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

**Maliheh Hashemyan[1], Ali Ganjeali[1]*, Monireh Cheniany[1]**
[1.] Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

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

* Corresponding Author: ganjeali@um.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
**DOI. 10.22108/ijpb.2020.118410.1164**

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوازدهم، شمارهٔ چهل و چهارم، تابستان ۱۳۹۹، صفحهٔ ۶۱-۷۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ و ۱۳۹۹/۰۴/۱۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۴/۲۲

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

ملیحه هاشمیان[۱]، علی گنجعلی[۱*]، منیره چنیانی[۱]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

## چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.)، گیاهی دارویی و متعلق به خانوادهٔ نعناعیان است. بهره‌برداری بی‌رویهٔ انسان از رویشگاه‌های طبیعی برای مصارف دارویی و پراکنش کم، این گیاه را در معرض خطر انقراض قرار داده است؛ در این راستا، استفاده از روش‌های زیست‌فناوری به‌شکل روش جایگزین در تولید متابولیت‌های دارویی مطرح است. در پژوهش حاضر، آزمایشی با هدف افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره با استفاده از الیسیتورهای متیل‌جاسمونات (MeJa) و سالیسیلیک‌اسید (SA) انجام شد. ریزنمونه‌های برگ از گیاهان چهارماههٔ رشدیافته در شرایط هیدروپونیک تهیه و در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱و ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر هورمون‌های ۲ و ۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D) و غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) به‌طورمجزا و ترکیبی کشت شدند. کالوس‌های منتخب که دارای بیشترین درصد (۱۰۰ درصد) کالوس‌زایی بودند (محیط‌کشت‌های MS حاوی غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP) تحت‌تأثیر تیمارهای مجزای غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید قرار گرفتند. پس‌از ۴۰ روز، محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار ارزیابی شد؛ در این آزمایش، بیشترین محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در کالوس‌های تیمارشده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر الیسیتور سالیسیلیک‌اسید و پس‌ازآن، در غلظت ۵۰ میکروگرم‌درلیتر الیسیتور متیل‌جاسمونات مشاهده شد که تفاوت معناداری نسبت با یکدیگر داشتند. در این آزمایش، مصرف ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید در محیط‌کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP بیشترین تأثیر را بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌ها داشت؛ بنابراین، کاربرد غلظت‌های مناسب این الیسیتورها نقش مؤثری در افزایش ترکیبات مؤثرهٔ دارویی گیاه کلپوره دارد.

**واژه‌های کلیدی:** کلپوره، آنتی‌اکسیدان، سالیسیلیک‌اسید، الیسیتور، فلاونوئید، فنل، متیل‌جاسمونات

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

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

**مقدمه**

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

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

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

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

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

پژوهش‌های اندکی در زمینهٔ کشت بافت گیاه کلپوره به‌منظور تولید متابولیت‌های دارویی و اسانسی انجام شده‌اند. Al-Qudah و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی‌های خود موفق به باززایی گیاه کلپوره در شرایط *in vitro* شدند؛ در این آزمایش، گیاهان باززایی‌شده در محیط MS حاوی ۶-بنزیل‌آدنین و ۱- نفتالین‌استات محتوای اسانسی بیشتری نسبت به گیاهان رشدیافته در محیط بدون هورمون داشتند.

عوامل بسیاری بر افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارند که ازجملهٔ آنها می‌توان به مواد تنظیم‌کنندهٔ رشد، ریزنمونه، افزودن پیش‌سازها و استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی اشاره کرد (Sayed-Tabatabae and Omidi, 2011). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها ازجمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که در سنتز متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سلول- بافت نقش دارند، ولی غلظت بهینه و نسبت کاربردی آنها برای قطعه‌های مختلف جداکشت یک گونه و از گونه‌ای به گونهٔ دیگر متفاوت است (Bagheri and Saffari, 2008). استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی مانند اشعهٔ ماوراءبنفش، نمک فلزات سنگین، برخی از ترکیبات شیمیایی مانند جاسمونیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، نیترات و همچنین کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت ازجمله روش‌های بهینه‌سازی شرایط کشت برای افزایش تولید متابولیت‌های گیاهی هستند (Box, 1945; Rao and Ravishankar, 2002; Matkowski, 2008). ثابت شده است متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید از مؤثرترین الیسیتورهای شیمیایی هستند که با مسیر علامت‌رسانی اختصاصی سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) و درنتیجه، فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئیدی می‌شوند که پیامد آن، افزایش محتوای درونی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است (Shabani and Ehsanpour, 2010; Mehrabani Javidi Moghadam *et al*., 2013). و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی توان کال‌زایی و آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی حاصل از کالوس‌های کلپوره، بیشترین وزن تر کالوس را در ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم‌برلیتر ۲ و ۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D) گزارش

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

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

## مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی مواد گیاهی و عملیات کشت:** بذر گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) در آبان‌ماه ۱۳۹۵ از منطقهٔ سد طرق، ابتدای روستای عارفی، استان خراسان رضوی (ارتفاع ۱۳۴۴ متر، طول جغرافیایی ″۷۱۱ ′۳۲۰ °۵۹ و عرض جغرافیایی ۸۴۲′ ۸۰° ۳۶) جمع‌آوری و پس‌از اینکه متخصصان پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد آن را شناسایی کردند و با شمارهٔ هرباریومی (FUMH) ۲۰۹۵۵ ثبت شد، به‌منظور استفاده در پژوهش حاضر نگهداری شد. به‌منظور ازبین‌بردن خواب بذر، مناسب‌ترین تیمار شامل خراش و هورمون جیبرلیک‌اسید (غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت شش روز استفاده شد (Javidi Moghadam *et al*., 2016)؛ سپس بذرها با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد (حجمی/حجمی) به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و پس‌از شستشو با آب مقطر استریل به‌مدت ۱۵ دقیقه، درون پتری‌دیش‌های استریل دارای کاغذ صافی شمارهٔ ۱ قرار گرفتند و در اتاق کشت (شرایط تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شدند. پس‌از ظاهرشدن ریشهٔ اولیه و محور زیرلپه، دانه‌رست‌های کلپوره به‌مدت دو روز در نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط کاملاً مرطوب قرار گرفتند. پس‌از سبزشدن اندام هوایی و افزایش طول ریشهٔ اولیه، دانه‌رست‌ها به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند (Arnon and Hoagland, 1940) منتقل و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاه رشدیافته در محیط یادشده به‌شکل گیاه مادری برای تهیهٔ ریزنمونه استفاده شد.

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

(غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر) قرار گرفت؛ به این منظور، قطعه‌های برگ بخش‌های رأسی ساقه پس‌از جداسازی از گیاه مادری به‌مدت ۵ دقیقه با آب شستشو و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) غوطه‌ور شدند و درنهایت، ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو و استریل شدند؛ در ادامه، ریزنمونه‌ها به قطعه‌های ۰/۵ سانتی‌متری برش داده شدند و روی محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی یادشده قرار گرفتند و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در پایان روز چهلم و باتوجه‌به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و میزان کال‌زایی در هر تیمار، کالوس‌های سبز حاصل از محیط‌های کشت حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند. کالوس‌های منتخب به محیط‌های کشت MS حاوی الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر) منتقل شدند. پس‌از پایان روز بیستم، وزن خشک کالوس‌ها (معیار رشد) اندازه‌گیری و کالوس‌ها با دستگاه فریز درایر (مدل Christ Alfa 1.2 LD Plus، آلمان) طی ۲۴ ساعت کاملاً خشک شدند.

**عصاره‌گیری ترکیبات فنلی:** مقدار ۰/۱ گرم از پودر خشک هر نمونه با ۲ میلی‌لیتر حلال متانول ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) مخلوط و به‌مدت ۳۶ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (مدل Parsonic 2600 s، ایران) در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفت و درنهایت، نمونه‌های با غلظت ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر به دست آمدند؛ سپس عصاره‌ها با کاغذ واتمن شمارهٔ ۱ صاف شدند و محلول حاصل به‌منظور حذف حلال متانول، به‌مدت ۲۴ ساعت زیر هود (شیمی طوس، ایران) و در شرایط کاملاً تاریک قرار گرفت و برای ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی استفاده شد.

**بررسی محتوای فنل کل:** محتوای ترکیبات فنلی کل به روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) بررسی شد؛ به این منظور، مقدار ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر عصارهٔ متانولی تهیه‌شده از هر نمونه با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول فولین‌سیوکالچو مخلوط و پس‌از ۳ دقیقه استراحت، مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد $Na_2Co_3$ (وزنی/حجمی) به آن افزوده و پس‌از ۴۵ دقیقه گرماگذاری در شرایط تاریکی، جذب نوری مخلوط در ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک نمونه به کمک منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) گالیک‌اسید تعیین شد.

**بررسی محتوای فلاونوئید کل:** محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل بر اساس اندازه‌گیری کالریمتری آلومینیوم‌کلرید (Zhishen *et al.*, 1999) بررسی شد؛ به این منظور، مقدار ۱ میلی‌لیتر عصارهٔ متانولی تهیه‌شده از هر نمونه با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۵ درصد $NaNo_2$ (وزنی/حجمی) مخلوط شد و پس‌از ۵ دقیقه استراحت، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد $AlCl_3$ (وزنی/حجمی)، ۲ میکرولیتر محلول ۱ مولار NaOH و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در تاریکی، جذب آن در ۵۱۰ نانومتر

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

**بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش احیای یون آهن III (FRAP):** به‌منظور اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) استفاده شد که مبتنی بر کاهش کمپلکس فریک‌تری‌پیریدیل‌تری‌آزین (TPTZ) به‌شکل فروس در مجاورت آنتی‌اکسیدان‌هاست (Shahwar *et al*., 2012; Chaouche *et al*., 2013)؛ به این منظور، پس‌از تهیهٔ محلول‌های ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات‌سدیم، ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در ۴۰ میلی‌مولار HCl و ۲۰ میلی‌مولار کلریدآهن سه‌آبه، عمل مخلوط‌کردن آنها برای تهیهٔ محلول FRAP به نسبت‌های حجمی ۱:۱:۱۰ انجام شد. به‌منظور سنجش، مقدار ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول FRAP تازه‌تهیه‌شده ترکیب و پس‌از ۴ دقیقه استراحت، جذب محلول در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محتوای آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم محلول سولفات‌آهن II در گرم وزن خشک نمونه به کمک منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر) محلول سولفات‌آهن II رسم شد.

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

## نتایج

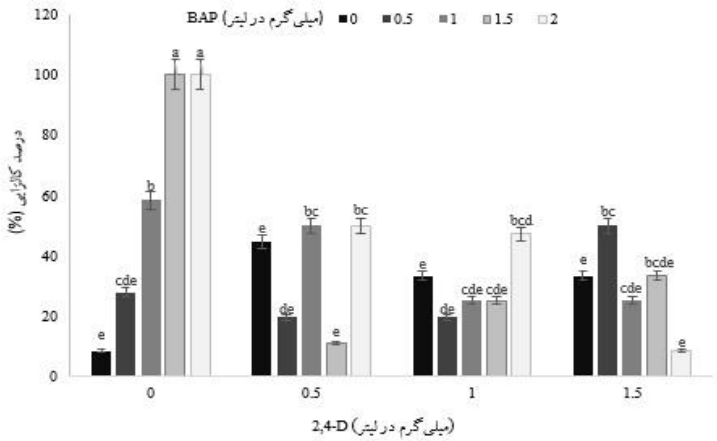
**ارزیابی سنجش سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-D و BAP در میزان کال‌زایی:** تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد کاربرد هورمون‌های 2,4-D و BAP بر درصد کال‌زایی ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره معنادار ($P\leq$۰/۰۱) است (جدول ۱). بر اساس نتایج، بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) به محیط‌کشت بدون هورمون 2,4-D و دارای غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP تعلق دارد (شکل ۱) و کمترین درصد کال‌زایی (۸/۳ درصد) به ترکیب تیماری ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر هورمون 2,4-D و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر هورمون BAP مربوط است (شکل ۲).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد کال‌زایی ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره در محیط‌کشت MS در سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-D و BAP

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

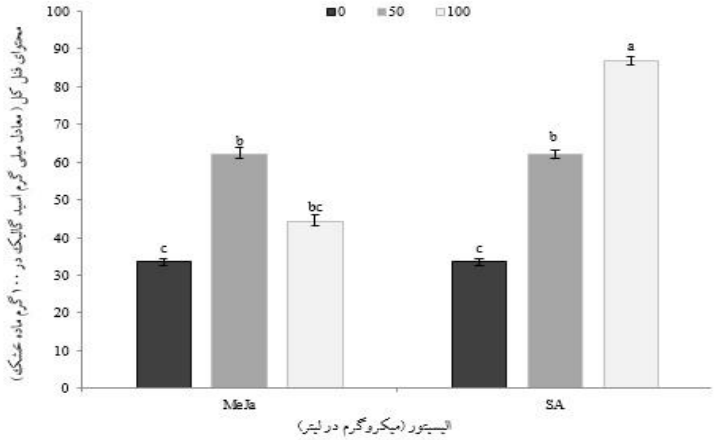
** بیان‌کنندهٔ معناداری در سطح احتمال خطای ۱ درصد ($P\leq0.01$) است.

شکل ۱- نمایی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره در محیط‌کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP (الف) و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP (ب) چهل روز پس‌از کشت




شکل ۲- مقایسهٔ میانگین درصد کال‌زایی ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره در محیط‌کشت MS در کاربرد هم‌زمان سطوح مختلف هورمون‌های BAP و 2,4-D. مقادیر، میانگین سه تکرار±انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح $P$≤۰/۰۱ را نشان می‌دهند.

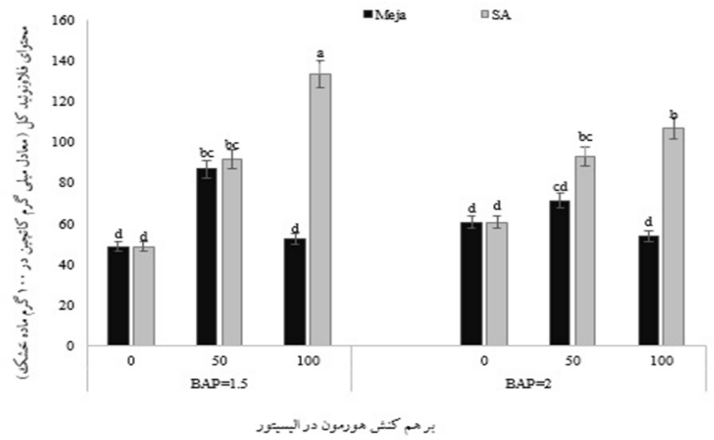
**نتایج بررسی تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی متأثر از سطوح مختلف متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید:** تجزیه واریانس داده‌های فنل کل نشان داد تنها اثر عامل الیسیتور (متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید) بر محتوای این دسته از ترکیبات معنادار ($P$≤۰/۰۱) است. مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید سبب تولید بیشترین محتوای فنل کل (۸۶/۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) در کالوس‌های حاصل می‌شود که ۲/۵ برابر نمونهٔ شاهد (بدون الیسیتور) (۳۳/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) است. در کاربرد الیسیتور متیل‌جاسمونات، تیمار ۵۰ میکروگرم‌درلیتر سبب افزایش حدود ۱/۹ برابری محتوای فنل کل کالوس (۶۱/۹۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) نسبت به نمونهٔ بدون الیسیتور (۳۳/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) شد و پس‌ازآن، محتوای فنل کل کالوس کاهش یافت (شکل۳).



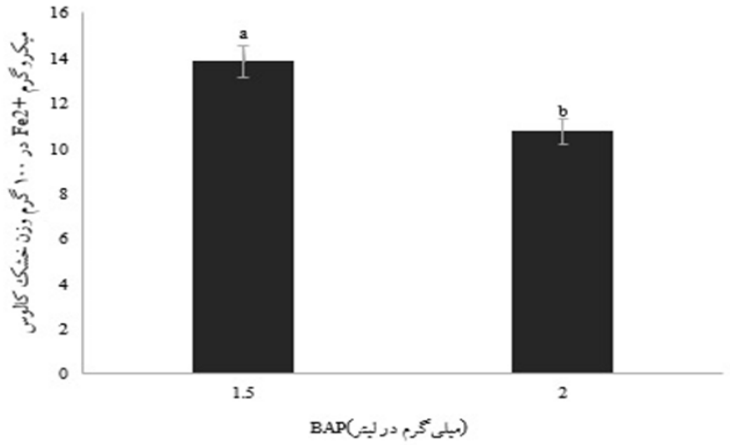

شکل ۳- مقایسهٔ میانگین محتوای فنل کل در کالوس حاصل از ریزنمونهٔ برگ گیاه کلپوره در محیط MS در سطوح مختلف الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات (میکروگرم‌درلیتر). مقادیر، میانگین سه تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح $P\leq$۰/۰۱ را نشان می‌دهند.

تجزیه واریانس داده‌ها در ارزیابی محتوای فلاونوئید کل نشان داد اثر متقابل BAP و الیسیتور بر محتوای فلاونوئید کل کالوس معنادار ($P \leq$۰/۰۵) است. نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان دادند غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید دارای بیشترین تأثیر (۱۳۳/۷۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌های رشدیافته در محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP است و تفاوت آن با تیمار شاهد (۴۸/۵۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) معنادار است ( افزایش حدود ۲/۷ برابری نسبت به تیمار شاهد) (شکل ۴). مقایسهٔ تأثیر دو الیسیتور بر کالوس‌های تولیدشده روی محیط BAP نشان داد اثر القایی الیسیتور سالیسیلیک‌اسید بر محتوای فلاونوئید کل کالوس‌ها بیشتر از اثر القایی متیل‌جاسمونات در محیط‌های یادشده است (شکل ۴).

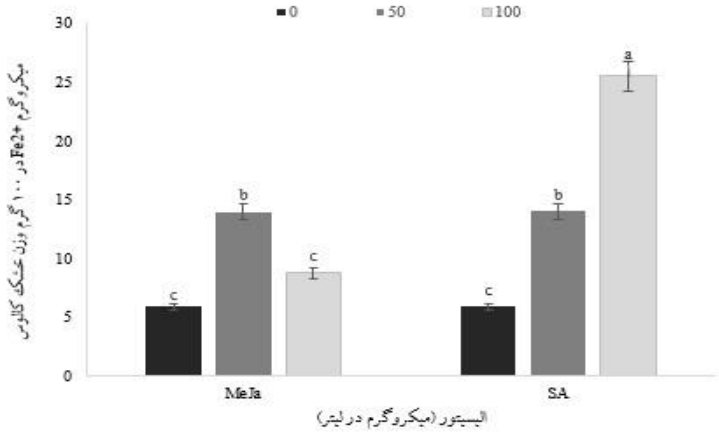
**ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان دادند تنها آثار سادهٔ هورمون BAP و الیسیتور بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل کالوس معنادار ($P\leq$۰/۰۱) است. بر اساس نتایج، غلظت ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP به‌طور معناداری سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (۱۳/۸۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در مقایسه با غلظت ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP (۱۰/۷۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) می‌شود (شکل ۵). کاربرد غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید (۲۵/۴۶ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک کالوس) به‌طور معناداری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نسبت به تیمار بدون الیسیتور (۵/۸۵ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) افزایش داد (افزایش ۴/۳ برابری نسبت به تیمار شاهد). در کاربرد متیل‌جاسمونات، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس (۱۳/۹۴ میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم‌درلیتر این الیسیتور مشاهده شد (شکل ۶).




شکل ۴- مقایسهٔ میانگین محتوای فلاونوئید کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS حاصل از تأثیر متقابل هورمون BAP و الیسیتورها. مقادیر، میانگین سه تکرار±انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح $P\leq$۰/۰۱ را نشان می‌دهند.




شکل ۵- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS در سطوح مختلف هورمون BAP. مقادیر، میانگین سه تکرار±انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح $P\leq$۰/۰۱ را نشان می‌دهند.




شکل ۶- مقایسه میانگین آثار سادهٔ الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات برظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از برگ گیاه کلپوره در محیط MS. مقادیر، میانگین سه تکرار±انحراف معیار است. حروف یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح P≤۰/۰۱ را نشان می‌دهند.

## بحث

نتایج بررسی درصد کال‌زایی نشان دادند در محیط‌های کشت بدون هورمون 2,4-D و دارای روند افزایشی غلظت هورمون BAP، درصد کال‌زایی ریزنمونه‌ها افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که بیشترین غلظت‌های به‌کاررفتهٔ BAP (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر)، مؤثرترین نتیجه را بر درصد کال‌زایی دارند. سیتوکینین‌ها تشدیدکنندهٔ تقسیم‌های سلولی و ترغیب‌کنندهٔ فرایند نمو سلول‌های حاصل هستند که فرایند اول از طریق افزایش بیان ژن‌های متعلق به سیکلین‌های نوع D (Ikeuchi *et al*., 2013) و فرایند دوم با افزایش و تجمع پورین‌های ضروری برای تقسیم‌های سلولی و سنتز پروتئین‌ها انجام می‌شود (Kumar Verma *et al*., 2016). کاربرد هم‌زمان دو هورمون نه‌تنها تأثیر مثبتی بر میزان کال‌زایی ریزنمونه‌ها نداشت، محیط‌های کشت دارای غلظت‌های زیاد این دو هورمون (۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D) سبب کاهش درصد کال‌زایی شدند؛ این یافته با نتایج پژوهش Mirshekar و همکاران (۲۰۱۴) در زمینهٔ گیاه آویشن (*Thymus daenensis*) مطابقت دارد. اگرچه مطالعه‌های بسیاری به القای کالوس در تیمار هم‌زمان دو هورمون اکسین و سیتوکینین اشاره دارند (Dronne *et al*., 1999; Soltanipool *et al*., 2011; Fan *et al*., 2012; Sahraroo *et al*., 2014)، نتایج متفاوت و حتی کاهشی کاربرد هم‌زمان تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین بر تولید کالوس ممکن است به‌علت تفاوت در تعداد و نوع گیرنده‌های هورمونی یا محتوای متفاوت هریک از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجود در بافت‌های مختلف کشت‌شده (ریزنمونه) باشد (Sarkheill *et al*., 2009)؛ به‌طوری‌که افزایش غلظت هورمون‌ها بیشتر از میزان بهینه در محیط‌کشت دارای اثر ممانعت‌کننده بر هورمون‌های داخلی ریزنمونه است و کاهش میزان تولید کالوس را در پی دارد (Dixon and Gonzales, 1996; Afshari poor, 1993).

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

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

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

محتوای فنل و فلاونوئید کل در کالوس‌های تیمارشده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید افزایش یافت؛ به‌طوری‌که رابطهٔ مستقیمی بین افزایش محتوای این دسته از ترکیبات و روند افزایشی غلظت الیسیتور یادشده مشاهده شد. در پژوهش Samadi و همکاران (۲۰۱۴) روی گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus*) مشخص شد با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید تا ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر، تجمع ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی مشاهده می‌شود. مشخص شده است سالیسیلیک‌اسید با ایجاد تنش کاذب سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) می‌شود که در مسیر تولید ترکیبات محافظتی قوی مانند فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و دیگر ترکیبات فنلی نقش دارد. ازآنجاکه مسیر سنتز سالیسیلیک‌اسید (ترکیب فنلی طبیعی) با سایر ترکیبات فنلی مشترک است و این ترکیب نقش مهمی در بیوسنتز سایر ترکیبات فنلی دارد، افزایش آن در محیط‌کشت یکی از دلایل مقدماتی افزایش سنتز ترکیبات مسیر فنیل‌پروپانوئیدی در کالوس تلقی می‌شود (Dixon and Paiva, 1995; Mahdavian *et al*., 2008; Shabani and Ehsanpour, 2010)؛ باوجوداین، پژوهش‌ها نشان داده‌اند سالیسیلیک‌اسید همانند متیل‌جاسمونات می‌تواند در غلظت‌های زیاد وضعیت اکسایشی گیاه را بیش از حد توان آن تحت‌تأثیر قرار دهد و سبب مرگ گیاه شود؛ اما این تأثیر به عواملی نظیر گونهٔ گیاهی، مرحلهٔ نموی گیاه، شیوهٔ اعمال تیمار و درنهایت، غلظت و مدت زمان اعمال تیمار سالسیلیک‌اسید وابسته است (Kovacik *et al*., 2009). به موازات تغییرات بیشینهٔ محتوای فنل و فلاونوئید کل کالوس‌ها، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل درنتیجهٔ کاربرد غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات به غلظت ۵۰ میکروگرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات و درنتیجه کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید به غلظت ۱۰۰ میکروگرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید تعلق داشت که ارتباط تنگاتنگ تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با تجمع ترکیبات فنلی را نشان می‌دهد. گزارش‌های متعددی مبنی بر رابطهٔ مستقیم محتوای فنلی عصاره‌های گیاهان رزماری (*Rosmarinas officinalis*) (Elmasta *et al*., 2006)، نعناع (*Mentha Spicata* L.) (Swetie *et al*., 2007)، زنجبیل (*Zingiber officinale*) (Ghasemzadeh *et al*., 2010) و مریم گلی (*Salvia miltorhiza*)

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

## نتیجه‌گیری

کلپوره، گیاهی ارزشمند ازنظر ویژگی‌های دارویی است و هر روشی که با ایجاد کمترین آسیب و تغییر سبب تولید ترکیبات مفید دارویی آن شود، کارآمد و درخور توجه است. پژوهش حاضر نشان داد الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید می‌توانند موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ این گیاه در محیط‌کشت شوند؛ باوجوداین، افزایش غلظت این الیسیتورها تا غلظت بهینه می‌تواند تولید ترکیبات ثانویه را تحریک کند و کاربرد غلظت‌های بیشتر آن به دلایل مختلف ازجمله کاهش توانایی سلول‌ها در پاسخ به افزایش غلظت الیسیتور و اثر تخریبی ناشی از آن، نه‌تنها سبب افزایش این ترکیبات نمی‌شود، کاهش آنها را نیز در پی دارد؛ بنابراین، گذشته از نقش مفیدی که الیسیتورهای یادشده در تولید ترکیبات مؤثر دارویی این گونه گیاهان دارند، توجه به غلظت آنها مهم و ضروری است و کاربرد مقادیر بهینهٔ ترکیبات یادشده در راستای بیش‌تولید متابولیت‌های دارویی اجتناب‌ناپذیر است و بایستی به آن توجه شود.

## سپاسگزاری

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

## References

Afshari poor, S. (1993) Principles of plant tissue culture. Isfahan University of Medical Sciences Press, Isfahan (in Persian).

Alcazar, R., Delatorre, M., Rodriguez, B., Bruno, M. and Arnold, N. A. (1992 ) Neo-clerodane diterpenoids from three species of *Teucrium*. Phytochemistry 31(11): 3957-3960.

Al-Qudah, T. S., Shibli, R. A., and Alali, F. Q. (2011 )*In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 47: 496-505.

Arnon, D. and Hoagland, D. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. Journal of Soil Science 50: 463-485.

Bagheri, A. and Saffari, M. (2008) Basis of plant tissue culture. Fourth edition. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad (in Persian).

Bedir, A., Arık, N., Adam, B., Kılınc, K., Gumus, T. and Guner, E. (1999) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. Ace Genotype in Turkish Hypertensives 12(10): 1038-1043.

Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry 239: 70-76.

Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E. (2002) Production of plant secondary metabolites. Plant Science 161: 839-851.

Box, G. E. P. (1945) The exploration and exploitation of response surfaces: Some general considerations and examples. Biometrics 10: 16-60.

Chaouche, T. M., Haddouchi, F. and Ksouri, R. (2013) Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium Majus* L. Free Radical Antioxidant Journal 3: 43-46.

Chen, B., Huang, J., Wang, J. and Huang, L. (2008 )Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16: 88- 92.

Chu, Y. H., Chang, C. L. and Hsu, H. F. (2000) Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 561-566.

Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7(7): 1085-1097.

Dixon, R. N. and Gonzales, R. A. (1996) Plant cell culture: A practical approach. Oxford University Press. Oxford.

Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010 ) Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in *Salvia miltorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology 148: 99-104.

Dronne, S., Jullien, F., Caissard, J. C. and Faure, O. (1999) A simple and efficient method for in vitro shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula ×intermedia* Emeric ex Loiseleur). Plant Cell Reports 18: 429-433.

Elmasta, M., Drirtas, I., Isildak, O. and Aboul-Enein, H. Y. (2006) Antioxidant activity of S-Carone isolated from Spearmint (*Mentha spicata* L.). Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 29(10): 1465-1475.

Fan, M., Xu, C., Xu, K. and Hu, Y. (2012) Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. Cellular Research 22: 1169-1180.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2010) Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules 15(6): 4324-4333.

Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. and Ozken, H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp, longifolia. Food Chemistry 103: 1449-1456.

Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerothanassis, I. P., Segura-Carretero, A. and Gutiérrez, A. F. (2012) Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. Food Science and Technology 46: 104-109.

Goyal, S. H. and Ramawat, (2008) Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. Acta Physiologiae Plantarum 30(6): 849-853.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. The Plant Cell 25: 3159-3173.

Javidi Moghadam, M., Cheniany, M., Ganjeali, A. and Lahouti, M. (2016) An investigation on callogenesis and antioxidant capacity of different explants of *Teucrium polium.* Iranian Journal of Plant Biology 8(29): 37-52 (in Persian).

Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N. C. (2006 )Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 54(6): 2327-2332.

Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Azizi, G. and Khazaei, H. R. (2009) Feasibility study for domestication of *Teucrium polium* L. based on ecological agriculture. Iranian Journal of Field Crops Research 2(6): 395-404 (in Persian).

Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. (2009) Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report 28: 135-143.

Kumar Verma, S., Kumar Das, A., Cingoz, G. S. and Usla, E. (2016) Influence of nutrient media on callus in duction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. Biotechnology Reports 10: 66-74.

Lev-Yadun, S. (2001) Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. Journal of Theoretical Biology 210(3): 385-388.

Mahdavian, K., Kalantari, K. M., Ghorbanli, M. and Torkzade, M. (2008) The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. Biologia Plantarum 52(1): 170-172.

Mashreghi, M. and Niknia, S. (2012) The effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* alcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* O157. Jundishapur Journal of Microbiology 5(3): 511-515.

Matkowski, A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. A review. Biotechnology Advances 26: 548-560.

Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, K. (2013) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. Journal of Agricultural Biotechnology 4(2): 77-88 (in Persian).

Mewis, I., Smetanska, I. M., Müller, C. T. and Ulrichs, C. (2011) Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. Cv. Gamay Fréaux. App. Biochemistry and Biotechology 164, 148-161.

Mirshekar, A., Honarvar, M., Mohammadi, F. and Alizadeh, A. (2014) Optimization of tissue culture of *Thymus daenensis* Celak. American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science 14(9): 949-953.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: The new wave? Trends Plant Science 16: 300-309.

Moghtader, M. (2009) Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 5(6): 843-846.

Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009) Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology 166: 180-191.

Nadimi, M., Zia, M. and Madani, M. (2013) The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Tuecrium polium* on *Candida albicans* and two species of Malassezia. Zahedan Journal of Research in Medical Science 15(8): 34-38.

Oksman-Caldentey, K. M. and Inzé, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce

designer secondary metabolites. Trends Plant Science 9(9): 433-440.

Padulosi, S. and Hadj-Hassan, A. (1998) Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia: genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. In Report of the IPGRI Workshop, 14-17 December, Irbid, Jordan.

Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A. (2010) *In vitro* antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts. Chiang Mai Journal of Science 37(3): 489-497.

Rao, S. R. and Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

Sadeghi, Z., Valizadeh, J. and Azizian Sharme, O. (2015) Evaluation of total phenol, flavonoid and antioxidant activity of Pistacia atlantica Gum from Saravan, Sistan and Baluchestan Province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants 10(3): 18-26 (in Persian).

Sahraroo, A., Babalar, M. and Hessein, M. (2014) *In vitro* callus induction and rosmarinic acid quatification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iran Journal Pharamaceutical Research 13(2): 1447-1456.

Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. (2014) Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Plant Products Research Journal 21(4): 135-148 (in Persian).

Sarkheill, P., Omidi, M., Peyghambari, S. A. and Davazdahemami, S. (2009) The effects of plant growth regualators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25: 364-375.

Sayed-Tabatabae, B. E. and Omidi, M. (2011) Plant cell and tissue culture. Tehran University Press, Tehran.

Shabani, L. and Ehsanpour, A. A. (2010) Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in in vitro culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Biology 22(4): 691-703 (in Persian).

Shahwar, D., Asam Raza, M., Bukhari, S. and Bukhari, G. (2012) Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from Eucalyptus and Curcuma species. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(3): 1633-1636.

Siddharthan, S., Yi-Zhong, C., Harold, C. and Mei, S. (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry 102: 938-953.

Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Soltanipool, M. M., Mohamadi, A., Rahnama, H. and AbbasZadeh, B. (2011) Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officin*alis L.). Journal of Agronomy and Plant Breeding 7(1): 45-54.

Swetie, R., Raesh, Ch. and Arun, S. (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiation processed lamb meat. Food Chemistry 100(2): 451-458.

Thiem, B. and Krawczyk, A. (2010) Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated in vitro cultures of kudzu (*Pueraria lobata Ohwi*). Herba Polonica 56(1): 48-56.

Toivonen, L. (1993) Utilization of hairy root culture for production of secondary metabolites. Biotechnology Progress 9: 12-29.

Zhang, L. and Xing, D. (2008) Methyl

jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. Plant Cell Physiology 49(7): 1092-1111.

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