https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 15, Issue3, No. 57, Autumn 2023
Document Type: Research Paper
Received: 09/06/2024 Accepted: 17/07/2024

The effect of Methyl jasmonate on growth and phenolic compound production in callus cultures of *Dracocephalum polychaetum* Bornm

Zeinab Khosravi Khouzani[1] and Marzieh Taghizadeh[1*]

[1.] Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Dracocephalum polychaetum Bornm. a species in the Lamiaceae family is a medicinal herb native to Iran. This study aims to investigate the impact of various concentrations of methyl jasmonate on the growth, and production of phenolic compounds, as well as the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) in *D. polychaetum* callus under *in vitro* conditions. For callus induction, hypocotyl sections were cultured in MS medium supplemented with 4 mg/L BAP+1.5 mg/L NAA. Following several subcultures, the callus was exposed to concentrations of 0, 10, 25, 50, 100, and 150 µM methyl jasmonate for 14 days. The application of methyl jasmonate increased fresh weight, callus growth rate, content of phenolic compounds, flavonoids, flavonols, and the activity of PAL, and TAL enzymes in the treated callus compared to the control. The highest callus growth rate, total phenolic compounds, PAL, and TAL enzyme activity were observed in callus treated with 50 µM of methyl jasmonate. Furthermore, callus treated with 25 µM of methyl jasmonate exhibited the highest fresh weight. These findings suggested that methyl jasmonate at optimal concentrations of 25 and 50 µM can effectively stimulate the production of phenolic compounds without adverse impact on callus growth.

Introduction

Dracocephalum polychaetum is a perennial woody herb belonging to the Lamiaceae. The secondary metabolites of *D. polychaetum* reportedly include phenolic compounds such as rutin, naringin, apigenin, quercetin, thymol, rosmarinic acid, and carvacrol.

Plant tissue culture appeared as a viable biotechnological tool for the production of secondary metabolites in medicinal plants. The production of secondary metabolites, such as phenolic compounds, can be affected by a variety of biotic and abiotic stresses.

One of the potent elicitors of secondary metabolites is MJ, a volatile methyl ester of jasmonic acid that prompts plants to respond to biotic and abiotic stress. It regulates and

* Corresponding Author: m.taghizadeh@bio.ui.ac.ir

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

DOI. 10.22108/IJPB.2024.141786.1364

improves biochemical pathways to improve plant morphology and physiology, ultimately enhancing their performance. Exogenous MJ *in vitro* has reportedly yielded higher levels of secondary metabolite production, compared to ordinary conditions. Given the medicinal significance of *D. polychaetum* and the lack of research on the experimental enhancements in this plant using biotic elicitors, this study aims to investigate the impact of various concentrations of MJ on the growth, production of phenolic compounds, and the activity of the PAL and TAL enzymes in the biosynthesis pathway of these compounds in *D. polychaetum* callus.

Material and Method

For hypocotyl explants, *D. polychaetum* seeds were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 10 mg/l GA3 and incubated at 23°C in darkness. After germination and seedling growth, to induce callus, hypocotyl explants were cultured in MS medium supplemented with 4 mg/l BAP, 1.5 mg/l of NAA, 30 g/l of sucrose, and 8 g/l of agar and incubated at 23°C in darkness. After several subcultures, the callus was exposed to different concentrations of MJ for 14 days. The concentrations used were 0, 10, 25, 50, 100, and 150 µM. The effects of these various concentrations of MJ on callus growth were determined by calculating the difference between the initial weight of cells on day 0 and their final weight on day 14. Additionally, the average growth rate of the callus was examined by measuring the difference in the diameter of the callus on days 0, 7, and 14. Production of phenolic compounds, flavonoids, and flavonols as well as the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) were measured by using UV–Vis spectrophotometry. Statistical analyses were performed using SPSS (version 26), set for a completely randomized design with three replications. To check the significance of mean values, Duncan's test was applied ($P \leq 0.05$). Using PAST software (version 4.13), principal component analysis (PCA), was used to show patterns and relationships between the studied physiological and biochemical factors.

Results and Discussion

Jasmonates are a group of phytohormones that regulate plant growth, development, and defense through intracellular and extracellular signals. One of the effects of MJ is the production of free radicals, which act as secondary signaling molecules and impact the phenylpropanoid pathway. This ultimately results in the synthesis of powerful antioxidants like phenolic compounds. These products may play a role in protecting plant cells against MJ treatment. Additionally, MJ acts as a signaling molecule and influences the expression of genes involved in secondary metabolite biosynthesis.

According to the results, applying a low concentration of MJ resulted in increased fresh weight, callus growth rate, and the content of phenolic compounds, flavonoids, and flavonols in the treated callus, as well as enhanced activity of PAL and TAL enzymes, when compared to the control. The callus treated with 25 µM MJ exhibited the highest fresh weight. Furthermore, the callus treated with 50 µM MJ showed the highest growth, phenolic compound content, and activity of PAL and TAL enzymes.

These results indicate that an increase in the activity of PAL and TAL at low MJ concentrations leads to an increase in the production of phenolic compounds as products of the phenylpropanoid pathway. PAL and TAL enzymes are two key enzymes that initiate the biosynthesis pathway of phenolic compounds. These findings are supported by positive and strong correlations between PAL, TAL, and total phenolic compounds.

The results also showed that an increase in MJ concentration reduces growth. Supporting

these findings, there were negative and strong correlations between MJ with FW and CGR. The high concentration of MJ may cause excessive production of free radicals in cells and induce oxidative stress, thus inhibiting cellular growth at high concentrations.

Conclusion

This study presents the first report on the enhanced production of phenolic compounds in *D. polychaetum* callus under MJ treatments. In summary, a low concentration of MJ was found to increase the growth, activate the phenylpropanoid pathway, and enhance the production of total phenolics, flavonoids, and flavonols. These findings lead to the logical conclusion that using low-risk elicitors like MJ is an effective strategy for improving the overproduction of phenolic compounds in plants that are typically produced in very low amounts under controlled conditions.

Keywords: Callus, Medicinal plants, Methyl jasmonate, Phenolic compounds.

علوم زیستی گیاهی، سال پانزدهم، شمارهٔ پیاپی پنجاه و هفتم، پاییز ۱۴۰۲، صفحهٔ ۱۸-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۲۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۳/۴/۲۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۴/۲۷
مقاله پژوهشی

تأثیر متیل جاسمونات بر رشد و تولید ترکیبات فنلی در کالوس گیاه *Dracocephalum polychaetum* Bornm.

زینب خسروی خوزانی [۱]، مرضیه تقی زاده [*۱]
[۱] گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

گیاه مفرو یا *Dracocephalum polychaetum* Bornm. یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعنائیان و بومی ایران است. این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر رشد، تولید ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز کننده آن، فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تایروزین آمونیالیاز (TAL) در کالوس گیاه مفرو در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شد. بدین منظور پس از القاء کالوس از هیپوکوتیل در محیط MS+4mg/L BAP+1.5mg/L NAA و چند مرحله واکشت کردن، کالوس‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات قرار گرفتند. متیل جاسمونات سبب افزایش وزن تر، سرعت رشد، محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئید، فلاونول و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در کالوس این گیاه در مقایسه با شاهد شد. بر اساس نتایج، بالاترین میزان رشد کالوس، محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در کالوس تحت تیمار با ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد. علاوه بر این، کالوس‌های تیمار شده با ۲۵ میکرومولار متیل جاسمونات بالاترین وزن تر کالوس را نشان دادند. این نتایج نشان دادند متیل جاسمونات در غلظت بهینه ۲۵ و ۵۰ میکرومولار می‌تواند بدون اینکه بر رشد کالوس اثر منفی بگذارد، به طور موثر تولید ترکیبات فنلی را تحریک کند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، کالوس، گیاهان دارویی، متیل جاسمونات.

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: m.taghizadeh@bio.ui.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۳۱۶۸۷۸۹۸

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

DOI. 10.22108/IJPB.2024.141786.1364

مقدمه

تنوع و پراکنش بالای گیاهان خانواده نعناء Lamiaceae در ایران، این گیاهان را به یکی از مهم‌ترین خانواده‌های گیاهی در فلور ایران تبدیل کرده است (Jamzad, 2013) گیاه *Dracocephalum polychaetum* Bornm. یا مفرو یکی از گیاهان دارویی از اعضای خانواده Lamiaceae و بومی ایران بوده و تنها در ارتفاعات کوه‌های هزار واقع در جنوب استان کرمان می‌روید (Boroomand et al., 2018; Khodami et al., 2011). خواب پیچیده‌ی بذر، رشد در ارتفاعات زیاد و هوای سرد از جمله عوامل محدودیت رویش و پراکنش این گونه‌ی گیاهی در منطقه جغرافیایی خاص است. همچنین تغییرات اقلیمی، کاهش بارندگی و برداشت بی‌رویه انسان سبب کاهش روز افزون جمعیت این گیاه در زیستگاه خود شده است (Mehrabani et al., 2005). حضور متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی همچون مونوترپن‌ها مانند پریل آلدهید و لیمونن و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مانند آپیژین، لوتئولین، نارینجین، کوئرستین، روتین، رزمارینیک اسید، تیمول و کاروکرول سبب خواص درمانی و اهمیت دارویی این گیاه شده است (Mehrabani et al., 2005; Taghizadeh et al., 2019). متابولیت‌های ثانویه طیف وسیعی از ترکیبات تولید شده توسط گیاهان هستند که عملکردهای مختلفی در گیاهان دارند. این ترکیبات در ارتباطات گیاه با محیط اطراف خود، دفاع گیاهان و مقابله با شرایط تنش نقش دارند (Hartmann, 2007; Jan et al., 2021). بیش از ۲۱۴۰۰۰۰ متابولیت ثانویه در گیاهان شناخته شده (Durairaj et al., 2018) و ترکیبات فنلی بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند. ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی گیاهی به خنثی‌سازی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی و دفاع از گیاه در برابر آفات و انگل‌ها می‌پردازند (Wuyts et al., 2006) و یکی از عوامل ایجاد رنگ و بو در گیاهان هستند (Zhang et al., 2022). همانطور که ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان با خاموش‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن از آسیب به گیاه در برابر تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند، حضور این ترکیبات در رژیم غذایی انسان به واسطه خواص آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد ویروس، ضد تومور و آنتی‌آلرژیک نیز نقش بسزایی در بهبود سلامت انسان دارند (Vergara-Martínez et al., 2021; Zhang et al., 2022). گروه‌های متعدد ترکیبات فنلی از جمله فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، کومارین‌ها، تانن‌ها، لیگنین‌ها و غیره همگی از مشتقات مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید هستند که طی این مسیر بیوسنتزی، آمینواسیدهای فنیل‌آلانین و تیروزین به عنوان پیش ماده با فعالیت آبشاری آنزیم‌ها به سنتز فنیل پروپانوئیدها می‌پردازند (Marchiosi et al., 2020; Vogt, 2010). آنزیم‌های PAL یا PTAL، آنزیم‌های آغاز کننده سنتز ترکیبات فنلی و کلیدی در تنظیم بین مسیر شیکیمات و مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها هستند که جریان کربن بین متابولیسم اولیه و ثانویه را تنظیم می‌کنند (Barros & Dixon, 2020).

اگرچه استفاده از متابولیت‌های ثانویه در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و عطرسازی اهمیت اقتصادی فراوانی دارد، اما سنتز این ترکیبات در گیاهان به کندی انجام شده و کمتر از ۱٪ از وزن

خشک گیاهان را به خود اختصاص می‌دهند (Namdeo, 2007). از طرفی برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از زیستگاه‌های طبیعی خود سبب تخریب زیستگاه و کاهش شدید در جمعیت طبیعی این گیاهان و رویارویی این گیاهان با خطر انقراض شده است. از این رو جهت بهره برداری پایدار از این منابع ارزشمند گیاهی، روش‌های مختلفی از جمله زراعی سازی این گیاهان، سنتز شیمیایی این ترکیبات و استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی پیشنهاد شده که استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی یکی از مناسب‌ترین راه‌ها جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است (Halder et al., 2019; Iannicelli et al., 2020). به کمک روش‌های بیوتکنولوژی با کشت سلول، بافت و اندام گیاهی و یا ریزازدیادی گیاهان و به کارگیری راهبردهای مختلفی مانند انتخاب لاین سلولی با توانایی تولید محصول بیشتر، اصلاح محیط کشت و استفاده از محرک‌ها (Elicitation)، کشت ریشه موئین، کشت سلول در مقیاس بزرگ در راکتورهای زیستی، بیوترانسفورماسیون (Biotransformation) و plant cell immobilization (تثبیت سلول‌های گیاهی) می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را بدون تخریب زیستگاه و با حفظ تنوع زیستی افزایش داد (Halder et al., 2019; Madani et al., 2021; M. Namdeo, 2007). براساس مطالعات پیشین در میان انواعی از روش‌های کشت سلول و بافت گیاهی، کشت کالوس، سوسپانسیون سلولی و ریشه‌های موئین پتانسیل بالاتری در تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس صنعتی دارند. معمولاً در محل زخم در گیاه، توده‌ی سلولی تمایز نیافته‌ای تحت عنوان کالوس تجمع می‌یابد. جهت به کارگیری کالوس در بیوتکنولوژی می‌توان این توده سلولی تمایز نیافته را از تمامی بخش‌های گیاه با استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی (اکسین و سیتوکینین) در کشت درون شیشه‌ای (*in-vitro*) به دست آورد. سلول‌های کالوس در بسیاری از صفات مشابه با سلول‌های تمایز نیافته مریستمی هستند و قابلیت تمایز یابی به انواع بافت، اندام و گیاه کامل را دارند. استفاده از کالوس جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بالا، تولید آنتی‌بادی و پروتئین‌های نوترکیب درمانی و باززایی گیاهان زراعی و باغبانی از کالوس را می‌توان مواردی از کابردهای کشت کالوس برشمرد (Efferth, 2019). تا امروز تعداد کمی از متابولیت‌های ثانویه برای مصارف دارویی، عطرسازی، آرایشی و صنایع غذایی در مقیاس صنعتی تولید شده‌اند که شامل کشت سوسپانسون سلولی *Lithospermum erythrorhizon* برای تولید شیکونین و *Captis japanica* برای تولید بربرین، کشت سلول در *Coleus blumei* برای تولید رزمارینیک اسید، *Papaver somniferum* برای تولید سانگواینارین و *Taxus bervifolia* برای تولید پاکلی تاکسل است (Madani et al., 2021). استفاده از روش کشت کالوس در افزایش تولید رزمارینیک اسید در گیاه *Salvia miltiorrhiza* (Morimoto et al., 2004). و کوئرستین از کالوس گیاه Chrysanthemum cinerariefolium (Purwianingsih et al., 2016) مؤثر بوده است.

یکی از روش‌های مؤثر در افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده از محرک‌ها (Elicitation) است. محرک‌ها مولکول‌های سیگنال با منبع زیستی و غیر زیستی هستند که سبب فعال شدن پاسخ‌های تنش و سیستم دفاعی در سلول شده

و منجر به افزایش سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌شوند (Halder et al., 2019; Thakur et al., 2019) جاسمونیک اسید و مشتقات آن مانند متیل‌جاسمونات، گروهی از هورمون‌های رشد گیاهی هستند که یکی از مهم‌ترین نقش‌های آن‌ها القاء پاسخ‌های دفاعی در برابر انواعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Yu et al., 2018)، همین ویژگی، جاسمونات‌ها بویژه متیل جاسمونات (MJ) را به یکی از مهم‌ترین محرک‌ها جهت افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است (Ruan et al., 2019). هنگام حضور متیل‌جاسمونات در محیط کشت سلول‌های گیاهی، MJ به گیرنده‌های سطح غشاء سلول متصل شده و سبب فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده و تولید ROS (Reactive oxygen species) در سلول افزایش می‌یابد. ROS در غلظت‌های کم، مولکول‌های پیام‌رسان ثانویه هستند که تولید مولکول‌های سیگنال مانند جاسمونیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، اتیلن و نیتریک‌اکسید را در گیاه تحریک می‌کند و سبب بیان ژن‌های پاسخ به تنش در سلول از جمله بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Ho et al., 2020; Hu et al., 2009). همچنین MJ به عنوان یک مولکول سیگنال، سبب تحریک فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده ROS (NADPH اکسیداز) و تولید ROS بیشتر می‌شود. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، سلول را دچار تنش اکسیداتیو می‌کند. حضور غلظت بالایی از رادیکال‌های آزاد در سلول، سلول را دچار آسیب می‌کند. برای جلوگیری از آسیب به سلول، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی سلول از جمله متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل‌ها وارد عمل می‌شود که به پاک‌سازی و مقابله با رادیکال های آزاد می‌پردازد (Ho et al., 2020). بنابراین، با توجه به اهمیت گیاه مفرو از نظر دارویی و پژوهش‌های بسیار اندک انجام شده بر روی این گیاه، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات به عنوان یک محرک زیستی بر رشد و تولید ترکیبات فنلی به عنوان بخشی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی و تأثیر بر فعالیت آنزیم PAL و TAL در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در کالوس گیاه *D. polychaetum* Bornm. است.

مواد و روش‌ها

القاء کالوس و تیمار متیل جاسمونات

بذرهای گیاه *D. poltchaetum* پس از استریل شدن جهت رشد هیپوکوتیل، به مدت ۲۸ روز در محیط $\frac{1}{2}$MS+10 mg/l GA_3 کشت و سپس در تاریکی و دمای ۲±۲۳ سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس هیپوکوتیل به دست آمده به عنوان ریز نمونه جهت القاء کالوس در محیط کشت MS+4mg/L BAP+1.5mg/L NAA به همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و آگار ۰/۶٪ قرار داده شد (Taghizadeh et al., 2020). جهت تیماردهی، پس از چند مرحله واکشت، کالوس‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات منتقل شدند. پس از گذشت ۱۴ روز از تیماردهی، کالوس‌ها برداشت و جهت اندازه‌گیری پارامترهای رشد و فیزیولوژیکی، در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند.

سرعت رشد کالوس

جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف تیمار متیل جاسمونات بر رشد کالوس، اختلاف وزن تر سلول‌ها در روز صفر و روز ۱۴ (انتهای مدّت تیماردهی) و میانگین سرعت رشد کالوس (CGR) (Callus Growth Rate) با اندازه‌گیری اختلاف قطر کالوس در روزهای صفر، ۷ و ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت (Golkar et al., 2017).

محتوای فنل کل، فلاونوئید و فلاونول‌ها

۵۰۰ میلی‌گرم از وزن تر کالوس برداشت شده در روز ۱۴ به همراه ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ سائیده شد و هموژنات حاصل به مدّت ۱۵ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ rpm شد و محلول رویی جهت اندازه‌گیری محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فلاونول مورد استفاده قرار گرفت. جهت اندازه گیری محتوای فنل کل از روش Folin-ciocalteau، به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۷۵۰ میکرولیتر معرف Folin-ciocalteu (۱۰ ٪) اضافه و ورتکس شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ ٪ اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۷۵ دقیقه در دمای محیط و تاریکی انکوبه شدند. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر در مقابل بلانک خوانده و سپس محاسبه محتوای فنل کل توسط منحنی استاندارد گالیک اسید انجام شد. نتایج حاصل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر حسب گرم وزن تر سلول گزارش شد (Singleton et al., 1999).

جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید از روش آلومینیوم کلراید (Chang et al., 2002) استفاده شد. ابتدا به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰٪، ۲۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید (۱۰٪) و ۲۰۰ میکرولیتر محلول سدیم استات یک مولار اضافه شد و پس از اندکی ورتکس کردن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری و نتایج حاصل با منحنی استاندارد کوئرستین و برحسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر سلول‌ها گزارش شد.

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونول، ۲۵۰ میکرولیتر عصاره به همراه ۲۵۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ۲٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم استات ۵٪ ترکیب شده و به مدت ۲/۵ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. جذب کمپلکس زرد رنگ تشکیل شده در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونول موجود در هر نمونه به کمک منحنی استاندارد کوئرستین و برحسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر سلول‌ها گزارش شد.

فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL

برای استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های PAL بر اساس روش Beaudoin و همکاران (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1985) ۳۰۰ میلی‌گرم از کالوس تازه با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس – کلریدریک اسید ۵۰ میلی مولار (pH=۸) حاوی ۲-مرکاپتو اتانول ۱۴/۴ میلی مولار و ۵٪ PVP (Polyvinylpyrrolidone) درون هاون چینی روی یخ (دمای ۴°C) هموژنایزر شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ و محلول رویی جداسازی و به لوله‌های جدید منتقل شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم PAL به ۱/۸ میلی‌لیتر بافر واکنش تریس- هیدروکلریک اسید ۵۰۰ میکرو مولار (pH=8) حاوی ۶ میکرومول فنیل آلانین به عنوان سوبسترای آنزیم PAL و جهت انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا، نمونه‌ها به مدّت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در انتها با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکلریک اسید ۵ نرمال به مخلوط واکنش، واکنش آنزیمی متوقف شد و مقدار ترانس-سینامیک اسید تشکیل شده، محصول آنزیم PAL، با خواندن شدت جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر انجام شد. فعالیت ویژه آنزیم PAL با در نظر گرفتن ضریب خاموشی آن محاسبه و برحسب نانو مول تولید محصول در میلی‌گرم پروتئین کل بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد.

جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم TAL، به ۱/۸ میلی‌لیتر بافر تریس- کلریدریک اسید ۵۰۰ میکرومولار (pH=8) حاوی ۵/۵ میکرو مول تیروزین به عنوان سوبسترا، ۲۰۰میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد و جهت انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و در انتها با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکلریک اسید ۵ نرمال به مخلوط واکنش، واکنش آنزیمی متوقف شد. مقدار *p*-کوماریک اسید تشکیل شده، حاصل فعالیت آنزیم TAL، با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۳۳۳ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی و فعالیت ویژه‌ی آنزیم بر حسب نانومول *p*-کوماریک اسید تولید شده در میلی‌گرم پروتئین کل بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1985).

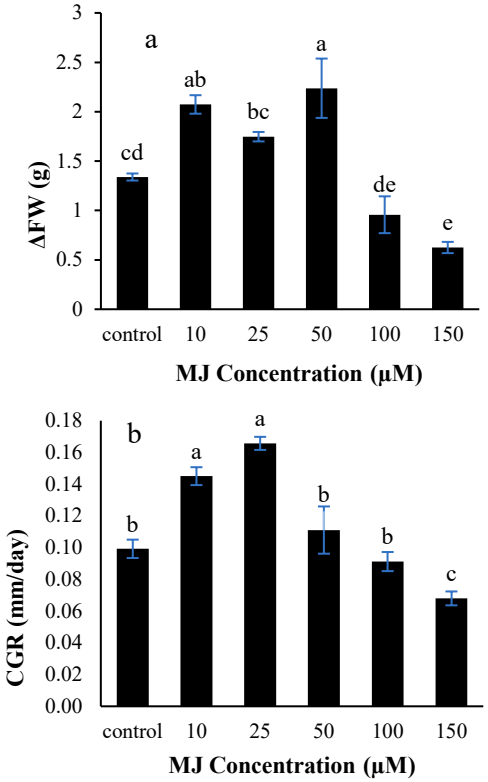
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال۵درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

اثر متیل جاسمونات بر رشد کالوس

جهت بررسی تأثیر متیل جاسمونات بر رشد سلول‌ها، اختلاف وزن تر سلول‌ها در ابتد (روز صفر) و انتهای تیمار (روز ۱۴) و همچنین میانگین سرعت رشد کالوس در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱-a مشاهده می‌شود، غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات سبب افزایش وزن تر کالوس نسبت به شاهد شدند. این افزایش در تیمار ۱۰ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد معنی‌دار بود. بیشترین افزایش در وزن تر در تیمار ۵۰ میکرومولار (۱/۶۷ برابر بیشتر نسبت به شاهد) مشاهده شد. با افزایش غلظت تیمار به ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار، متیل جاسمونات سبب کاهش معنی‌دار در وزن تر و رشد کالوس‌ها شد. در سلول‌های تیمار شده با بیشترین غلظت متیل جاسمونات کاهش رشد ۵۳ درصدی در وزن تر کالوس نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین میانگین سرعت رشد کالوس در این پژوهش روندی مشابه با اختلاف وزن تر سلول‌ها نشان داد. متوسط نرخ رشد در کالوس‌های تحت تیمار با غلظت‌های پائین متیل جاسمونات نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار و با افزایش غلظت تیمار روند کاهشی در نرخ رشد مشاهده شد. غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار متیل جاسمونات سبب افزایش معنی‌داری (به ترتیب ۱/۴۶

و ۱/۶۶ برابری) در میانگین سرعت رشد کالوس در مقایسه با شاهد شد. نرخ سرعت رشد در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان نداد و در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکرومولار، کاهش ۳۱/۴۸ درصدی نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۱-b).



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر وزن تر (a) و نرخ رشد (b) در کالوس گیاه *D. polychaetum*. Δ: تفاوت وزن تر کالوس در روز صفر و ۱۴. مقادیر براساس میانگین سه تکرار ± SE نشان داده شده و حروف نامشابه معرف معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

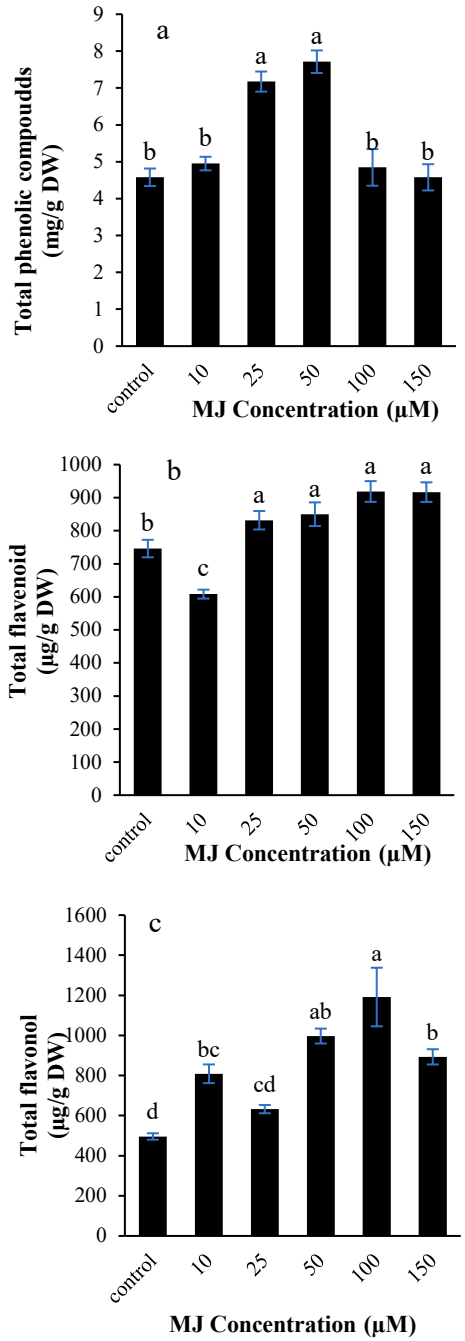
Figure 1- Effect of the methyl jasmonate (MJ) concentrations (0, 10, 25, 50, 100 and 150 µM) on the (a) Fresh weight, and (b) Callus growth rate (CGR) in : The weight difference of Δ*D. polychaetum* callus. the callus from Day 0 to Day 14. Data are mean values of three replicates ± SE. Dissimilar letters indicate significant differences based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

اثر متیل جاسمونات بر محتوای فنل کل، فلاونوئید و فلاونول‌ها

در این پژوهش محتوای فنل کل، فلاونوئید و فلاونول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات محتوای فنل کل را به طور معنی‌دار و به ترتیب ۱/۵۶ و ۱/۶۸ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش داد در حالی‌که سایر غلظت‌های تیمار سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری در محتوای فنل کل نسبت به نمونه شاهد نشدند (شکل ۲-a). کالوس‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات همگی افزایش معنی‌داری در محتوای فلاونوئید کل نسبت به شاهد نشان دادند. اگرچه بین این غلظت‌های تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، با این حال با افزایش غلظت تیمار، محتوای فلاونوئیدی روند افزایشی از خود نشان داد. در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات کاهش معنی‌داری در محتوای فلاونوئیدی مشاهده شد (شکل۲-b). محتوای فلاونول در کالوس‌های تحت تیمار با تمامی غلظت‌های متیل جاسمونات به غیر از غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش در کالوس تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به حداکثر مقدار خود رسیده و محتوای فلاونول در این غلظت از تیمار حدود ۲/۴ برابر نسبت به سلول‌های شاهد بیشتر بود (شکل ۲-c).

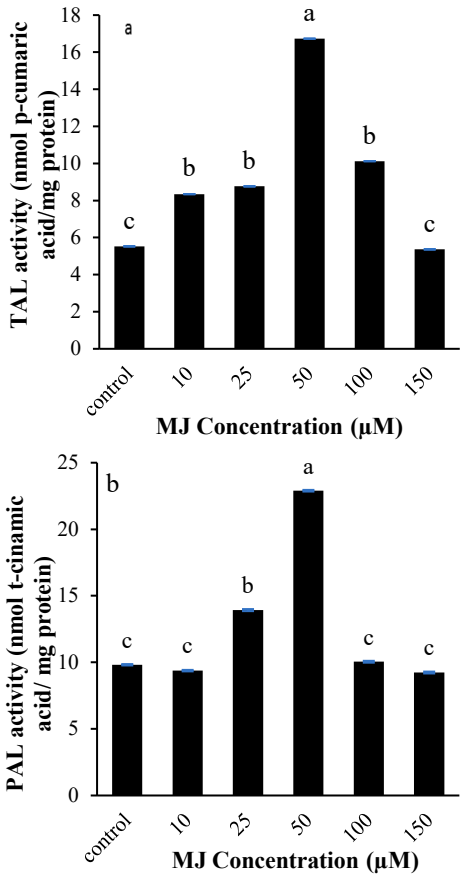
اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL و TAL

براساس نتایج شکل۳، تیمار کالوس با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL)، آنزیم‌های کلیدی و آغازگر مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها، شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت آنزیم TAL نسبت به شاهد شد. بیشترین فعالیت آنزیم TAL مربوط به تیمار ۵۰ میکرومولار بود که افزایشی ۳/۰۲ برابری نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۳-a). کالوس‌های تحت تیمار با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات نیز افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد نشان دادند. مشابه با آنزیم TAL، بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم PAL نیز در کالوس تحت تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد، که این افزایش حدود ۲/۳۶ برابر بیشتر نسبت به نمونه شاهد بود (شکل ۳-b).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر محتوای فنل کل (a)، فلاونوئید (b) و فلاونول (c) در کالوس گیاه *D. polychaetum*. مقادیر براساس میانگین سه تکرار ± SE نشان داده شده و حروف نامشابه معرف معنی دار بودن براساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Figure 2: Effect of the methyl jasmonate (MJ) concentrations (0, 10, 25, 50, 100 and 150 µM) on the (a) total phenol content; (b) flavonoid content and (c) flavonol content in *D. polychaetum* callus. Data are mean values of three replicates ± SE. Dissimilar letters indicate significant differences based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).



شـکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسـمونات بر فعالیت آنزیم‌های (a) تیروزین آمونیالیاز (TAL) و (b) فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در کالوس گیاه *D. polychaetum*. مقادیر براساس میانگین سه تکرار ± SE نشان داده شده و حروف نامشابه معرف معنی دار بودن براساس آزمون دانکن (P≤0.05) است.

Figure 3. Effect of the methyl jasmonate (MJ) concentrations (0, 10, 25, 50, 100 and 150 µM) on the (a) TAL activity and (b) PAL activity in *D. polychaetum* callus. Data are mean values of three replicates ± SE. Dissimilar letters indicate significant differences based on Duncan's test (P≤0.05).

همبستگی بین صفات مختلف

همبستگی بین صفات بررسی شده در جدول ۱ قابل مشاهده است. بین صفات بررسی شده فلاونوئید و فلاونول نسبت به افزایش غلظت تیمار همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان دادند و سایر صفات با نسبت به افزایش غلظت تیمار همبستگی منفی نشان دادند. بین وزن تر کالوس با صفات اندازه‌گیری شده مانند نرخ رشـد کالوس، محتوای فنل کل و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. در حالی‌که بین این صفت و محتوای فلاونوئید و فلاونول همبستگی منفی مشاهده شد که این همبستگی تنها در محتوای فلاونوئیدی معنی‌دار بود. نرخ رشد کالوس علاوه بر وزن تر تنها با محتوای فلاونوئیدی همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد و همبستگی بین نرخ رشد و سایر صفات معنی‌دار نبود. محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی بررسی شده با یکدیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان دادند. محتوای فنل کل همبستگی مثبت، معنی‌دار و قابل توجهی با فعالیت آنزیم PAL و TAL نشان داد. همچنین همبستگی میان فعالیت آنزیم PAL و فعالیت آنزیم TAL نیز مثبت و معنی‌دار بود.

جدول ۱- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف در کالوس گیاه *D. polychaetum* تحت غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات. MJ: متیل جاسمونات، CGR: نرخ رشد کالوس، FW: وزن تر، TPC: محتوای فنل کل، TFD: محتوای فلاونوئید، TFL: محتوای فلاونول، PAL: آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و TAL: آنزیم تیروزین آمونیالیاز.

Table 1- Trait correlation between different traits of *D. polychaetum* callus under methyl jasmonate treatment. MJ: Methyl jasmonate, CGR: Callus growth rate. FW: fresh weight, TPC: total phenolic compound, TFD: total flavonoid content, TFL: total flavonol content, TAL: tyrosine ammonia lyase, PAL: phenylalanine ammonia-lyase.

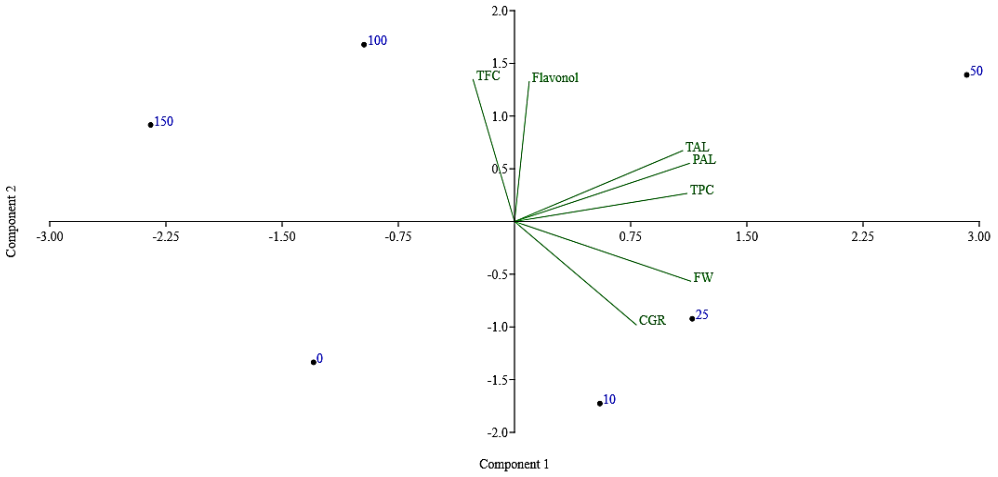
	MJ	FW	CGR	TPC	TFD	TFL	PAL	TAL
MJ	1							
FW	-0.668**	1						
CGR	-0.665**	0.589**	1					
TPC	-0.233	0.547**	0.415*	1				
TFD	0.706**	-0.495*	-0.398	0.092	1			
TFL	0.567**	-0.146	-0.296	0.074	0.489*	1		
PAL	-0.197	0.634**	0.197	0.801**	0.039	0.210	1	
TAL	-0.135	0.545**	0.130	0.664**	0.008	0.425*	0.865**	1

** معنی‌داری در سطح ۱٪ و * معنی داری در سطح ۵٪

* and ** significant at P≤ 0.05 and P≤0.01 respectively

تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA)

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اجزای اصلی (PCA) دسته‌بندی بین کالوس‌های شاهد و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات را تأئید کرد و روابط بین صفات مورد پژوهش را نشان داد (شکل ۳). اجزای اصلی (PC_1) و (PC_2) به ترتیب ۹۷/۶۷ و ۳/۳۲ درصد از کل واریانس در سلول‌های تیمار شده و شاهد را تشکیل می‌دهند. بر این اساس، سلول های تحت تیمار با متیل‌جاسمونات به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول شامل کالوس‌های شاهد بود. کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات گروه دوم را تشکیل دادند که به دلیل مقدار وزن تر و سرعت رشد نسبی بیشتر در یک گروه قرار گرفتند. طبق تجزیه و تحلیل PCA، غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات سبب افزایش مقدار فنل کل، فلاونول، آنزیم PAL و TAL شد که گروه سوم کالوس‌های تحت تیمار با متیل جاسمونات را تشکیل دادند. همچنین، سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های بالاتر، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات گروه چهارم را تشکیل دادند که سطح قابل توجهی از فلاونوئید را نشان دادند.



شکل ۴- نمایش‌دوبعدی تجزیه مولفه های اصلی (PCA) صفات مورد بررسی تحت تیمار متیل جاسمونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار). CGR: نرخ رشد کالوس، FW: وزن تر، TPC: محتوای فنل کل، TFC: محتوای فلاونوئید، PAL: آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و TAL: آنزیم تیروزین آمونیالیاز.

Figure 4- PCA biplot of the analyzed responses of *D. polychaetum* callus to methyl jasmonate (0, 10, 25, 50, 100 and 150 µM) treatments. CGR: Callus growth rate. FW: fresh weight, TPC: total phenolic compound, TFC: total flavonoid content, TAL: tyrosine ammonia lyase, PAL: phenylalanine ammonia-lyase.

بحث

جاسمونات‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که در کنار سایر هورمون‌های درون گیاه متناسب با سیگنال‌های درون و برون سلولی رشد، نمو و دفاع گیاهان را تنظیم می‌کنند (Sohn et al., 2022). به کارگیری محرک‌ها در افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه، می‌تواند همراه با تغییرات زی‌توده نیز باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از شکل ۱ و نتایج حاصل از PCA، غلظت‌های پائین متیل جاسمونات رشد را تحریک و غلظت‌های بالا سبب مهار رشد شد. نتایج حاصل از ضریب همبستگی تأییدکننده این ارتباط است که بین رشد و غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات رابطه عکس وجود دارد (جدول ۱). احتمالاً غلظت‌های پائین متیل جاسمونات سبب تحریک رشد و تقسیم سلولی شده و مهار رشد در غلظت‌های بالای متیل جاسمونات را می‌توان به نقش فیزیولوژیک آن در بروز پاسخ‌های پیری، تخریب کلروفیل و کاهش سیتوکینین‌های فعال نسبت داد (Andi et al., 2019; Sohn et al., 2022). همچنین ممکن است تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد درون سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های بالای متیل جاسمونات دلیلی بر مهار رشد باشد (Yazdanian et al., 2021). مشابه با نتایج به دست آمده در این پژوهش، کالوس گیاه *Carum carvi* نیز تحت تیمار با غلظت پائین متیل جاسمونات (۲۵ میکرومولار) بیشترین نرخ رشد را نشان داد و با افزایش غلظت تیمار مهار رشد مشاهده شد (Rahmati et al., 2023). همچنین بر اساس پژوهشی، غلظت ۲۵ میکرومولار متیل جاسمونات

سبب افزایش رشد در سوسپانسیون سلولی دو گونه‌ی *O. basilicum* و *O. sanctum* شد، که با افزایش غلظت متیل جاسمونات رشد کاهش یافت (Mathew & Sankar, 2012). در کالوس گیاه *Allium jesdianum* تحت تیمار با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات، با افزایش غلظت تیمار، کاهش نرخ رشد و وزن تر مشاهده شد (Yazdanian et al., 2021). احتمالا غلظت بالای متیل جاسمونات بطور مستقیم و غیر مستقیم از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد درون سلولی سبب آسیب به سلول، کاهش رشد و کاهش تولید ترکیبات فنلی با اثر گذاری بر مسیر بیوسنتز این ترکیبات شده است.

ترکیبات فنلی بخشی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی هستند و متیل‌جاسمونات به عنوان مولکول سیگنال، با اثر بر بیان ژن‌های پاسخ‌های دفاعی، بیان عوامل تنظیمی (فعال‌کننده و یا مهارکننده‌ها) ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، به تنظیم مسیرهای بیوسنتز کننده آن‌ها و تجمع این ترکیبات در سلول و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و مقابله با تنش اکسیداتیو می‌پردازند (Gharechahi et al., 2013; Li et al., 2022). این ترکیبات به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل و متوکسی فراوان در ساختمان خود، به الکترون و هیدروژن دهندگان قوی تبدیل شده‌اند که پتانسیل بالایی در به دام انداختن و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند (Dumanović et al., 2021). این آنتی‌اکسیدان‌های قوی با روش‌های متعددی مانند جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، انتقال هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و همکاری با پراکسیدازها جهت پاکسازی H_2O_2 به خنثی سازی عوامل اکسید کننده و رادیکال‌های آزاد در سلول می‌پردازند. فنل‌ها در واکنش آنتی‌اکسیدانی خود به رادیکال‌های فنوکسیل تبدیل شده و با واکنش با آسکوربات احیاء شده و به حالت اولیه‌ی خود باز می‌گردند (Khanpour-Ardestani, 2015). بر اساس نتایج حاصل، افزایش متیل جاسمونات سبب افزایش محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فلاونول شد. در تأئید این موضوع، بررسی ضریب همبستگی بین صفات مختلف نشان داد که بین غلظت متیل جاسمونات با فلاونول و فلاونوئید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد که نشان می‌دهد با افزایش غلظت متیل جاسمونات و احتمالا افزایش تنش ایجاد شده در سلول، تولید و تجمع این ترکیبات در جهت تقویت سیستم دفاعی سلول افزایش یافته است. بر اساس پژوهش‌های پیشین، نقش محرک‌ها در افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای بارها گزارش شده‌است (Ram et al., 2013). متیل-جاسمونات با فعالیت سیگنالینگ خود به فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه و بیوسنتز ترکیبات فنلی پرداخته است. احتمالا سلول جهت مقابله با اثرات مخرب رادیکال‌های تولید شده، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها را افزایش داده است. با این حال در غلظت‌های بالای تیمار اندکی کاهش در محتوای فنلی کل مشاهده می‌شود که احتمالا ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد از جمله ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) در غلظت‌های بالای تیمار و آسیب به غشاءهای زیستی و قرارگیری ترکیبات فنلی در معرض آنزیم‌های اکسیدکننده خود، پلی فنل اکسیدازها، باشد

(Hashemyan et al., 2020). همچنین ممکن است رادیکال‌های آزاد اضافی وارد واکنش با اجزای درون سلول از جمله پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و یا اسیدهای نوکلئیک شده و سبب تغییر در بیان ژن‌ها و آنزیم‌های موثر در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی شده باشد. مشابه با نتایج به دست آمده در این پژوهش، محتوای فنلی در کالوس گیاه *Carum carvi* نیز در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است و غلظت بالای تیمار سطوح پائین‌تری از ترکیبات فنلی را شامل شده است (Rahmati et al., 2022). همچنین نتایج بررسی اثر تیمار غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بر کالوس *Allium jesdianum* نشان داد، تمامی غلظت‌های تیمار سبب افزایش در محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فلاونول‌های کالوس این گیاه نسبت به نمونه شاهد شدند و تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات سبب بیشترین افزایش در محتوای فنلی این گیاه شد (Yazdanian et al., 2021). پژوهش‌های دیگر انجام شده بر سوسپانسیون سلولی *Thevetia peruviana* (Mendoza et al., 2018)، کالوس گیاه *Teucrium polium* (Hashemyan et al., 2020). و سوسپانسیون سلولی *Hypericum perforatum* (Wang et al., 2015). همگی تائید کننده نقش متیل جاسمونات بر افزایش محتوای فنلی و فلاونوئیدی گیاهان تحت تیمار است.

تحریک فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی منجر به تولید تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در سلول می شود. در این پژوهش همگام با افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL به عنوان آنزیم‌های کلیدی و تنظیم‌کننده مسیر فنیل پروپانوئید، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فلاونولی در کالوس‌های تحت تیمار با متیل جاسمونات افزایش یافت. این دو آنزیم یکی از مهم‌ترین شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی وهمچنین یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌شود (Ferrer et al., 2008). تنش به سرعت بر بیان ژن PAL و TAL اثر گذاشته و تولید ترکیبات فنلی را در گیاه برای مقابله با شرایط تنش افزایش می‌دهد. تیماردهی سلول‌های گیاهی با محرک‌هایی مانند متیل جاسمونات با ایجاد شرایط تنش، سلول گیاهی را به سمت بروز پاسخ‌های دفاعی از جمله سنتز آنتی اکسیدان‌های فنلی که لازمه آن اثر بر بیان ژن‌های کد کننده و یا فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آن است، می برد (Bavi et al., 2021; Ehsanpour &,Maleki, 2018; Zhang & Liu, 2015). از این رو می‌توان افزایش محتوای فنلی، فلاونوئیدی و فلاونولی در این پژوهش را می‌توان ناشی از فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL دانست. وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین این آنزیم‌ها با محتوای ترکیبات فنلی می‌تواند تائید کننده این موضوع باشد. همچنین وجود همبستگی مثبت معنی‌دار بین ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم‌های PAL وTAL با وزن تر نشان دهنده نقش مثبت این ترکیبات و مسیر بیوسنتز آن‌ها در حفظ رشد و حفاظت از سلول در برابر غلظت‌های متیل جاسمونات است. در پژوهش انجام شده توسط Ben Romdhane و همکاران (2022). هم‌راستا با

افزایش فعالیت آنزیم PAL و TAL در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات محتوای فنل و فلاونوئید کل در گیاه *Phoenix dactylifera* افزایش یافت. در پژوهش دیگری نیز به همبستگی میان افزایش در فعالیت آنزیم PAL و محتوای ترکیبات فنلی اشاره شده‌است (Rubio et al., 2021). همچنین تیمار با جاسمونیک‌اسید فعالیت آنزیم PAL و TAL و محتوای کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در برگ‌های گیاه ریحان نسبت به شاهد افزایش داد (Złotek et al., 2016). در این پژوهش بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL هم راستا با بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود.

جمع‌بندی

در این پژوهش به بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر رشد و تولید ترکیبات فنلی در کالوس گیاه *D. polychaetum* پرداخته شد. بر اساس نتایج، متیل‌جاسمونات به عنوان یک تنظیم کننده‌ی رشد در غلظت‌های کم با اثرات مثبت القایی سبب افزایش رشد شد. همچنین این محرک از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن سبب تحریک فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL و افزایش تولید ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها در کالوس گیاه *D. polychaetum*. شد. در این پژوهش غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات سبب بیشترین افزایش در محتوای ترکیبات فنلی همراه با اثر مثبت بر رشد کالوس شد، که این غلظت‌های تیمار می‌تواند به عنوان یک القا کننده رشد و تولید ترکیبات فنلی در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از بررسی ضریب همبستگی بین تولید ترکیبات فنلی، رشد و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL با تیمار MJ تائید کننده این موضوع است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدرانی خود را از دانشگاه اصفهان به منظور حمایت از انجام این پژوهش ابراز می‌کنند.

References

Andi, S. A., Gholami, M., Ford, C. M., & Maskani, F. (2019). The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *199*, 111625. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111625

Barros, J., & Dixon, R. A. (2020). Plant Phenylalanine/Tyrosine Ammonia-lyases. *Trends in Plant Science*, *25*(1), 66-79. https://doi.org/10,106/j.tplants.2019.09.011

Bavi, K., Khavari-Nejad, R. A., Najafi, F., & Ghanati, F. (2021). Stimulation of phenolic compounds production in *Zataria multiflora* Boiss. cell suspension culture through salicylic acid elicitation. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *34*(4), 806-817. https://plant.ijbio.ir/article_2098_8a7913b5e2350d1be590a2b61690bc3a.pdf

Beaudoin-Eagan, L. D., & Thorpe, T. A. (1985). Tyrosine and Phenylalanine Ammonia Lyase Activities during Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiology*, *78*(3), 438-441. https://doi.org/10.1104/pp.78.3.438

Ben Romdhane, A., Chtourou, Y., Sebii, H., Baklouti, E., Nasri, A., Drira, R., Maalej,

M., Drira, N., Rival, A., & Fki, L. (2022). Methyl jasmonate induces oxidative/nitrosative stress and the accumulation of antioxidant metabolites in *Phoenix dactylifera* L. *Biotechnology Letters*, *44*(11), 1323-1336 .

Boroomand, N., Sadat-Hosseini, M., Moghbeli, M., & Farajpour, M. (2018). Phytochemical components, total phenol and mineral contents and antioxidant activity of six major medicinal plants from Rayen, Iran. *Natural Product Research*, *32*(5), 564-567. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1315579

Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10.*(3). https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jaćević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview [Review]. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969

Durairaj, T., Alagappan, C., Suresh, S. S. R., & Ramasamy, V. (2018). An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In V. Ramasamy & S. S. R. Suresh (Eds.), *Secondary Metabolites* (pp. Ch. 1). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.79766

Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, *5*(1), 50-59. https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006

Ehsanpour, A. A., & Maleki, M. S. (2018). Effect of salicylic acid on total phenol, flavonoid, anthocyanin and PAL and TAL enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill) plants. *Iranian Journal of Plant Biology*, *9*(4), 55-68. https://doi.org/10.22108/ijpb.2018.103092.1013

Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., Jr., & Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 356-370. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009

Gharechahi, J., Khalili, M., Hasanloo, T., & Salekdeh, G. H. (2013). An integrated proteomic approach to decipher the effect of methyl jasmonate elicitation on the proteome of *Silybum marianum* L. hairy roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 115-122. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.031

Golkar, P., Amooshahi, F., & Arzani, A. (2017). The effects of salt stress on physio-biochemical traits, total phenolic and mucilage content of *Plantago ovata* Forsk under *in vitro* conditions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *90* . https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.028

Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*, *19*(12), 880-895. https://doi.org/10.1002/elsc.201900058

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, *68*(22), 2831-2846. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017

Hashemyan, M., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2020). Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Elicitors on the Production of Secondary Metabolites

and Antioxidant Capacity of *Teucrium polium* L. *in-vitro*. *Iranian Journal of Plant Biology*, *12*(2), 61-76. [In Persian]

https//:doi.org/10.22108/ijpb.2020.118410.1164

Ho, T.-T., Murthy, H. N., & Park, S.-Y. (2020). Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, *21* (3), 716. https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/716

Hu, X., Li, W., Chen, Q., & Yang, Y. (2009). Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant Signaling and Behavior*, *4*(8), 696-697. https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9181

Iannicelli ,J., Guariniello, J., Tossi, V. E., Regalado, J. J., Di Ciaccio, L., van Baren, C. M., Pitta Álvarez, S. I., & Escandón, A. S. (2020). The "polyploid effect" in the breeding of aromatic and medicinal species. *Scientia Horticulturae*, *260*, 108854. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108854

Jamzad, Z. (2013). A survey of Lamiaceae in the flora of Iran. *Rostaniha*, *14*(1), 59-67. https://doi.org/10.22092/botany.2013.101317

Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K.-M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, *11*(5), 968. https://www.mdpi.com/2073-4395/11/5/968

Khanpour-Ardestani, N. (2015). Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *27*(5), 840-853. https://doi.org/27508

Khodami, M., Abbasnejad, M., Sheibani, V., Mobasher, M., Mehrabani, M., Anaie Goodary, A., & Salari, S. (2011). Evaluation of the analgesic and anxiolytic effects of *Dracocephalum polychaetum*. *Physiology and Pharmacology*, *15*(3), 444-454 .

Li, C., Xu, M., Cai, X., Han, Z., Si, J., & Chen, D. (2022). Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3945. https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3945

Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., & Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, *11*(6), 899. https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/899

Marchiosi, R., dos Santos, W. D., Constantin, R. P., de Lima, R. B., Soares, A. R., Finger-Teixeira, A., Mota ,T. R., de Oliveira, D. M., Foletto-Felipe, M. d. P., Abrahão, J., & Ferrarese-Filho, O. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, *19*(4), 865-906. https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2

Mathew, R., & Sankar, P. D. (2012). Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. *African Journal of Biotechnology*, *11*(21), 4759 .

Mehrabani, M ,.Roholahi, S., & Foruomadi, A. (2005). Phytochemical studies of *Dracocephalum polychaetum* Bornm. *Journal of Medicinal Plants*, *4*(16), 36-42 .

Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in

plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, *19*, e00273. https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273

Morimoto, S., Goto, Y., & Shoyama, Y. (2004). Production of Lithospermic Acid B and Rosmarinic Acid in Callus Tissue and Regenerated Plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Natural Products - J NAT PROD*, *57*. https://doi.org/10.1021/np50108a020

Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, *1*(1), 69-79 .

Purwianingsih, W., Febri, S., & Kusdianti. (2016). Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariefolium* as alternative provision medicine. *AIP Conference Proceedings*, *1708*(1). https://doi.org/10.1063/1.4941150

Rahmati, E., Khoshtaghaza, M. H., Banakar, A., & Ebadi, M. T. (2022). Decontamination technologies for medicinal and aromatic plants: A review. *Food Science and Nutrition*, *10*(3), 784-799. https://doi.org/10.1002/fsn3.2707

Rahmati, M., Golkar, P., & Tarkesh, M. (2023). Effects of methyl jasmonate elicitation on the carvone and limonene contents, phenolic compounds and antioxidant activity in caraway (*Carum carvi* L.) callus cultures. *Natural Product Research*. https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2169862

Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *113*(3), 459-467. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0287-1

Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2479. https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2479

Rubio, E., vera reyes, I., Sepúlveda, E., Ramos-Valdivia, A., & Trejo-Tapia, G. (2021). Secondary metabolite production and related biosynthetic genes expression in response to methyl jasmonate in *Castilleja tenuiflora* Benth. *in vitro* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *144*, 1-14. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01975-3

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, 299, 152-178). https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Sohn, S. I., Pandian, S., Rakkammal, K., Largia, M. J. V., Thamilarasan, S. K., Balaji, S., Zoclanclounon, Y. A. B., Shilpha, J., & Ramesh, M. (2022). Jasmonates in plant growth and development and elicitation of secondary metabolites: An updated overview. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 942789. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942789

Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., & Benakashani, F. (2020). Callogenesis optimization and cell suspension culture establishment of *Dracocephalum polychaetum* Bornm. and *Dracocephalum kotschyi* Boiss.: An *in vitro* approach for secondary metabolite production. *South African Journal of Botany*, *132*, 79-86. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.015

Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M.,

& Ghanati, F. (2019) .Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in *Dracocephalum polychaetum* Bornm. cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic field elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *136*(3), 489-498. https://doi.org/10.1007/s11240-018-01530-1

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *12*, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004

Vergara-Martínez, V. M., Estrada-Soto, S. E., Valencia-Díaz, S., Garcia-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L. M., de Jesús Arellano-García, J., & Perea-Arango, I. (2021). Methyl jasmonate enhances ursolic, oleanolic and rosmarinic acid production and sucrose induced biomass accumulation, in hairy roots of *Lepechinia caulescens*. *PeerJ*, *9*. https://doi.org/10.7717/peerj.11279

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2-20. https://doi.org/10.1093/mp/ssp106

Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, *2*(1), 5. https://doi.org10-1186/s40643-014-0033-5

Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*(5), 308-314. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.005

Yazdanian, E., Golkar, P., Vahabi, M., & Taghizadeh, M. (2022). Elicitation effects on some secondary metabolites and antioxidant activity in callus cultures of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse.: methyl jasmonate and putrescine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *194*, 601-619. https://doi.org/10.1007/s12010-021-03643-4

Yu, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, X., Lang, D., & Zhang, X. (2018). The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Functional Plant Biology*, *46*(3), 197-212 .https://doi.org/10.1071/FP18106

Zhang, X., & Liu, C.-J. (2015). Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. *Molecular Plant*, *8*(1), 17-27. https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.001

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*, *17*(1). https://doi.org/10.1177/1934578x211069721

Złotek, U., Szymanowska, U., Karaś, M., & Świeca, M. (2016). Antioxidative and anti-inflammatory potential of phenolics from purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves induced by jasmonic, arachidonic and β-aminobutyric acid elicitation. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(1), 163-170. https://doi.org/10.1111/ijfs.12970