونه تهیه شد. گونه باکاتا از باغ گیاهشناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گونه بریوفولیا از باغ گیاهشناسی ملی نوشهر جمع‌آوری شد. پس از تهیه و به

<sup>۱</sup> 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

جهت استخراج آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۰/۲ گرم کالوس تازه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیم ۵۰ میلی-مولار (pH=7) در هاون سرد کاملاً کوبیده شد. عصاره حاصل در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ rcm در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ 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 نیتروبلوتترازولیم توسط ریپوفلاوین اندازه‌گیری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر حاوی ۲/۲۵۰ میلی-لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH 7.8)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (۰/۶۶ میلی‌مولار)، ۳۰۰ میکرولیتر متیونین (۱۰ میلی‌مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر NBT (۶۶ میکرومولار)، ۵۰ میکرولیتر ریپوفلاوین (۳/۳۵ میکرومولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش در کووت‌های شیشه‌ای شفاف در دمای ۲۵ 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 ۱۵ دقیقه، جذب نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد و اختلاف جذب زمان صفر و ۱۵ دقیقه تعیین گردید. قابلیت مهارکنندگی احیای نوری نیتروبلوتترازولیم توسط عصاره آنزیمی هر نمونه در مقایسه با اختلاف جذب نور زمان صفر و ۱۵ دقیقه واکنش شاهد (فاقد آنزیم) مطابق فرمول زیر تعیین گردید. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز معادل با ۵۰ درصد مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیم به فورامازون تعریف شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس واحد سوپراکسیددیسموتاز بر دقیقه بر گرم وزن تر گزارش شد.

لیتر همراه با اسیدسینامیک میلی مولار، ۹) متیل جاسمونات ۱۰۰ میکروگرم برلیتر همراه با فنیل آلانین ۰/۱ میلی مولار ، ۱۰) اسیدسینامیک ۰/۲۵ میلی مولار همراه با ۰/۱ میلی مولار فنیل آلانین و ۱۱) اسیدسالیسیک ۸۰ میلی گرم در لیتر × متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرو گرم در لیتر × اسیدسینامیک ۰/۲۵ میلی مولار × فنیل آلانین ۰/۱ میلی مولار (۱۲) کنترل در ۳ تکرار که در هر تکرار تعداد یک ریزنمونه بود.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL)

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز ۰/۳ گرم از کالوس تازه با ۶/۵ ml از بافر تریس-اسید هیدروکلریدریک (۵۰ mM) (۵۰ mM) (۸/۸) شامل ۱۵mM از بتا-مرکاپتواتانول درون هاون چینی روی یخ ساییده شده تا همگن شود. نمونه در سانتریفیوژ یخچال دار دور ۵۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و فاز بالایی به عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم شامل ۶۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸، ۹۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۲ میلی‌مولار و ۸۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصل در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد و سپس واکنش تولید اسیدسینامیک حاصل از فنیل آلانین با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال متوقف شد. در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید و مخلوط حاصل در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب بخش شفاف بالایی که حاوی ترانس اسیدسینامیک است، در طول موج ۲۹۰ نانومتر بوسیله اسپکتوفتومتر خوانده شد. ضریب خاموشی ترانس اسیدسینامیک ۲۰۰۰ لیتر بر میلی‌مول بر سانتی‌متر است و مقدار فعالیت آنزیم بر اساس مقدار اسیدسینامیک تولید شده در ۱۰ و ۲۰ دقیقه محاسبه شد (وتن و سدروف ۱۹۹۲).

عصاره متانولی تهیه‌شده به آن افزوده شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. بعد از پایان واکنش، جذب نمونه‌ها بی‌درنگ با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۸۰۰ UV/VIS) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و از متانول به‌عنوان بلانک استفاده شد. افزون بر نمونه‌های مذکور، یک لوله‌آزمایش به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که تنها حاوی ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. فعالیت مهار رادیکال DPPH از فرمول درصد فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال محاسبه شد:

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

### اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد (اسلینکار و همکاران، ۱۹۷۷). بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (۰/۲۵ گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر متانول ۰/۸۰) با ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو<sup>۱</sup> و ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و پس از ۵ الی ۸ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم<sup>۲</sup> یک مولار (۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شدند. در نمونه شاهد نیز به‌جای عصاره، از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد اسید گالیک<sup>۳</sup> (۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. سپس با استفاده از معادله خط نشان داده شده در شکل ۱ با قرار دادن عدد جذب نمونه به‌جای  $y$  میزان فنل (x) برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر بدست آمد.

$$\frac{\Delta A}{\Delta A} = 2 \left( 1 - \frac{\Delta A}{\Delta A} \right) / \text{min} \text{ (Unit)}$$

### استخراج عصاره‌ی پلی‌فنل‌اکسیداز

مقدار ۰/۱ گرم کالوس با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مونو سدیم ۰/۲ مولار (pH=6.2) حاوی پلی‌وینیل‌پلی-پرلیدون ۲/۵ درصد وزنی/حجمی (PVPP) و ۲ درصد حجمی/حجمی تریتون (TritonX-100) در هاون چینی سرد و در ظرف یخ کاملاً سائیده شد. بافت استخراج‌شده ی حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰g دور در دقیقه و دمای ۴ 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 ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش که شامل ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH 7)، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی کالوس و ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالل است، تهیه گردید. به این منظور واکنش با اضافه کردن پیروگالل آغاز می‌گردد. مخلوط واکنش شاهد، شامل ۲۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH 7) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است (غلظت نهایی پیروگالل در مخلوط واکنش برابر ۰/۰۱ میلی‌مولار می‌باشد). تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Kar and Mishra, 1976). تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز براساس تولید پورپوروگالین از پیروگالل با ضریب خاموشی ۲/۴۷ لیتر بر میلی‌مول بر سانتیمتر محاسبه گردید (Resend et al., 2002).

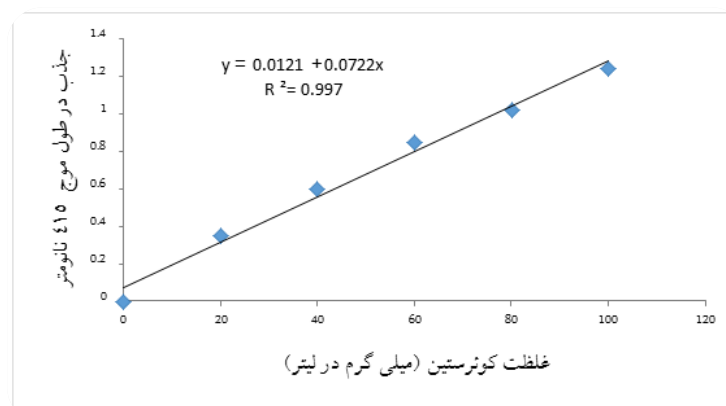
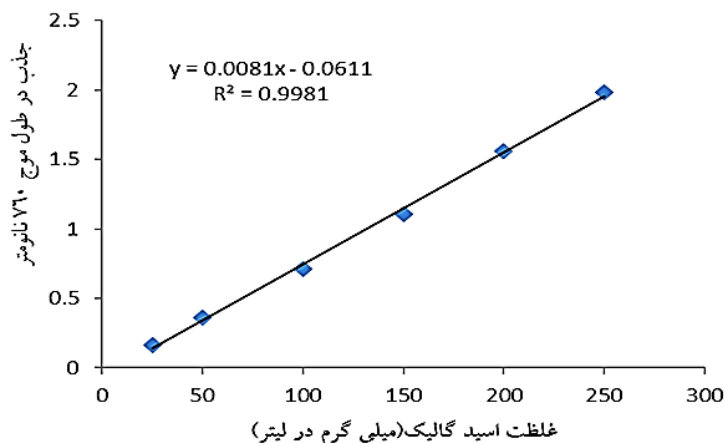
### اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در این آزمایش، از روش درصد مهار رادیکال‌های دی پی پی اچ (DPPH) استفاده شد (میلیوسکاس و همکاران، ۲۰۰۴) ابتدا ۱ میلی‌لیتر از DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار (۲ میلی‌گرم DPPH به ۵۰ میلی‌لیتر متانول) به لوله‌آزمایش اضافه و سپس ۱ میلی‌لیتر از

<sup>1</sup> Folin-Ciocalteu

<sup>2</sup> Sodium carbonate

<sup>3</sup> Gallic acid



شکل (۱) بالا، منحنی استاندارد اسید گالیک و پایین، منحنی استاندارد کوئرستین

### اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش آلومینیوم کلراید<sup>۱</sup> استفاده شد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). بدین جهت ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم<sup>۲</sup> یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نمونه شاهد به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد. مخلوط نیم ساعت

در تاریکی قرار داده شد و سپس بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد کوئرستین (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ 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 (نمودار ۲).

### نتایج و بحث

اثر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کالوس سرخدار

همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده است، بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در

<sup>1</sup> Aluminium chloride

<sup>2</sup> Potassium acetat

میزان آن در نمونه شاهد مشاهده شد. در تیمارهایی که رادیکال‌های آزاد مضر شوند که سبب پراکسیداسیون لیپید و دناتوره شدن (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).

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

همچنین در بین محرک‌ها، کمترین میزان افزایش نسبت به شاهد در تیمار فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد. اولین پاسخ دفاعی مهم گیاه در برابر تیمار با محرک‌ها (الیسیپتورها)، 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

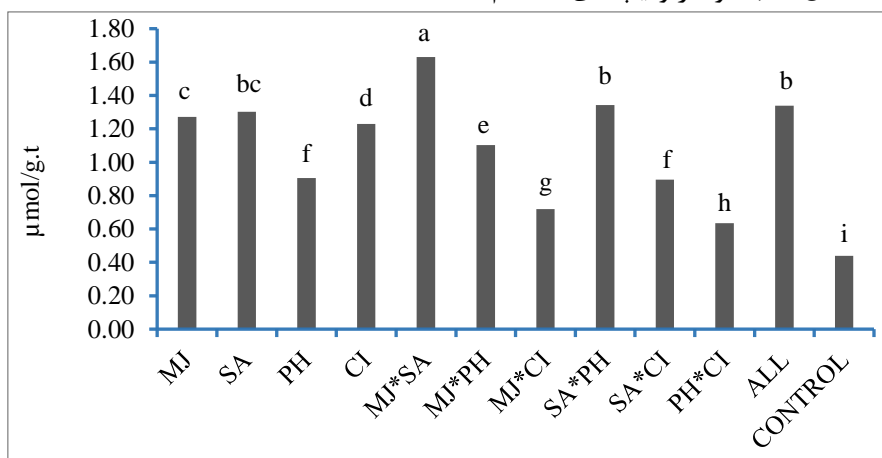
جدول ۱: تجزیه واریانس اثرساده تیمار و گونه و اثر متقابل تیمار و گونه بر فعالیت آنزیم SOD، PPO و PAL

منابع تغییر	Df	SOD مقدار F	POP مقدار F	PAL مقدار F
تیمار	۱۱	۷۰۷/۱۴۸**	۶۶۳۱/۰۰**	۱۱۲۲۰/۰۰**
گونه	۱	۱۸۹/۵۹۴**	۳۳۸۶۰/۰۰**	۴/۰۵۹**
تیمار×گونه	۱۰	۷۶/۰۶۵**	۳۴۰/۸۶۹**	۱۱۷/۸۲۹**

ns, \*\*, \*\*\* ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ را نشان می‌دهد.

(Agarwal et al., 2005) و توت‌فرنگی (wang, 1999) گزارش شده است.

تاثیر استفاده از محرک‌ها بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مریم‌گلی (Dong et al., 2010) و آرابیدوپسیس (Jung, 2004) و ژنوتیپ‌های گندم



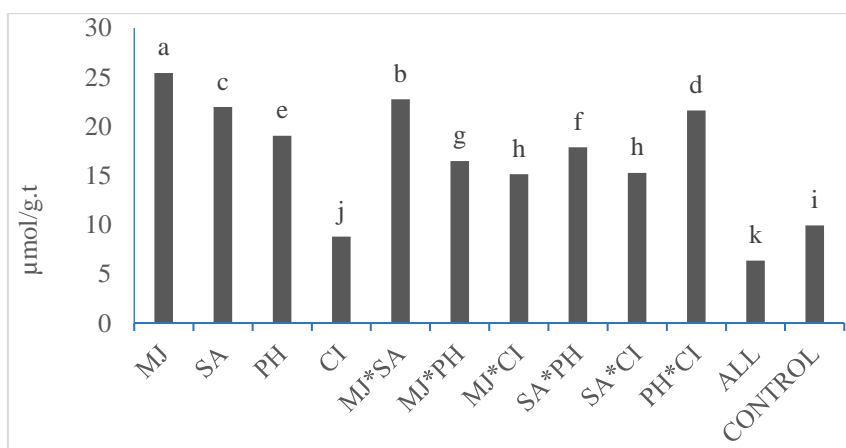
شکل ۲- تاثیر محرک‌ها بر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل جاسمونات\*اسیدسالیسیلیک، MJ\*PH: متیل جاسمونات\*فنیل آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالیسیلیک\*فنیل آلانین، SA\*CI: اسیدسالیسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک\*متیل جاسمونات\*فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، Control: شاهد

### تاثیر محرک‌ها بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

باتوجه به شکل ۳، همه محرک‌های بکار برده شده اثر معنی‌داری در تحریک فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به شاهد نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار متیل جاسمونات و کمترین میزان آن در تیمار ترکیبی متیل جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل آلانین و اسیدسینامیک و در نهایت اسیدسینامیک اتفاق افتاد. اسیدسینامیک باعث کاهش فعالیت پلی-فنل اکسیداز نسبت به شاهد به میزان  $1.137 \mu\text{mol/g.t}$  شد. اما استفاده از آن در ترکیب با متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک حدودا  $5.34 \mu\text{mol/g.t}$  و همچنین همراه با فنیل آلانین بیش از دوبرابر نسبت به شاهد فعالیت PPO را افزایش داد. استفاده از متیل جاسمونات به تنهایی اثر بیشتری نسبت به استفاده همزمان متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک داشت که می‌تواند ناشی از همبستگی منفی این دو تیمار باهم نسبت به استفاده به تنهایی از متیل جاسمونات باشد. با توجه به نتایج، اسیدسالیسیلیک در ترکیب با متیل جاسمونات نسبت به حالتی که به تنهایی به کار برده شد اثر افزایشی بیشتری بر فعالیت PPO داشت. در مقابل در ترکیب با فنیل آلانین و اسیدسینامیک افزایش کمتری نشان داد (شکل ۳).

استفاده از ترکیب تیماری متیل جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل آلانین و اسیدسینامیک همبستگی منفی نسبت به شاهد نشان داد. همچنین در بین نمونه‌هایی که دو تیمار باهم به کار برده شد، تیمار متیل جاسمونات همراه با اسیدسالیسیلیک بیشترین افزایش را نشان داد. متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک باعث تحریک ژن درگیر در بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، فنیل پروپانوئید و آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) که در پاسخ دفاعی نقش دارد، می‌شود (Sarmadi et al., 2018). همچنین استفاده از فنیل آلانین 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.



شکل ۳-تاثیر محرک‌ها بر فعالیت پلی فنل اکسیداز.



MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل جاسمونات\*اسیدسالسیلیک، MJ\*PH: متیل جاسمونات\*فنیل آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالسیلیک\*فنیل آلانین، SA\*CI: اسیدسالسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالسیلیک\*متیل جاسمونات\*فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

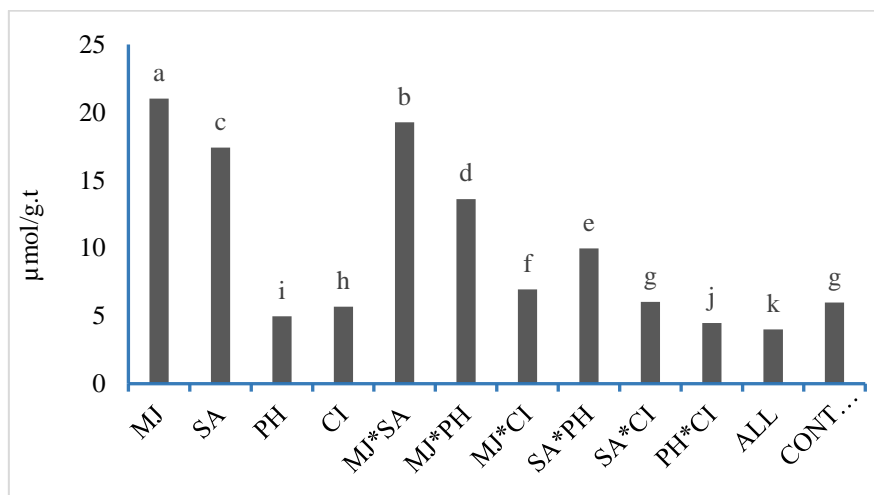
### اثر محرک بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) تحت تاثیر تیمارها معنی دار شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در نمونه‌های کالوس تیمار شده با متیل جاسمونات مشاهده شد. به طوری که فعالیت ۳/۳ برابری در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل ۴). همچنین از تیمارهای ترکیبی، تیماری همزمان متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک اثر بیشتری بر فعالیت آنزیم PAL داشت.

کمترین میزان فعالیت PAL در تیمار تلفیقی متیل جاسمونات، اسیدسالسیلیک، فنیل آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد (شکل ۴). فنیل آلانین به میزان  $1.025 \mu\text{mol/g.t}$  و اسیدسینامیک  $0.301 \mu\text{mol/g.t}$  و کاربرد همزمان فنیل آلانین و اسیدسینامیک  $1.503 \mu\text{mol/g.t}$  موجب کاهش فعالیت PAL نسبت به شاهد شد. مقدار این کاهش تحت تاثیر کاربرد فنیل آلانین به تنهایی بیشتر بود. کاربرد فنیل آلانین همراه با متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک به ترتیب افزایش بیشتر فعالیت PAL را به همراه داشت. همچنین در مقایسه با شاهد، استفاده توأم اسید سینامیک، اسیدسالسیلیک و متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت PAL شد. PAL آنزیم کلیدی در تشکیل ترکیبات فنلی در مسیر فنیل پروپانوئید و همچنین پاسخ دفاعی گیاه می باشد (Zhang, and Liu, 2015) و (Wang et al., 2006). نشان داده شد که تحریک سلول گیاهی با متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک، سبب القاء تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت PAL می شود (Wang et al., 2007) و (صمدی و همکاران، ۲۰۱۵). فنیل آلانین از پیش ماده‌های مهم دو مسیر جدا از هم شامل مسیر بیوسنتز تاکسل و همچنین بیوسنتز ترکیبات فنلی است. چون فنیل آلانین هردو زنجیره جانبی فنیل ایزوسرین در مسیر فنیل پروپانوئید و بخش بنزویل در کربن شماره ۲

تاکسل را فراهم می کند (Edahiro et al., 2005) و (Steele et al., 2005)، انسداد مسیر فنیل پروپانوئید می تواند فنیل آلانین را به سمت تولید تاکسل پیش ببرد (Cusido et al., 1999). فنیل آلانین آمونیا لیاز اولین آنزیم درگیر در مسیر فنیل پروپانوئید است که فنیل آلانین را به اسیدسینامیک تبدیل می کند (Baranek et al., 2012). اضافه کردن مهارکننده‌های این آنزیم می تواند نقطه کنترل برای تبدیل فنیل آلانین به اسیدسینامیک باشد. اسیدسینامیک به عنوان مهارکننده فنیل آلانین آمونیا لیاز، فعالیت آنزیم را ۴۰-۵۰٪ کاهش می دهد (Brincat et al., 2002). با افزایش حضور فنیل آلانین در محیط کشت رقابت به سمت تولید تاکسل پیش می رود در نتیجه از فعالیت PAL کاسته می شود (Cusido et al., 1999) و (Brincat et al., 2002). بررسی حاضر استفاده همزمان فنیل آلانین و سینامیک نسبت به حالتی که هرکدام از تیمارها به تنهایی به کار برده شدند، تاثیر بیشتری در کاهش فعالیت PAL نشان داد (شکل ۴). این امر می تواند به همبستگی مثبت این دو تیمار در جهت مهار فعالیت PAL باشد (Brincat et al., 2002). همچنین ترکیب متیل جاسمونات × اسیدسالسیلیک × فنیل آلانین × اسید سینامیک باعث مهار فعالیت PAL شده که می تواند 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 ژن های بیوسنتز کننده مرتبط و یا فقدان محرک های محیطی، فرایند بیوسنتز تکمیل نشود. بنابر این بیان حداقلی ژن های مرتبط به آنزیم های بیوسنتز کننده در بخشی از مسیر ممکن است با تغذیه خارجی سلول ها تقویت شده و در نهایت متابولوم مورد نظر تشکیل شود (Matkowski, 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.



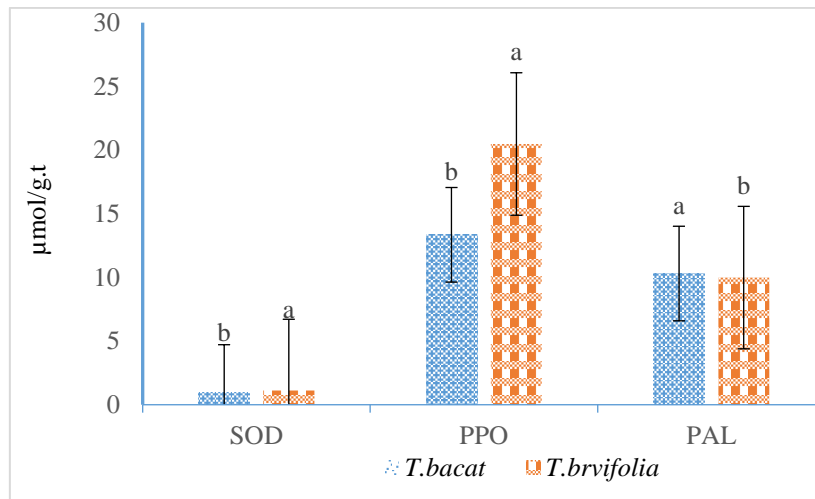
شکل ۴- اثر محرک‌ها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز

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

برای تولید این ترکیب با ارزش تلقی شود (Wang et al., 2006). از شکل ۴ مشخص است که فعالیت آنزیم PPO در گونه بریوفولیا افزایش قابل توجهی 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) و گونه *brevifolia* (Zhang et al., 2002) روند تغییرات آنزیمی مشابه بوده است.

#### 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 ۵). به طوری که میزان فعالیت SOD و PPO در گونه بریوفولیا نسبت به گونه باکاتا بیشتر بود. در مقابل فعالیت PAL در گونه باکاتا نسبت به بریوفولیا 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

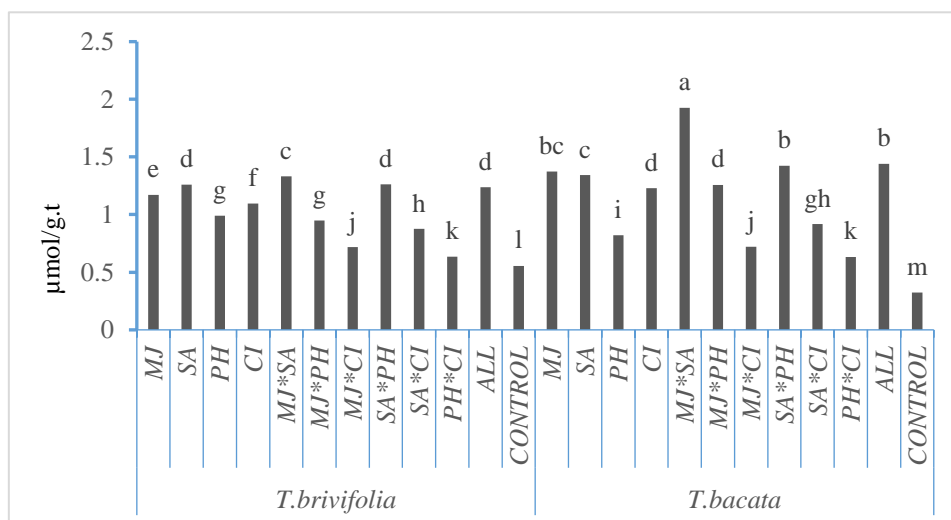


شکل ۵- مقایسه دو گونه سرخدار از نقطه نظر فعالیت آنزیمی

بیشتر بوده که بیانگر توانمندی ژنتیکی بالاتر گونه باکاتا در پاسخ به محرک‌ها، که به نوعی 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 پیش‌سازهای 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.

### اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر متقابل گونه و تیمار معنی‌دار شد. با توجه به شکل (۵) بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار توام متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک در گونه باکاتا مشاهده شد. به‌طور کلی محرک‌های استفاده شده به میزان بیشتری گونه باکاتا را در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نسبت به گونه بریوفولیا تحت تاثیر قرار دادند (شکل ۶). مقایسه نمونه شاهد هر دو گونه نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم در گونه بریوفولیا بدون تاثیر محرک‌ها



شکل ۶- 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\*فنیل آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالیسیلیک\*فنیل آلانین، SA\*CI: اسیدسالیسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک\*متیل جاسمونات\*فنیل آلانین\*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

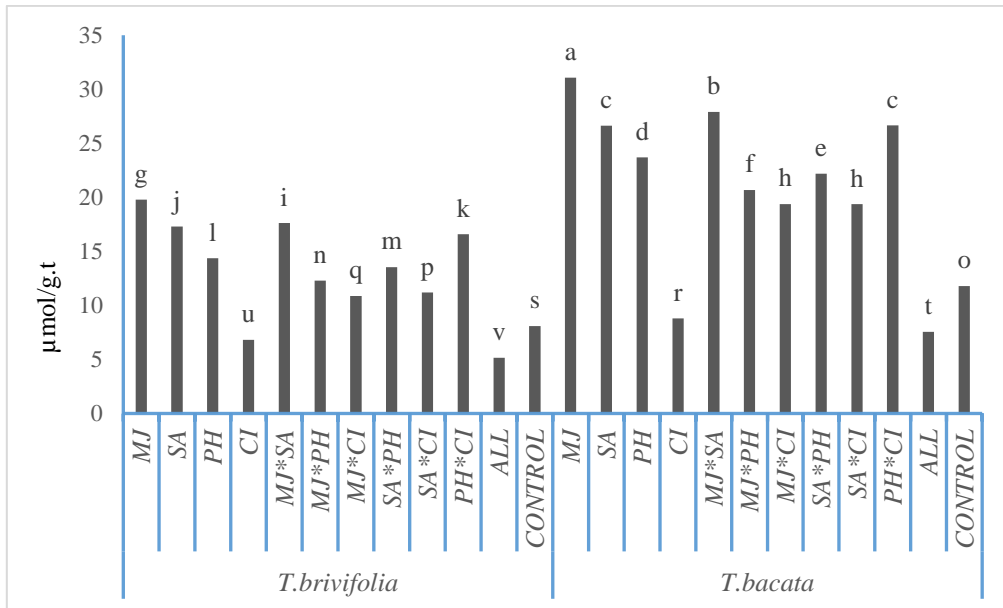
گرفته توسط سایر محققین نشان داده شد که متیل جاسمونات می تواند تولید مشتقات فنل را در کالوس سرخدار گونه باکاتا تحریک کنند. به موازات القای تولید ترکیبات فنولی در سلول، نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم ppo در سلول های تاکسوس به طور قابل توجهی در پاسخ به متیل جاسمونات افزایش یافت ( Jalalpour et al., 2014).

### اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

با توجه به جدول تجزیه واریانس (۱) فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز 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 متیل جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل آلانین، و اسیدسینامیک ایجاد شد. در هر دو گونه مورد بررسی در این تحقیق بیشترین میزان فعالیت PAL در تیمار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل ۸). در هر دو گونه باکاتا و بریوفولیا 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 معنی داری نداشت. این در حالی است که تحت تاثیر تیمارها فعالیت آنزیم PAL در گونه باکاتا نسبت به بریوفولیا افزایش معنی داری داشت (شکل ۸). هنگامی که کالوس دو گونه سرخدار با فنیل آلانین و اسیدسینامیک، که از مهار کننده های 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 است که در مقایسه تیمارهای ترکیبی بیشترین افزایش در کاربرد همزمان متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک مشاهده شد.

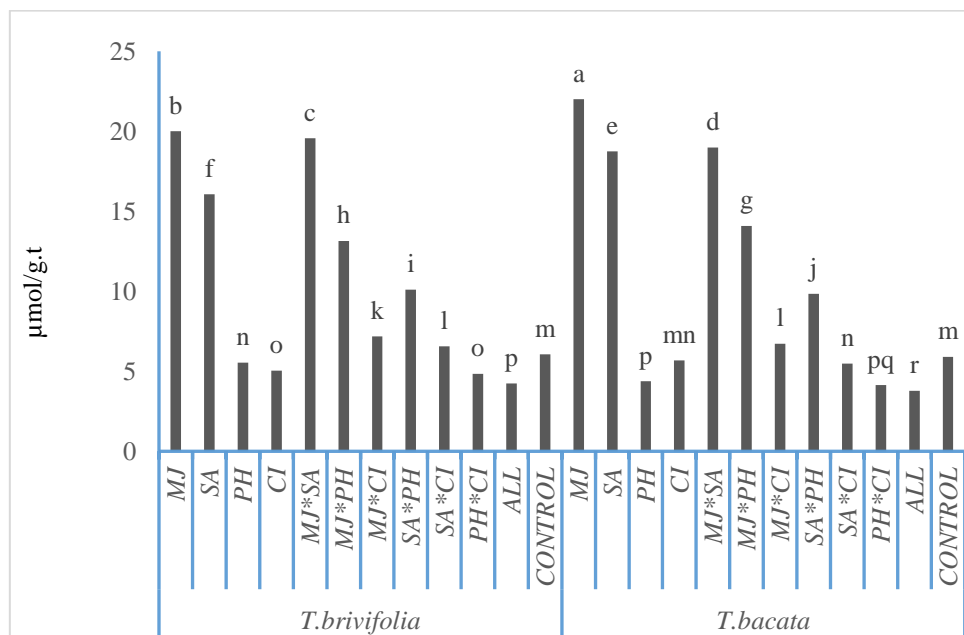
### اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز تفاوت معنی داری نشان داد (جدول ۲). بیشترین میزان فعالیت پلی فنول اکسیداز در تیمار متیل جاسمونات در گونه باکاتا مشاهده شد. کمترین میزان آن در ترکیب متیل جاسمونات\*اسیدسالیسیلیک\*فنیل آلانین\*اسیدسینامیک در کالوس بریوفولیا اندازه گیری شد. به طور کلی محرک های استفاده شده در محیط رشد کالوس باکاتا نسبت به بریوفولیا، فعالیت آنزیم ppo را به میزان بیشتری افزایش دادند (شکل ۶). با مقایسه شاهد در دو گونه باکاتا و بریوفولیا مشخص شد که گونه باکاتا نسبت به بریوفولیا میزان فعالیت طبیعی آنزیم ppo بالاتری دارد (شکل ۷) در هر دو گونه بیشترین تاثیر پذیری در میزان فعالیت آنزیم ppo از تیمار متیل جاسمونات مشاهده شد که نشان دهنده اثر بالای این ترکیب شبه هورمونی در القاء تنش 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 فنیل آلانین آمونیالیاز در استویا (Salmalian et al., 2019) با کاربرد متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس گزارش شد. نکته جالب اینکه تحت تاثیر اثر متقابل تیمارها، زمانی که تیمار ترکیبی متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک استفاده شد، در هر دو گونه بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز مشاهده شد که بیانگر اثر همسوی این دو ترکیب هورمونی در القاء تنش کاذب است. در بررسی های انجام



شکل ۷- اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز.

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



شکل ۸- اثر متقابل گونه و تیمار بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالاز.

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

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرساده تیمار و گونه و اثر متقابل تیمار و گونه بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

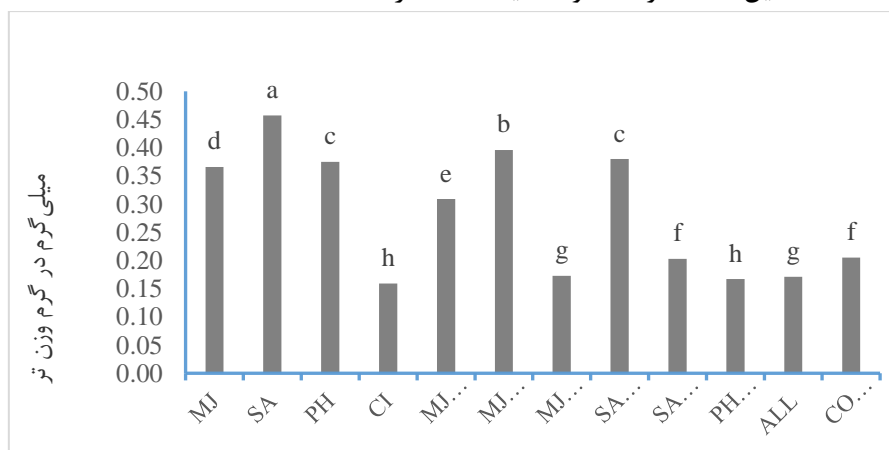
منابع تغییر	درجه آزادی (DF)	مقدار F فنل	مقدار F فلاونوئید	مقدار F فعالیت آنتی‌اکسیدانی
تیمار	۱۱	۱۷۸/۱**	۱۸۶/۱۶۶**	۲۶۹/۳۶۷**
گونه	۱	۱۱۱۵/۰۰**	۱۰۵۳/۰۰**	۱۶۵۰/۶۵۴**
تیمار*گونه	۱۰	۲۴/۶۰۶**	۲۲/۵۶۸**	۲۴/۹۴۲**

ns, \*\*, \* ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ را نشان می‌دهد

### اثر تیمارها بر میزان فنل کل

با توجه به جدول تجزیه واریانس (۲) 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. همچنین اثر متقابل اغلب تیمارها سبب افزایش میزان فنل نسبت به شاهد شد (شکل ۹). که ناشی از توانایی فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک در بازدارندگی القاء بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیاز 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 (شکل ۹). در حالیکه اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در ترکیب باهم و سایر محرک‌های به کار برده شده سبب افزایش تجمع فنل نسبت به شاهد شدند. متیل‌جاسمونات و اسید

سالیسیلیک از محرک‌های مهم در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که در تحقیقات متعددی تاثیر آن‌ها ثابت شده است (Salmalian et al., 2019). همچنین (Matkowski, 2008) و گروب و همکاران، (۲۰۰۴). محتوای فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم PAL در استویا (Salmalian et al., 2019) و اسید رزمارینیک و اسید کافئیک در مریم‌گلی (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 (Matkowski, 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 et al., 2011) کلم‌بروکلی (Kabiri et al., 2014) شیرین‌بیان (صمدی و همکاران، ۱۳۹۳ (کنگرفرنگی) نتایج همسو گزارش کردند.



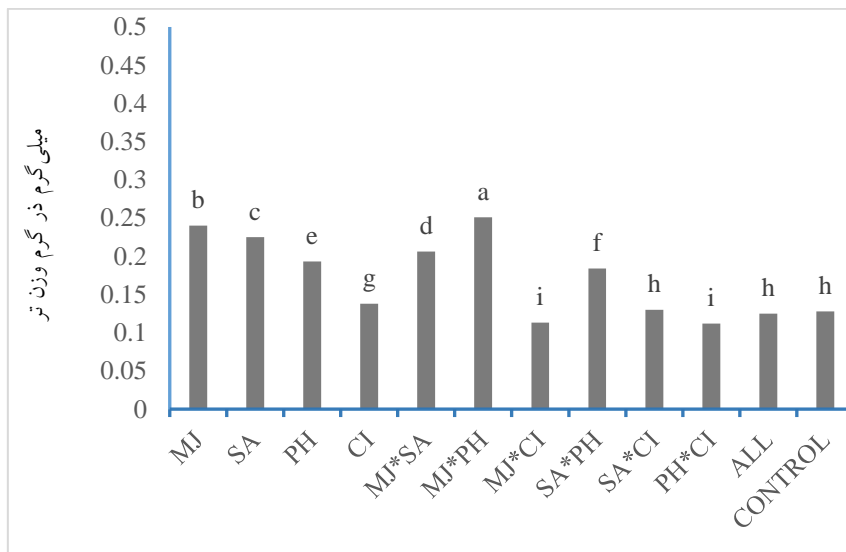
شکل ۹- اثر محرک بر میزان فنل کل.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل جاسمونات\*اسیدسالسیلیک، MJ\*PH: متیل جاسمونات\*فنیل‌آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالسیلیک\*فنیل‌آلانین، SA\*CI: اسیدسالسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالسیلیک\*متیل جاسمونات\*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 ۹ استفاده از ترکیب جاسمونات\*فنیل‌آلانین در محیط کشت بیشترین تاثیر را در افزایش ترکیبات فلاونوئیدی نسبت به نمونه شاهد داشت. متیل جاسمونات\*اسیدسالسیلیک\*فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک و ترکیب اسیدسالسیلیک\*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 متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک و فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک مشاهده شد که باتوجه به افزایش بیشتر در مورد کاربرد متیل جاسمونات و فنیل‌آلانین به تنهایی، این کاهش می‌تواند به دلیل اثر سینرژیستی منفی اسیدسینامیک بر متیل جاسمونات و فنیل‌آلانین باشد. گل راعی (Wang et al., 2015) کنگرفرنگی (صمدی و همکاران، ۲۰۱۵) گوجه‌فرنگی (Ehsanpour and Maleki, 2018) نتایج همسو گزارش کردند.



شکل ۹- اثر محرک بر میزان فلاونوئید کل.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل جاسمونات\*اسیدسالسیلیک، MJ\*PH: متیل جاسمونات\*فنیل‌آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالسیلیک\*فنیل‌آلانین، SA\*CI: اسیدسالسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالسیلیک\*متیل جاسمونات\*فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک، CONTROL: شاهد

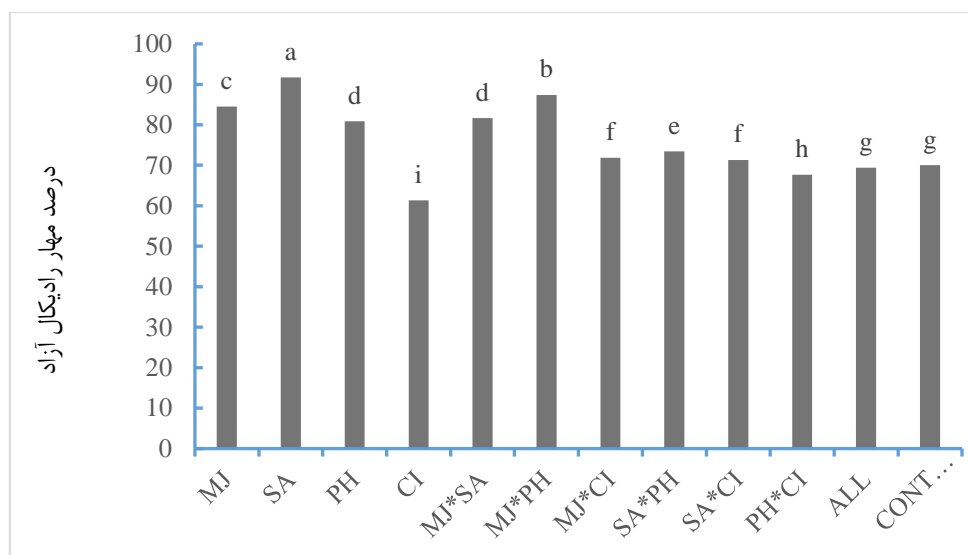
### اثر محرک‌ها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

با توجه به جدول تجزیه واریانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پینه‌های تیمار شده با محرک‌ها اثرات

معنی داری را نشان داد همانطور که در شکل (۴-۷) نشان داده شده است بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار اسیدسالسیلیک و کمترین آن در اسیدسینامیک

مسیر بیوسنتزی اتیلن و تغییر در بیان ژن‌ها، بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی‌فنل اکسیداز اثر می‌گذارد و از این طریق باعث مقاومت به تنش می‌شود. همچنین اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات از طریق فعال نمودن آنزیم‌های دیگری چون فنیل‌آلانین آمونیلایز و یا بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی سبب القا ترکیبات ثانویه فنیل پروپانوییدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. گزارشات نعناع لفللی (Shabrangi and Mehrabi, 2014)، نخود (بوکرا و همکاران، ۲۰۱۴) و گل بنفشه (قربانی و همکاران، ۱۳۹۰) با نتایج ما همسو بود.

اندازه‌گیری شد. علاوه بر تیمار اسیدسینامیک ترکیب فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به شاهد کاهش 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. اسیدسالیسیلیک با انتقال پیام از طریق فعال کردن



شکل ۱۰- تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

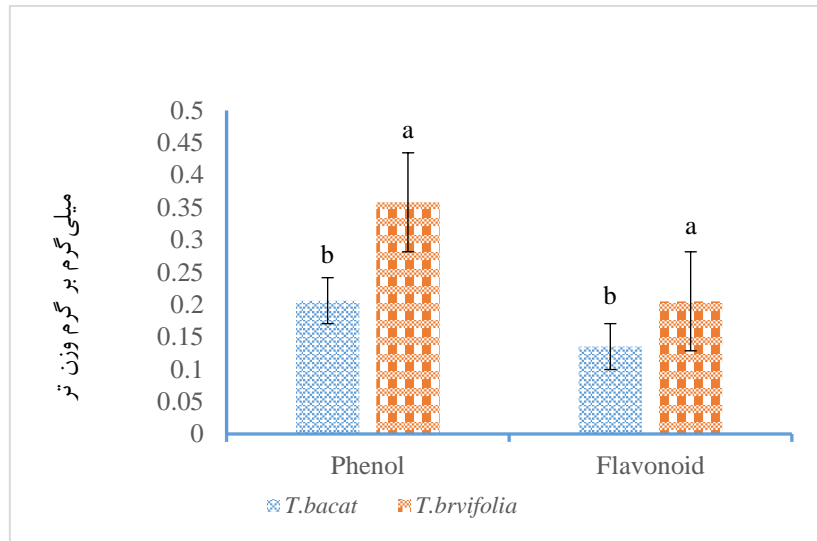
MJ: متیل‌جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل‌آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل‌جاسمونات\*اسیدسالیسیلیک، MJ\*PH: متیل‌جاسمونات\*فنیل‌آلانین، MJ\*CI: متیل‌جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالیسیلیک\*فنیل‌آلانین، SA\*CI: اسیدسالیسیلیک\*اسیدسینامیک، PH\*CI: فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک، ALL: اسیدسالیسیلیک\*متیل‌جاسمونات\*فنیل‌آلانین\*اسیدسینامیک،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

نسبت به گونه بریوفولیا 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 پروپانوییدی 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).

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 بریوفولیا میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به گونه باکاتا نشان داد (شکل ۱۱). ثابت شده است که گونه باکاتا توانمندی ژنتیکی بیشتری در تولید ماده مؤثره تاکسل



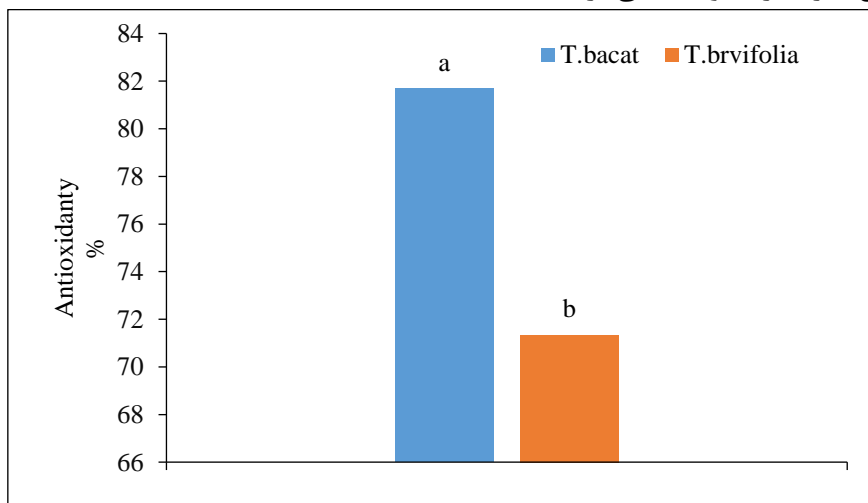


شکل ۱۱- مقایسه میزان فنل و فلاونوئید کل در دو گونه *baccata* و *brevifolia* سرخدار.

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

مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس دو گونه *baccata* و *brevifolia* سرخدار  
 نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس گونه باکاتا از گونه بریوفولیا بالاتر است، به ترتیب (شکل ۱۲).

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) گونه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرخدار تفاوت معنی‌داری داشت.



شکل ۱۲- اثر دو گونه *baccata* و *brevifolia* سرخدار بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

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

بیشتر بیومس باشد. ساقه جوان گونه بریوفولیا 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 بریوفولیا نسبت به باکاتا طولانی‌تر بود (۷-۹ روز) که می‌تواند از دلایل اصلی این تفاوت مشاهده شده باشد (Bagheri and Saffari, 2011).



### تغییرات وزن کالوس تحت تاثیر اثر متقابل تیمار و گونه گیاهی

با توجه به نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) 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 بریوفولیا وزن‌تر بیشتری داشتند (شکل ۱۳ و ۱۴) که می‌تواند ناشی از توانمندی ژنتیکی گونه باکاتا در تولید



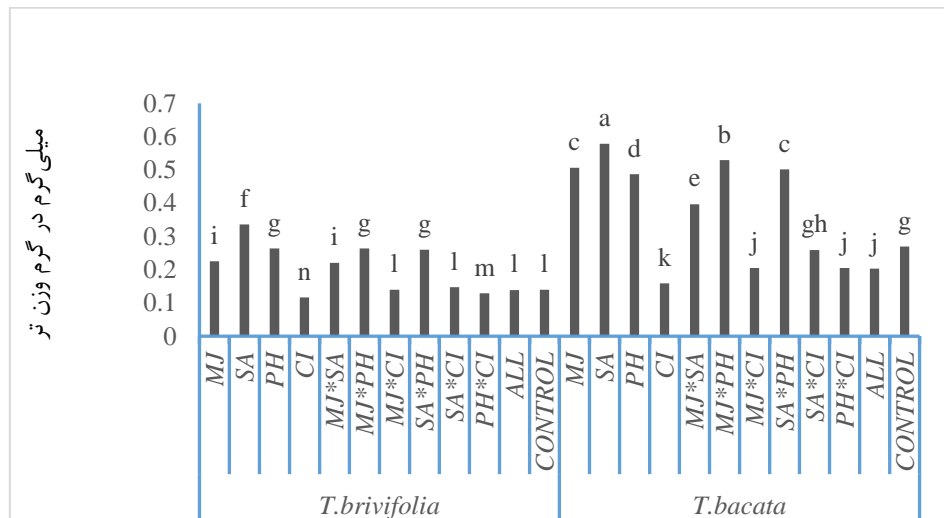
شکل ۱۳. شکل بالا. کالوس گونه باکاتا و شکل پایین. کالوس گونه بریوفولیا

مسیر فنیل پروپانوئیدی مرتبط به واکنش‌های دفاعی باشد (شکل ۵). استفاده همزمان متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک و همچنین فنیل‌آلانین و اسیدسینامیک در گونه باکاتا، و تیمار فنیل‌آلانین، اسیدسینامیک و همچنین اسیدسینامیک به تنهایی در گونه بریوفولیا سبب کاهش تجمع فنل شد. به طوری که تجمع فنل تحت تاثیر تیمارهای ذکر شده از نمونه شاهد نیز کمتر بود (شکل ۱۳). 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 ۱۳). بیشترین میزان تولید فنل و فلاونوئید در تیمارهای سالیسیلیک اسید (۱۰۰mM) + شوری (۵۰mM) در محیط کشت

### اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فنل کل

میزان فنل کل کالوس تحت تاثیر نوع تیمار و گونه گیاهی تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۱۳). بیشترین (۰.۵۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) میزان فنل در گونه باکاتا و تحت تاثیر تیمار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. در مقابل کمترین آن (۰.۱۱۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار اسیدسینامیک گونه بریوفولیا بود. به طور کلی میزان فنل در گونه باکاتا در همه تیمارهای به کار برده شده نسبت به گونه بریوفولیا بیشتر بود. مقایسه میزان فنل در نمونه شاهد دو گونه نشان می‌دهد که توانمندی ژنتیکی گونه باکاتا در تولید ترکیبات فنلی بیشتر است (شکل ۱۳). افزون بر این گونه باکاتا به محرک واکنش بیشتری نشان داد که می‌تواند ناشی از فعالیت بالاتر ژنهای مرتبط به آنزیم PAL و دیگر آنزیم‌های

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



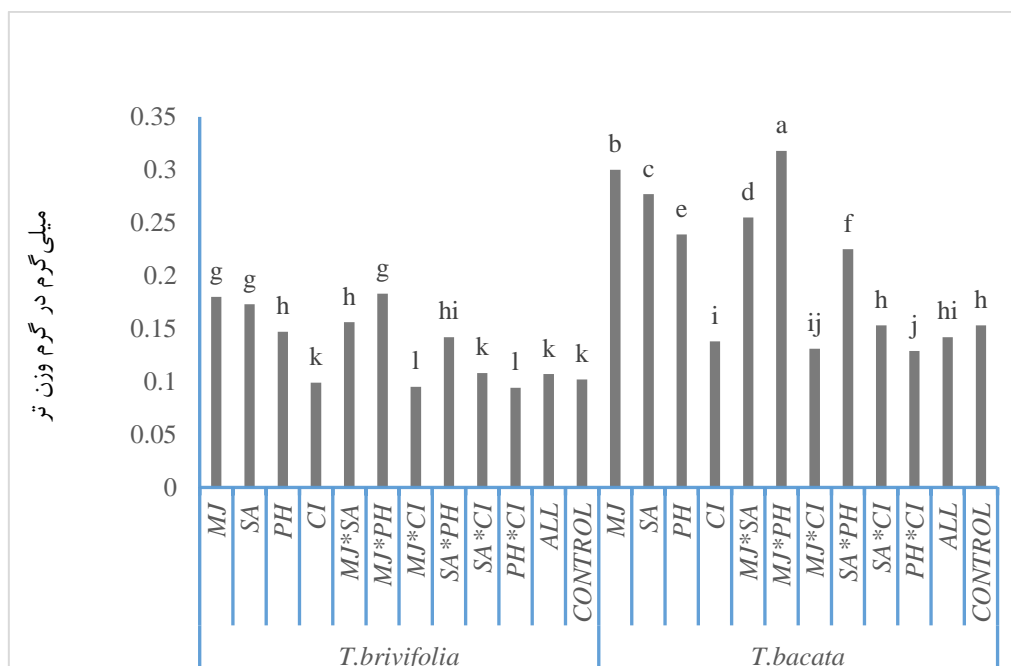
شکل ۱۳- اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فنل.

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

(2004) نشان داده شد پس از استفاده از متیل جاسمونات در محیط کشت *T. bacata*، *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 متیل جاسمونات و فنیل آلانین مشاهده شد (۰.۳ میلی گرم در گرم وزن تر). این در حالی است که در گونه بریوفولیا بیشترین میزان تجمع فلاونوئید در دو تیمار متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک و همچنین متیل جاسمونات و فنیل آلانین مشاهده شد. تیمارهایی که تفاوت معنی‌داری در این صفت گونه باکاتا نداشتند (شکل ۱۴).

### اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل

با توجه به نتایج (جدول ۲)، اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل تفات معنی‌داری داشت. بیشترین میزان فلاونوئید در کالوس رشد کرده در محیط کشت حاوی متیل جاسمونات\*فنیل آلانین و کمترین آن در تیمار ترکیبی فنیل آلانین و اسیدسینامیک مشاهده شد (شکل ۱۳). در بررسی حاضر مشخص شد که میزان فلاونوئید در گونه باکاتا هم در شاهد و هم در تیمارهای به کار برده شده نسبت به گونه‌ی بریوفولیا بیشتر بود که می‌تواند 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 الیسیست شدن و تنش باشد. نکته‌ای که در بررسی Tabata



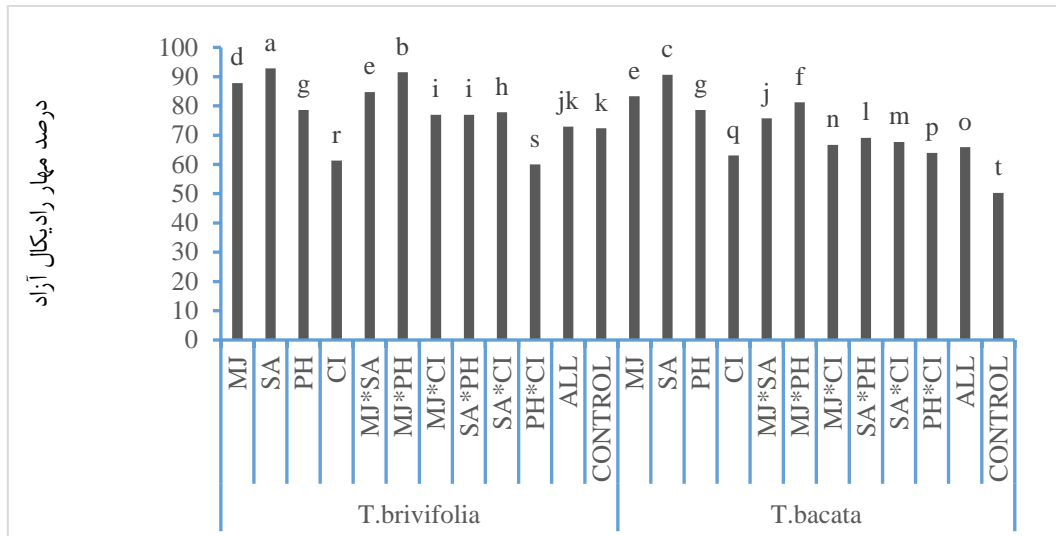
شکل ۱۴- اثر متقابل گونه و تیمار بر میزان فلاونوئید کل.

MJ: متیل جاسمونات، SA: اسیدسالیسیلیک، PH: فنیل آلانین، CI: اسیدسینامیک، MJ\*SA: متیل جاسمونات\*اسیدسالیسیلیک، MJ\*PH: متیل جاسمونات\*فنیل آلانین، MJ\*CI: متیل جاسمونات\*اسیدسینامیک، SA\*PH: اسیدسالیسیلیک\*فنیل آلانین، 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 (جدول ۲)، اثر متقابل گونه و تیمار بر توانمندی آنتی‌اکسیدانی عصاره کالوس معنی‌دار بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه بریوفولیا تحت تاثیر اسیدسالیسیلیک در بیشترین مقدار (۹۳ درصد مهار رادیکال آزاد) قرار داشت. در مقابل کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۵۰ درصد مهار رادیکال آزاد) در نمونه شاهد گونه باکاتا مشاهده شد. تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو گونه را می‌توان به تفاوت در خصوصیات ژنتیکی و همچنین شرایط زیستگاه گیاه مرتبط دانست. نشان داده شده است که توانمندی آنتی‌اکسیدانی کالوس متأثر از پارامترهای مختلف از جمله نور،

گرما و دما، سطح و کیفیت کالوس قرار می‌دهد (ماندو، ۲۰۰۹). 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 هر دو گونه روند مشابهی داشت. تیمار اسیدسینامیک در گونه بریوفولیا نسبت به شاهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری داشت. حضور اسیدسینامیک در محیط کشت بازدارنده فعالیت آنزیم PAL و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی 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 (Matkowski, 2008).



شکل ۱۵- 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

### نتیجه‌گیری کلی

گونه بریوفولیا در استفاده خارجی پیش‌سازها و محرک‌ها در شرایط درون شیشه دارد. بادر نظر 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 می‌گیرد. 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 مورد نظر کاهش داد.

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان گفت استفاده از محرک متیل‌جاسمونات برای آنزیم‌های PAL و PPO و استفاده از متیل‌جاسمونات 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

منابع

- III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science*, 146(2), pp.101-107.
11. Cusido, R.M., Palazon, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., and Pinol, M.T. (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).
  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*
۱. صمدی، ص.، قاسم نژاد، ع. و علیزاده، م. (۲۰۱۵). تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) تحت تاثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در شرایط درون شیشه‌ای. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۱(۴)، ۱۳۵-۱۴۸.
  ۲. قربانی، ا. و بخشی، د. (۱۳۹۰). ارزیابی مقدار کلروژنیک اسید، فلاونوئیدها و ظرفیت آنتی اکسیدانی ۱۳ رقم ایرانی و خارجی سیب، مجله فن آوری تولیدات گیاهی، ۱۱(۲): ۶۲-۵۳.
  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

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 piperita* L. 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.
39. Singh, A. and Dwivedi, P. (2018). Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for *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 squalenstatin 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., Ghassempour, 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 Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, pp.53-88.

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.
- 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<sup>1</sup>, Azim Ghasemnezhad<sup>\*2</sup>, Khodayar Hemmati<sup>3</sup>, Alireza Sadeghipour<sup>4</sup>

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](mailto: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