بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی

تاثیر چند الیسیتور بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت درون شیشه‌ای نوروزک (*Salvia lerrifolia* Benth)

نگارنده: سمیه جوکار

استاد راهنما

دکتر زیبا قسیمی حق

اساتید مشاور

دکتر معصومه مدرس

دکتر حجت اله بداقی

بهمن ۱۳۹۶

شماره: ۳۰۵/۱
تاریخ: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سمیه جوکار با شماره دانشجویی ۹۴۰۵۳۱۴ رشته علوم باغبانی گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی تحت عنوان تاثیر چند الیسیتور بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت درون شیشه‌ای نوروزک (*Salvia lerrifolia* Benth)که در تاریخ ۹۶/۱۱/۲ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: عالی) ☐ مردود ☐

نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☐

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم			
۳- استاد مشاور اول	دکتر معصومه مدرس	استادیار	
۴- استاد مشاور دوم	دکتر حجت اله بداقی	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر زهرا گنجی نوروزی	استادیار	
۶- استاد ممتحن اول	دکتر محمدرضا عامریان	دانشیار	
۷- استاد ممتحن دوم	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم به:

پدرم، بزرگ استادم

و مادرم، بلندتکیه گاهم

مهربان فرشتگانی که

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن،

عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون وجود آنهاست...

و خواهران و برادر عزیزم

که در تمامی لحظات زندگی، پشتیبانم بودند...

به نام ایزد یکتا

پس از سپاس و ثنای بی حد بر آستان صفات بی‌همتای احدیت که در کمال رافت و در نهایت عطوفت رخصت اتمام این پایان نامه را به نگارنده عطا فرموده است؛ در ابتدا صمیمانه ترین تقدیرها تقدیم به **خانواده عزیز و مهربانم** که همواره حامی و مشوقم بودند و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی‌ام بدون دعای خیر و برکت وجودشان غیر ممکن بود.

نگارنده بر خود می داند تا بدین وسیله از زحمات بی دریغ، تلاش های بی وقفه و راهنمایی های ارزشمند استادان گرامی سرکار خانم **دکتر زیبا قیمی حق**، سرکار خانم **دکتر معصومه مدرس** و جناب آقای **دکتر حجت اله بداقی** در راستای انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی نماید.

از اساتید بزرگوار جناب آقای **دکتر محمدرضا عامریان** و جناب آقای **دکتر شاهرخ قریشیک** که به عنوان اساتید داور، زحمت بازخوانی این پایان نامه را بر عهده داشتند و نظرات ارزنده‌ای در هر چه بهتر شدن آن ارائه نمودند، کمال سپاسگزاری را دارم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم **دکتر زهرا گنجی نوروزی** که زحمت اداره جلسه را بر عهده داشتند سپاسگزارم.

و در خاتمه از تمامی دوستانم که حضورشان همواره مایه دلگرمی‌ام بودند، صمیمانه قدردانی کرده و آرزومند بهترین‌ها در زندگی برای ایشان، هستم.

سمیه جوکار

بهمن ماه یک هزار و سیصد و نود و شش هجری شمسی

تعهد نامه

اینجانب سمیه جوکار دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه تاثیر چند الیسیتور بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت درون شیشه‌ای نوروزک (Salvia lerrifolia Benth) تحت راهنمایی دکتر زیبا قسیمی حق متعهد می شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.**

چکیده

در سال‌های اخیر با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، دست‌یابی به شرایطی که بتواند بیش‌ترین اثرگذاری را در تولید اقتصادی این ترکیبات داشته باشد، دارای اهمیت فراوان است. در پژوهش حاضر اثر الیسیتورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) در سه سطح (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرو مولار)، و اثر الیسیتورهای فیزیکی نور UV-A و نور UV-B در دو سطح (۳۰ و ۶۰ دقیقه) در کالوس گیاه نوروزک (*Salvia lerrifolia* Benth) در آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر میزان وزن تر (۴/۱۶۷ گرم) و خشک (۰/۲۷۵ گرم)، فنل کل (۱/۶۸۱ میلی‌گرم در رم وزن تر) و فلاونوئید (۹۸/۰۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات مشاهده شد. با افزایش غلظت متیل جاسمونات از این مقدار محتوای فنل کل، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید کاهش یافت. با افزایش سالیسیلیک اسید نیز تجمع ترکیبات فوق روند رو به افزایشی را نشان داد. حداکثر میزان رزمارینیک اسید (۴۳/۶۵۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در نمونه تیمار شده با ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد در حالی که غلظت ۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید بیشترین تاثیر (۰/۴۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را در افزایش تولید کافئیک اسید داشت، با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مقدار کافئیک اسید کاهش یافت. بررسی اثر الیسیتورهای نور UV-A و UV-B افزایش محتوای فنل کل، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید را در کالوس‌های تحت تیمار نشان داد. ولی با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه در هر دو نوع نور از میزان مواد مورد سنجش کاسته شد. نتایج نشان داد تیمار نور UV-B به مدت ۳۰ دقیقه تاثیر بیشتری در افزایش میزان رزمارینیک اسید (۳۵/۶۷۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کافئیک اسید (۰/۲۵۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داشت. با توجه به نتایج به دست آمده بیان می‌شود که سالیسیلیک اسید بیشترین تاثیر را در افزایش میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کالوس حاصل از برگ نوروزک نسبت به

دیگر تیمارهای الیسیتوری داشته و با بهینه سازی غلظت آن می‌توان میزان این متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد.

کلمات کلیدی: *Salvi lerrifolia B.*، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات، UV-A، UV-B، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه و کلیات ۱

مقدمه ۲

۱ کلیات... ..... ۴

۱-۱ خاستگاه جنس مریم گلی..... ۴

۱-۲ پیشینه تاریخی مصرف مریم گلی ۴

۱-۳ گیاهشناسی جنس مریم گلی..... ۵

۱-۴ نوروزک..... ..... ۵

۱-۴-۱ گیاهشناسی نوروزک ۵

۱-۴-۲ نیازهای اکولوژیکی ۶

۱-۴-۳ اهمیت دارویی ۷

۱-۵ اهمیت و لزوم کشت بافت در گیاهان دارویی ۱۳

۱-۵-۱ مزایای کشت بافت..... ۱۴

۱-۶ الیسیتورها..... ..... ۱۵

۱-۶-۱ متیل جاسمونات ۱۷

۱-۶-۲ سالیسیلیک اسید ۱۸

۱-۶-۳ نور UV.... ..... ۱۹

۱-۷ اهداف مشخص تحقیق ۲۰

فصل دوم

۲ بررسی منابع و تحقیقات انجام شده در موضوع ۲۲

فصل سوم

۳ مواد و روش‌ها ۳۰

۳-۱ تهیه گیاهان استریل درون شیشه‌ای ۳۰

۳-۱-۱ تهیه ریزنمونه ۳۰

۳-۲ مواد شیمیایی..... ..... ۳۱

۳-۳ تهیه محیط کشت ۳۱

۳-۳-۱ تهیه محلول‌های ذخیره عناصر پرمصرف ۳۱

۳-۳-۲ تهیه محلول ذخیره عناصر کم‌مصرف ۳۲

۳-۳-۳ تهیه محلول ذخیره آهن ۳۲

۳-۳-۴ تهیه محلول ذخیره ویتامین‌ها ۳۳

۳-۳-۵ تهیه محلول ذخیره تنظیم کننده‌های رشد ۳۳

۳-۳-۶ تهیه یک لیتر محیط کشت ۳۴

۳-۴ سترون کردن وسایل و محیط کشت ۳۴

۳-۵ الیسیتورها..... ..... ۳۵

۳-۵-۱ تهیه استوک متیل جاسمونات (Methyl jasmonate) ۳۵

۳-۵-۲ تهیه سالیسیلیک اسید (salicylic acid) ۳۵

۳-۶ القای الیسیتورها در فاز کالوس‌زایی ۳۵

۳-۷ اندازهگیری صفات مورفولوژیکی کالوس‌ها ۳۶
۳-۷-۱ درصد کالوس‌زایی ۳۶
۳-۷-۲ اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس ۳۶
۳-۸ سنجش میزان ترکیبات فنلی کل به روش فولین سیوکالتو ۳۶
۳-۸-۱ رسم منحنی استاندارد گالیک اسید ۳۷
۳-۹ سنجش رزمارینیک اسید ۳۸
۳-۹-۱ رسم منحنی استاندارد رزمارینیک اسید ۳۸
۳-۱۰ سنجش کافئیک اسید ۳۹
۳-۱۰-۱ رسم منحنی استاندارد کافئیک اسید ۳۹
۳-۱۰-۲ تهیه معرف آرنو ۳۹
۳-۱۰-۳ تعیین مقدار کافئیک اسید ۳۹
۳-۱۱ سنجش فلاونوئید کل ۴۰
فصل چهارم
۴ نتایج و بحث ۴۲
۴-۱ صفات مورفولوژیکی کالوس ۴۲
۴-۱-۱ درصد کالوس‌زایی ۴۲
۴-۱-۲ رنگ کالوس ۴۲
۴-۱-۳ بافت کالوس ۴۵
۴-۱-۴ قطر کالوس ۴۶
۴-۱-۵ بررسی وزن تر و خشک کالوس ۴۸

۴-۲ نتایج حاصل از سنجش اسیدهای فنلی ۵۴
۴-۲-۱ میزان فنل کل ۵۴
۴-۲-۲ میزان فلاونوئید کل ۶۰
۴-۲-۳ میزان رزمارینیک اسید ۶۶
۴-۲-۴ میزان کافئیک اسید..... ۷۱
فصل پنجم
۵-۱ نتیجه گیری کلی ۷۸
۵-۲ پیشنهادات.. ..... ۷۹
پیوست‌ها.....۸۱
منابع ۸۴

فهرست جداول

جدول ۳-۱ غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت MS ۳۱

جدول ۳-۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت MS..... ۳۲

جدول ۳-۳ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت MS..... ۳۳

جدول ۳-۴ غلظت ویتامین‌های محیط کشت MS..... ۳۳

جدول پیو ست ۱- تجزیه واریانس الیسیتور سالیسیلیک ا سید بر صفات فیزیولوژیکی و بیو شیمیایی گیاه نوروزک ۸۰

جدول پیو ست ۲- تجزیه واریانس الی سیتور متیل جا سمونات بر صفات فیزیولوژیکی و بیو شیمیایی گیاه نوروزک ۸۰

جدول پیوســـت ۳- تجزیه واریانس الیســـیتور UV-A بر صـــفات فیزیولوژیکی و بیوشـــیمیایی گیاه نوروزک..... ۸۰

جدول پیوســـت ۴- تجزیه واریانس الیســـیتور UV-B بر صـــفات فیزیولوژیکی و بیوشـــیمیایی گیاه نوروزک..... ۸۱

فهرست شکل‌ها

۱-۱ فرمول شیمیایی کافئیک اسید ۱۱

۱-۲ مسیر بیوسنتزی اسیدهای فنولیک و فلاونوئید از مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید ۱۱

۱-۳ فرمول شیمیایی رزمارینیک اسید ۱۲

۱-۴ مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید ۱۳

۱-۵ ساختار متیل جاسمونات ۱۸

۱-۶ ساختار سالیسیلیک اسید ۱۸

۱-۷ مسیر بیوسنتز سالیسیلیک اسید ۱۹

۴-۱ رنگ کالوس‌های تشکیل شده از برگ در محیط کشت تیمار شده با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات..... ۴۳

۴-۲ رنگ کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت تیمار شده با نور UV-A و UV-B ۴۴

۴-۳ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر قطر کالوس ۴۶

۴-۴ تاثیر نور UV-A بر قطر کالوس ۴۷

۴-۵ تاثیر نور UV-B بر قطر کالوس ۴۸

۴-۶ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر وزن تر کالوس ۴۹

۴-۷ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر وزن خشک کالوس ۴۹

۴-۸ تاثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر وزن تر کالوس ۵۱

۴-۹ تاثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر وزن خشک کالوس ۵۱

۴-۱۰ تاثیر نور UV-A بر وزن تر کالوس ۵۲

۴-۱۱ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل ۵۳

۴-۱۲ تاثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر میزان فنل کل ۵۴
۴-۱۳ تاثیر نور UV-A بر میزان فنل کل ۵۵
۴-۱۴ تاثیر نور UV-B بر میزان فنل کل ۵۸
۴-۱۵ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل ۵۹
۴-۱۶ تاثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئید کل ۶۱
۴-۱۷ تاثیر نور UV-A بر میزان فلاونوئید کل ۶۲
۴-۱۸ تاثیر نور UV-B بر میزان فلاونوئید کل ۶۴
۴-۱۹ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان رزمارینیک اسید ۶۵
۴-۲۰ تاثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر میزان رزمارینیک اسید ۶۷
۴-۲۱ تاثیر نور UV-B بر میزان رزمارینیک اسید ۶۸
۴-۲۲ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان کافئیک اسید ۷۰
۴-۲۳ تاثیر نور UV-A بر میزان کافئیک اسید ۷۲
۴-۲۴ تاثیر نور UV-B بر میزان کافئیک اسید ۷۳
پیوست ۱- نمودار منحنی استاندارد رزمارینیک اسید ۸۰

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که توسط انسان به‌عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌هاست، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است. با توجه به اینکه بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا متابولیت‌های ثانویه گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولا پیچیده و پرهزینه می‌باشد. بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست فناوری از جمله کشت سلولی گیاه، راه جایگزین سودمندی است. دست ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از الیسیتورهای زیستی یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. الیسیتورها از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های فوق حساسیتی می‌شوند. تشخیص مولکولی و برهمکنش بین الیسیتور و گیرنده‌های گیاه فرایند پیچیده‌ای است که برای انتقال پیام الیسیتور ضروری است. به‌دنبال درک الیسیتور پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول گیاهی نظیر افزایش جریانات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر (ROS)، فعال سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و سنتز فیتوآلکسین‌ها اتفاق می‌افتد. در این مطالعه جنبه‌های مختلف امکان افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاه با استفاده از الیسیتورهای غیرزیستی مورد بررسی قرار گرفته است. علی رغم خصوصیات دارویی و آنتی اکسیدانی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* B.) و تحقیقات فارماکولوژیکی گسترده روی عصاره‌های این گیاه، در مورد شناسایی ترکیبات فنولیک در این گیاه و نیز تولید اسیدهای فنولیک از طریق کشت بافت وسلول پژوهشی صورت نگرفته است و با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، تحقیق در مورد اثر الیسیتورهای مختلف بر میزان تولید

ترکیبات ثانویه ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که گیاه نوروزک، گیاهی در معرض خطر انقراض است، بنابراین دسترسی به منابع جدید داروهای طبیعی موجود در این گیاه ضروری است. در این پژوهش تلاش شد با استفاده از کشت بافت و کشت کالوس گیاه نوروزک بتوان اسیدهای فنولیک موجود در این گیاه که شامل کافئیک اسید و رزمارینیک اسید است، را افزایش داد.

۱ کلیات

۱-۱ خاستگاه جنس مریم گلی[۱]

جنس مریم گلی متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) اســـت. نام جنس .L *Salvia* از لاتین Salvare مشتق شده است که به معنی سالم بودن، ایمن بودن و بی خطر بودن است که به خصوصیات دارویی بعضـــی از گونه‌ها برمی‌گردد. این گیاه بخصـــوص توســـط چینی‌ها برای افزایش طول عمر و در جشن‌های روم قرن‌ها به عنوان گیاه مقدس، استفاده شده است. این نام به Sauge (Sage) در فرانسه و Sawge در انگلیس قدیم ترجمه شـده اسـت. جنس مریم گلی حدود ۹۰۰ گونه را شـامل می‌شـود که در سراسر جهان انتشار یافته و دارای چندین گونه زینتی، سالادی و دارویی است. اگر چه مکزیکو بالاترین تعداد گونه (حدود ۲۵۰) را در بر دارد، اما به نظر می‌رسد که منشا این جنس افغانستان و آسیای مرکزی باشد، جایی که دامنه وسیعی از انواع مورفولوژیکی اولیه واقع شده است (شاعرزاده، ۲۰۱۱).

۱-۲ پیشینه تاریخی مصرف مریم گلی

این گیاه دارای پیشـــینه تاریخی و کاربردی بســـیار قدیمی حتی دورتر از نعناع می‌باشـــد. به ویژه در مکزیک پیش از اینکه مســـتعمره اســـپانیا گردد و ذرت گیاه غالب منطقه شـــود، مریم گلی گیاه خوراکی و مقدس مردم این منطقه بود، به طوری که از تمام اجزای آن اســـتفاده خوراکی و دارویی می‌شـــد. در حال حاضر نیز کاربرد خود را تا حدودی حفظ نموده است، اخیرا در کشورهای اروپای جنوبی و آلمان برگ‌های تازه مریم گلی به خصـــوص گونه *S. officinalis* جهت معطر و ترد ســـاختن انواع گوشـــت و همچنین نوشیدنی‌ها به کار می‌رود. از سوی دیگر این گیاه به دلیل کرکینه پوش بودن، ظاهری نقره‌ای و درخشنده

[۱] salvia

دارد که بسیار فریبنده بوده و برای تزیین در باغ‌ها کشت می‌گردد. همچنین توسعه سیستم ریشه‌ای آن به گونه‌ای اســت که به حاصــلخیزی خاک کمک می‌کند. در ضــمن به دلیل داشــتن تنوع رنگی در جام گل، نوش فراوان و شکل و ظاهر فریبنده خود به شدت مورد پ سند و توجه ح شرات به ویژه زنبورهای ع سل می با شد. ع سل حا صل از این گیاه ب سیار معطر و سر شار از خواص دارویی و موثر بر بیماری‌های معده و دستگاه گوارش است (زرگری، ۱۳۷۲؛ اورمزدی و چلبیان، ۱۳۸۶ و نوال و همکاران، ۱۹۹۶).

۱-۳ گیاهشناسی جنس مریم گلی

گونه‌های جنس مریم گلی بوته‌هایی چند ساله هستند. ساقه‌های طویل، زاویه‌دار و مستقیم دارند که ارتفاع آنها ب سته به گونه‌ها و شرایط آب و هوایی به ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر می‌ر سد. تعدادی از شاخه‌ها (معمولا سه تا پنج) از جوانه‌های جانبی ساقه ا صلی تولید می شوند. شاخه دهی بعد از سربرداری زیادتر می‌شود. برگ‌ها متقابل، ساده، تخم‌مرغی و دارای دمبرگ هستند. گل‌آذین یک چتر انتهایی شامل چهار تا ۱۰ گل بنفش، آبی، یاســی یا آبی کم رنگ اســت. همه بخش‌های بالای زمین پوشــیده از موهای غده‌دار هستند که در گیاهان بالغ دارای رنگ نقره‌ای می‌باشند. شروع گلدهی از فروردین تا اواسط خرداد، بسته به شرایط آب و هوایی است و حدود یک ماه طول می‌کشد. بعد از سربرداری گیاهان به سهولت تمایل به رشد دوباره هم از نظر طولی و هم شاخه‌دهی، به خصوص بعد از سال دوم کشت دارند. شواهدی موجود ا ست که محصولات مریم گلی وقتی در یک محیط مناسب کشت شوند، می‌توانند بیش از ۱۰ سال تولید شوند (کارامانوس، ۲۰۰۰)

۱-۴ نوروزک

۱-۴-۱ گیاهشناسی نوروزک

نوروزک یا مریم گلی مشــهدی با نام علمی *Salvia leriifolia* Benth متعلق به تیره نعناعیان گیاهی

چند ساله، علفی و بسیار معطر است. اندام‌های هوایی این گیاه به ویژه برگ و ساقه‌ی گلدار آن معطر است و پوست بذرهای آن حاوی موسیلاژ فراوان است (قربانعلی و همکاران، ۱۳۸۸). هم‌چنین برگ‌های گیاه غنی از کلسیم، فسفر و آهن بوده و دانه و برگ آن دارای مقادیر بالایی از پروتئین و اسیدهای چرب و دارای ارزش غذایی فراوانی است. از این رو در تغذیه دام و انسان از اهمیت بالایی برخوردار است (خداپرست، حسینی، ۱۳۷۲). تاج پوشش گیاه به صورت مدور متشکل از تعداد زیادی بوته به قطر ۱۵۰-۵۰ و ارتفاع ۴۰-۳۰ سانتی‌متر است. وزن هزار دانه این گیاه با توجه به شرایط اقلیمی منطقه از ۵۰ تا ۸۸ گرم متغیر است. شروع رسیدن بذر و نیز تشکیل گل از پایین ساقه به بالا بوده ودر یک ساقه همه مراحل رشد زایشی امکان دارد دیده شود. تکثیر به وسیله بذر و زادآوری آن با توجه به شرایط منطقه و فصل چرای دام مناسب است. مراحل فنولوژیکی گیاه نشان می‌دهد که این گیاه پس از کاهش سرمای زمستانه از نیمه اسفند، رشد رویشی خود را آغاز می‌کند ودر اوایل فروردین (بسته به شرایط محیطی) رشد ساقه‌های گل‌دهنده آن شروع می‌شود. ارتفاع ساقه گل‌دهنده بین ۲۳/۵-۱۲ سانتی‌متر، تعداد ردیف گل‌دهنده بین ۹-۴ ردیف و تعداد بذر در هر شاخه ۳۶-۱۶ عدد است.

۱-۴-۲ نیازهای اکولوژیکی

این گیاه در فلور طبیعی ایران به عنوان گیاه بومی مناطق سرد و نیمه خشک استان‌های خراسان و برخی از مناطق استان سمنان شناسایی شده است (ریچینگر، ۱۹۸۲). پراکنش این گیاه در اقلیم فراخشک بیابانی سرد، ارتفاعات سنگلاخی، ارتفاعات کنگلومرایی و واریزه‌های سنگی است. بررسی پروفیل خاک در مناطق گسترش ریشه این گونه نشان می‌دهد که بیش از ۶۴٪ خاک، شن و به عبارتی گسترش این گونه بیشتر در روی خاک‌های سبک است. گسترش ریشه تا عمق ۹۰ و پراکندگی آن تا ۱۶۰ سانتی‌متر اندازه‌گیری شده است. این گونه معمولا در روی شیب‌های جنوبی حضور دارد (فیله کش، ۱۳۸۲).

۱-۴-۳ اهمیت دارویی

نوروزک از جمله گیاهان با ارزش مناطق کویری ایران می‌باشد که دارای خواص با ارزشی از قبیل، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضددرد است (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶). گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. برای مثال مشخص شده است که عصاره ریشه گیاه دارای خاصیت محافظت کنندگی از سلول‌های عصبی در برابر صدمات ناشی از ایسکمی موضعی در مغز موش است (صادق نیا و همکاران، ۲۰۰۳). فعالیت ضد درد عصاره برگ نوروزک در دز $500 mg.kg^{-1}$ قابل مقایسه با دز $5 mg.kg^{-1}$ دیازپام، گزارش شده است (حسین زاده و همکاران، ۲۰۰۰). هم چنین عصاره برگ و ریشه‌ی آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. بعلاوه استانس این گیاه به واسطه داشتن تأثیر بازدارنده بر آنزیم بوتیل کولین استراز می‌تواند در معالجه بیماری آلزایمر مفید باشد (لوییز و همکاران، ۲۰۰۹). خاصیت ضد التهابی عصاره برگ گیاه از نظر کارآئی مشابه با داروی دیکلوفناک است (حسین زاده و یاوری، ۱۹۹۹). عصاره آبی و الکلی برگ نوروزک از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش جلوگیری کرده و کارآیی آن مشابه داروی sucralfate است. (حسین زاده و همکاران، ۲۰۰۰). بعلاوه نتایج حاصل از بررسی تاثیر عصاره ریشه و برگ این گیاه بر میکروب‌های مختلف، حاکی از وجود خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در بخش‌های مختلف گیاه است (باغی، ۱۳۷۵) و (جبارزاده، ۱۳۷۸).

۱-۴-۳-۱ اهمیت متابولیت‌های ثانویه

تولید فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی که جزء گران‌بهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند، امروزه با استفاده از زیست فناوری گیاهی امکان تولید تجاری آن به وسیله بیوراکتورها فراهم گردیده است. با استفاده از کشت بافت می‌توان متابولیت‌های ثانویه را در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود. تحقیقات زیادی در استفاده از کشت سوسپانسیون و سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است. لازم به ذکر است که متابولیت‌های ثانویه دسته‌ای از مواد هستند که به صورت عصاره یا

پودرهای گیاهی در درمان بسیاری از بیماری‌های شایع به کاربرده می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خصوصیات دارویی، بهداشتی و صنعتی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با ا ستخراج این مواد از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق پارامترهای مختلف، سبب می شود که کیفیت مواد حا صل در طول زمان تغییر نکند. در حالی‌که در شرایط طبیعی مرتباً تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و آفات است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۹۰). از متابولیت‌های ثانویه با ارزش موجود در گیاه نوروزک، به ترتیب فراوانی، می‌توان به ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها ا شاره کرد (طباطبائی یزدی، ۱۳۷۴). که در بین متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاه پلی فنل‌هایی مانند کافئیک اسید و رزمارینیک اسید به گروه فلاونوئیدها تعلق دارند (پیچرسکی و گونگ، ۲۰۰۰) که توانایی آنتی اکسیدانی دارند (مارجا و هینون، ۱۹۹۹).

۱-۴-۳-۲ پیش ماده‌های ساختاری متابولیت‌های ثانویه

پیش ماده‌های ساختاری متابولیت‌های ثانویه از متابولیت‌های اولیه حاصل می‌شوند. به استثنای فرایندهای اولیه بیوسنتز قند و آمینواسید، سه مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شامل مسیرهای استات – مالونات، استات – موالونات و اسید شیکمیک است (دیویک، ۲۰۰۲). متابولیت‌های ثانویه گیاهان معمولا بر اساس مسیر متابولیسمی آن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (کریستن، ۲۰۰۰). معمولا متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنول‌ها در نظر گرفته می‌شوند (بورگائد و همکاران، ۲۰۰۱). در ساختمان بسیاری از متابولیت‌های ثانویه گیاهان، ازت وجود دارد. ترکیباتی که در این گروه قرار دارند ترکیبات دفاعی ضد گیاهخواران هستند که آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای سیانوژنی در این دسته از این ترکیبات قرار می‌گیرند. گروه دیگر یعنی ترپن‌ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل می‌شوند. ترکیبات متنوع این گروه معمولا در آب غیر محلول بوده و کلیه ترپن‌ها

از واحدهای پنج کربنی ایزوپرن (دو و پنج بوتا دی ان)، مشتق می‌شوند (سانگان[1] و همکاران، ۲۰۰۱). ترپن‌ها بر اساس تعداد واحدهای پنج کربنه‌ای که دارند طبقه‌بندی می‌شوند. ترپن‌های ده کربنی که شامل دو واحد ایزوپرن هستند، مونوترپن نامیده می‌شوند که از مشتقات مونوترپنی می‌توان لیمونن، کامفور، لینالول و ژرانیول را نام برد. ترپن‌های ۱۵ کربنی، سزکوئی‌ترپن‌ها و ترپن‌های ۲۰ کربنه، دی‌ترپن نامیده می‌شوند. ترپن‌های طویل‌تر شامل تری‌ترپن‌ها، تتراترپن‌ها و پلی‌ترپنوئیدها می‌باشند (تایز و زایگر، ۲۰۰۶).

بیوسنتز ترپن‌ها، از استیل کوآنزیمA و از طریق مسیر موالونیک اسید صورت می‌گیرد. بیشتر ترپن‌ها اعمال مشخصی در رشد و نمو گیاه به عهده دارند. به عنوان مثال پیش‌ماده آبسیزیک اسید، یک سزکوئی‌ترپن است. استروئیدها، مشتقات تری‌ترپن‌ها بوده و از اجزای ضروری غشای پلاسمایی به حساب می‌آیند. بنابراین بع ضی از ترپن‌ها نقش‌های اولیه مهمی در گیاه به عهده دارند، هر چند که ق سمت عمده ترپن‌های گیاهی، جز متابولیت ثانویه بوده و در سیستم دفاعی گیاه دخیل هستند. برخی از گیاهان دارای مخلوطی از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌های فرار می‌باشند که روغن‌های فرار یا اسانس نامیده می‌شود (سانگان و همکاران،۲۰۰۱) و (تایز و زایگر، ۲۰۰۶). گروه آخر فنیل‌پروپانوئیدها، مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل‌پروپانوئیدی سنتر می‌شوند (دایکسون و همکاران، ۲۰۰۳) ، عامل طعم، بو و مزه در اسانس هستند و نقش‌های متفاوتی را در گیاهان بازی می‌کنند. بسیاری از آن‌ها در دفاع بر علیه گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند و یا در حفاظت مکانیکی، در جذب عوامل گرده افشان و پراکنده کردن میوه یا در کاهش ر شد گیاهان رقیب دخالت دارند (تایز و زایگر، ۲۰۰۶). این ترکیبات در شرایط تنش در گیاه تولید می‌شوند. عوامل تنش‌زایی که محرک تولید فنیل‌پروپانوئیدها هستند شامل کمبود آهن، نیترات و فسفات خاک، دمای پایین، عومل بیماری‌زا، زخمی‌شدن گیاه و اشعه فرابنفش می‌باشند (دایکسون و پایوا، ۱۹۹۵).

[1] Sangwan

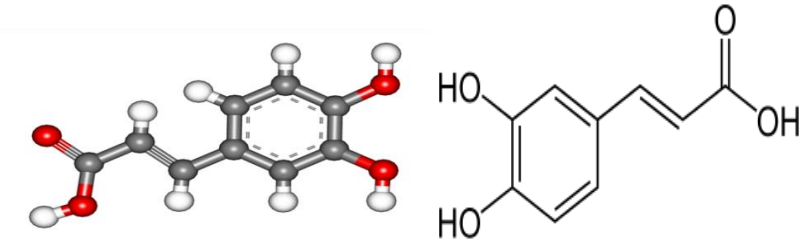
همچنین فاکتورهای رونویسی مانند R2R3-MYB در افزایش تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی دخالت دارند (ووم اند و همکاران، ۲۰۰۲).

مسیر بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز لیگنین، لیگنان‌ها، فلاوونوئیدها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشند. مسیر اصلی بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها، از مسیر شیکمیک اسید (مسیر بیوسنتزی آمینواسیدهای حلقوی مانند فنیل آلانین و تیروزین) و مسیر مالونیک اسید شروع می‌شود. در ساخت بیشتر ترکیبات فنلی در گیاه مسیر شیکمیک اهمیت دارد. این در حالی است که مسیر مالونیک‌اسید در ساخت محصولات فنلی در باکتری‌ها و قارچ‌ها اهمیت دارد (سائوفی و همکاران، ۲۰۰۷).

فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) آنزیم حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. آنزیم PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها است و عمل اصلی آن دآمینه کردن غیراکسیداتیو آمینواسید L-فنیل آلانین و تبدیل آن به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید می‌باشد. سینامیک اسید به عنوان ماده اولیه، در مسیرهای بیوسنتزی متفاوتی مصرف می‌شود. در ادامه مسیر با فعالیت آنزیم‌های سینامات ۴-هیدروکسیلاز ((C4H، 4-کومارات-کوآ لیگاز (CL۴) و سینامول کوآ ردوکتاز (CCR)، متابولیت‌های دیگری از جمله p-کومارآلدئید، کونیفرآلدهید و سیناپالدئید تولید می‌شود که این ترکیبات توسط سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) به فرم الکلی خود تبدیل می‌شوند. این ترکیبات زیر واحدهای سازنده انواع فلاونوئیدها و لیگنان‌ها و لیگنین هستند (آنترولا و همکاران، ۲۰۰۲) و (هومفریز و چپل، ۲۰۰۲).

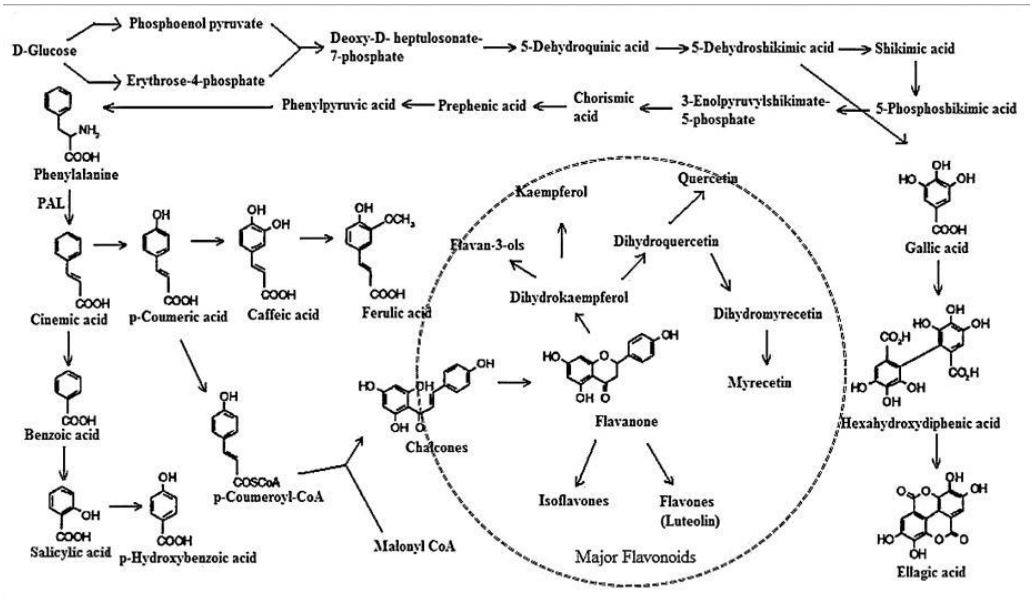
۱-۴-۳-۳ کافئیک اسید

کافئیک اسید با فرمول شیمیایی $C_9H_8O_4$ یک ترکیب شیمیایی است که جرم مولی آن ۱۸۰/۱۶g.mol است (۱-۱).



شکل۱-۱ فرمول شیمیایی کافئیک اسید

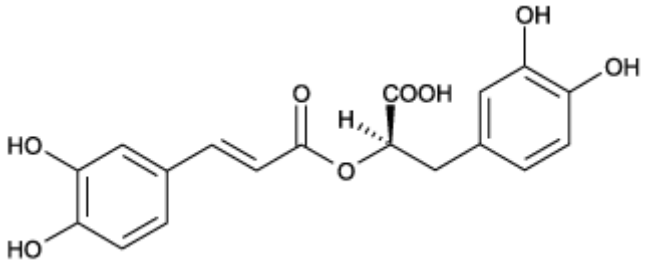
کافئیک ا سید در بیو شیمی تیره نعناعیان نقش محوری دارد و در گونه‌های مریم گلی، واحد سازنده انواع متابولیت‌های فنلی از مونومرهای ســاده تا انواع فراورده‌های الیگومری می‌باشــد. شــکل‌های تریمر و تترامر کافئیک ا سید به علت دا شتن خ صو صیات منح صر به فرد زی ستی از اهمیت دارویی قابل توجهی برخوردار هستند. تریمرهای مشتق شده از کافئیک اسید، بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه را در جنس مریم گلی تشکیل می‌دهند که سالویانولیک اسید A در این گروه قرار می‌گیرد.



شکل۱-۲: مسیر بیوسنتزی اسیدهای فنولیک و فلاوونوئیدها از مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید

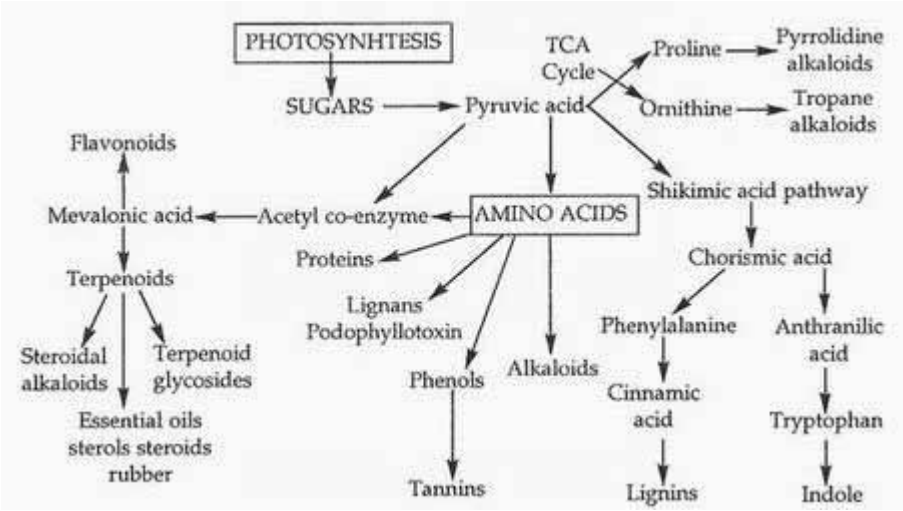
۱-۴-۳-۴ رزمارینیک اسید

رزمارینیک اسید جزء اسیدهای فنلیک بوده و دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد ویروس، ضد آلرژی، ضد التهاب و ضد سرطان ا ست. این ترکیب در گیاهان خانواده نعناعیان به وفور یافت می شود (پتر سن، ۲۰۱۳) و (دستمالچی و همکاران، ۲۰۰۷). بیوسنتز رزمارینیک اسید از دو اسید آمینه فنیل آلانین و تیروزین آغاز می‌شود (شکل ۳و ۴).



شکل۱-۳ فرمول شیمیایی رزمارینیک اسید (دستمالچی و همکاران، ۲۰۰۷)

افزایش میزان رزمارینیک اسید مصادف است با افزایش میزان دو آنزیم PAL و TAT، که هر کدام جهت تولید رزمارینیک اسید دو مسیر جدا از هم دارند. مسیری که کلید شروع آن آنزیم PAL است مسیر Phenylpropanoid و مسیری که کلید شروع آن آنزیم TAT است، مسیر Tyrosine-derive می‌گویند.



شکل۱-۴ مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید

مشـــارکت آنزیم‌های RAS و PAL در بیوســـنتز رزمارینیک اســـید و افزایش تجمع این ترکیب در چندین تحقیق به اثبات رسـیده اسـت هرچند فعالیت آنزیم TAT در این رابطه هنوز سـؤال برانگیز اسـت (پترسـن، ۲۰۱۳) و (هوانگ، ۲۰۰۸). رزمارینیک اسـید فراوان‌ترین دیمرکافئیک اسـید و مهم‌ترین ترکیب فنلی است که فعالیت پاداکسایشی گونه‌های مریم گلی را به طور عمده به علت وجود این ترکیب می‌دانند (زئوا و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۵ اهمیت و لزوم کشت بافت در گیاهان دارویی

کشت بافت بنا به تعریف استریت در سال ۱۹۹۷ عبارت است از هر نوع کشت چند سلولی که بر روی محیط ک شت ر شد و نمو کرده و با یکدیگر ارتباط پروتوپلا سمی دارند. ک شت بافت و سلول گیاهی نقش کلیدی در دومین انقلاب سـبز را دارد که در آن تغییر ژن و بیوتکنولوژی در جهت اصـلاح و بهبود کیفیت محصولات بکار می‌رود (مجد، ۱۳۸۱).

برداشـت بی‌رویه گیاهان دارویی طی قرون و اعصـار مختلف، سـبب نابودی برخی از مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی کشور و حتی جهان شده است. از طرف دیگر امروزه موسسات داروسازی، متقاضی گیاهان دارویی

یکدست و استاندارد با مواد موثره یکنواخت و معین می‌باشند که این ویژگی‌ها در گیاهان خودرو به جهت وجود تنوع ژنتیکی و متفاوت بودن شـرایط محیطی و زمان وجود ندارد. لذا لازم اسـت راهکارهای فناوری زیسـتی در جهت تولید گیاهان دارویی با مواد موثره یکنواخت مورد توجه قرار گیرد (دوازده امامی و مجنون حسـینی، ۱۳۸۷). در حال حاضـر تکنیک‌های کشـت بافت به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن در سال‌های اخیر این روش‌ها کاربردهای تجاری گسترده‌ای در اصلاح گیاهان داشته است. در حال حاضر می‌توان گفت که کشت بافت به مرحله بلوغ خود رسیده است. درکشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه خصوصاً کشورهای آسیایی به صورت گسترده مورد توجه قرار گرفته‌است (اثنی عشری و خسروشاهی، ۱۳۸۸).

۱-۵-۱ مزایای کشت بافت

۱. این روش مستقل از تغییرات فصلی، جغرافیایی و عوامل محیطی می‌باشد.

۲. در این روش ممکن اسـت ترکیبات جدیدی تولید شـوند که در شـرایط طبیعی در گیاه مادر وجود نداشته باشند (رائو و راویشانکار، ۲۰۰۲).

۳. تولید با هزینه کم و سرعت بالا انجام می‌گیرد.

۴. رشد سلول را می‌توان به صورت خودکار کنترل کرده و فرایندهای متابولیکی را تنظیم نمود.

۵. تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی.

۶. حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد.

۷. تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که از نظر صـنعتی مورد توجه می‌باشـند، مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات آلکالوئیدی ضد سرطان، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، ادویه‌جات و حشره‌کش‌ها در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام.

۸. ایجاد گیاه دورگه، ازدیاد غیرجنسی گیاهان به روش رویشی.

۹. ایجاد بانک ژن گیاهان دارویی با استفاده از کشت تعلیقی[1](تریپاتی و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۵-۲ کشت کالوس یا توده‌های سلولی تمایز نیافته

کالوس اصولا یک بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که معمولا در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. عمل تحریک برای تشکیل کالوس، القای کالوس نامیده می‌شود. امکان تولید کالوس و پس از آن رشد مجدد در یک محیط کشت جدید، در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد که این رشد مجدد واکشت کردن کالوس نامیده می‌شود. تشکیل کالوس تحت تاثیر مواد تنظیم کننده رشدی خارجی که به محیط کشت اضافه می‌شوند، قرار می‌گیرد. نوع ماده تنظیم کننده رشد مورد نیاز و غلظت مصرفی آن در محیط کشت، به طور شدیدی به ژنوتیپ و محتوای تنظیم کننده رشدی درون ریز نمونه بستگی دارد. پنج مرحله در رشد کالوس وجود دارد:

۱. فاز کمون: در این مرحله سلول‌ها برای آغاز تقسیم آماده می‌شوند.

۲. فاز تصاعدی: در این مرحله تقسیم سلولی با حداکثر سرعت صورت می‌گیرد.

۳. فاز خطی: در این مرحله تقسیم سلولی کند است، اما میزان توسعه سلولی افزایش می‌یابد.

۴. فاز کند شدن: مرحله‌ای است که سرعت تقسیم و توسعه سلولی کاهش می‌یابد.

۵. فاز سکون: در این مرحله اندازه و تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

۱-۶ الیسیتورها

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی و غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (زائو و همکاران، ۲۰۰۱). الیسیتورهای زیستی شامل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و

[1] Suspension culture

میکروارگانیسم‌ها (کتین و گلوکان) می‌باشد (واسکونسوئلو و بلوند، ۲۰۰۷). الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص مانند کیتین و کیتوزان باشند و یا نامشخص مانند قارچ و عصاره مخمر و مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند. به طور کلی استفاده از الیسیتورها در پژوهش‌های مربوط به زیست‌فناوری متابولیت‌های ثانویه گیاهی دو هدف اصلی را دنبال می‌کند: نخست کسب یافته‌هایی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می شود. دوم افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه برای کاربرد تجاری. در طبیعت گیاهان به حمله پاتوژن‌ها، حشرات، علف‌خوران و دیگر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی شامل القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه نظیر فیتوالکسین‌ها، پاسخ‌های فوق حساسیتی و سدهای دفاعی ساختاری مانند رسوب لیگنین در دیواره سلول پاسخ می‌دهند (واسکونسوئلو و بلوند،۲۰۰۷). در گیاهان کامل، متابولیت‌های ثانویه اغلب در واکنش به تنش تغذیه‌ای تولید می‌شوند. در محیط درون شیشه‌ای نیز تنش تغذیه‌ای می‌تواند عامل محرکی برای سنتز فرآورده‌ها باشد. همچنین آلودگی‌های میکروبی گیاهان کامل، اغلب سنتز متابولیت‌های خاصی را تحریک می‌کند. بهترین مثال در این رابطه پاتوژن‌های قارچی است که باعث تولید برخی ترکیبات محرک می‌شوند. به منظور درک مکانیسم عمل عوامل محرک، اثرات آنها بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاهان در سطح آنزیمی بررسی شده است. اگرچه مکانیسمی که به واسطه آن عوامل محرک باعث افزایش بازدهی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می شوند، هنوز روشن نیست، ولی بدیهی است که اگر یک عامل محرک مناسب برای تحریک سنتز فرآورده خاصی انتخاب شود، اثر تحریکی آن کاملا واضح و معنی‌دار خواهد بود (اثنی عشری و خسرو شاهی، ۱۳۸۸). عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور ، سن محیط کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد (واسکونسوئلو و همکاران، ۲۰۰۷).

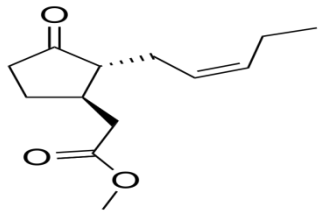
۱-۶-۱ متیل جاسمونات[1]

جاسـمونات‌ها (Jas)، شـامل جاسـمونیک اسـید (JA) و متیل جاسـمونات (MeJA)، یک خانواده از ترکیبات سیکلوپنتانون هستند که از طریق مسیر اکتادکانوئیک از لینولئیک اسید ساخته می‌شوند. به طور کلی این ترکیبات از رشد گیاه جلوگیری می‌کنند، اما به عنوان یک شاخه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فرایندهای متنوعی از قبیل ر سیدن میوه، پیری، ت شکیل غده، ت شکیل دانه گرده، پا سخ‌های دفاعی علیه آ سیب‌های مکانیکی و حمله ح شرات و بیماری‌زاها را راه اندازی می کنند (جانگ، ۲۰۰۴) این ترکیبات به عنوان الیسیتور و از طریق القای د ستگاه دفاعی باعث بیو سنتز و انبا شت متابولیت‌های ثانویه نیز می شوند (جانگ، ۲۰۰۴ ؛ زائو و همکاران، ۲۰۰۵). به علاوه اینکه متیل جاســمونات تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن را القا می‌کند (ژانگ و زینگ، ۲۰۰۸).

نقش مهم جا سمونات‌ها در ارتباط با ایجاد سیگنال‌های بین سلولی ا ست که باعث ایجاد مقاومت در سلول‌ها و بافت‌های سالم می شود. جا سمونات‌ها گروه جدیدی از هورمون‌ها هستند که با دخالت در بیان ژن های مختلف، گیا هان را در م قابل تنش های مختلف محیطی م حافظت نموده و نیز می‌توانند عمر انبارداری میوه‌ها و سـبزی‌ها را افزایش دهند. این مواد فرآورده نهایی اکسـیداسـیون اسـیدهای چرب غیر ا شباع همانند ا سید لینولئیک می‌با شند و از م شخصات آنها وجود ساختار پنج ضلعی حلقوی ا ست. وقتی جاسمونات‌ها به صورت خارجی بر بافت‌های گیاهی اعمال می‌شوند، اثرات مهاری یا تحریکی در پدیده‌های مربوط به رشــد ونمو، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان از خود نشــان می‌دهند که برخی از این اثرات م شابه با آ بسیزیک ا سید ا ست. اثرات فیزیولوژیکی جا سمونات‌ها در گیاهان ب سته به گونه گیاهی، مرحله نموی، نوع جا سمونات‌ها و غلظت به کاررفته متفاوت‌اند. از این ترکیبات به عنوان الی سیتورهای شیمیایی برای القای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده می‌شود.

[1] Methyl jasmonate

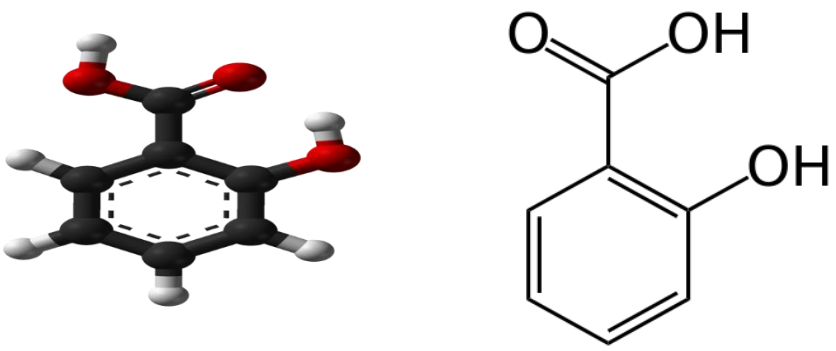
متیل جاســمونات با فرمول شــیمیایی $C_{13}H_{20}O_3$ یک ترکیب شــیمیایی با جرم مولی ۲۲۴/۳g.mol است. شکل ظاهری این ترکیب، مایع بی‌رنگ است.



شکل ۱-۵ ساختار متیل جاسمونات

۱-۶-۲ سالیسیلیک اسید[۱]

سالی سیلیک ا سید یک ا سید طبیعی ا ستخراج شده از ا سید بتاهیدروک سی، با فرمول شیمیایی $C_6H_6O_3$ و جرم مولی ۱۳۸/۱۲g.mol $^{-۱}$ است.

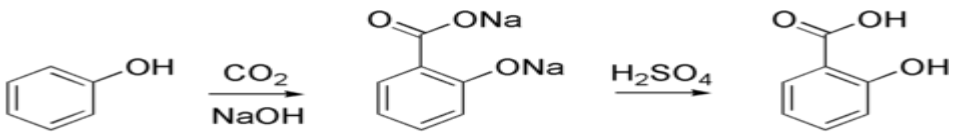


شکل ۱-۶ ساختار سالیسیلیک اسید

سالیسیلیک ا سید به و سیله آمینوا سیدی به نام فنیل آلانین به صورت زیستی سنتز می‌شود. روش زیر که به روش کولبه – شمت معروف است نیز راه ساختن تجاری این ماده است. از اسیدی کردن سدیم سالیسیلات به وسیله اسید سولفوریک، سالیسیلیک اسید حاصل می‌شود. سالیسیلیک اسید ماده‌ای شبه

[۱] Salicylic acid

هورمونی است که بر رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد.



شکل ۱-۷ مسیر بیوسنتز سالیسیلیک اسید

۱-۶-۳ نور UV

گیاهان قابلیت این را دارند تا طول موج‌های مختلفی از تشعشع و پرتو خورشید را با استفاده از گیرنده‌های نوری دریافت و به آن واکنش نشان دهند. تابش فرابنفش یا به اختصار UV، موجی است در گستره امواج الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه‌تر از نور مرئی، ولی بلندتر از پرتو ایکس. به بیانی دیگر انرژی آن کمتر از پرتو ایکس، ولی بیشتر از نور مرئی است. این پرتو را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد: پرتو فرابنفشA با علامت اختصاری UV-A دارای طول‌موج ۴۰۰-۳۲۰ نانومتر است، موج بلند یا نور سیاه که توسط لایه ازون جذب نمی‌شود. پرتو فرابنفشB با علامت اختصاری UV-B دارای طول‌موج ۳۲۰-۲۸۰ نانومتر است که بیشتر آن توسط لایه ازون جذب می‌شود. پرتو فرابنفشC با علامت اختصاری UV-C دارای طول‌موج ۲۸۰-۲۰۰ نانومتر است، موج کوتاه که کاملا توسط لایه ازون و جو زمین جذب می‌شود (بینتسیس و همکاران، ۲۰۰۰). فنل‌ها نقش عمده‌ای در حفاظت از گیاه به دلیل غربالگری UV و خواص آنتی‌اکسیدانی دارند (آگاتی و همکاران، ۲۰۱۳؛ کربنل و همکاران، ۲۰۱۴؛ پارک و کیم، ۲۰۱۵). بخش‌هایی از این طیف دارای اثرات تنشی شدید روی گیاهان است و باعث از بین رفتن گیاهان می‌گردد. در مقابل استفاده از تنش ملایم طیف فرابنفش در مواردی ممکن است باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گردد. مطالعات گذشته نشان داده است که نور UV-A می‌تواند در برخی گیاهان سبب ایجاد تغییرات و افزایش در میزان بعضی از فنل‌ها شود.

بین خصـوصـیات روشـنایی و تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی، ارتباطی تنگاتنگ وجود دارد و نقش اکو فیزیولوژیک رو شنایی در تولید فرآورده‌های مذکور، عمده و ا سا سی ا ست. فعالیت گیاهان تحت تاثیر وضعیت‌های مختلف نوری تغییر می‌کند. مدت، شدت و کیفیت روشنایی، هر یک به تنهایی می‌تواند تاثیر عمده‌ای بر وضعیت متابولیت‌های ثانویه بر جای بگذارند (امیدبیگی، ۱۳۹۲).

۱-۷ اهداف مشخص تحقیق

۱. ارزیابی الی سیتورهای سالی سیلیک ا سید، متیل جا سمونات و نور UV-A و UV-B در جهت تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کالوس گیاه نوروزک.

۲. انتخاب منا سب‌ترین الی سیتور جهت تولید رزمارینیک ا سید و کافئیک ا سید در کالوس گیاه نوروزک.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات انجام شده

۲ بررسی منابع و تحقیقات انجام شده در موضوع

اخیراً با توجه به اهمیت اقتصادی و دارویی متابولیت‌های ثانویه، کشت‌های سلولی مورد توجه بسیار قرار گرفته است. بر اساس بیشتر گزارش‌ها میزان تولید متابولیت ثانویه از کشت‌های تمایز نیافته بسیار کم است (کولین و ادوارد، ۱۹۹۸). اما تلاش‌های زیادی برای تحریک سلول‌ها با استفاده از روش‌های متنوع صورت گرفته است. این روش‌ها شامل انتخاب لاین سلولی، بهینه سازی محیط کشت (از نظر مواد غذایی، فیتوهورمون‌ها و پیش ماده)، شرایط کشت (pH، نور، دما و ...) و اخیراً مهندسی متابولیکی می‌باشد (ورپورات و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین محققان متعددی تولید ترکیبات مفید از کالوس و سوسپانسیون سلولی گزارش کرده‌اند. از کشت کالوس گیاه *Catharantus roseus* ماده ضد فشار خون ajmalicine تولید شد. کشت کالوس گیاه *Stizolobium hassjo* تولید دارو ضد پارکینسون دی هیدروکسی بنزین را به همراه داشت که همچنین به عنوان دی اکسی فنیل آلانین شناخته شده است. بر اساس اطلاعات موجود، به طور عمده مطالعات روی سنتز و مسیرهای بیوسنتزی (مسیرشیکمیک اسید و مسیر فنیل پروپانوئیدها) اسید های فنلی محدود به ریشه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌های مویین *S. miltiorrhiza* می‌باشند. از آنجایی که سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می‌باشد بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش های مختلف فناوری کشت بافت گیاهی، جایگزین سودمندی است. در شرایط درون شیشه‌ای تولید متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر عوامل محیطی مختلف نظیر اقلیم، آفات، بیماری‌های میکروبی، تنش‌های فصلی و جغرافیایی قرار نمی‌گیرد، از این‌رو رشد سلول‌ها در شرایط درون شیشه‌ای در جهت تولید فرآیندهای متابولیکی تنظیم شده در نتیجه فرآورده‌های مفید تحت شرایط کنترل شده تولید شده و محصولات خالص‌تر و مطمئن‌تر به بازار عرضه خواهد شد (رائو و راویشانکار، ۲۰۰۲). دستورزی محیط‌های کشت بافت با استفاده از الیسیتورها یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارز شمند می‌باشد. الیسیتورها از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث

القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های فوق حساسیتی می شوند (زائو و همکاران، ۲۰۱۱). عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد (واسکونسهو و همکاران، ۲۰۰۷). مسیر بیوسنتزی رزمارینیک اسید در گونه *Coleus blumei* حسن یوسف از تیره نعناعیان مورد مطالعه قرار گرفته است و بررسی‌ها نیز نشان داده‌اند که تمامی اندام‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای توان سنتز و ذخیره این اسید فنلی را دارد و مقدار تولید آن می‌تواند تحت تاثیر عواملی چون گونه، مرحله‌ی نموی و سن، نوع اندام، رده سلولی و شرایط کشت تغییر نماید (جرزگرزیک و همکاران، ۲۰۰۵). در تحقیقی که در بررسی اثرات نوع ریز نمونه، محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر نرخ کالوس‌زایی گیاه دارویی مرزه تابستانه *Satureja hortensis L.* انجام شد، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی بر شدت کالوس‌زایی هر دو ریز نمونه برگ و بذر اثر معنی داری داشته است. ریز نمونه‌های برگ و بذر، وزن تر و خشک کالوس بیشتری را در محیط کشت‌هایی که هر دو هورمون IBA و BA حضور داشتند در مقایسه با محیط کشت‌هایی که تنها حاوی هورمون IBA بودند نشان دادند. بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در این پژوهش در حضور ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و در شرایط روشنایی حاصل شد (لاهوتی و همکاران، ۱۳۹۱). در پژوهشی که توسط مدرس و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، نشان داده شد که بهترین کالوس‌ها (۹۴/۷۱٪) و بیشترین وزن خشک (۰/۲۲۶٪) مربوط به غلظت‌های ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بوده است اما در طول دوره رشد هیچ کالوسی در گونه‌های شاهد مشاهده نشد. در این پژوهش سنجش اسیدهای فنلی با دستگاه HPLC نشان داد که رزمارینیک اسید، فنل عمده تشکیل دهنده ریشه (۰/۳۳mg.g)، برگ (۴/۵۶mg.g) و کالوس (۶/۳۹mg.g) *S. leriifolia* است در حالی‌که کافئیک اسید به مقدار خیلی کم در ریشه (۰/۱۵mg. g) ، برگ (۰/۲۰mg. g) و کالوس (۰/۰۷mg. g) نسبت به رزمارینیک اسید وجود داشت. در بررسی‌هایی که در *S. miltiorrhiza* انجام شده،

نشان داد که رزمارینیک اسید و سالویالونیک اسید B ترکیبات فنلی غالب در ریشه‌های خشک این گیاه است. با این حال محتوای رزمارینیک اسید در ریشه‌های خشک و سلول‌های *کشت* شده خیلی کمتر از مقداری است که در مطالعات مدرس و همکاران (۲۰۱۴) به دست آمده است (یوان و همکاران،۱۹۹۸). اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات دو نمونه از محرک‌های طبیعی بی خطری هستند که به عنوان ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق القای تنش کاذب عمل می نمایند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ دیویا و همکاران، ۲۰۱۴). فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی است که از گیاه در برابر واکنش‌های فتودینامیک آسیب رسانده، با سرکوب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت می‌کنند. مطالعات انجام شده، مشخص کرده است که کاربرد ترکیباتی که به طور طبیعی یافت می شوند، مانند متیل جاسمونات می‌تواند باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه شود. برای مثال، تیمار گیاهان توت سیاه با متیل جاسمونات، محتوای فلاونوئید را به طور معنی‌دار در این گیاهان افزایش داد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸). فلاونوئیدها (ترکیبات فنلی گیاهی) در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی، سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نقش حفاظتی دارند (پور سل و همکاران، ۲۰۰۷). در پژوهش خانپور اردستانی و همکاران (۱۳۹۳) اثر متیل جاسمونات ۰/۱ میلی مولار به عنوان الیسیتور بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئید در کشت سلولی *Scrophularia striata* در بازه‌های زمانی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی میزان فنل در سلول‌های شاهد و تیمار شده نشان داد که میزان ترکیبات فنلی با شیب ملایمی افزایش می‌یابد و در کشت‌های تیمار شده با متیل جاسمونات پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی گزارش شد.

اسید سالیسیلیک از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تاثیر قرار داده و تغییراتی را در ریخت شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند (پووا و همکاران، ۲۰۰۳). اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات شرایط تنش را در گیاه القا کرده و به

عنوان یک سیگنال درونی در پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده مانند فتوژن‌ها، اشعه‌ی UV، شوری و کم آبی عمل کرده (پووا و همکاران، ۲۰۱۳) و همچنین سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردند که برایند همه این فعالیت‌ها مقاومت به تنش است (پووا و همکاران، ۲۰۱۳). در آزمایشی که اثر دو فاکتور اسید جاسمونیک و متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی برای تولید رزمارینیک اسید در گیاه *Mentha piperita* مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین مقدار رزمارینیک اسید (۱۱۷/۹۵ میلی‌گرم وزن خشک) در نمونه‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات تیمار شده بودند، وجود داشت (کرز- آنوسکا، ۲۰۱۱). در تحقیقی که در بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی گیاه سیاهدانه انجام شد، سالیسیلیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمولیاز (PAL) و تولید بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شد (کبیری، ۲۰۱۴). درویشی و همکاران (۱۳۹۵) اعلام کردند کاربرد سالیسیلیک اسید در کشت سلولی پونه باعث افزایش ماده موثره بتاکاریوفیلن نسبت به نمونه های شاهد شد. گل همیشه بهار نیز در پاسخ به سالیسیلیک اسید، محتوای فلاونوئیدی خود را افزایش داد (پاچکو و همکاران، ۲۰۱۳). در پژوهشی که اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمولیاز، محتوای فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگر فرنگی انجام شده است، تاثیر تیمارهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به تنهایی و به صورت ارتباط متقابل برمحتوای فنل کل، فلاونوئید و فعالیت انزیم PAL کاملاً معنی‌دار بود. به طوری که تیمارهای اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میکرو مولار و متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار حداکثر محتوای فنیل پروپانوئیدی را داشته است. همچنین با افزایش غلظت الیسیتور کاهش قابل توجهی در سطح فنل کل مشاهده شده است (صمدی و همکاران، ۱۳۹۳). افزایش غلظت متیل جاسمونات تا ۱۳۰ میکرو مولار باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه تاکسول در کشت درون شیشه‌ای فندق شد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۴). در کشت سوسپانسیون سلول *Pueraria thberosa* تیمار ۴۰۰ میکرومول متیل جاسمونات بیش‌ترین تاثیر را در تولید ایزوفلاونوئیدها داشته است (قاسمی و

همکاران، ۱۳۹۱). مصـــرف متیل جاســـمونات با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول باعث افزایش میزان ایزوفلاونوئیدها در کشـــت بافت گیاه کودزو (*Pueraria labata*) شـــده اســـت (تیم و کرازیک، ۲۰۱۰). جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور برای سنتز Stilbene در قلمه برگ انگور (بیل هاد و همکاران، ۲۰۰۶)، کشـــت ســـلولی انگور (تاســـونی و همکاران، ۲۰۰۵) و کشـــت ریشـــه مویین *V. rotundifolia* (نوپو- اولازوبال و همکاران، ۲۰۱۴) استفاده شده است. فنل‌ها نقش عمده‌ای در حفاظت از گیاه به دلیل غربالگری UV و خواص آنتی‌اکســـیدانی دارند (آگاتی و همکاران، ۲۰۱۳؛ کربنل و همکاران، ۲۰۱۴؛ پارک و کیم، ۲۰۱۵). آنزیم فنیل‌آلانین‌آمولیاز تبدیل L- فنیل‌آلانین به اسید ترانس سینامیک را در مراحل اولیه از مسیر فنیل پروپانوئید کاتالیز می‌کند که همراه با مسیر شیکمیک اسید سرچشمه تولید تمام ترکیبات فنلی اســـت. کیفیت یا طول موج نور، یکی از ویژگی‌هایی اســـت که در فرآیند فتوســـنتز و فتومورفوژنز گیاه، نقش اســـاســـی دارد. بین خصـــوصـــیات مختلف نور (کمیت، کیفیت، تداوم) و تولید متابولیت های ثانویه گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد. نور در جوانه زدن بذرهای برخی گیاهان نقش مهمی دارد. تناوب روشـــنایی و تاریکی نیز بر فرآیندهای مختلف گیاه از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد (ماردانی و همکاران، ۲۰۱۵). مطالعات مناف و همکاران (۲۰۱۶) بر روی تاثیر نورUV-B بر برخی از تغییرات بیوشیمیایی و پارامترهای رشدی در کالوس و کشت سلولی گیاه سرخارگل نشان داد، نور UV-B منجر به افزایش همه پارامترهای رشـــدی، فعالیت آنتی اکســـیدانی و مقدار کافئیک اســـید در کالوس و کشت سلولی این گیاه می‌شود و حداکثر افزایش مقدار کافئیک اسید، فنل کل و آنزیم PAL، ۴ ساعت بعد از تیمار با نور UV-B در کشت سلولی گیاه سرخارگل گزارش شده است. نورUV-C مسیر فنیل پروپانوئید را راه اندازی می‌کند و باعث تحریک بیو سنتز فلاونوئید می شود (دایکسون و پایوا، ۱۹۹۵). نور UV-C یک روش موثر به منظور افزایش Stilbene در حبه (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳)، برگ (وانگ و همکاران، ۲۰۱۰) و کالوس (لیو و همکاران، ۲۰۱۰) در ژنوتیپ‌های مختلف انگور شـناخته شـده اسـت. در

توت فرنگی، نور UV-C با تحریک فعالیت PAL مرتبط با اتیلن باعث افزایش در مقدار ترکیبات فنلی شده است (نیگرو و همکاران، ۲۰۰۰). با این حال، نور UV-C در گوجه فرنگی رونوشت PAL را افزایش نمی‌دهد در حالی‌که ژن‌ها را از آنزیم‌های مهم دیگر از مسیر بیوسنتز فنل‌ها تحریک می‌کند (تیچر و همکاران، ۲۰۱۳). نور UV-B به عنوان عاملی برای القاء فنل در گیاهان شناخته شده است که برای این عمل به مسیر شیکمیک اسید و فنیل‌آلانین و از این رو به DAHP سنتتاز نیاز دارد (دی و همکاران، ۲۰۰۲). در آزمایشی که برای تولید آرتمیزینین در کالوس و گیاه درمنه کوهی در برابر محرک‌های نوری و اشعه UV، انجام شد، بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که نور UV-B می‌تواند باعث فعال شدن ژن‌های غیر فعال تولید کننده آرتمیزینین در درمنه کوهی شود (بختیاری و همکاران، ۱۳۹۵). در پژوهشی که در بررسی اثرات نور UV-C، متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در بیوسنتز Stilbene در کشت سوسپانسیون انگور انجام شده است، بررسی اثر متیل جاسمونات و نور UV-C هر کدام به تنهایی در زمان ۴۸ ساعت بعد از تیمار باعث حداکثر تولید محتوای فنلی شد در حالی‌که اثر متقابل این دو الیسیتور در زمان ۳۶ ساعت بعد از تیمار باعث حداکثر تولید محتوای فنلی شده بود. مطالعه اثر میدان مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر گیاه بادرنجبویه تحت تنش فرابنفشB نشان داد که پرتو UV-B باعث افزایش میزان فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز و ترکیبات جاذب UV نیز تحت تاثیر پرتوهای UV-B افزایش پیدا کرد (پور اکبر و عابد زاده، ۱۳۹۳). محتوای فنل کل در پاسخ به اثر اسید سالیسیلیک به تنهایی معنی دار نبود در حالی‌که ترکیب دو الیسیتور اسید سالیسیلیک و نور UV-C باعث افزایش میزان فنل کل شد و در زمان ۳۶ ساعت بعد از تیمار تولید به حداکثر میزان خود رسید (ایکسو و همکاران، ۲۰۱۵). در خصوص تاثیر اشعه UV-B بر تولید آرتیمیزین، در آزمایشی که توسط پان و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه درمنه خزری *Artemisia annua* انجام شد، تاثیر اشعه UV-B برای ساخت آرتمیزین مثبت ارزیابی گردید و این اشعه به عنوان محرکی در تولید ماده موثره آرتمیزین شناخته شد. همچنین گزارش شده است که محتوای

درونی اکسین در گیاهانی که در معرض تابش پرتوهای فرابنفش قرار گرفته و نسبت به آن سازگاری یافته‌اند، کاهش می‌یابد (جاسن و همکاران، ۲۰۰۱). محققان معتقدند که این کاهش در محتوای اکسین حاصل افزایش فعالیت پراکسیدازهای آنیونی است که به نوبه خود سبب تجمع ترکیب‌های فنلی نظیر فلاونوئیدها، استرهای سینامیک اسید، لیگنین و تانن در گیاهان سازگار شده می‌گردد (جاسن و همکاران، ۲۰۰۱). در بسیاری از گونه‌های گیاهی سنتز برخی از مشتقات مسیر فنیل پروپانوئید مانند فلاونوئیدها و نیز آنتوسیانین در پاسخ به UV تحریک می‌شود (دایکسون و همکاران، ۲۰۰۱). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های گیاهی و افزایش تقاضا، محققین به دنبال روش‌هایی به منظور تولید هر چه بیشتر این ترکیبات هستند. با استفاده از روش کشت بافت شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و نیز مکانیسم تنظیمی آن بدست می‌آید و با استفاده از روش‌های زیست فناوری تولید متابولیت‌های با ارزش در گیاهان را می‌توان افزایش داد. استفاده از الیسیتورهای زیستی روش مناسبی به منظور تولید هر چه بیشتر متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت درون شیشه می‌باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات فعال الیسیتورهای زیستی نقش موثری در القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه دارند.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳ مواد و روش‌ها

این پژوهش با هدف سنجش میزان رزمارینیک ا سید و کافئیک ا سید در کالوس گیاه نوروزک، تحت تاثیر الیسیتورها در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام گرفت.

۳-۱ تهیه گیاهان استریل درون شیشه‌ای

۳-۱-۱ تهیه ریزنمونه

جهت دست‌یابی به ریز نمونه‌های برگی استریل ابتدا، بذور گیاه نوروزک از منطقه بجستان واقع در ا ستان خرا سان ر ضوی در خرداد ماه جمع‌آوری شدند. بذور پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا نیاز سرمایی برای جوانه زنی بذور رفع گردد. جهت تهیه گیاهچه های ا ستریل، بذور نوروزک پس از جدا کردن پو سته سخت آن به مدت دو ساعت در آب ا ستریل قرار گرفتند تا کاملاً متورم شوند. سپس جهت ضدعفونی در زیر هود ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ در صد و در ادامه سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم سه در صد قرار گرفتند. پس از این مرحله بذرها در زیر هود ۳ بار با آب مقطر سترون آبشویی شدند. با توجه به جوانه زنی کم بذور در شرایط درون شیشه‌ای، از کشت جنین برای بدست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶). جهت ایجاد گیاهچه‌های سترون برای گرفتن ریزنمونه برگ، بذور نوروزک پس از طی مراحل ضدعفونی، پوسته نازک بذور جداسازی شد و جنین درون بذور به آرامی جدا شد و در محیط MS در درون شیشه‌ها کشت شدند و به تاریکی به مدت یک هفته با دمای ۲±۲۵ انتقال داده شدند. بعد از یک هفته جنین‌های با رشد اولیه به اتاق رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵

سانتی‌گراد انتقال یافتند و پس از چهار هفته گیاهان استریل نوروزک درون شیشه‌ای بدست آمدند.

۳-۲ مواد شیمیایی

ساکارز و آگار و همچنین همه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در پژوهش از نمایندگی شرکت Sigma و نیز ویتامین و عناصر ماکرو و میکرو مورد نیاز برای ساخت محیط MS از نمایندگی Merck در ایران خریداری شد.

۳-۳ تهیه محیط کشت

۳-۳-۱ تهیه محلول‌های ذخیره عناصر پرمصرف

نمک‌های پر مصرف در غلظت‌های ۱۰ برابر نسبت به غلظت نهایی خود تهیه شدند. به این صورت که برای محلول مادری عناصر ماکرو، هر نمک را جداگانه وزن کرده مطابق با (جدول ۳-۱) و داخل بشر ریخته و در آب مقطر به راحتی حل می‌شوند. محلول مادری تهیه شده، در یخچال نگهداری شدند. محلول جداگانه‌ای برای نمک‌های کلسیم لازم است تا از رسوب کردن جلوگیری شود.

جدول ۳-۱ غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم)10x
NH_4NO_3	۱۶۵۰
KH_2PO_4	۱۷۰
$MgSO_4. 7H_2O$	۳۷۰
$CaCl_2. 2H_2O$	۴۴۰
KNO_3	۱۹۰۰

۳-۳-۲ تهیه محلول ذخیره عناصر کم‌مصرف

محلول‌های عناصر کم مصرف به طور معمول ۱۰۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت ساخته می‌شوند. برای تهیه محلول مادری نمک‌های میکرو، مطابق (جدول ۳-۲) نمک‌های وزن شـــده را جداگانه در آب مقطر حل کرده و در پایان محتویات تمام بشـــرهای حاوی نمک‌ها را به بشـــر منتقل کرده و با افزودن آب مقطر به حجم می‌رسانیم و سپس در یخچال نگهداری می‌شود.

جدول ۳-۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم) 100x
$CuSO_4. 5H_2O$	۰/۰۲۵
$ZnSO_4. 7H_2O$	۸/۶
KI	۰/۸۳
$COCl_2. 6H_2O$	۰/۰۲۵
H_3BO_3	۶/۲

۳-۳-۳ تهیه محلول ذخیره آهن

محلول مادری آهن نیز با غلظت ۱۰۰ برابر تهیه می‌شـــود (۱۰۰x). ابتدا به مقدار مندرج در جدول (۳-۳) از ماده Na_2EDTA و $FeSO_4.7H_20$ را جداگانه وزن کرده و در آب مقطر حل نموده و در نهایت هر محلول را جداگانه به حجم می‌رسانیم. محلول تهیه شده باید با فویل آلومینیوم پوشیده شود و یا در شیشه تاریک نگهداری شود زیرا در برابر نور تجزیه می‌شود. در پایان محلول در یخچال قرار داره می‌شود.

جدول ۳-۳ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم) 100x
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸
Na_2EDTA	۳۷/۳

۳-۳-۴ تهیه محلول ذخیره ویتامین‌ها

ویتامین‌ها را در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر به صورت محلول ذخیره تهیه و در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) تا هنگام مصرف نگهداری می‌کنند. مقادیر هر یک از ویتامین‌ها را مطابق (جدول ۳-۴) در آب مقطر حل کرده و در آخر به حجم نهایی رسانده می‌شود.

جدول ۳-۴ غلظت ویتامین‌های محیط کشت پایه MS (mg/l)

ویتامین	مقدار (میلی‌گرم) 100x
Glycine	۲
Nicotinic acid	۰/۵
Pyridoxine	۰/۵
Thiamine	۰/۵

۳-۳-۵ تهیه محلول ذخیره تنظیم کننده‌های رشد

در این پژوهش از دو هورمون 2,4-D و Kin استفاده شد. همه تنظیم کننده‌های رشد در آب محلول نیستند. ترکیبات مورد نظر را باید در مقدار کمی حلال مناسب (چند میلی‌لیتر NaOH) حل کرده و سپس به آرامی به آن آب اضافه کرده تا به حجم مورد نظر برسد. محلول‌های تهیه شده تا زمان استفاده در یخچال و شرایط تاریکی نگه‌داری شدند.

۳-۳-۶ تهیه یک لیتر محیط کشت

محیط کشت مورد نیاز در این پژوهش محیط MS بود که به روش زیر تهیه شد:

برای تهیه یک لیتر محیط کشـــت MS جهت جوانه‌زنی بذر، ابتدا مقداری آب مقطر (۵۰۰ میلی‌لیتر) در داخل ارلن ریخته شد. سپس ترکیبات مورد نیاز (عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها) افزوده شدند. پس از ا ضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول و همچنین تنظیم کننده‌های ر شد گیاهی محلول به حجم نهایی رسـانده شـد. جهت تنظیم pH محیط کشـت به ۵/۸ از NaOH و HCL یک نرمال اسـتفاده شـد. مقدار مصـرف آگار برای یک لیتر محیط ۷ تا ۸ گرم اسـت. که در این آزمایش، ۷ گرم آگار وزن شد و به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت جهت استریل شدن در داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان لازم جهت استریل شدن محیط کشت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر بود. زمان لازم برای سترون کردن بستگی به حجم محیط کشت درون ظرف کشت دارد. مواد ناپایدار در برابر گرما باید با فیلتر سترون گردند. در نهایت محیط کشت درون شیشه‌های کشت توزیع شد.

۳-۴ سترون کردن وسایل و محیط کشت

کلیه شیشه‌های حاوی محیط کشت و وسایل مورد نیاز مانند ظروف آب مقطر، تیغ، اسکالپل، پنس و پتری دیش توسط اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. قبل از شروع کشت، سطح کار هود با الکل ۷۰ درصد تمیز و سپس با استفاده از لامپ UV به مدت ۲۰ دقیقه سترون گردید. مراحل کشت در زیر هود لامینار با کم‌ترین جابجایی دست‌ها و با استفاده از ماسک و دستکش و سترون کردن مداوم آن‌ها در زیر هود با الکل ۷۰ درصد انجام شد.

۳-۵ الیسیتورها

۳-۵-۱ تهیه استوک متیل جاسمونات (Methyl jasmonate)

ماده متیل جاسمونات در غلظت ۹۵ درصد محلول آبی از شرکت زیگما به مقدار ۵ میلی‌لیتر خریداری گردید. سپس استوک آن با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار تهیه شد.

۳-۵-۲ تهیه سالیسیلیک اسید (salicylic acid)

ابتدا مقدار ۵ /۶۹۰ میلی‌گرم پودر سالیسیلیک اسید در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید تا محلول ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید تهیه شود. به طوریکه هر یک میلی‌لیتر از محلول، حاوی ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید است، و سپس از روی این محلول بقیه غلظت‌های سالیسیلیک اسید تهیه شد.

۳-۶ القای الیسیتورها در فاز کالوس‌زایی

در را ستای اعمال تیمار الی سیتورهای سالی سیلیک ا سید (SA)، متیل جا سمونات (MeJA)، و نور UV- A و UV- B بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کالوس‌های گیاه نوروزک، از گیاهان چهار هفته‌ای استریل درون شیشه‌ای ریز نمونه‌های برگی با اندازه یک سانتی‌متر برش داده شد. ریز نمونه‌های برگی در محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر و Kin در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر (مدرس و همکاران، ۲۰۱۴) قرار داده شدند. الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار در محیط کالوس‌زایی افزوده شد. با توجه به عدم پایداری آن‌ها به دمای بالا، بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت در زیر هود لامینار و در شرایط استریل، زمانی که دمای محیط حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید با استریلیزاسیون فیلتری به محیط کشت اضافه شد.

برای اعمال الیسیتورهای نوری، از LED های حاوی نور UV- A و UV- B به فاصله ۳۰ سانتی‌متر از ظروف کشت و در دو سطح (۳۰ و ۶۰ دقیقه در روز) استفاده شد. پتری دیش‌ها پس از اعمال تیمار روزانه در تاریکی قرار داده می‌شدند.

۳-۷ اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی کالوس‌ها

پس از گذشت ۴ هفته (اوایل هفته پنجم) ویژگی‌های ظاهری کالوس‌ها از قبیل درصد کالوس‌زایی، رنگ کالوس، نوع کالوس و قطر کالوس توسط دستگاه کولیس یادداشت برداری شد.

۳-۷-۱ درصد کالوس‌زایی

درصد کالوس‌زایی براساس نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده در یک ظرف کشت بدست آمد.

۳-۷-۲ اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس

یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت، میانگین وزن آن‌ها به صورت میانگین مجموع وزن تر بررسی گردید. برای اندازه گیری وزن خشک، کالوس‌های مورد نظر در ورق آلومینیومی بسته‌بندی و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۶ ساعت در آون قرار داده شد و در نهایت وزن کالوس‌ها محاسبه گردید.

۲- سنجش اسیدهای فنلی

۳-۸ سنجش میزان ترکیبات فنلی کل به روش فولین سیوکالتو[۱]

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین – سیوکالتیو (سینگلتون و روسی،

[۱] Folin- Ciocalteu

۱۹۶۵) و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۵ گرم از کالوس‌ها را در ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت ۳ ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفیوژ و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل و فلاونوئید استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فولین – سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرو لیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه توسط دستگاه اسپکتوفتومتری مدل UV 2150 در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. برای شاهد نیز به جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد.

۳-۸-۱ رسم منحنی استاندارد گالیک اسید

یک محلول ذخیره گالیک اسید با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. به این منظور مقدار ۱۰mg گرد گالیک اسید را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا ۱۰ میلی‌لیتر محلول گالیک اسید ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آید و سپس از محلول ذخیره فوق محلول‌های ۱۰۰تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را تهیه کرده و از هر یک میزان ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و به حجم ۷ رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین - سیوکالتو افزوده و مخلوط می‌شود. پس از گذشت ۳ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر معرف سدیم کربنات اشباع و ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و خوب ورتکس کرده و پس از ۴۵ دقیقه جذب آن‌ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد (ساین و همکاران، ۱۹۵۹). پس از سه بار تکرار منحنی مربوطه رسم می‌شود.

میزان ترکیبات فنلی بر مبنای مقادیر جذب نا شی از واکنش عصاره با معرف فولین - سیوکالتو و بر اساس مقایسه آن با محلول‌های استاندارد اسید گالیک و بر طبق معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد اسید گالیک y= 0.464x-0.0264 محاسبه گردید. آزمایش سه بار تکرار و میانگین آن ها گزارش

گردید.

۳-۹ سنجش رزمارینیک اسید

عصاره‌گیری و سنجش رزمارینیک اسید به روش تپ و سوکمن (۲۰۰۷) انجام شد. در این روش بیومس تر کالوس (۰/۵ گرم) پس از توزین، در مقدار ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ به خوبی همگن و به مدت یک ساعت در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از آن به کمک روتاری، حلال اتانول از محلول حذف و باقی مانده‌های کالوس در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ حل گردید. در این مرحله محلول به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در نهایت محلول جهت فیلتر شدن، دو مرتبه از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و محلول صاف حاصل از آن تا زمان سنجش رزمارینیک اسید به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. برای سنجش رزمارینیک اسید از دستگاه ا سپکتروفتومتری و محلول شاهد اتانول ۷۰ در صد ا ستفاده شد. به این صورت که حدود ۳ میلی‌لیتر از عصاره‌های گرفته‌شده را درون محفظه‌های مورد نظر ریخته و جذب آن در طول موج ۳۲۷nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. سنجش رزمارینیک اسید در هر تیمار با سه تکرار انجام شد و سپس غلظت رزمارینیک ا سید در هر نمونه با کمک منحنی ا ستاندارد بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر محا سبه گردید. برای شاهد از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد.

۳-۹-۱ رسم منحنی استاندارد رزمارینیک اسید

جهت رسم منحنی استاندارد ابتدا محلول پایه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رزمارینیک اسید تهیه گردید. برای این منظور ۲۰ میلی‌گرم پودر رزمارینیک اسید در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصدحل شد. سپس از این محلول پایه، محلول‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. به این صورت که ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میکرولیتر از محلول پایه برداشته شد و با اتانول

۷۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد ($y=0.044x$).

در نهایت پس از خواندن جذب هر یک از محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری، منحنی استاندارد بر اساس غلظت رزمارینیک اسید و مقدار جذب آن ترسیم می‌شود (شکل پیوست ۲).

۳-۱۰ سنجش کافئیک اسید

برای سنجش کافئیک اسید از روش ساوستی و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. نمونه‌ها روی یخ و با کمک متانول ۸۰ درصد به نسبت w/v، ۱/۵ تا حصول یک محلول همگن سائیده شدند. همگنای حاصل به مدت سه ساعت در دمای $40^{\circ}C$ همزده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول روئی برای سنجش کافئیک اسید استفاده گردید.

۳-۱۰-۱ رسم منحنی استاندارد کافئیک اسید

غلظت‌های ۰، ۰/۲ تا یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کافئیک اسید را تهیه کرده و سپس به هریک یک میلی‌لیتر معرف آرنو، یک میلی‌لیترسدیم هیدروکسید یک مولار و یک میلی‌لیتر کلرهیدریک اسید ۰/۱ مولار افزوده شد تا حجم نهایی به ۱۰ میلی‌لیتر ر سید. پس از ورتکس کردن، جذب نمونه‌ها بلافا صله در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۱۰-۲ تهیه معرف آرنو

معرف آرنو حاوی سدیم مولیبدات۱۰٪ و سدیم نیترات ۱۰٪ می‌باشد.

۳-۱۰-۳ تعیین مقدار کافئیک اسید

یک میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی۸۰ درصد را برداشته و به آن یک میلی‌لیتر معرف آرنو، یک میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید یک مولار، یک میلی‌لیتر کلرهیدریک اسید ۰/۱ مولار افزوده شد تا حجم نهایی به ۱۰ میلی‌لیتر ر سید. سپس ورتکس کرده و بلافا صله جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد

(y=3.6192x-0.0470). در نمونه شاهد به جای عصاره، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ در صد اضافه شد. این آزمایش با سه تکرار انجام شد (پولیش فارموکوپیا، ۲۰۰۵).

۳-۱۱ سنجش فلاونوئید کل

سنجش فلاونوئید کل نیز بر اساس منحنی استاندارد روتین[۱] سنجیده شد (y=0.017x+0.003). به یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرو لیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (آکول و همکاران، ۲۰۰۸).

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. پس از داده برداری تمامی داده‌ها به محیط EXCEL انتقال و سپس با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد.

[۱] Rutin

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴ نتایج و بحث

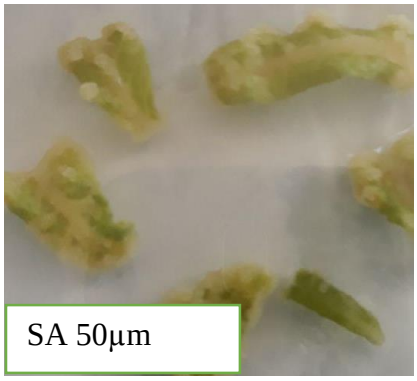
۴-۱ صفات مورفولوژیکی کالوس

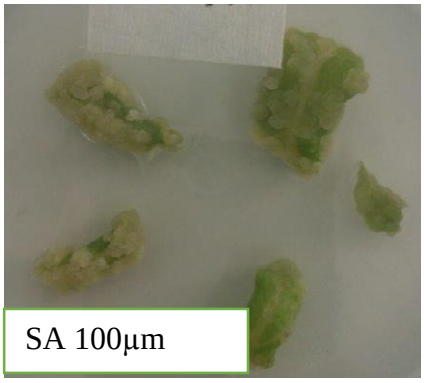
۴-۱-۱ درصد کالوس‌زایی

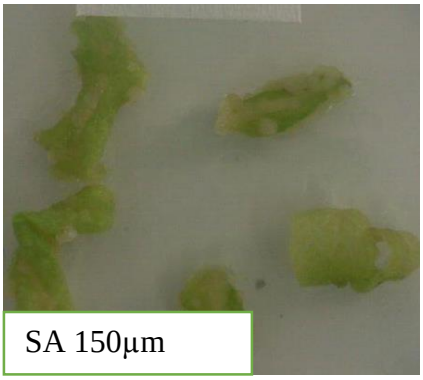
بررسی نتایج آزمایش چهار هفته بعد از کشت ریز نمونه‌های برگی در محیط کالوس‌زایی نشان داد که افزودن الیسیتورهای سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و تاباندن نور UV-A و UV-B به محیط کالوس‌زایی، تاثیری بر کالوس‌زایی نداشت و در تمام محیط‌ها همانند محیط شاهد ۱۰۰٪ کالوس‌زایی مشاهده شد (شکل ۴-۱ و ۴-۲).

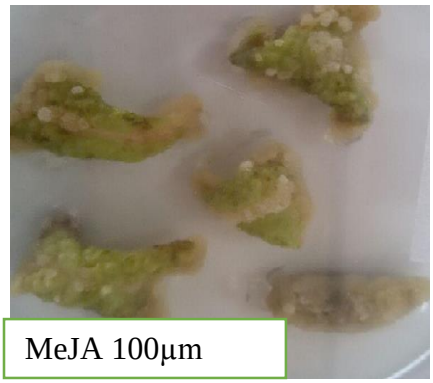
۴-۱-۲ رنگ کالوس

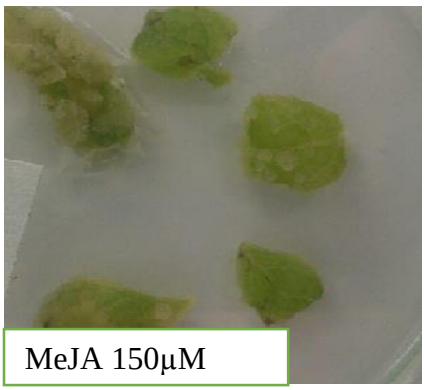
بررسی ریز نمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالوس‌زایی نشان داد که اولین توده‌های کالوس ۱۰ روز پس از کشت نمونه‌های برگی در محیط کالوس‌زایی ایجاد شدند و پس از گذشت چهار هفته کالوس‌های بزرگ تشکیل شدند. کالوس‌هایی با دامنه رنگی سبز تا کرم مشاهده شد. کالوس‌های رشد یافته از برگ در محیط کشت شاهد، کالوس‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید در سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار دارای رنگ سبز و کالوس‌های تیمار شده با متیل جاسمونات در سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار دارای رنگ سبز مایل به زرد بودند (شکل ۴-۱). رنگ کالوس‌های تحت تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نتیجه تحریک سلول‌ها توسط تنش القا شده در ایجاد پاسخ فوق حساسیت است. از این رو احتمالا نکروزه شدن بافت می‌تواند به دلیل تخریب کلروفیل، افزایش ترکیبات فنولی در نتیجه القای تنش اکسیداتیو، زوال و پیری بافت کالوس در نتیجه سنتز اتیلن باشد.



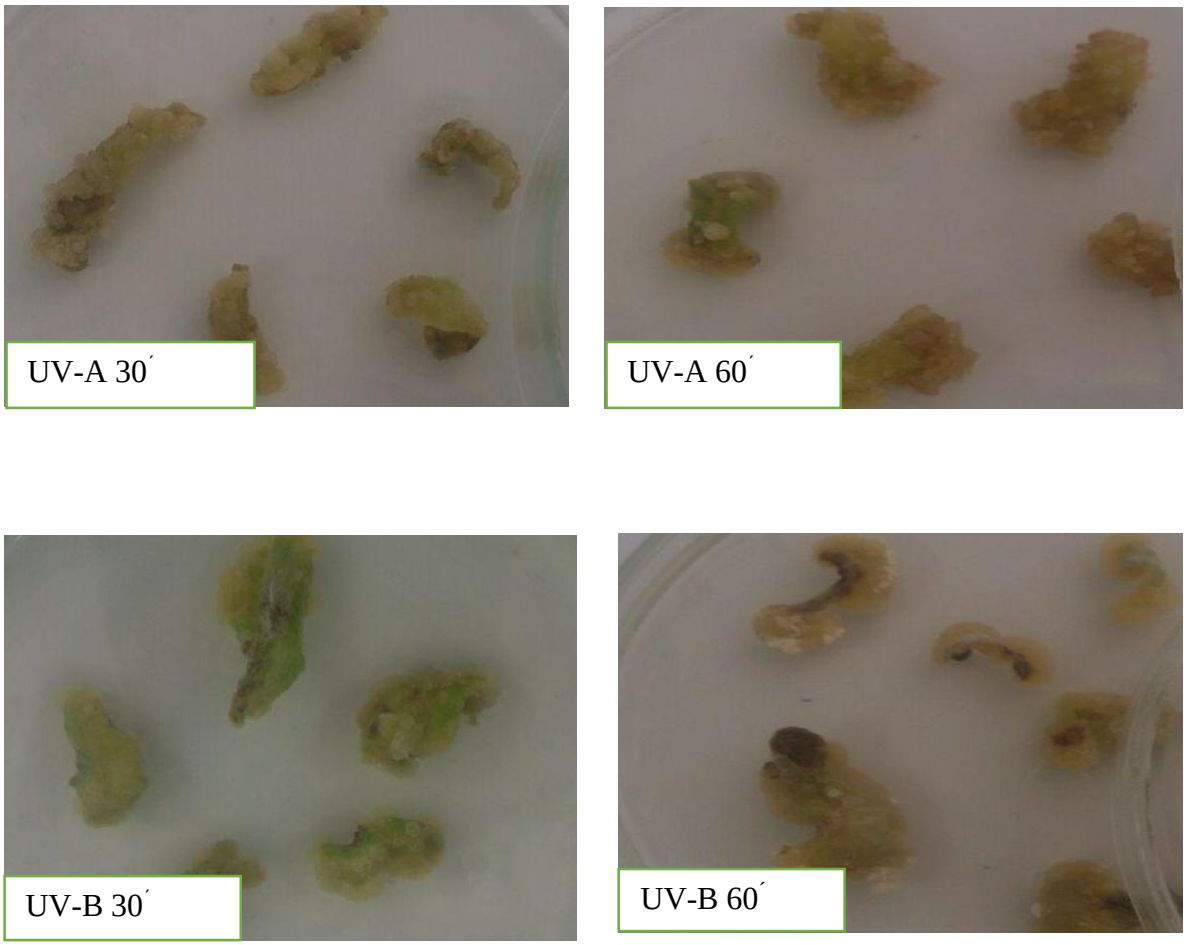








شکل ۴- ۱ درصد و رنگ کالوس‌های تشکیل شده از برگ در محیط کشت تیمار شده با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات



شکل ۴-۲ درصد و رنگ کالوس‌های تشکیل شده از برگ در محیط کشت تیمار شده با UV-A و UV-B

(چانگ و همکاران، ۲۰۰۵؛ دانگ و ژانگ، ۲۰۰۱).

نتایج تنوری و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد افزایش غلظت سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در کنگر فرنگی باعث شد رنگ کالوس از سبز به زرد و قهوه‌ای تغییر یابد. با افزایش غلظت و القای استرس اکسیداتیو در کالوس ترکیبات فنلی چون اسید کلروجینیک و دیگر مشتقات آن برای کاهش خسارت اکسیداتیو در آن‌ها تجمع می‌یابد. تجمع این ترکیبات و نشت آن از سلول به محیط سبب تغییر رنگ کالوس و به ویژه کشت اطراف آن می‌شود و خود منبعی برای استخراج ترکیبات ارزشمند دارویی است. شاید بتوان تغییر رنگ کالوس‌های گیاه نوروزک تحت تیمار با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات را ناشی از تجمع فنل در کالوس‌ها دانست.

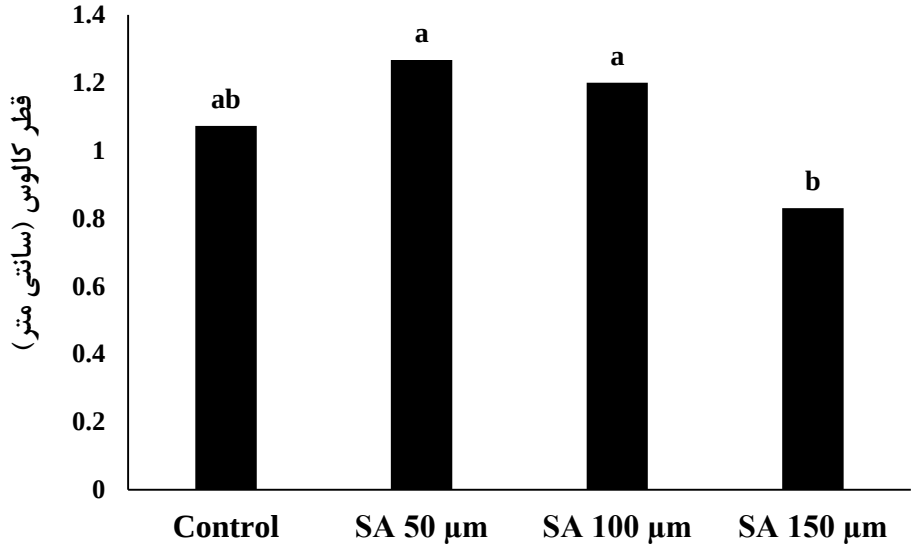
محیط کشت‌های تیمار شده با ۶۰ و ۳۰ دقیقه نور UV-A و ۶۰ دقیقه نور UV-B دارای رنگ کرم و محیط کشت تیمار شده با ۳۰ دقیقه نور UV-B دارای رنگ سبز بودند (شکل ۴-۲). تاثیر مستقیم نور UV بر رشد و نمو گیاهان، معمولا منفی است و گیاهان ساز و کارهای دفاعی مختلفی برای حفاظت و سازگاری خود به کار می‌گیرند. علایم ظاهری تنش UV-B شامل تغییر شکل و رنگ برگ‌ها، خشک شدن برگ‌ها، ایجاد کلروزه و نکروزه در برگ‌ها (کاهش کلروفیل)، کلروز بین رگبرگی و فنجانی شدن برگ‌هاست (بارسیج و مالز، ۲۰۰۰). این یافته ها تا حدودی می‌تواند تغییرات رنگ کالوس‌ها را در این آزمایش توجیه کند. رنگ کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های برگ بسته به تیمارهای مورد استفاده متفاوت بودند، بنابراین رنگ کالوس به ترکیبات محیط کشت وابسته است (عبد اللئمه و همکاران، ۲۰۰۹).

۴-۱-۳ بافت کالوس

بافت کالوس‌های حاصل از برگ در تمام محیط کشت‌های تیمار شده با الیسیتورهای مورد استفاده نرم بود. بافت کالوس تیمارها با بافت کالوس شاهد، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

۴-۱-۴ قطر کالوس

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) نشان داد که صفت قطر کالوس در تیمار با سالیسیلیک اسید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۴-۳) نشان داد که بیش‌ترین قطر کالوس در تیمار با الیسیتور ۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید (۱/۲۶۷ سانتی‌متر) و کم‌ترین قطر کالوس در تیمار با الیسیتور ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید (۰/۸۳۳ سانتی‌متر) بدست آمد (شکل ۴-۳).

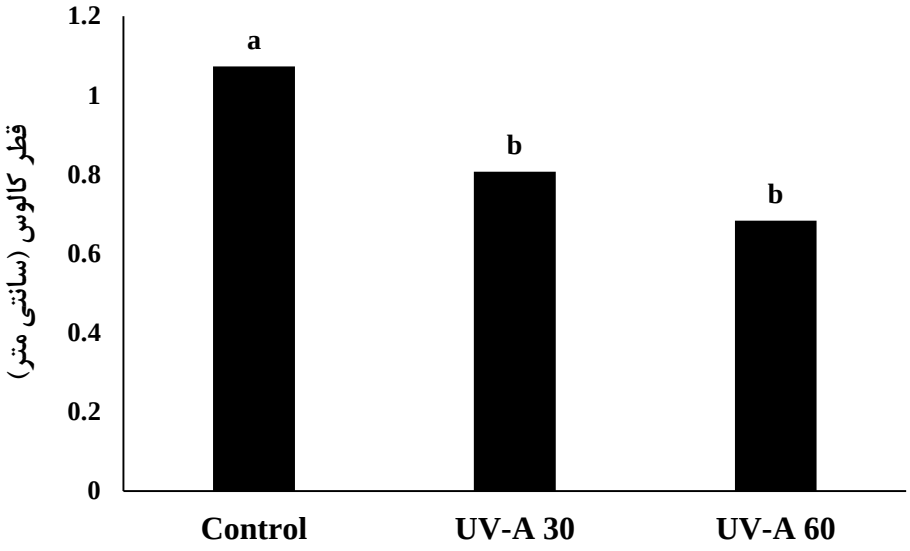


شکل ۴-۳ تاثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر قطر کالوس

با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۵۰ تا ۱۵۰ میکرو مولار قطر کالوس کاهش یافت، ولی اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند.

جدول تجزیه واریانس (جدول پیو ست۳) نشان داد که صفت قطر کالوس در تیمار با نور UV-A در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بررسی نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۴) اثر نور UV-A بر قطر کالوس نشان داد، تیمار با الیسیتور نور UV-A باعث کاهش قطر کالوس نسبت به شاهد گردید (شکل ۴-

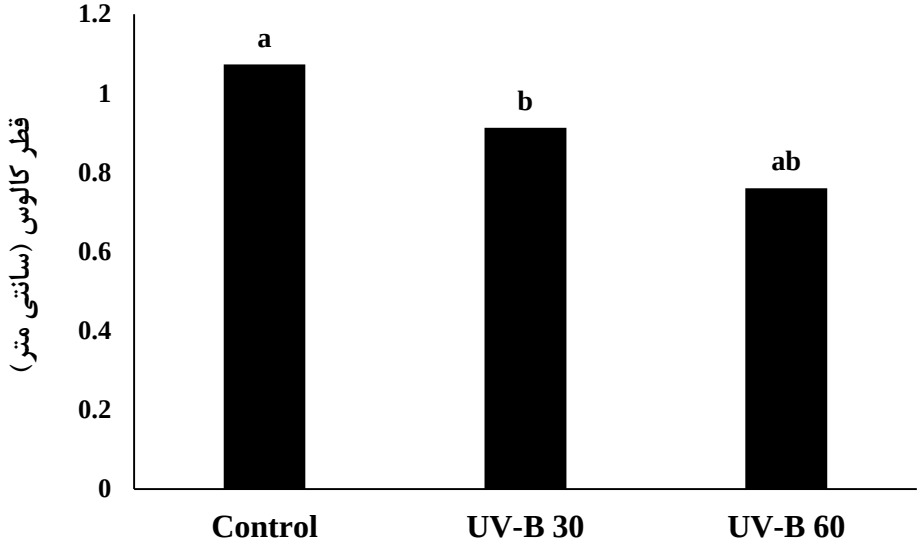
.(۴



شکل ۴-۴ تاثیر نور UV-A بر قطر کالوس

به طوری که بیشترین قطر کالوس (۱/۰۷۳ سانتی‌متر) مربوط به تیمار شاهد بود. تیمار با الیسیتور نور UV-A به مدت ۳۰ دقیقه باعث کاهش قطر کالوس نسبت به کالوس‌های شاهد شد. در حالی‌که این کاهش، با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه با نور UV-A بیشتر بود.

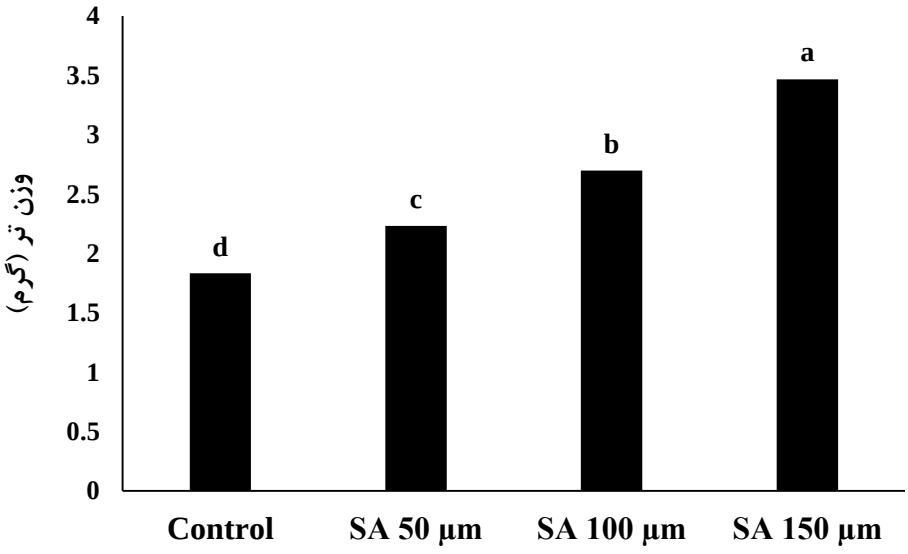
جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست۴) نشان داد که صفت قطر کالوس در تیمار با نور UV-B در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. بررسی نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۵) اثر نور UV-B بر قطر کالوس نشان داد، تیمار با الیسیتور نور UV-B باعث کاهش قطر کالوس نسبت به شاهد گردید (شکل ۴-۵). همچنین با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه با نور UV-B کاهش قطر کالوس مشاهده شد ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای نور UV-B با شاهد مشاهده نشد.



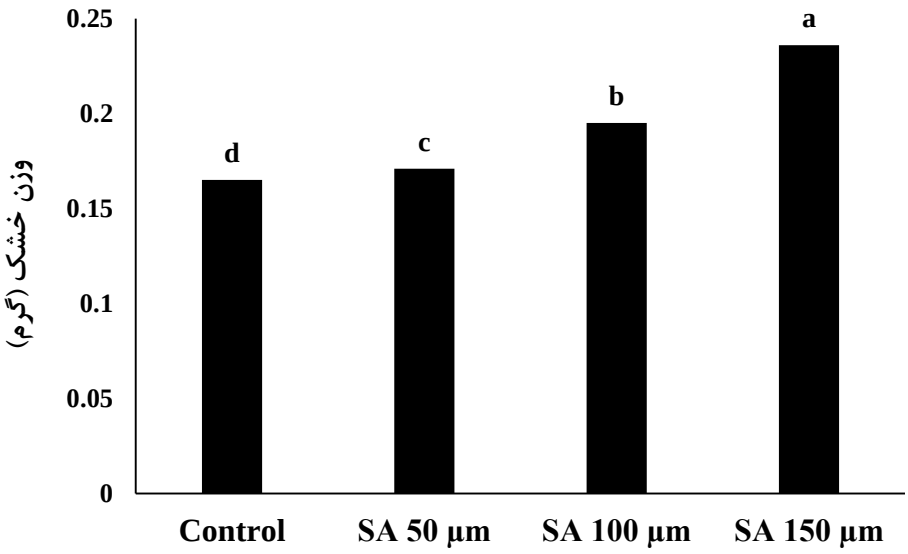
شکل ۴-۵ تاثیر نور UV-B بر قطر کالوس

۴-۱-۵ بررسی وزن تر و خشک کالوس

تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) اثر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر صفت وزن تر و خشک کالوس‌ها نشـان که در سـطح احتمال یک درصـد معنی‌دار اسـت. بنابراین در بین غلظـت‌های سـالیسـیلیک اسـید بیش‌ترین وزن تر و خشک به ترتیب (۳/۴۶۷ گرم) و (۰/۲۳۵۷ گرم)، مربوط به الیسیتور سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۵۰ میکرو مولار بود که به طور معنی‌داری از ســـایر غلظت‌ها بیش‌تر بود. کم‌ترین وزن تر و خشک به ترتیب مربوط به کالوس شاهد (۱/۸۳۳ گرم) (۰/۱۶۵۳ گرم) بود (شکل ۴-۶) و (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۶ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر وزن تر کالوس

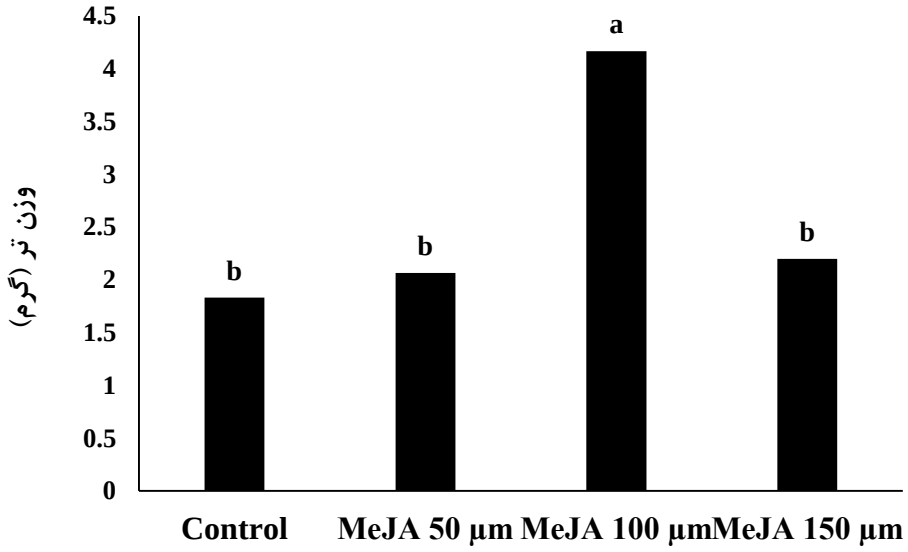


شکل ۴-۷ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر وزن خشک کالوس

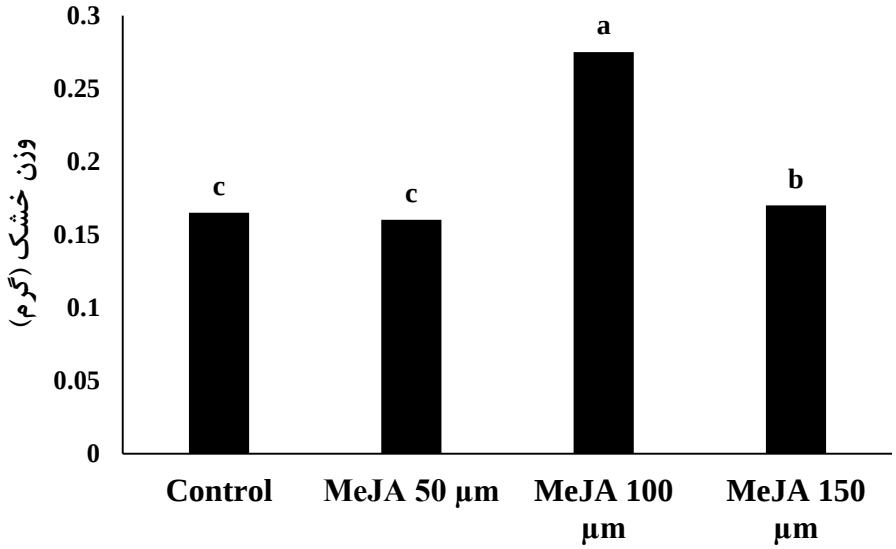
نتایج نشان داد که افزایش معنی‌داری در وزن تر کالوس تیمارهای سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد وجود دارد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، وزن تر (شکل ۴-۶) و همچنین وزن خشک

(شـــکل۴-۷) کالوس‌ها افزایش یافت. به طوری که کم‌ترین وزن تر و خشـــک در تیمار ۵۰ میکرو مولار و بیش‌ترین وزن تر و خشک مربوط به تیمار ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. سالیسیلیک اســید به عنوان یک تنظیم‌کننده رشــد گیاهی در اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه تاثیر مهمی دارد و به دلیل ماهیتش در گیاه، سلول‌های گیاهی تحت تیمار این ترکیب، رفتارهای رشدی یک سلول تحت تنش را، از خود نشان می‌دهند. البته ارتباط یا عدم ارتباط مستقیم بین غلظت‌های القاکننده و القای فعالیت‌های متابولیسمی اولیه که به افزایش وزن سلول‌ها منجر می‌شود، به ماهیت ترکیب، گیاه و غلظت سالیسیلیک اسید بستگی دارد (نامدئو و همکاران، ۲۰۰۷). سالیسیلیک اسید می‌تواند در گیاه نقش‌های متفاوتی ایفا کند (راسکین، ۱۹۹۲a؛ راسکین، ۱۹۹۲b). سالیسیلیک اسید با وجود افزایش وزن خشک کالوس گیاه داتوره، در وزن تر کالوس تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. همچنین رابطه مستقیمی بین سالیسیلیک اسید و تحریک ســلول‌ها و فعالیت متابولیســم اولیه در کالوس روناس گزارش شــده اســت (بولگاکو و همکاران، ۲۰۰۴).

تجزیه واریانس (جدول پیوست ۲) اثر الیسیتور متیل جاسمونات بر صفت وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان که در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد در بین غلظت‌های متیل جاسمونات بیش‌ترین وزن تر و خشک به ترتیب (۴/۱۶۷ گرم) و (۰/۲۷۵۰ گرم)، مربوط به الیسیتور متیل جاســمونات با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار بود که به طور معنی‌داری از ســایر غلظت‌های تعیین شــده بیش‌تر بود. کم‌ترین وزن تر و خشک به ترتیب مربوط به کالوس شاهد (۱/۸۳۳ گرم) و (۰/۱۶۵۳ گرم) بود (شکل ۴-۸) و (شکل ۴-۹).



شکل ۴-۸ تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر وزن خشک کالوس



شکل ۴-۹ تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر وزن خشک کالوس

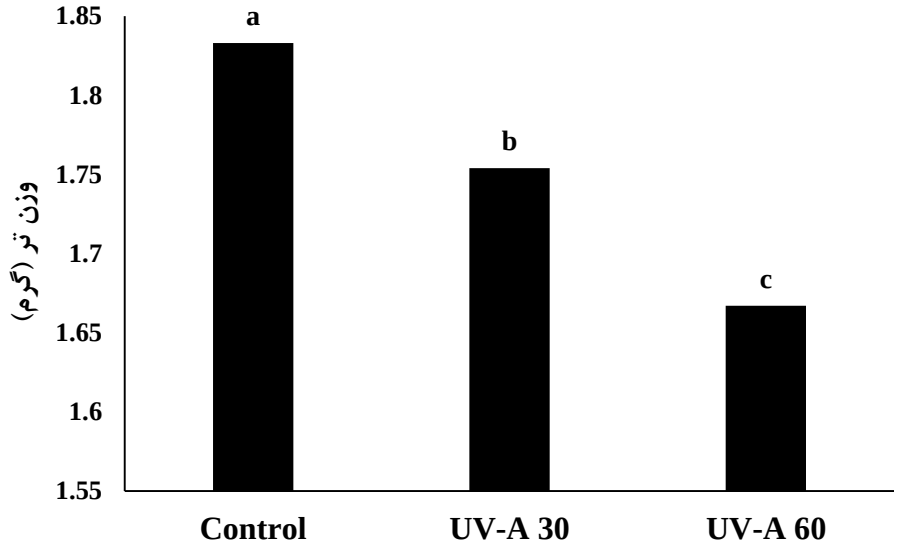
با افزایش غلظت متیل جاسمونات بر وزن تر و خشک کالوس‌ها افزوده شد، اگرچه در تیمار ۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی مقدار وزن تر کالوس‌ها

نسبت به شاهد بیشتر بود. بیش‌ترین مقدار وزن تر و خشک در تیمار ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات ثبت شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد و سایر تیمارها دا شت. با افزایش غلظت متیل جا سمونات از این مقدار وزن تر و خشک کالوس‌ها کاهش یافت، اگرچه اختلاف غلظت ۱۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات در مقدار وزن تر و خشک با شاهد معنی‌دار بود، ولی غلظت‌های ۱۵۰ و ۵۰ میکرو مولار در وزن تر با هم تفاوت معنی داری نداشتند. افزایش غلظت متیل جاسمونات در نعناع فلفلی باعث کاهش وزن خشک گیاه شد (کرزیزانوسکا و همکاران، ۲۰۱۲). نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داد که جاسمونات‌ها تاثیرات تحریک‌کنندگی و بازدارندگی بر ر شد و فعالیت متابولیکی گیاهان دارند و آثار بازدارندگی م شابه آبسزیک ا سید و اتیلن از خود ن شان می‌دهند. به نظر می‌ر سد که جا سمونات‌ها با کاهش فعالیت پروتئین کینازها وابسته به سیکلین مانع ورود چرخه سلول از حالت G_1 به S و G_2 به M می‌شوند و از این طریق، از رشد و تقسیم سلولی ممانعت می‌کنند (سیاتک و همکاران، ۲۰۰۳؛ چانگ و همکاران، ۲۰۰۵). تیمار کالوس توتون با متیل جاسمونات تقسیم میتوز و همانند سازی DNA را با کاهش فعالیت سیکلین‌ها و توقف سلول‌ها در مرحله G_1، مهار کرد. همچنین مهار رشد و کاهش زنده‌مانی در نتیجه زوال تمامیت سلول تو سط جا سمونات‌ها در ب سیاری از گیاهان به اثبات ر سیده ا ست (سیاتک و همکاران، ۲۰۰۳؛ میامتو و همکاران، ۱۹۹۷؛ آنانیوا و آنانیو، ۲۰۰۰). افزایش غلظت متیل جاسمونات در کشت رودندرون هندی، کاهش معنی‌داری در وزن تر و خشک کالوس ایجاد کرد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (سی و همکاران، ۲۰۱۱).

بر ا ساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیو ست ۳)، وزن تر کالوس با الیسیتور نور UV-A در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. اندازه‌گیری وزن تر کالوس‌های تحت تیمار نور UV-A و مقایسه آن با کالوس‌های شاهد نشان داد که بین تیمارهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه نور UV-A با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دا شت و تیمار با نور UV-A باعث کاهش وزن تر کالوس گیاه نوروزک شد. با افزایش زمان تیمار از

۳۰ به ۶۰ دقیقه با نور UV-A میزان کاهش وزن تر بیش‌تر بود (شکل ۴-۱۰).

جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۳) نشان داد که در مورد وزن خشک، اختلاف تیمارهای نور UV-A با شاهد معنی‌دار نبود.



شکل ۴-۱۰ تاثیر نور UV-A بر وزن تر کالوس

نتایج آزمایشات پوراکبر و همکاران (۱۳۹۱) در تاثیر نور UV بر کاهش وزن تر و خشک در گیاه رازیانه نیز با نتایج پژوهش حا ضر هم را ستا ا ست. در ک شت درون شی شه‌ای گندم، ا شعه UV-C باعث کاهش وزن تر ریز نمونه‌ها شد (رحمت‌زاده و خارا، ۲۰۰۷). نتایج آزمایشات عابدزاده و پور اکبر (۱۳۹۲) نیز همانند این آزمایش ن شان داد که پرتوهای UV-B و UV-C باعث کاهش وزن تر و خ شک بادرنجبویه شد. یکی از دلایل کاهش وزن ریشه و اندام هوایی تحت تاثیر نور UV، اختلال در بیوسنتز یا انتقال تنظیم کننده‌های رشد و نمو گیاهی مثل اکسین و اسید جیبرلیک است (هسن و همکاران، ۲۰۱۲). توینی و ایوانزیل (۱۹۸۶)، معتقدند که اثر بازدارندگی اشعه UV بر رشد گیاهان مربوط به تخریب اکسین درونی

ا ست زیرا وقتی که ا شعه UV را از محیط حذف کردند افزایش ر شد گیاه را م شاهده نمودند. این افزایش رشد را به سنتز بیش‌تر اکسین و یا تحریک بیش‌تر آنزیم‌های مسئول متابولیسم اکسین نسبت دادند.

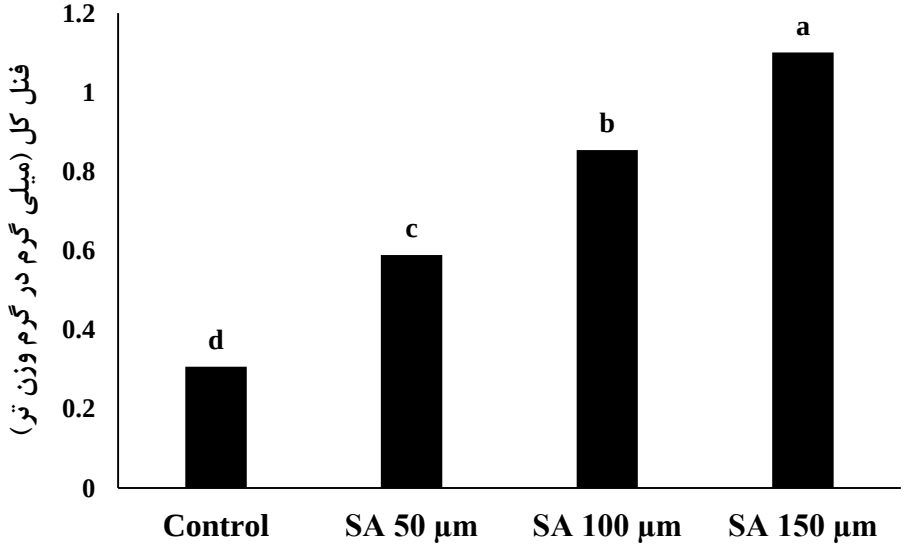
جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۴) نشان داد که در تیمار با الیسیتور نور UV-B، اختلاف وزن تر و خشک تیمارهای نور UV-B با شاهد معنی‌دار نبود.

۴-۲ نتایج حاصل از سنجش اسیدهای فنلی

۴-۲-۱ میزان فنل کل

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتور سالیسیلیک اسید بر محتوای فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

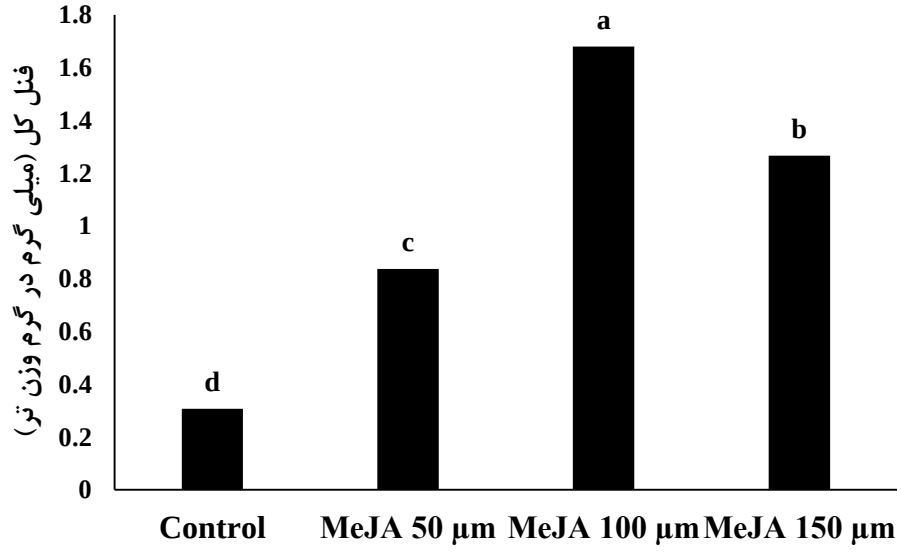
بر ا ساس نمودار مقای سه میانگین (شکل ۴-۱۱) بیش‌ترین میزان فنل در کالوس‌ها در محیط ک شت حاوی الیسیتور سالیسیلیک اسید در غلظت ۱۵۰ میکرو مولار به میزان (۱/۱۰۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کم‌ترین میزان فنل در کالوس‌های شاهد به میزان (۰/۳۰۶۹ میلی‌گرم درگرم وزن تر) مشاهده شد.



شکل ۴-۱۱ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل

تیمار سالیسیلیک اسید با افزایش غلظت روند رو به افزایش در محتوای فنل کل نشان داد، طوری که میزان فنل کل در غلظت ۱۵۰میکرو مولار سالیسیلیک اسید توانست تقریبا چهار برابر شاهد باشد (شکل ۴-۱۱).

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول پیو ست ۲) تاثیر تیمار متیل جا سمونات بر محتوای فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس نمودار مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۲) بیش‌ترین میزان فنل در کالوس‌ها در محیط کشت حاوی الیسیتور متیل جا سمونات در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار به میزان (۱/۶۸۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کم‌ترین میزان فنل در کالوس‌های شاهد به میزان (۰/۳۰۶۹ میلی‌گرم درگرم وزن تر) مشاهده شد.



شکل ۴-۱۲ تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان فنل کل

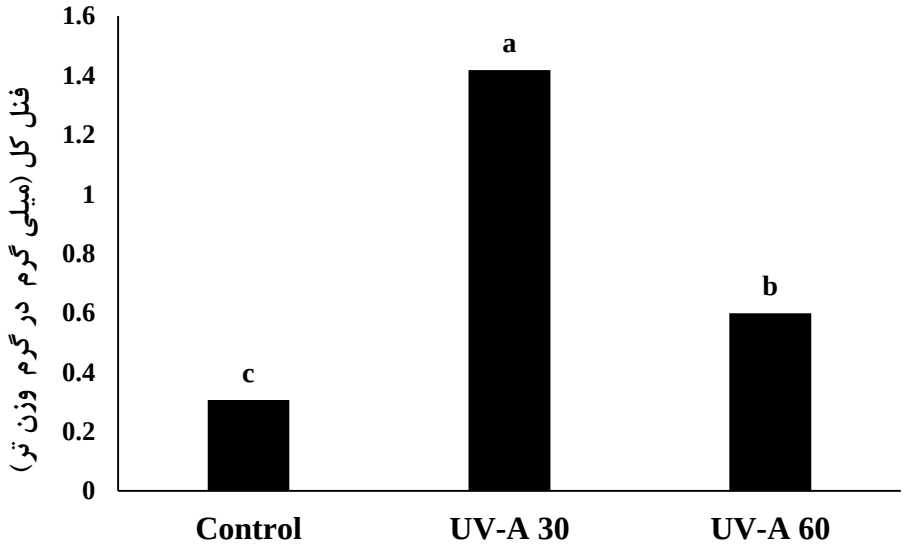
بررسی اثر متیل جاسمونات بر محتوای فنلی کالوس (شکل ۴-۱۲) نشان داد که تمام غلظت‌ها نسبت به شـــاهد میزان ترکیبات فنلی را افزایش دادند ولی بیش‌ترین میزان در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار بوده و با

افزایش غلظت به ۱۵۰ میکرو مولار کاهش دیده شد که می‌تواند به دلیل محدود بودن توانمندی سلول در پاسخ به عامل تنش‌زا و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها توسط آن، ایجاد گردد (صمدی و همکاران، ۱۳۹۳). محتوای فنلی در ۱۰۰ میکرو مولار در حداکثر مقدار بوده و نسبت به نمونه شاهد افزایش پنج برابری نشان داد. جالب این که با افزایش بیشتر غلظت متیل جاسمونات نه تنها افزایش تجمع فنل مشاهده نشد، بلکه روند تجمع فنل کاهش یافت.

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که افزودن سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، پروتئین کینازها، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات می‌شود (رامان و همکاران، ۲۰۱۱؛ اندی و همکاران، ۲۰۰۱). با تاثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند. این ترکیبات خود به طور مستقیم به عنوان عامل دفاعی عمل نمی‌کنند بلکه با فعالسازی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه سبب حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زنده و غیر زنده می‌شوند. در واقع متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید با تاثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب فعالسازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شوند (ون و همکاران، ۲۰۰۵؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) آنزیم اصلی در اتصال مسیر بیوسنتزی اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت‌های ثانویه شامل گروه وسیعی از ترکیبات فنلی است و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانوئیدی ایفا می‌کند (باگال و همکاران، ۲۰۱۲). هم راستا با نتایج این پژوهش، مهربانی و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند که میزان فنل در چای کوهی با افزایش غلظت متیل جاسمونات کاهش نشان داد. در حالی‌که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید سبب افزایش میزان آن گردید. اثر متیل جاسمونات بر ترکیبات ثانویه ریحان شیرین نشان داد که افزایش غلظت متیل جاسمونات سبب افزایش میزان فنل کل در ریحان شد (کیم و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرو مولار متیل

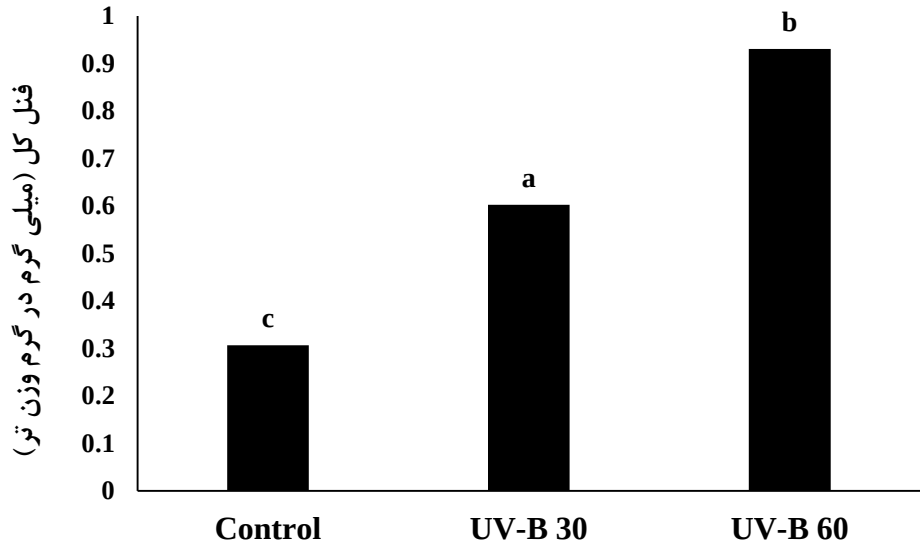
جا سمونات و ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک ا سید بیش‌ترین تاثیر را در افزایش فنل در کنگر فرنگی دارد (صمدی و همکاران، ۱۳۹۳)، که با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد. اسید جاسمونیک با دارا بودن مشابهت به ماده متیل جاسمونات سبب افزایش ترکیبات فنلی در گیاه *Hypericum perforatum* L. شده اســت که افزایش غلظت محرک ســبب کاهش میزان تولید این ترکیب در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرو مول می‌گردد که مشابه با نتایج متیل جاسمونات است (گادزوسکا و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش شده است که غلظت‌های بالای محرک واکنش فوق حســاســیت را القاء می‌کند که منجر به مرگ بافت می‌گردد در حالی‌که غلظت‌های پایین ســبب القاء واکنش‌های دفاعی می‌گردد (نامادئو و همکاران، ۲۰۰۷). بر این اســاس، افزایش تولید و تجمع ترکیبات فنلی مشــاهده شــده در کالوس‌های گیاه نوروزک را می‌توان به پا سخ‌های دفاعی که تو سط این محرک‌ها القاء می‌گردد، ن سبت داد. و همچنین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات، غلظت محرک است و غلظت بالاتر از آن واکنش فوق حساسیت را القا می‌کند.

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۳) اثر نور UV-A بر میزان فنل کل در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۳) محیط‌های تیمار شده با نور UV-A و شاهد نشان داد که فنل کل به طور معنی‌داری تحت تابش نور UV افزایش یافت. از بین تیمارهای نور UV-A ، تیمار ۳۰ دقیقه با نور UV-A بیشترین میزان فنل کل (۱/۴۱۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را به خود اختصاص داد و کمترین میزان فنل (۰/۳۰۶۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به کالوس‌های شاهد بود. در تیمار نور UV-A با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه میزان فنل کل کاهش یافت.



شکل ۴-۱۳ تاثیر نور UV-A بر میزان فنل کل

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۴) اثر نور UV-B بر میزان فنل کل در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۴) محیط‌های تیمار شده با نور UV-B و شاهد نشان داد که فنل کل به طور معنی‌داری تحت تابش نور UV افزایش یافت. از بین تیمارهای نور UV-B، تیمار ۶۰ دقیقه با نور UV-B بیشترین میزان فنل کل (۰/۹۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را به خود اختصاص داد و کمترین میزان فنل (۰/۳۰۶۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به کالوس‌های شاهد بود. در تیمار نور UV-B با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه میزان فنل کل افزایش یافت.



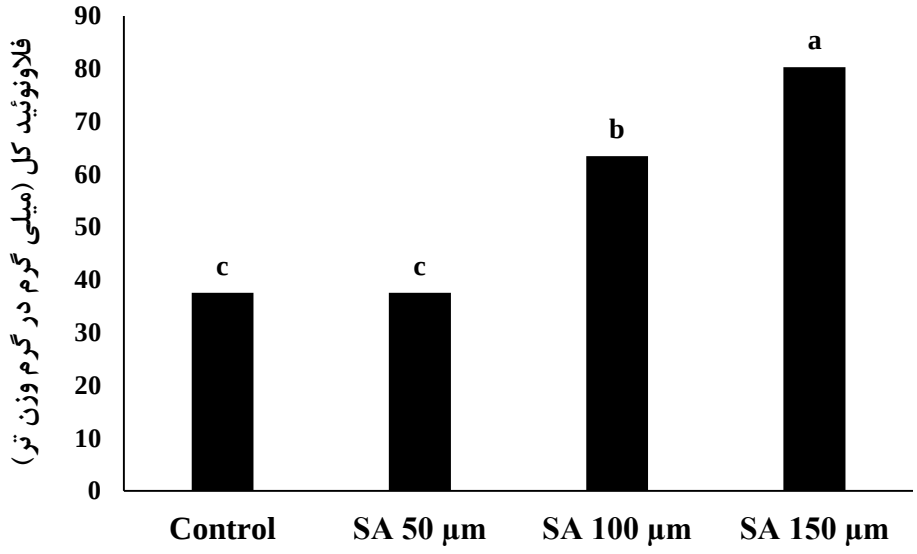
شکل ۴-۱۴تاثیر نور UV-B بر میزان فنل کل

بین خصوصیات نور (کیفیت، کمیت و تداوم) و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد (ماردانی و همکاران، ۲۰۱۵). ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که در بسیاری از گیاهان سنتز می‌شوند. میزان ساخته شدن این ترکیبات در واکنش به شرایط نامساعد، از جمله تنش‌های خشکی، گرما، تابش اشعه فرابنفش، حمله بیماری‌ها و حشرات افزایش می‌یابد. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که تابش اشعه UV سبب افزایش میزان ترکیبات ثانویه در گیاه می‌شود (زانکن و همکاران، ۱۹۹۳؛ زاپلوسکا و همکاران، ۲۰۰۲). اما مواردی هم دیده شده که تابش اشعه UV نه تنها سبب افزایش این ترکیبات نشده، بلکه باعث کاهش آن‌ها شده و یا بی‌تاثیر بوده است (کتاریا و همکاران، ۲۰۱۲؛ سلاما و همکاران، ۲۰۱۱؛ تورنن و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین رحیمی ریزی و همکاران (۱۳۹۳) مشخص کردند که پرتودهی با اشعه UV-A باعث افزایش فنل کل در گیاه رزماری گردید. اثر تیمارهای مختلف اشعه UV-A روی میزان فنل کل در کنگر فرنگی نشان داد که تیمار ۴ ساعت اشعه UV-A باعث افزایش معنی‌دار این متابولیت ثانویه شد (شاهبداغلو و همکاران، ۱۳۹۴). به نظر می‌رسد که تیمار با اشعه UV-A باعث بیان

ژن‌های خاص و راه‌اندازی مسیرهای متابولیکی مرتبط با ساخت ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش (متابولیت-های ثانویه) در گیاه می‌شود تا از این طریق بر آسیب‌های تنش فرابنفش غلبه کند (ویلسون و همکاران، ۲۰۰۱). اگرچه تولید ترکیبات فنلی در پاسخ به نور UV-B در چندین گونه گیاهی با ارزش مورد بررسی قرار گرفته است اما اثرات روابط بین دوز واکنش برای انباشت این متابولیت ثانویه کمتر مورد توجه قرار گرفته است (جانسن و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج آزمایش مصدق و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد، که نور UV-B باعث افزایش محتوای فنلی در ریحان شیرین شد. همچنین نشان داده شده که الیسیتور UV-B باعث افزایش فعالیت آنزیم کلیدی متابولیسم فنیل پروپانوئیدی و سرعت بخشیدن به بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌شود (اسکوبار، ۲۰۱۷). تیمار ۲۰ دقیقه با نور UV-C توانست باعث افزایش محتوای فنل کل در انگور شود (کتین، ۲۰۱۴).

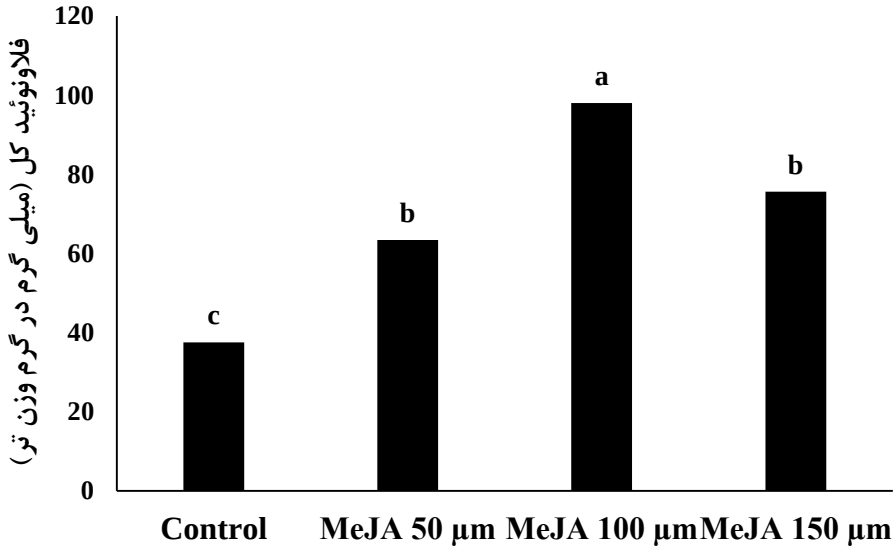
۴-۲-۲ میزان فلاونوئید کل

همانطور که در (جدول پیوست ۱) مشاهده می شود اثر تیمار الیسیتور سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴-۱۵) نشان داد که بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل در تیمار ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید (۸۰/۲۹۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کم‌ترین میزان فلاونوئید کل در کالوس‌های شاهد (۳۷/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید نشان داد، با افزایش غلظت از ۵۰ به ۱۵۰ میکرو مولار بر محتوای فلاونوئید کل نیز افزود می شود. به طوری که میزان فلاونوئید کل در غلظت ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد افزایش دو برابری نشان داد.



شکل ۴-۱۵ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل

همانطور که در (جدول پیو ست ۲) م شاهده می شود اثر تیمار الی سیتور متیل جا سمونات بر میزان فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴-۱۶) نشان داد که بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل در تیمار ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاســـمونات (۹۸/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کم‌ترین میزان فلاونوئید کل در کالوس‌های شـــاهد (۳۷/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود. در بین غلظت‌های متیل جاســـمونات، تیمار ۱۰۰ میکرو مولار بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل را به خود اختصاص داد و با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۱۵۰ میکرو مولار از میزان فلاونوئید کل کاسته شد (شکل ۴-۱۰).

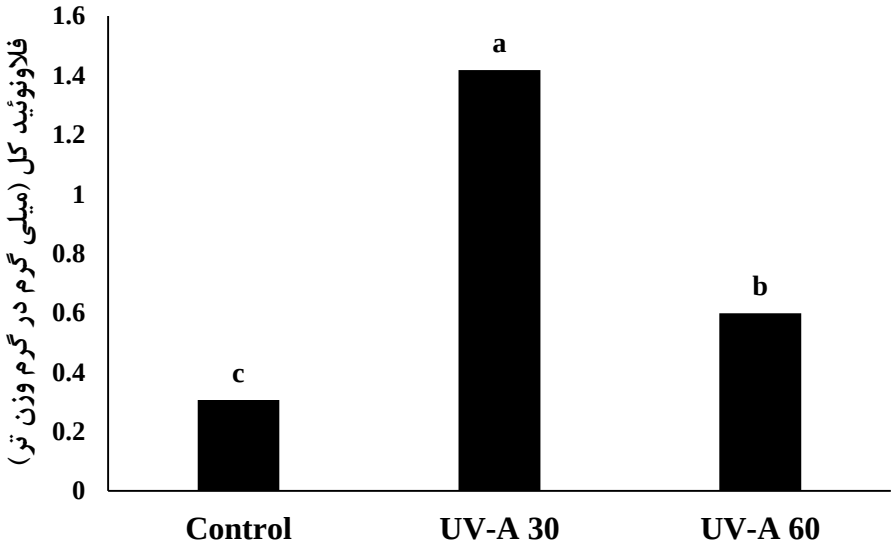


شکل ۴-۱۶ تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئید کل

فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنلی توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. در تنش‌های اکسیداتیو ترکیبات فنلی به ویژه فلاونوئیدها می‌توانند با فسفولیپیدهای غشا از طریق پیوند هیدروژنی با سرهای قطبی فسفولیپیدها ارتباط برقرار کنند، در نتیجه این ترکیبات در سطح داخل و خارج غشا جمع شده و به دلیل جلوگیری از دستیابی مولکول‌های آسیب‌رسان به ناحیه هیدروفوبی دو قطبی به حفظ سیالیت و تمامیت غشا کمک می‌کنند (میچالاک، ۲۰۰۶). در کنگر فرنگی افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا سطخ ۲۵۰ میکرو مولار سبب افزایش محتوای فلاونوئیدی شد (صمدی و همکاران، ۱۳۹۳). سالیسیلیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL و تولید بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در سیاهدانه شد (کبیری و همکاران، ۲۰۱۴). گل همیشه بهار نیز در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید، محتوای فلاونوئیدی خود را افزایش داد (پاچکو و همکاران، ۲۰۱۳). سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی‌داری در محتوای فنلی و فلاونوئیدی در کشت درون شیشه‌ای گیاه شیرین بیان گردید (شبانی و احسانپور، ۲۰۰۹). کاربرد متیل جاسمونات مقدار

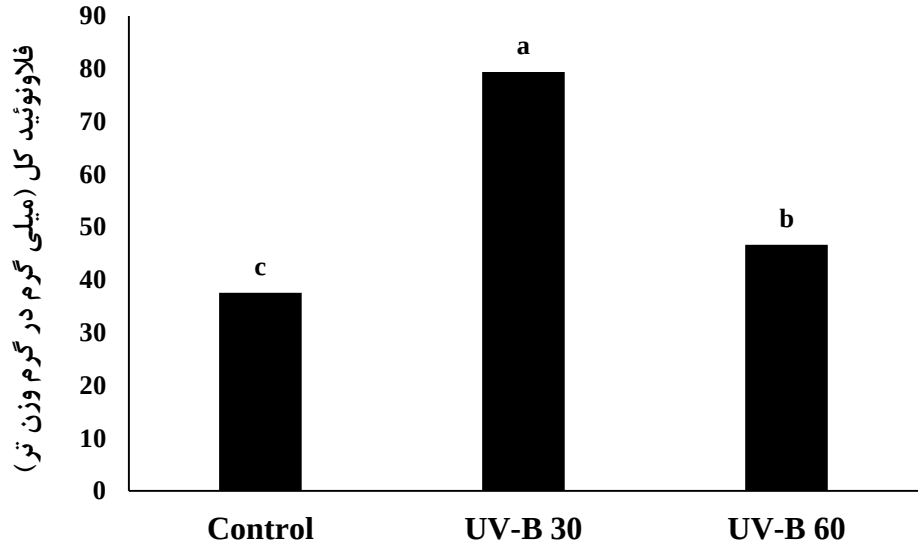
ترکیبات فنلی را در برخی از گیاهان نظیر سیب زمینی، سیب قرمز، مارچوبه و لوبیا سبز افزایش داد (هیردیا و همکاران، ۲۰۰۹). تاثیر متیل جاسمونات بر سنتز ترکیبات فنلی به غلظت آن وابسته است (زائو و همکاران، ۲۰۰۵). مسیر فنیل پروپانوئیدی، مسیر اولیه تولید بسیاری از ترکیبات طبیعی مانند هیدروکسی سینامیک اسیدها و سپس فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها و طیف وسیعی از سایر مواد فنلی است. این ترکیبات در گیاه نقش های مهمی چون حفاظت را به عهده دارند. آنزیم PAL امکان تبدیل فنیل آلانین به ترانس – اسید سینامیک را فراهم ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنلی می‌شود. ترانس – ا سید سینامیک پیش ماده ا صلی تولید فلاونوئیدها ست و بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوئیدی می‌گردد (باگال و همکاران، ۲۰۱۲). پینت و همکارانش (۱۹۹۸) بیان کردند که چالکون سنتتاز که پیش ساز فلاونوئیدها را تولید می‌کند تو سط متیل جا سمونات القا می شود. متیل جا سمونات دارای نقش دوگانه در تکامل و دفاع می‌با شد. این ترکیبات می‌توانند با القای م سیرهای علامت‌رسانی باعث فعال‌شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه شده و در نتیجه باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه گردند (زائو و همکاران، ۲۰۰۵). در واقع سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات با تاثیر آنتاگونیستی و سینرژیستی در تنظیم ژن پروتئین‌های وابسته به تنش و در نتیجه افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (گالاندچ و همکاران، ۱۹۹۲؛ مانگسری ماندی و همکاران، ۲۰۱۱؛ رامان و راوی، ۲۰۱۱).

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۳) اثر نور UV-A بر میزان فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۷) تیمارهای نور UV-A نشان داد، که تیمارهای نور UV-A نسبت به شاهد سبب افزایش معنی‌داری در میزان فلاونوئید شده است. که بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل مربوط به تیمار ۳۰ دقیقه نور UV-A (۹۳/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها دا شت و ۲/۵ برابر شاهد بود. در کل با افزایش زمان تیمار با نور UV-A از ۳۰ به ۶۰ دقیقه از میزان فلاونوئید کل کاسته شد.



شکل ۴-۱۷ تاثیر نور UV-A بر میزان فلاونوئید کل

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۴) اثر نور UV-B بر میزان فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۸) تیمارهای نور UV-B نشان داد، که تیمار نور UV-B نسبت به شاهد سبب افزایش معنی‌داری در میزان فلاونوئید شده است. که بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل مربوط به تیمار ۳۰ دقیقه نور UV-B (۷۹/۴۱۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت و دو برابر شاهد بود. در کل با افزایش زمان تیمار با نور UV-B از ۳۰ به ۶۰ دقیقه از میزان فلاونوئید کل کاسته شد.



شکل ۴-۱۸ تاثیر نور UV-B بر میزان فلاونوئید کل

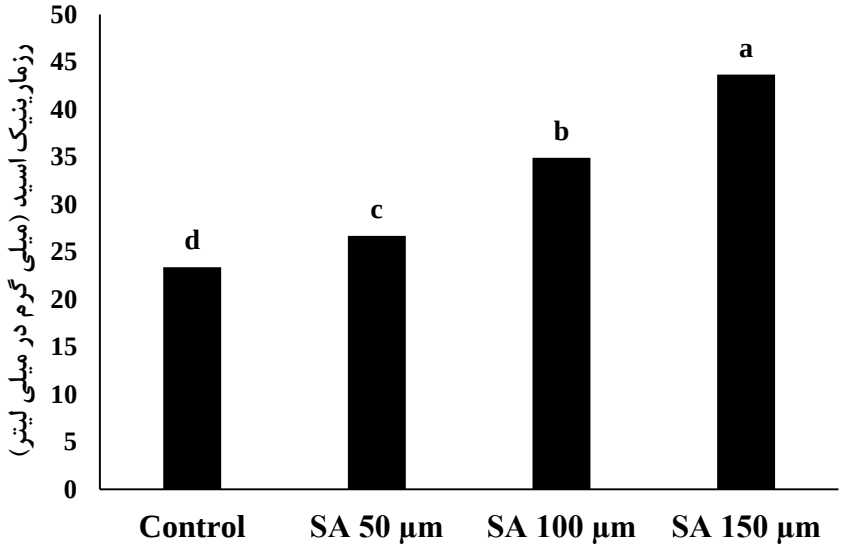
در بسیاری از گونه‌های گیاهی سنتز برخی از مشتقات مسیر فنیل پروپانوئید مانند فلاونوئیدها در پاسخ به نور UV تحریک می‌شود (دایکسون و همکاران، ۲۰۰۱). افزایش مقدار فلاونوئیدها در تیمار با نور UV از ویژگی‌های دفاعی برخی از گیاهان در برابر پرتو فرابنفش است. این ترکیب‌ها با جذب پرتو UV و جلوگیری از نفوذ آن به درون بافت‌های حساس از ایجاد خسارت جلوگیری می‌کنند و یا نقش آنتی اکسیدانی در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش UV در گیاهان ایفا نموده، تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. افزایش در غلظت فلاونوئیدها ناشی از فعالیت زیاد آنزیم PAL و یا سرعت بالای سنتز این آنزیم تحت تنش UV است (گائو و وانگ، ۲۰۰۷). گزارش‌ها نشان داده که مقدار و فعالیت آنزیم چاکلون سنتاز که نقش اساسی در بیوسنتز فلاونوئیدها دارد نیز تحت تاثیر نور UV افزایش می‌یابد (ساکیاما و همکاران، ۲۰۰۲). لوئیس و همکاران در سال ۱۹۹۴ گزارش نمودند که فلاونوئیدها در پاسخ به تابش اشعه ماوراء بنفش (UV-B و UV-C) سریعا افزایش یافته و به مقدار زیاد در لایه اپیدرمی تجمع می‌یابند. آنها با استفاده از موتانهایی که قدرت ساختن این ترکیبات را ندارند اهمیت فلاونوئیدها را در مقاومت گیاهان

نسبت به تابش این اشعه نشان دادند. تجمع فلاونوئیدها در کشت سلول و بافت جعفری و سویا در ارتباط با فعال شدن آنزیم چاکلون سنتاز تحت تاثیر نور UV-B گزارش شده است (ولمان، ۱۹۷۱).

گزارش شده است که محتوای درونی اکسین در گیاهانی که در معرض تابش پرتوهای فرابنفش قرار گرفته و نسبت به آن سازگاری یافته‌اند، کاهش می‌یابد. محققان معتقدند که این کاهش در محتوی اکسین حاصل افزایش پراکسیدازهای آنیونی است که به نوبه خود سبب تجمع ترکیبهای فنلی نظیر فلاونوئیدها در گیاهان سازگار شده می‌گردد (جاسن و همکاران، ۲۰۰۱).

۴-۲-۳ میزان رزمارینیک اسید

میزان رزمارینیک اسید در کالوس‌های تحت تیمار با الیسیتور سالیسیلیک اسید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول پیوست ۱). در مقایسه بین سطوح مختلف سالیسیلیک اسید، با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۵۰ به ۱۵۰ میکرو مولار، میزان رزمارینیک اسید به طور معنی‌داری افزایش یافت به گونه‌ای که کم‌ترین میانگین این صفت مربوط به شاهد (۲۳/۴۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید (۴۳/۶۵۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود (شکل ۴-۱۹).



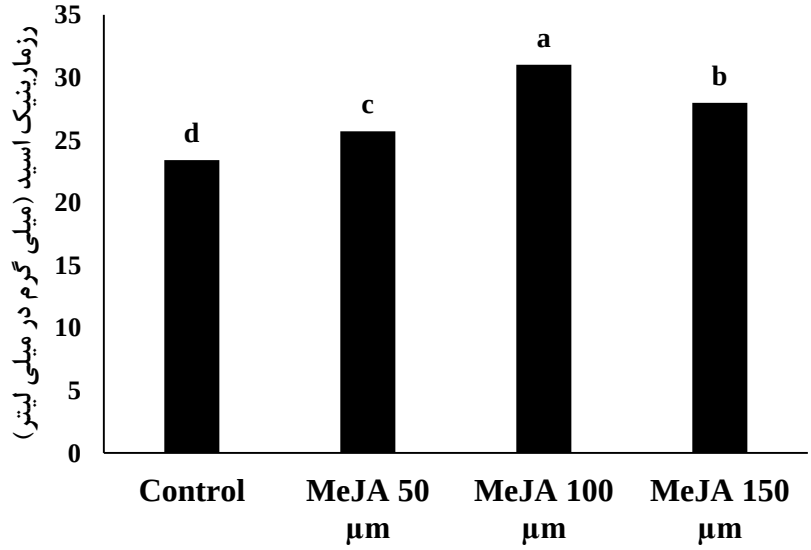
شکل ۴-۱۹ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان رزمارینیک اسید

میزان رزمارینیک اسید در کالوس‌های تحت تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول پیوست ۲). در مقایسه بین سطوح مختلف متیل جاسمونات با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میکرو مولار، میزان رزمارینیک اسید افزایش یافت، در حالی‌که با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۱۵۰ میکرو مولار، میزان رزمارینیک اسید کاهش یافت. اگرچه غلظت ۱۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات (۳۱/۰۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به تیمار شاهد، میزان رزمارینیک اسید را به طور معنی‌داری افزایش داد. در کل تیمار سالیسیلیک اسید نسبت به متیل جاسمونات در تولید رزمارینیک اسید در نوروزک موثرتر واقع شد (شکل ۴-۲۰).

ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی برای سلامتی گیاه و جانور دارای اهمیت هستند (دایکسون و سامنر، ۲۰۰۳). بعضی از ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی در شرایط تنش تولید می‌شوند و این ترکیبات در شرایط تنشی مختلف و در گیاهان مختلف و در بافت‌های مختلف یک گیاه می‌تواند یکسان باشد (چریستی و همکاران، ۱۹۹۴). ترکیبات حا صل از آنزیم‌های م سیر بیو سنتزی فنیل‌پروپانوئیدها نقش‌های مهمی برای

بقا گیاه دارند به طور مثال رزمارینیک اسید یکی از استرهای کافئیک اسید است که خاصیت آنتی‌میکروبیال دارد (سیسک و همکاران، ۱۹۹۶).

سالیسیلیک اسید به عنوان یک جزء پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود و در جایگاه ترکیب القاکننده تنش، مسیر سیگنالیک را فعال نموده و سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) شده که منجر به پاسخ‌های دفاعی گیاه و بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنولیک می‌گردد. آنزیم PAL یک آنزیم حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه ا ست (دایک سون و همکاران، ۱۹۹۲). در ک شت سلولی گیاه *L.erythrorhizon*، غلظت ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات بیشترین تاثیر را در افزایش و تجمع رزمارینیک اسید داشت (میزوکامی و همکاران، ۱۹۹۳). نتایج مطالعات ساهو و همکاران (۲۰۱۳) در ک شت سلولی *S.scutellarioides* ن شان داد افزایش غلظت در هر دو نوع الیسیتور سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات، باعث افزایش میزان رزمارینیک اسید شد، ولی بیشترین میزان رزمارینیک اسید در غلظت ۵۰ میکرو مولار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید به دست آمد.



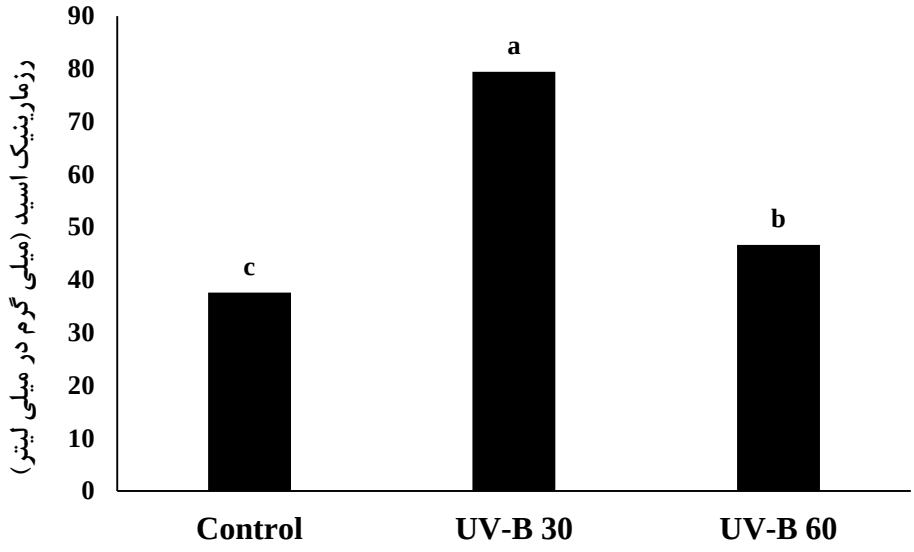
شکل ۴-۲۰ تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان رزمارینیک اسید

افزایش تجمع رزمارینیک اسید در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ظاهرا به علت فعال شدن دو مسیر فنیل پروپانوئید و مسیر مشتق شده از تیروزین است. در حالی‌که هر دو ترکیب فنیل آلانین و تیروزین هم به اندازه رزمارینیک اسید توسط متیل جاسمونات افزایش یافته‌اند. افزایش گذرا و سریع در فعالیت آنزیم PAL در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات به خوبی با تحریک تجمع رزمارینیک اسید مرتبط است. که این نشان‌دهنده نقش مهم آنزیم PAL در تنظیم متابولیسم ترکیبات فنل‌پروپانوئیدی است (میزوکامی و همکاران، ۱۹۹۳). ماتکوسکی (۲۰۰۸) گزارش کرده است که در شرایط درون شیشه‌ای تولید ترکیبات فنلی می‌تواند توسط الیسیتورهایی مانند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در سلول تحریک شده و افزایش یابد. استرهای القاء شده توسط اسید جاسمونیک و استرهای آن به ویژه متیل جاسمونات در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات دارویی به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه بر متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید نیز یکی از مولکول‌های محرک مهم است. سالیسیلیک اسید سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال سازی گروه مشخصی از ژن‌ها مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. سالیسیلیک اسید در تولید رزمارینیک اسید در کشت سلولی ریشه موئین گیاه *Ocimum basilicum L.* و کوکورمین در کشت سلولی *Catharanthus roseus* مورد استفاده قرار گرفته است (ماتکوسکی، ۲۰۰۸). افزایش غلظت الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تولید آجمالیسین[1] در کشت سلول *Catharantous roseus* اثر معکوس بر تولید آجمالیسین داشت (نامادئو، ۲۰۰۷). در حالی‌که این دو الیسیتور بر متابولیسم تروپان آلکالوئید در کشت ریشه مویی گیاه *Brugmavsia suaveolens* L.، تولید هیوسیامین را ۱۰ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (زید و وینک، ۲۰۰۴).

[1] Ajmalicine

همانطور که در جدول تجزیه واریانس (جدول پیو ست ۳) م شاهده می شود، میزان رزمارینیک ا سید تحت تیمارهای نور UV-A با شاهد معنی‌دار نبود.

بر ا ساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیو ست ۴) میزان رزمارینیک ا سید تحت تیمار با الی سیتور UV-B در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۱) تیمارهای نور UV-B نشان داد، محیط کشت تیمار شده با ۳۰ دقیقه نور UV-B تاثیر بیشتری بر میزان رزمارینیک اسید نسبت به محیط کشت تیمار شده با ۶۰ دقیقه داشت و با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه میزان تجمع رزمارینیک اسید کاهش یافت، ولی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.



شکل ۴-۲۱ تاثیر نور UV-B بر میزان رزمارینیک اسید

ژو و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرو مولار و نور UV-C برای ۲۰ دقیقه بیش‌ترین تاثیر را در تجمع stilbene در کشت سلولی انگور داشت. لیو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند میزان تاثیر نور UV بر تولید متابولیت‌های ثانویه بستگی به مدت زمان تیمار دارد. تغییرات در تولید رزمارینیک اسید می‌تواند تحت تاثیر نوع، زمان و غلظت الیسیتور در کشت درون شیشه‌ای قرار

گیرد. اثر الیسیتورهای فوق بر تجمع رزمارینیک اسید به فعالیت خاص آنزیم‌های موجود در مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید وابسته است (ساهو و همکاران، ۲۰۱۳).

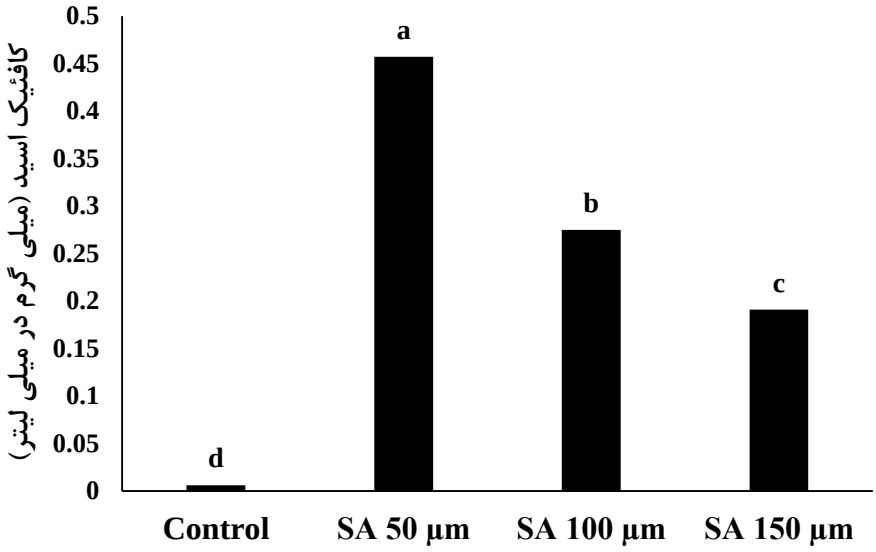
۴-۲-۴ میزان کافئیک اسید

بر اساس تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱)، میزان کافئیک اسید در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار گرفت. در این مطالعه نتایج اثر غلظت‌های مختلف الیسیتورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید بر تحریک تولید کافئیک اسید نشان داد که الیسیتور سالیسیلیک اسید در افزایش میزان کافئیک اسید بسیار تاثیر داشته است. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴-۲۲) نشان داد که غلظت ۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید نسبت به سایر غلظت‌ها (۱۵۰، ۱۰۰ میکرو مولار)، بیش‌ترین تاثیر را در افزایش میزان کافئیک اسید (۰/۴۷۵۴ میلی گرم بر میلی‌لیتر) داشته است. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۵۰ به ۱۵۰ میکرو مولار از میزان کافئیک اسید کاسته شد، ولی همچنان نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول پیوست ۲)، میزان کافئیک اسید در غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات با شاهد معنی‌دار نبود.

گیاهان قابلیت فرار از تنش‌های مختلف را ندارند، اما مکانیسم‌هایی جهت شناسایی و مواجهه با انواع تنش‌ها و افزایش سازگاری و تحمل برای به حداقل رساندن آسیب را دارند. تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه و فعال شدن برخی آنزیم‌های خاص از جمله این مکانیسم‌ها هستند. استفاده از الیسیتورهای مختلف یکی از راه‌های ایجاد تنش به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه است (میرزایی، ۱۳۹۲؛ نورانی آزاد، ۱۳۹۰). سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن سیستم مقاومت اکتسابی سیستمیک، سنتز متابولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود (اراسلان و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج مطالعات صمدی و همکاران (۱۳۹۳)، نشان داد ۲۰۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید بیش‌ترین تاثیر را در محتوای کافئیک اسید و

کلروجنیک اسید داشته و با افزایش غلظت الیسیتورها میزان ترکیبات مذکور نیز کاهش می‌یابد. طبق نتایج حاصله از پژوهش صمدی و همکاران (۱۳۹۳) محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تحت تاثیر نسبت های مختلف الیسیتور قرار داشته است که بیانگر نقش مستقیم سالیسیلیک اسید در تحریک تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است.

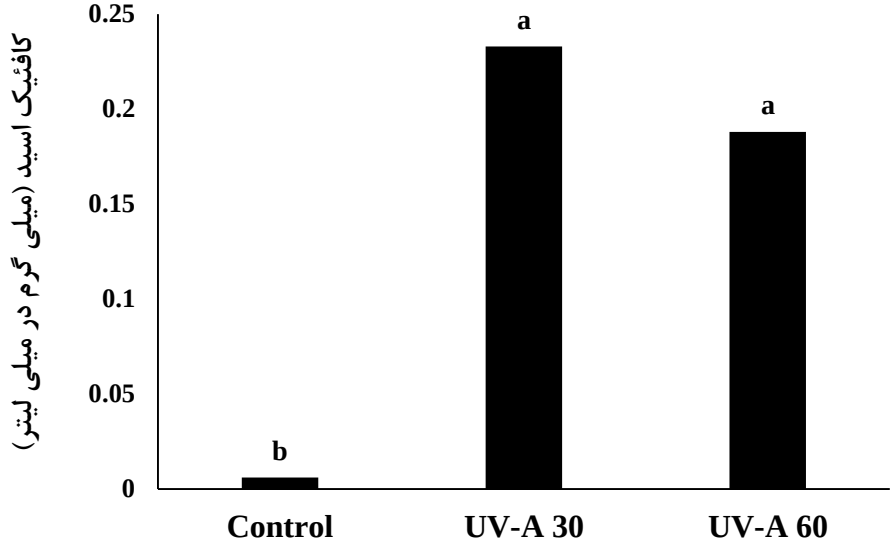


شکل ۴-۲۲ تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان کافئیک اسید

دانگ و همکاران (۲۰۱۰) در کشت سلولی گیاه *Salvia miltiorrhiza* تحت تاثیر سالیسیلیک اسید نشان دادند که با افزایش غلظت و زمان تیمار با سالیسیلیک اسید از میزان کافئیک اسید کاسته شد، ولی همچنان میزان تولید با شاهد افزایش معنی‌داری دا شت که هم را ستا با نتایج پژوهش حا ضر ا ست و نیز نتایج حاصل از پژوهش درویشی و همکاران (۱۳۹۵)، نشان داد افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در کشت سلولی پونه باعث افزایش معنی‌دار متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن شد، در حالی‌که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، میزان متابولیت ثانویه ایزوپولگون کاهش یافت.

نتایج به دست آمده (جدول پیوست ۳) از تاثیر الیسیتور UV-A بر میزان کافئیک اسید در سطح

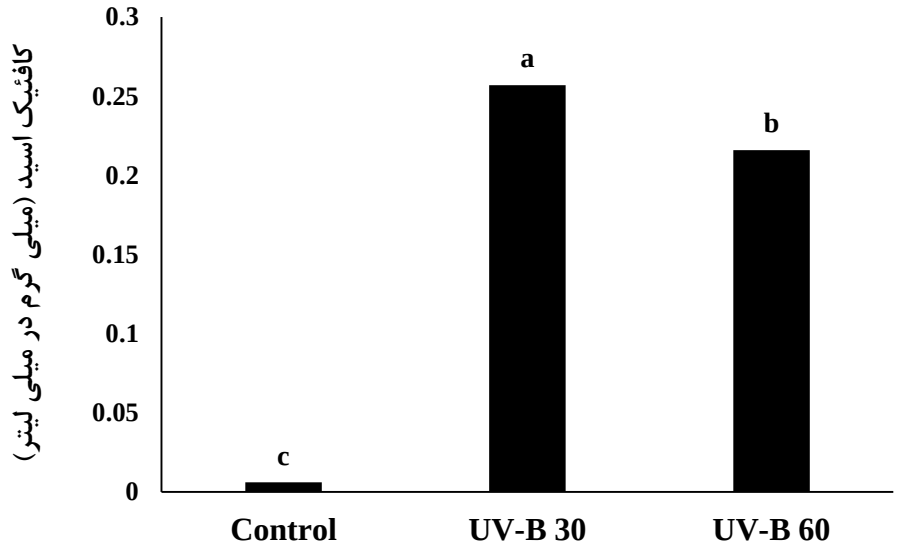
احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۳) نشان داد، تیمار ۳۰ دقیقه با نور UV-A بیش‌ترین (۰/۲۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تاثیر را بر افزایش میزان کافئیک اسید داشت. به طوری‌که باعث افزایش ۳۸ برابری میزان کافئیک اسید نسبت به تیمار شاهد شد. ولی بین تیمار ۳۰ و ۶۰ دقیقه نور UV-A، اختلاف معنی‌داری از لحاظ افزایش میزان کافئیک اسید وجود نداشت.



شکل ۴-۲۳ تاثیر نور UV-A بر میزان کافئیک اسید

نتایج به دست آمده (جدول پیوست ۴) از تاثیر الیسیتور UV-B بر میزان کافئیک اسید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۴) نشان داد، تیمار ۳۰ دقیقه با نور UV-B بیش‌ترین (۰/۲۵۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تاثیر را بر افزایش میزان کافئیک اسید داشت. به طوری‌که باعث افزایش ۴۳ برابری میزان کافئیک اسید نسبت به تیمار شاهد شد. تیمار با نور UV-B توانست به طور قابل توجهی میزان تولید کافئیک اسید را در کالوس نوروزک افزایش دهد، ولی با افزایش زمان تیمار از ۳۰ به ۶۰ دقیقه با نور UV-B، میزان کافئیک اسید کاهش یافت، ولی همچنان تفاوت معنی‌داری از نظر تولید کافئیک اسید با تیمار شاهد داشت.

بین خصـوصـیات روشـنایی و تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی، ارتباط تنگاتنگ وجود دارد و نقش اکوفیزیولوژیک روشـنایی در تولید فرآورده‌های مذکور، عمده و اسـاسـی اسـت. فعالیت گیاهان در سـنتز متابولیت‌های دارویی، تحت تاثیر وضعیت‌های مختلف نوری تغییر می‌کند. مدت، شدت و کیفیت روشنایی، هر یک به تنهایی می‌تواند تاثیر عمده‌ای بر وضعیت متابولیت‌های ثانویه بر جای بگذارد (دوکی ، ۲۰۰۲).



شکل ۴-۱۵ تاثیر نور UV-B بر میزان کافئیک اسید

نتایج شاهبداغلو و همکاران (۱۳۹۳)، نشان داد افزایش تابش اشعه UV-A کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) باعث کاهش میزان ترکیبات موثره مهم دارویی از جمله کافئیک اسید و کلروجنیک اسید می‌شـود. مطالعات مناف و همکاران (۲۰۱۶)، نور UV-B منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسـیدانی و مقدار کافئیک اسید در کالوس و کشت سلولی گیاه سرخارگل می شود و حداکثر افزایش مقدار کافئیک اسید، فنل کل و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، ۴ سـاعت بعد از تیمار با نور UV-B در کشـت سـلولی گیاه سرخارگل گزارش شده است.

نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز حاکی از این است که احتمالاً افزایش زمان تابش اشعه UV-A و UV-B نه تنها باعث افزایش میزان فلاونوئیدهای دارویی و سایر ترکیبات فنلی مهم در گیاهان مورد تیمار قرار گرفته نمی شود، بلکه باعث کا سته شدن این ترکیبات نیز می‌گردد. نتایج فوق با نتایج پژوهش ویلسون و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. همچنین از این آزمایش نتیجه گرفته شد که سنتز ترکیبات فنلی متفاوت به و سیله گیرنده‌های نوری جداگانه‌ای تحریک می‌گردد و تاثیری که گیرنده‌های نور UV-B بر مسیر متابولیکی می‌گذارند کاملا متفاوت با تاثیر گیرنده‌های طیف UV-A است. علاوه بر آن هر ترکیب گیاهی به صورت جداگانه در مسیرهای متابولیکی شرکت کرده و به محرک پاسخ می‌دهد، یعنی پاسخ این ترکیبات می‌تواند به صورت م ستقل از هم بوده و حتی متفاوت از هم با شد. داده‌های ما نتایج ویل سون و همکاران (۲۰۰۱) را تایید می‌کند.

فصل پنجم

نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱ نتیجه گیری کلی

نتایج آزمایش تاثیر تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر کشت کالوس نوروزک نشان داد که محیط کشت تیمار شده با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات بیش‌ترین تاثیر بر قطر کالوس‌ها (۱/۸۰۳ سانتی‌متر) داشت. بیش‌ترین مقدار وزن تر و خشک کالوس به ترتیب (۴/۱۶۷ و ۰/۲۷۵۰ گرم) در محیط کشت تیمار شده با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات مشاهده شد. بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید در کالوس‌ها (۱/۶۸۱ و ۹۸/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در محیط کشت تیمار شده با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات مشاهده شد. تیمار با الیسیتور سالیسیلیک اسید تاثیر بسزایی در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کالوس گیاه نوروزک داشت. به طوری که بیشترین میزان رزمارینیک اسید (۴۳/۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در غلظت ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید و بیشترین میزان کافئیک اسید (۰/۴۷۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت تیمار شده با ۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید به دست آمد.

در مورد الیسیتور UV، تیمار ۳۰ دقیقه نور UV-A بیش‌ترین (۲/۱۰۰ گرم) تاثیر را بر وزن تر داشت. بیشترین میزان فنل و فلاونوئید (۱/۴۱۸ و ۹۳/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار ۳۰ دقیقه نور UV-A مشاهده شد. بیش‌ترین میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید (۰/۲۵۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت تیمار شده با ۳۰ دقیقه نور UV-B مشاهده شد. تیمار نور UV-A نشان داد که میزان فلاونوئید کل نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش داشته است، که می‌تواند یک تیمار مناسب جهت افزایش محتوای فلاونوئید کل بعد از تیمار ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات در کالوس گیاه نوروزک به کار رود. چنین به نظر می‌رسد که گیرنده‌های نور UV-A نسبت به سایر طول موج‌ها از جمله امواج UV-B متفاوت بوده و جذب اشعه فوق توسط آنها سبب تحریک مسیرهای متابولیکی متفاوتی در گیاه می‌شود.

در این آزمایش نشان داده شد که الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بیش‌ترین تاثیر را در تولید متابولیت های ثانویه در کالوس گیاه نوروزک داشـــتند. از بین غلظت های مختلف این دو الیســـیتور، غلظت ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاســـمونات بیش‌ترین تاثیر در افزایش میزان فنل و فلاونوئید داشــت و در ســالیســیلیک اســید، غلظت ۱۵۰ میکرو مولار آن تاثیر بســزایی در افزایش میزان رزمارینیک ا سید دا شت. در حالی‌که غلظت ۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک ا سید باعث افزایش معنی‌دار کافئیک ا سید نسبت به دیگر تیمارهای الیسیتوری در کالوس گیاه نوروزک شد.

۵-۲ پیشنهادات

۱) اعمال تیمارهای پژوهش حا ضر در ک شت سو سپان سیون سلولی نوروزک در برر سی میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید.

۲) اندازه‌گیری میزان کافئیک اسید و رزمارینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC.

۳) اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و همب ستگی آن با میزان ا سیدهای فنلی.

۴) بررسی اثر نور UV-C در تولید اسیدهای فنلی.

۵) بررسی اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید.

۶) استفاده از تیمارهای زمانی برای بررسی بیش‌تر اثر نور UV-A و UV-B در تولید متابولیت-های ثانویه.

پیوست‌ها

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها با الیسیتور سالیسیلیک اسید

منابع تغییر	درجه آزادی	قطر کالوس	وزن تر	وزن خشک	فنل کل	فلاونوئید کل	رزمارینیک اسید	کافئیک اسید
تیمار	۳	۰/۱۱۱*	۱/۴۷۶**	۰/۰۰۳**	۰/۳۵۱**	۱۳۱۷/۹۳۲**	۲۴۶/۳۰۱**	۰/۰۱۴**
خطا	۸	۰/۰۲۶	۰/۰۲۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۷/۸۷۹	۱/۷۳۱	۰/۰۰۱
CV%		۱۴/۶۶	۵/۸۶	۶/۵۵	۶/۹۸	۵/۱۳	۴/۰۹	۶/۷۵

** معنی‌دار در سطح یک درصد، * معنی‌دار در سطح پنج درصد، ns غیر معنی‌دار

جدول ۴-۲ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها با الیسیتور متیل جاسمونات

منابع تغییر	درجه آزادی	قطر کالوس	وزن تر	وزن خشک	فنل کل	فلاونوئید کل	رزمارینیک اسید	کافئیک اسید
تیمار	۳	۰/۰۶۵ns	۳/۴۸۲**	۰/۰۰۹**	۱/۰۴۰**	۱۹۰۷/۷۹۵**	۳۱/۶۸۱**	۰/۰۲۱ns
خطا	۸	۰/۰۲۳	۰/۰۴۷	۰/۰۰۱	۰/۰۲۰	۴۶/۵۷۳	۰/۹۴۷	۰/۰۱۸
CV%		۱۳/۸۷	۸/۴۹	۷/۳۶	۱۳/۷۸	۹/۹۴	۳/۶۰	۱۷/۹۶

** معنی‌دار در سطح یک درصد، * معنی‌دار در سطح پنج درصد، ns غیر معنی‌دار

جدول ۴-۳ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها با الیسیتور UV-A

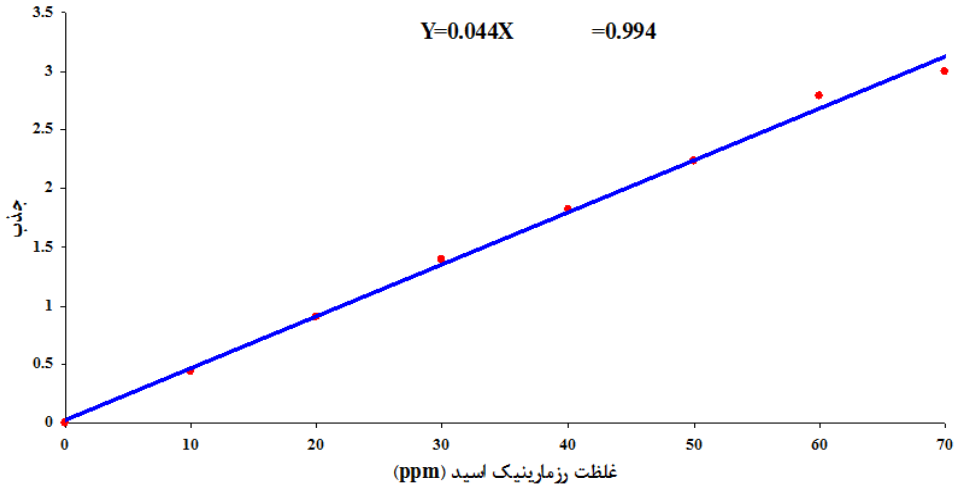
منابع تغییر	درجه آزادی	قطر کالوس	وزن تر	وزن خشک	فنل کل	فلاونوئید کل	رزمارینیک اسید	کافئیک اسید
تیمار	۲	۰/۱۱۹**	۰/۱۴۶**	۰/۰۰۶ns	۰/۹۹۶**	۲۶۶۰/۶۵۷**	۳۱/۱۹۰ns	۰/۰۴۳**
خطا	۶	۰/۰۰۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۱۰/۸۲۱	۶/۰۹۰	۰/۰۰۱
CV%		۱۰/۴۹	۵/۹۲	۷/۴۶	۱۱/۶۶	۵/۵۱	۹/۳۴	۲۰/۵۲

** معنی‌دار در سطح یک درصد، * معنی‌دار در سطح پنج درصد، ns غیر معنی‌دار

جدول ۴-۴ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها با الیسیتور UV-B

منابع تغییر	درجه آزادی	قطر کالوس	وزن تر	وزن خشک	فنل کل	فلاونوئید کل	رزمارینیک اسید	کافئیک اسید
تیمار	۲	۰/۰۷۴*	۰/۱۹۱ns	۰/۰۰۲ns	۰/۲۹۳**	۱۴۵۳/۳۹۶**	۱۱۴/۴۱۶**	۰/۰۵۴**
خطا	۶	۰/۰۱۰	۰/۰۵۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۹	۲/۹۲۰	۱/۹۶۷	۰/۰۰۱
CV%		۱۰/۹۷	۱۴/۳۸	۱۶/۶۹	۱۵/۳۱	۳/۱۳	۴/۸۱	۶/۸۸

** معنی‌دار در سطح یک درصد، * معنی‌دار در سطح پنج درصد، ns غیر معنی‌دار



شکل ۱ نمودار منحنی استاندارد رزمارینیک اسید

منابع

ال ام پیریک، (۱۳۷۶) **مبانی کشت بافت‌های گیاهی**، مترجم: دکتر عبدالرضا باقری با همکاری مهندس مهری صفاری.

ابراهیمی، چ. سلوکی، م. امیدی، م. فروتن، م. زارع کاریزی، ا. و مهرآفرین، ع. (۱۳۹۴) "اثر متیل جاسمونات بر تولید تاکسول در کشت درون شیشه‌ای گیاه فندق (*Corylus avellana L.*)" **فصلنامه گیاهان دارویی**.

اثنی عشری، م. زکایی خسرو شاهی، م. (۱۳۸۸) "اصول کشت بافت گیاهی"، **انتشارات دانشگاه ابو علی سینا**، چاپ سوم، ص ۹۳.

اورمزدی، پ. و چلبیان، ف. (۱۳۸۵) "مطالعه کشت بافت و اندام زایی در گیاه دارویی *Salvia nemorosa*" **فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران**، جلد ۱۴، شماره ۲.

بختیاری، ز. غ. اصغری، ش. انتشاری، ن. مهدی نژاد، م. شریعتی. (۱۳۹۵) "بررسی تولید آرتمیزینین در کالوس و گیاه Artemisia aucheri Boiss در برابر محرک‌های نوری و اشعه UV در محیط آزمایشگاهی" **فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی**، شماره پیاپی ۱۵، سال چهارم، شماره ۳.

پوراکبر، ل. عابدزاده، م. (۱۳۹۳) "مطالعه اثر میدان مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر گیاه بادرنجبویه (نعناعیان) تحت تنش فرابنفش B" **یافته‌های نوین در علوم زیستی**، جلد ۱، شماره ۲: ۵۶-۴۰.

پوراکبر، ل.، صدقی، ح. و اسدی سامانی، م. (۱۳۹۱) "تأثیر میدان های مغناطیسی بر جوانه زنی، رشد اولیه و فعالیت برخی آنزیم های دخیل در جوانه زنی بذر رازیانه" . مجله علوم دانشگاه تربیت معلم. ۱۲:۱-۱.

تنوری، آ. قاسم‌نژاد، ع. و علیزاده، م. (۱۳۹۳) "تاثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر صفات مورفولوژیکی و رنگدانه‌های درونی کالوس کنگر فرنگی" **مجله به زراعی کشاورزی**، دوره ۱۶، شماره ۴.

حدادخداپرست، م. حسینی، م. (۱۳۷۲) "اثر عوامل محیطی بر جوانه زنی گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی" **مجله پژوهش و سازندگی**، سال ۱۰، ۳۷: ۴۵-۴۲.

خانپور اردستانی، ن. شریفی، م. و بهمنش، م. (۱۳۹۳) "اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت سلول *Scrophularia straita*" مجله زیست شناسی ایران، جلد۲۷، شماره ۵.

درویشی، ا. کهریزی، د. بهرامی نژاد، ص. و منصوری، م. (۲۰۱۷) "بررسی اثر الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید بر درصد زنده مانی سلول و میزان متابولیت‌های ثانویه بتاکاریوفیلن و ایزوپولگون در کشت سلولی پونه (*Mentha pulegium*)" **مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی**, ۲۹(۴), ۳۷۰-۳۸۱.

دوازده امامی، س.، و مجنون حسینی، ن. (۱۳۷۸) " زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه ای" **موسسه انتشارات دانشگاه تهران** ص ۳۰۰ .

رحیمی‌ریزی، م. عزیزی، ع. و ساری‌خانی، ح. (۱۳۹۳) "پاسخ‌های گیاه دارویی رزماری به افزایش تشعشع فرابنفش UV-A با تغییر در صفات اگرومورفولوژیک، تولید ترکیبات فنلی و ویژگی‌های ضد اکسایش" **دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار**، ۱ شهریور، همدان.

زرگری، ع. (۱۳۷۲) گیاهان دارویی، جلد چهارم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۷۱-۵۹.

شاهبداغلو، ع. عزیزی، ع. و ساری خانی، ح. (۱۳۹۳) "اثر نور فرابنفش بر تعدادی از ترکیبات ثانویه در برخی ژنوتیپ‌های کنگر فرنگی (*Cynara scolymus L.*)" اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی، دانشگاه تهران، پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست.

صمدی، ص. قاسم نژاد، م. علیزاده، م. (۱۳۹۳) "تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) کنگر فرنگی (*Cynara scolymus L.*) تحت تأثیر متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای" **نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی**، جلد ۲۱، شماره ۴.

طباطبائی یزدی، ف .، ۱۳۷۴ "بررسی اثرات آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره برگ گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن" . پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

فارسی، م. و ذوالعلی، ج. (۱۳۹۰) "اصول بیوتکنولوژی گیاهی"، ویرایش دوم، **انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد**. ص ۱۰۴-۱۰۵.

فیله‌کش، ا. (۱۳۸۲) "بررسی آت اکولوژی گیاه مرتعی *Salvia lerrifolia* در سبزوار" **خلاصه مقالات اولین همایش توسعه پایدار گیاهان دارویی** ص ۳۳.

قاسمی پیربلوطی، ع. اشرافی، م. رحیم ملک، م. و حامدی، ب. (۱۳۹۱) "اثرمحلول پاشی اسید جاسمونیک بر درصد و ترکیبات اسانس آویشن دنایی" **داروهای گیاهی**، شماره ۲، ص۸۰-۷۵.

قربانعلی م.، ف. میقانی.، ش. میرقاضی. (۱۳۸۸) "اثر غلظت‌های مختلف مس و برهمکنش آن با کینیتین بر چند جنبه بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نوروزک" **فصلنامه شناخت و کاربرد گیاهان دارویی**، جلد ۲، شماره۱.

مجد، ا . (۱۳۸۱) **جزوه کشت بافت و سلول گیاهی**. دانشگاه آزاد ، واحد تهران شمال .

مدرس، م. ابریشم چی، پ. اجتهادی، ح. و رمضانی، ع. (۱۳۸۶) "تکثیر گیاه نوروزک از طریق کشت رویان" **فصل نامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران**.

مهربانی، ب. ناظری، س. و پیری، خ. (۱۳۹۱) "بررسی میزان فنول کل در گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia Vahia*) از طریق کشت کالوس و امکان افزایش آن با استفاده از محرک‌ها" **مجله بیوتکنولوژی کشاورزی**، دوره ۴، شماره ۲.

میرزایی، م. معینی، ا. قناتی، ف. (۱۳۹۲) "اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus*)" **مجله زیست شناسی ایران**، دوره ۲۶، شماره ۱، ص ۹۹۸-۹۹۰.

نورانی آزاد، ح. کفیل زاده، ف. (۱۳۹۰) "تأثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی آنزیم‌ها در گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*)" **مجله زیست شناسی ایران**، شماره ۶، ص ۸۶۷-۸۵۸.

Agati G., C. Brunetti, M. Di Ferdinando. F. Ferrini. S. Pollastri. M. Tattini. (2013) "Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from The past" **Jornal Plant Physiologycal.,** 72:35-45.

Akkol, E. K., Göger, F., Koşar, M., & Başer, K. H. C. (2008) "Phenolic composition and biological activities of Salvia halophila and Salvia virgata from Turkey" **Food chemistry.**, 108(3), 942-949.

Neumann, K. H., Kumar, A., and Imani, J. (2009) "Plant cell and tissue culture-A tool in Biotechnology: Basics and Application" **Springer Science and Business Media.**

am an eh Rahmatzadeh, S., and Khara, J. (2007) "Anatomical and morphological changes caused by interaction between UV-C radiation and colonized wheat by some species of arbuscular mycorrhizas" **Journal of Biological Sciences.,** 7(6), 1001-1004.

Ananieva, K., and Ananiev, E. D. (2000) "Interaction between methyl ester of jasmonic acid and benzyladenine during the growth of excised greening cotyledons of Cucurbita pepo L.(zucchini)".

Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2001) "Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen

peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells" **Plant and cell physiology.**, 42(4), 446-449.

Anterola, A. M., Jeon, J. H., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2002) "Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis inPinus taeda Factors Affecting Monolignol Ratios and Carbon Allocation in Phenylpropanoid Metabolism" **Journal of Biological Chemistry**., 277(21), 18272-18280.

Bagal, U.R., Leebens mack, J.H., Walter Lorenz, W., and Dean, J.F.D. (2012) "The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age" **BMC Genoms**., 13: 3. 1471-2164.

Barsig, M., and Malz, R. (2000) "Fine structure, carbohydrates and photosynthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation" **Environmental and Experimental Botany.,** 43(2), 121-130.

Belhadj A., C. Saigne, N. Telef, S. Cluzet, J. Bouscaut, MF. Corio-Costet, JM. Me´rillon. (2006) "Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against Erysiphe necator" **Jornal Agricalturae Food Chemistry**., 54:9119–9125.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001) "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective" **Plant science.**, 161(5), 839-851.

Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., ... and Zhuravlev, Y. N. (2002) "Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by Rubia cordifolia callus cultures transformed with the rolB and rolC genes" **Journal of biotechnology.**, 97(3), 213-221.

Carbonell-Bejerano, P., Diago, M. P., Martínez-Abaigar, J., Martínez-Zapater, J. M., Tardáguila, J., & Núñez-Olivera, E. (2014) "Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses" **BMC plant biology.,** 14(1), 183.

Cetin, E. S. (2014) "Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in Vitis vinifera L Öküzgözü callus cultures" **Biological research.**, 47(1), 37.

Chong, T. M., Abdullah, M. A., Fadzillah, N. M., Lai, O. M., and Lajis, N. H. (2005) "Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in Morindaelliptica" **Enzyme and microbial technology.,** 36(4), 469-477.

Christen, P. (2000) "Tropane alkaloids": old drugs used in modern medicine.

Christie, P. J., Alfenito, M. R., and Walbot, V. (1994) "Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings" **Planta.**, 194(4), 541-549.

Collin, H. A. and Edwards, S. (1998) "Plant cell culture" **Bios Scientific Publisher**. PP. 121-137.

Cosgrove, D. J. (2001) "Wall structure and wall loosening" A look backwards and forwards". **Plant physiology.**, 125(1), 131-134.

Day TA., PJ. Neale. 2002 "Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers" **Ann Rev Ecol Syst**., 33:371-396.

Dewick, P. M. (2002) **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. John Wiley and Sons.

Divya, P., Puthusseri, B., and Neelwarne, B. (2014) "The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander" **LWT-Food Science and Technology.,** 56(1), 101-110.

Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1995) "Stress-induced phenylpropanoid metabolism" **The plant cell.,** 7(7), 1085.

Dixon, R. A., and Sumner, L. W. (2003) "Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health" **Plant Physiology.,** 131(3), 878-885.

Dixon, R. A., Choudhary, A. D., Dalkin, K., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., ... and Orr, J. (1992) "Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa" **In Phenolic metabolism in plants.,** (pp. 91-138). Springer, Boston, MA.

Dong, H. D., and Zhong, J. J. (2001) "Significant improvement of taxane production in suspension cultures of Taxus chinensis by combining elicitation with sucrose feed" **Biochemical engineering journal**., 8(2), 145-150.

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), 99-104.

Duke, J. A. (2002) **Handbook of medicinal herbs**., CRC press.

Edition, Wiley. (2002) 7: 121-140.

Elaleem, K. G. A., Modawi, R. S., and Khalafalla, M. M. (2009) "Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (Solanum tuberosum L.) cultivar Diamant" **African Journal of Biotechno**logy., 8(11).

Eraslan, F., Inal, A., Pilbeam, D. J., and Gunes, A. (2008) "Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (Spinacia oleracea L. Cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity" **Plant Growth Regulation.**, 55(3), 207.

Escobar, A. L., de Oliveira Silva, F. M., Acevedo, P., Nunes-Nesi, A., Alberdi, M., and Reyes-Díaz, M. (2017) "Different levels of UV-B resistance in Vaccinium corymbosum cultivars reveal distinct backgrounds of phenylpropanoid metabolites" **Plant Physiology and Biochemistry.**, 118, 541-550.

Facchini, P. J., and St-Pierre, B. (2005) "Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes" **Current opinion in plant biology.**, 8(6), 657-666.

Farkya, S., Bisaria, V. S., and Srivastava, A. K. (2004) "Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin" **Applied microbiology and biotechnology.,** 65(5), 504-519.

Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C., and Hagege, D. (2007) "Jasmonic acid elicitation of Hypericum perforatum L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones" **Plant cell, tissue and organ culture.,** 89(1), 1-13.

Gao, W., Zheng, Y., Slusser, J. R., Heisler, G. M., Grant, R. H., Xu, J., and He, D. (2004) "Effects of Supplementary Ultraviolet-B Irradiance on Maize Yield and Qualities: A Field Experiment" **Photochemistry and Photobiology.,** 80(1), 127-131.

Grzegorczyk I., I. Bilichowski, O. Mikiciuk, H. Wysokińska. (2005) "*In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds" **Acta Societatis Botanicorum Poloniae.**, 74(1): 17-21.

Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., and Zenk, M. H. (1992) "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures" **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, 89(6), 2389-2393.

Han, Y., Jin, X. L., Wu, F. B., and Zhang, G. P. (2011) "Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (Hordeum vulgare L.)" **Journal of Zhejiang University-Science B.,** 12(5), 399-407.

Hassan, I. A., Basahi, J. M., and Kadi, M. W. (2012) "Physiological and Biochemical Impairment in Bean Plants Due to Supplementary" **Australian Journal of Basic and Applied Sciences.**, 9(6).

Heredia, J. B., and Cisneros-Zevallos, L. (2009) "The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce" **Food Chemistry.**, 115(4), 1500-1508.

Hosseinzadeh, H., and Lary, P. (2000) "Effect of Salvia leriifolia leaf extract on morphine dependence in mice" **Phytotherapy Research.**, 14(5), 384-387.

Hosseinzadeh, H., and Yavary, M. (1999) "Anti-inflammatory effect of Salvia leriifolia Benth. leaf extract in mice and rats" **Pharmaceutical and Pharmacological Letters.**, 9(2), 60-62.

Humphreys, J. M., and Chapple, C. (2002) "Rewriting the lignin roadmap" **Current opinion in plant biology.,** 5(3), 224-229.

Jansen, M. A., Gaba, V., and Greenberg, B. M. (1998) "Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation" **Trends in plant science.**, 3(4), 131-135.

Jansen, M. A., van den Noort, R. E., Tan, M. A., Prinsen, E., Lagrimini, L. M., and Thorneley, R. N. (2001) "Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress" **Plant Physiology.**, 126(3), 1012-1023.

Jimenez, V. and Thomas, C. (2006) "Participation of Plant Hormone Determination and Progression of Somatic embryogenesis" **Plant cell Monographs.,** 2: 103-118.

Johri, M.M. and Mitra, D. (2001) "Action of callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of Sorghum" **Euphytica.,** 52: 177-181.

Jung, S. (2004) "Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems" **Plant Physiology and Biochemistry.**, 42(3), 225-231.

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).

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., and Heinonen, M. (1999) "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds" **Journal of agricultural and food chemistry.,** 47(10), 3954-3962

Karamanos, A. J. (2000) "Laboratory of Crop Production, Faculty of Crop Science and Production" **Agricultural University of Athens.**, 75 Iera Odos, 11855. Sage: The Genus Salvia, 93

Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G., and Alfermann, A. W. (2004) "Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in Linum species" **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.,** 35(3), 441-447.

Kataria, S., Dehariya, P., Guruprasad, K. N., and Pandey, G. P. (2012) "Effect of exclusion of ambient solar UV-A/B components on growth and antioxidant response of cotton (Gossypium hirsutum L.)" **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.,** 54(2), 47-53.

Kelkar, N. G., Nowakowski, M., Khemchandani, K. P., and Jain, S. R. (2004) "Time delay plots of unflavoured baryons" **Nuclear Physics A.**, 730(1-2), 121-140.

Kim HY., F. Chen, Z. Wang, N. Rajapakse. (2006)" Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)" **Journal of Agricultural and Food Chemistry.,** 54:2327-2332.

Kim, Y. S., Lee, H. H., Ko, M. K., Song, C. E., Bae, C. Y., Lee, Y. H., & Oh, B. J. (2001) "Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (Capsicum annuum) esterase" **Molecular plant-microbe interactions.**, 14(1), 80-85.

Lewis, W., Meyer, R. R., Simpson, J. F., Colacino, J. M., and Perrino, F. W. (1994) "Mammalian DNA Polymerases. alpha.,. beta.,. gamma.,. delta., and. epsilon. Incorporate Fialuridine (FIAU) Monophosphate into DNA and Are Inhibited Competitively by FIAU Triphosphate" **Biochemistry.**, 33(48), 14620-14624.

Liu W., CY. Liu, CX. Yang, LJ. Wang, SH. Li. (2010) "Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation" **Food Chem.,** 122:475–481.

Manaf, H. H., Rabie, K. A., and El-Aal, M. S. A. (2016) "Impact of UV-B radiation on some biochemical changes and growth parameters in Echinacea purpurea callus and suspension culture" **Annals of Agricultural Sciences.**, 61(2), 207-216.

Mardani, H., Sekine, T., Azizi, M., Mishyna, M., and Fujii, Y. (2015) "Identification of safranal as the main allelochemical from saffron (Crocus sativus)" **Natural product communications.,** 10(5), 775-777.

Michalak, A. (2006) "Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress" **Polish Journal of Environmental Studies.**, 15(4).

Miyamoto, K., Oka, M., and Ueda, J. (1997) "Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development" **Physiologia Plantarum.**, 100(3), 631-638.

Mizukami, H., Tabira, Y., and Ellis, B. E. (1993) "Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures" **Plant Cell Reports.,** 12(12), 706-709.

Mockeviciute, R., and Anisimoviene, N. (1999) "Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol" **Biologija.**, 4, 90-93.

Modarres M., J. Asili, A. Gangali, M. Iranshahy, A. Sahebkar. (2014) "Simultaneous rosmarinic acid, salvianolic acid b and caffeic acid in salvia leriifolia benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diodearray

detection technique" **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**., 37:12, 1721-1730.

Mosadegh, H., Trivellini, A., Ferrante, A., Lucchesini, M., Vernieri, P., and Mensuali, A. (2017) "Applications of UV-B lighting to enhance phenolic accumulation of sweet basil" **Scientia Horticulturae.**, 229, 107-116.

Moungsrimuangdee, B., Moriwaki, H., Nakayama, M., Nishigaki, S., and Yamamoto, F. (2011) "Effects of injection of ethrel, methyl jasmonate, and salicylates and Raffaelea quercivora inoculation on sapwood discoloration in Quercus serrata" **Iawa Journal.**, 32(1), 41-53.

Namdeo, A. G. (2007) "Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review". **Pharmacognosy reviews**, 1(1), 69.

Newall, C. A., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (1996) "Herbal medicines. A guide for health-care professionals" **The pharmaceutical press**.

Nigro F., A. Ippolito, V. Lattanzio, D. Di Venere, M. Salerno. (2000) "Effect of Ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry" **Jornal Plant Pathology**., 82 (1), 29-37.

Nopo-Olazabal C, Condori J, Nopo-Olazabal L, Medina-Bolivar F, (2014) "Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of Vitis rotundifolia treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide" **Plant Physiol Biochem.,** 74:50–69.

Pacheco, A. C., da Silva Cabral, C., da Silva Fermino, E. S., and Aleman, C. C. (2013) "Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants" **Journal of Medicinal Plants Research.**, 7(42), 3158-3163.

Pan, W. S., Zheng, L. P., Tian, H., Li, W. Y., and Wang, J. W. (2014) "Transcriptome responses involved in artemisinin production in Artemisia annua L. under UV-B radiation" **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, 140, 292-300.

Park, M.H., Kim, J.G., (2015) "Low-dose UV-C irradiation reduces the microbial population and preserves antioxidant levels in peeled garlic (Allium sativum L.) during storage. Postharvest Biology" **Technology**., 100: 109e112.

Petersen, M. (2013) "Rosmarinic acid: New aspects" **Phytochemistry Reviews.**, 12:207-227.

Pichersky, E., and Gang, D. R. (2000) "Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective" **Trends in plant science.,** 5(10), 439-445.

Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J. P., and Durst, F. (1998) "Methyl Jasmonate Induces Lauric Acid ω-Hydroxylase Activity and Accumulation of CYP94A1 Transcripts but Does Not Affect Epoxide Hydrolase Activities inVicia sativaSeedlings" **Plant physiology.**, 118(4), 1481-1486.

Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V., and Stoinova, Zh. (2003) "Salicylic Acid and Methyl Jasmonte induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg" **Jornal Plant Physiology**., 133-152.

Popova, L., Pancheva, T., and Uzunova, A. (1997) "Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role" **Bulg. Jornal Plant Physiology.**, 23(1-2), 85-93.

Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. (2007) "Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions" **Trends in plant science.,** *12*(1), 29-36.

Raman, V., and Ravi, S. (2011) "Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of Haematococcus pluvialis" **Acta physiologiae plantarum.**, 33(3), 1043-1049.

Rao, S. R., and Ravishankar, G. A. (2002) "Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites" **Biotechnology advances.**, 20(2), 101-153.

Raskin, I. (1992) "Role of salicylic acid in plants" **Annual review of plant biology.**, 43(1), 439-463.

Raskin, I. (1992) "Salicylate, a new plant hormone" **Plant physiology.**, 99(3), 799.

Rechinger, K. H. (1982) Flora Iranica. no. 150. Academische Druk-U Verlagsustalt, Gratz.

Sahu, R., Gangopadhyay, M., and Dewanjee, S. (2013) "Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Solenostemon scutellarioides" **Acta physiologiae plantarum.**, 35(5), 1473-1481.

Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., and Yamasaki, H. (2002) "Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants" **Toxicology.,** 177(1), 67-80.

Salama, H. M., Al Watban, A. A., and Al-Fughom, A. T. (2011) "Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants" **Saudi journal of biological sciences.,** 18(1), 79-86.

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001)" Regulation of essential oil production in plants" **Plant growth regulation.**, 34(1), 3-21.

Saufi A. (2007) "Lignans in Phaleria macrocarpa and in Linum flavum var. compactum L. Doctoral Thesis" **Heinrich-Heine-Dusseldorf University Germany**., 300-316.

Sauvesty, A., Page, F., & Huot, J. (1992) "A simple method for extracting plant phenolic compounds" **Canadian Journal of Forest Research.,** 22(5), 654-659.

Sergio, C., jose, M.and Fernando, P. (2011) "An efficient regeneration system Via Somatic embryogenesis in olive" **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, 8: 334- 337.

Shabani, L., and Ehsanpour, A. (2010) "Induction of Antioxidan Enzmes, Phenolic and Flavenoid Compound in in vitro culcure of licorice (*Glycyrrhiza glabra L*.) using methyl jasmonate and saliculic acid".

Shaerzadeh, F., Alamdary, S. Z., Esmaeili, M. A., Sarvestani, N. N., and Khodagholi, F. (2011) "Neuroprotective effect of Salvia sahendica is mediated by restoration of mitochondrial function and inhibition of endoplasmic reticulum stress" **Neurochemical research.**, 36(12), 2216.

Singleton V.S., J.A. Rossi. (1965) "Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents" **American Journal of Enology and Viticulture.,** 3: 144–158.

Sisk, C. B., Shorey, H. H., Gerber, R. G., and Gaston, L. K. (1996) "Semiochemicals that disrupt foraging by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae): Laboratory bioassays" **Journal of economic entomology.**, 89(2), 381-385.

Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E., and Van Onckelen, H. (2003) "Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle" **Bulg Jornal Plant Physiology.,** 29, 172-178.

Taiz L, Zeiger E. (2006) Plant Physiology, 4th Edition. Sinauer Associates Inc. **Sunderland, Massachusetts USA**. 260-287.

Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, AJ., Perry, B., and Bagni, N. (2005) "Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in Vitis vinifera cv" **Barbera cell cultures**., New Phytology 166:895–905.

Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A. J., Perry, B., and Bagni, N. (2005) "Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in Vitis vinifera cv. Barbera cell cultures" **New Phytologist.**, 166(3), 895-905.

Tevini, M., and Iwanzik, W. (1986) "Effects of UV-B radiation on growth and development of cucumber seedlings. In Stratospheric ozone reduction, solar ultraviolet radiation and plant life" **Springer, Berlin, Heidelberg**., 271-285

Thiem, B. A. R. B. A. R. A., and Krawczyk, A. L. D. O. N. A. (2010) "Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated in vitro cultures of kudzu (Pueraria lobata Ohwi)" **Herba Pol.**, 56(1), 48-56.

Tiecher, A., de Paula, L. A., Chaves, F. C., & Rombaldi, C. V. (2013) "UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening" **Postharvest biology and technology.,** 86, 230-239.

Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003) "Role of biotechnology in medicinal plants" **Tropical Journal of Pharmaceutical Research.**, 2(2), 243-253.

Turunen, M., Heller, W., Stich, S., Sandermann, H., Sutinen, M. L., and Norokorpi, Y. (1999) "The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic" **Environmental Pollution.,** 106(2), 219-228.

Vasconsuelo, A., and Boland, R. (2007) "Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants" **Plant Science.**, 172(5), 861-875.

Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink. (2002) "Biotechnology for the production of plant sceondary metabolites" **Phytochemistry Reviews.,** 1: 13-25

Vom Endt, D., Kijne, J. W., and Memelink, J. (2002) "Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?" **Phytochemistry.**, 61(2), 107-114.

Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z., and Zheng, Y. (2009) "Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese bayberries" **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., 57(13), 5809-5815.

Wang, L., Ma, L., Xi, H., Duan, W., Wang, J., and Li, S. (2013) "Individual and combined effects of CaCl2 and UV–C on the biosynthesis of resveratrols in grape leaves and berry skins" **Journal of agricultural and food chemistry.**, 61(29), 7135-7141.

Wang, S. Y., Bowman, L., and Ding, M. (2008) "Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (Rubus sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells" **Food Chemistry.,** *107*(3), 1261-1269.

Wang, W., Tang, K., Yang, H. R., Wen, P. F., Zhang, P., Wang, H. L., and Huang, W. D. (2010) "Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (Vitis vinifera L. Cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation" **Plant Physiology and Biochemistry.**, 48(2), 142-152.

Wellmann, E. (1971) "Phytochrome-mediated flavone glycoside synthesis in cell suspension cultures of Petroselinum hortense after preirradiation with ultraviolet light" **Planta.,** 101(3), 283-286.

Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B., and Huang, W. D. (2005) "Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry" **Plant Science.**, 169(5), 928-934.

Wilson, K. E., Thompson, J. E., Huner, N. P., and Greenberg, B. M. (2001) "Effects of Ultraviolet-A Exposure on Ultraviolet-B–induced Accumulation of Specific Flavonoids in Brassica napus" **Photochemistry and photobiology.**, 73(6), 678-684.

XuA., J. Zhang, W. Huang. (2015) "Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of Vitis vinifera L. Cv. Cabernet Sauvignon" **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, 122: 197–211.

Yuan, J. P., Chen, H., and Chen, F. (1998) "Simultaneous determination of rosmarinic acid, lithospermic acid B, and related phenolics in Salvia miltiorrhiza by HPLC" **Journal of agricultural and food chemistry.**, 46(7), 2651- 2654.

Zancan, S., Suglia, I., La Rocca, N., and Ghisi, R. (2008) "Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants" **Environmental and Experimental Botany.,** 63(1), 71-79.

Zapolska-Downar, D., Zapolski-Downar, A., Naruszewicz, M., Siennicka, A., Krasnodębska, B., and Kołodziej, B. (2002) "Protective properties of artichoke (Cynara scolymus) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes" **Life sciences.**, 71(24), 2897-2908.

Zayed, R., and Wink, M. (2004) "Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of Brugmansia suaveolens (Solanaceae)" **Zeitschrift für Naturforschung C.,** 59(11-12), 863-867.

Zhang, L., and Lu, Y. T. (2003) "Calmodulin-binding protein kinases in plants" **Trends in plant science.**, 8(3), 123- 127.

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

Zhao, J., Davis, L. C., and Verpoorte, R. (2005) "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites" **Biotechnology advances.**, 23(4), 283-333.

Zhao, J., Zhu, W. H., and Hu, Q. (2001) "Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in Catharanthus roseus suspension cell culture" **Enzyme and microbial technology.**, 28(7), 666- 672.

Zhao, S. J., Zhang, J. J., Yang, L., Wang, Z. T., and Hu, Z. B. (2011) "Determination and biosynthesis of multiple salvianolic acids in hairy roots of Salvia miltiorrhiza" **Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica.**, 46(11), 1352-1356.

Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999) "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals" **Food chemistry.**, 64(4), 555-559.

Abstract

In recent years, due to the importance of secondary metabolites in medicinal plants, it is important to find the conditions that can have the most impact on the economic production of these compounds. In the present study, the effect of salicylic acid and methyl jasmonate as chemical elicitors in three concentrations (50, 100, 150 µM), and the effect of UV-A and UV-B radiation as physical elicitors in two levels (30 and 60 minutes) on callus of *Salvia lerrifolia* Benth was tested in a completely randomized design with three replications. The highest of fresh and dry weight, content of total phenol and flavonoids of callus were observed in the samples in which treated with 100 µM methyl jasmonate. By increasing the concentration of methyl jasmonate from this amount, content of total phenol, flavonoids, rosmarinic acid and caffeic acid decreased. The accumulation of these compounds increased as increasing salicylic acid concentration. The highest accumulation of rosmarinic acid was observed in 150 µM salicylic acid, while 50 µM salicylic acid had the highest effect on increasing the production of caffeic acid. The content of caffeic acid decreased as increasing salicylic acid concentration. UV-A and UV-B radiation as elicitors increased content of total phenol, flavonoids, rosmarinic acid and caffeic acid in calluses. However, the accumulation of these secondary metabolites was decreased as increasing treatment time from 30 to 60 minutes in both types of radiation. The results showed that UV-B radiation for 30 minutes had a greater effect on increasing the content of caffeic acid and rosemarinic acid. According to the results, salicylic acid has the most effective on increasing the accumulation of rosmarinic acid and caffeic acid in leaf calluses compared to other treatments. Thus by optimizing its concentration, the content of this secondary metabolites can be increased.

Key words: *Salvi lerrifolia* B., Salicylic acid, Methyl jasmonate, UV-A, UV-B, Rosemaric acid, Caffeic acid.

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Biotechnology and Molecular Genetics of Hoticultural Products

Effects of some elicitors on rosmarinic acid and caffeic acid production in vitro culture of *Salvia lerrifolia* Benth

By: Somayyeh Jokar

Supervisor

Dr. Ziba Ghasimi Hagh

Advisors

Dr. Hojatollah Bodaghi

Dr. Massumeh Modarres

January, 2018