

تحریک تولید ترکیبات فنولی در کشت سلولی آویشن شیرازی

Zataria multiflora Boiss.) تحت تیمار سالیسیلیک‌اسیدخدیدجه باوی^{۱*}، رمضانعلی خاوری نژاد^۱، فرزانه نجفی^۱ و فائزه فغانی^۲^۱ ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۰

چکیده

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) با داشتن ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی، دارای طیف وسیعی از ویژگی‌های بیولوژیکی است. القای متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت سلولی توسط محرک‌ها یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها برای بهبود تولید ترکیبات ارزشمند دارویی است. در مطالعه حاضر رده سلولی آویشن شیرازی در محیط کشت B5 بنیان‌گذاری و سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی به مدت سه روز تحت تیمار سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های ۰، ۹۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار قرار گرفتند و فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی و آنتی‌اکسیدان، محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و نیتریک اکسید (NO) و همچنین میزان ترکیبات فنولی توسط اسپکتروفتومتر و HPLC تعیین شد. سالیسیلیک‌اسید، منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، همچنین محتوای NO و H_2O_2 گردید. در غلظت‌های ۹۰ و ۱۸۰ میکرومولار، فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانیل‌آمینوآسیل‌آز (PAL) در حدود ۱/۲ برابر، تیروزین‌آمونیاک‌آز (TAL) در حدود ۱/۴-۱/۳ برابر، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) در حدود ۱/۷-۱/۵ برابر افزایش یافت. همچنین محتوای فنول کل در این غلظت‌ها برترتیب ۵/۷۹ و ۴/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در مقایسه با گروه شاهد افزایش نشان داد. در کشت‌های سلولی آویشن شیرازی، در غلظت‌های مختلف بکار رفته، محتوای ۴- هیدروکسی بنزوئیک اسید، بنزوئیک اسید، اپی کاتکین و سیرینجیک اسید افزایش یافت. بنظر می‌رسد که کشت سلولی آویشن شیرازی و استفاده از محرک غیر زیستی سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های مناسب می‌تواند بعنوان یک سیستم کارآمد برای تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، سالیسیلیک‌اسید، نیتریک‌اکسید، ترکیبات فنولی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۱۶۶۰۲۴، پست الکترونیکی: std_bavi@khu.ac.ir

مقدمه

(۳۸، ۴۳ و ۴۴). کشت سلول، بافت و اندام گیاهی، تکنولوژی جذاب و پایدار برای افزایش بیوسنتز ترکیبات ثانویه با ارزش، بدون نیاز به برداشت بیش از حد گیاهان از زیستگاه‌های طبیعی آنها می‌باشد (۲۰). استفاده از محرک‌های مختلف زیستی و غیر زیستی یک استراتژی مؤثر و مفید برای افزایش تولید و انباشت متابولیت‌های با ارزش دارویی می‌باشد که با کاهش زمان لازم برای

گیاهان یک منبع تجدید پذیر بالقوه از ترکیبات زیستی فعال هستند. این ترکیبات منبع ارزشمندی از داروها، سموم دفع آفات، مواد طعم‌دهنده و معطر و افزودنی‌های غذایی هستند. سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه، از جمله ترکیبات فنولی بخشی از پاسخ دفاعی گیاهان در برابر حملات گیاه‌خواران، حشرات، عوامل بیماری‌زا و اشعه ماورای بنفش جهت بقا، سازگاری و رقابت با آنها می‌باشد

علامت رسان است که بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک مهم گیاه مانند رشد، تمایز و متابولیسم را تنظیم می‌کند (۲۹). این ترکیب فنولی قادر است با تحریک بیان ژن‌ها در فعال‌سازی بسیاری از مکانیسم‌های دفاعی در گیاه نقش کلیدی ایفا کند (۴۶). در تحقیقات متعددی مشخص شده است که می‌توان از سالیسیلیک اسید بعنوان یک محرک غیر زیستی برای تحریک مقاومت به عوامل بیماری‌زا و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند تانن‌ها در کشت‌های سلولی *Salvia miltiorrhiza*، آنتوسیانین در کشت کالوس *Daucus carota*، کلروژنیک اسید و مشتقات آن در کشت سلولی *Gardenia jasminoides* و محتوای فنولی و فلاونوئیدها در کشت سلولی *Orostachys cartilaginosa* استفاده کرد (۲۹، ۳۷، ۴۶ و ۴۸).

Zataria multiflora معروف به آویشن شیرازی، گیاهی معطر و با ارزش دارویی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که در افغانستان، پاکستان و مناطق مرکزی و جنوبی ایران رشد می‌کند. این گیاه چند ساله بدلیل محتوای بالای متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها و ترکیبات تریپنوییدی در طب سنتی کاربرد فراوان داشته است (۴۷). تحقیقات زیادی در زمینه خواص بیولوژیکی و دارویی عصاره و اسانس گیاه آویشن شیرازی شامل فعالیت‌های ضد قارچی، ضد باکتری، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و سیمت‌زایی بر سلول‌های سرطانی صورت گرفته است (۲۵ و ۴۰). از آنجایی که گزارش‌های کمی در مورد افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از محرک‌های مختلف در کشت سلول‌های *Z. multiflora* ارائه شده است، در تحقیق حاضر اثر سالیسیلیک اسید بر پروفایل ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوستنز ترکیبات فنولی، فنیل‌آلانین‌آمونیاپاز (PAL) و تیروزین آمونیاپاز (TAL) در کشت سلولی این گونه مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین محتوای مولکول‌های علامت رسان NO و H₂O₂ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

بدست آوردن غلظت‌های بالایی از این ترکیبات و افزایش سرعت تولید آنها همراه است (۹). تحریک سلول‌ها بطور گسترده‌ای در کشت‌های تعلیقی سلول‌های گیاهی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط آزمایشگاهی یا القای ژن‌های درگیر در بیوستنز متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است (۲۶ و ۳۴). در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که اثرات محرک‌های زیستی و غیر زیستی بر روی گیاهان بسته به نوع گیاه، غلظت محرک بکار رفته، شرایط کشت، مدت زمان تیمار و ترکیب مواد مغذی متفاوت است. محرک‌های مختلف زیستی و غیر زیستی مانند کیتوزان، کیتین و عصاره مخمر، اشعه UV، میدان مغناطیسی، نانو ذرات نقره با القای مکانیسم‌های دفاعی منجر به بیوستنز و انباشت ترکیبات ثانویه می‌گردند (۴، ۸ و ۲۳). این محرک‌ها با تنظیم میزان بیوستنز، تجمع و یا انتقال واکوئلی متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۳ و ۴۴). محرک‌های مختلف می‌توانند با ایجاد تنش اکسیداتیو منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، القای مسیرهای انتقال علامت و در نهایت تولید متابولیت‌های ثانویه شوند. گونه‌های فعال اکسیژن بویژه پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در غلظت‌های پایین از طریق القای بیان ژن‌های خاص و تولید متابولیت‌های ثانویه بعنوان یک مولکول علامتی در پاسخ‌های سلول به تنش‌های زیستی و غیر زیستی عمل می‌کند. غلظت‌های بیشتر ROS بعنوان یک عامل سمی می‌تواند باعث تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاهای سلولی گردد (۲۴). هموستازی ROS از طریق القای فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مانند ترکیبات فنولی برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو تنظیم می‌شود (۴۱). همچنین مولکول نیتریک اکساید (NO) یکی از علامت‌رسان‌های مهم در القای بسیاری از پاسخ‌های دفاعی است. مطالعات فراوانی نشان‌دهنده نقش محرک‌های مختلف بر تولید این مولکول علامتی می‌باشند (۳). سالیسیلیک اسید (۲- هیدروکسی بنزوئیک اسید) مولکول

مواد و روشها

جمع‌آوری و کشت بذر: بذرهای *Z. multiflora* از جمعیت گیاهان در حال رشد وحشی در منطقه کوهپایه (ارتفاع ۲۰۰۰ متر) واقع در استان کرمان در منطقه جنوب شرقی ایران جمع‌آوری شدند. نمونه گیاهی با شماره هرباریومی ۴۴۷۷ در مرکز تحقیقات منابع طبیعی و کشاورزی استان کرمان قرار گرفت. بذرها پس از شستشو با آب مقطر، در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ (w/v) با چند قطره Tween 20 به مدت ۵ دقیقه استریل شدند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل. در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفته و در پایان با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرها روی محیط (Murashige and MS (Skoog حاوی ۶/۵ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز قرار داده شد و در یک دوره رشد ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اطاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از گیاهچه‌های حاصل برای ایجاد قطعات جداگشت و کشت بافت استفاده شد.

القای تولید کالوس و راه‌اندازی کشت سلولی: بمنظور ایجاد کالوس، ریز نمونه‌های برگ‌ی از گیاهچه‌های ۳۰ روزه به محیط کشت B5 حاوی ۱/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزین آدنین (BA)، ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۷٪ درصد با pH ۵/۶ منتقل شد. بعد از گذشت دو هفته القای کالوس در ریز نمونه‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد. واگشت کالوس‌ها هر چهار هفته یک‌بار در محیط جامد صورت گرفت (شکل ۱ الف). پس از یک ماه لاین مناسبی از سلول‌های هم شکل با سرعت رشد یکسان برای انجام آزمایش‌ها بدست آمد که از سرعت تکثیر مناسبی برخوردار بودند. برای راه‌اندازی کشت سلولی مایع، مقدار سه گرم از کالوس‌های نرم و شکننده بعد از ۲۰ بار واگشت به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع B5 حاوی ۱/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک

اسید (NAA)، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزین آدنین (BA) و ساکارز ۳ درصد انتقال یافت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی روی شیکر قرار گرفتند. کشت تعلیقی سلول‌های آویشن شیرازی بر اساس منحنی رشد و زمان بدست آمده در دوره رشد لگاریتمی هر هفته یک‌بار و به مدت ۸ هفته واگشت شدند (شکل ۱ ب و ج).

تیماردهی: محرک غیر زیستی سالیسیلیک اسید در غلظت های ۱۸۰،۹۰،۰ و ۳۶۰ میکرومولار بعد از استریل شدن با فیلتر سر سرنگی (با اندازه ۰/۲۲ μm)، هفت روز پس از واگشت (مرحله رشد لگاریتمی) به سلول‌های کشت تعلیقی اضافه شدند. سه روز پس از اعمال تیمار و بمنظور انجام آزمایش‌های موردنظر، سلول‌ها جمع‌آوری و به سرعت در نیتروژن مایع منجمد شدند. همه آزمایش‌ها در چهار تکرار صورت گرفتند.

اندازه‌گیری رشد سلولی: سلول‌ها با استفاده از کیف بوخنر و در شرایط مکش، از محیط کشت مایع جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و رشد سلولی تعیین شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی: بمنظور سنجش محتوای مالون دی آلدئید (MDA) بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، ۰/۲ گرم از توده سلولی در ۳ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱٪ (TCA) سائیده شد. مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک محلول در ۲۰٪ TCA مخلوط گردید. مخلوط حاصله در حمام آب‌گرم در دمای ۹۵ °C درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت قرار داده شد و سپس سریع سرد گردید. میزان جذب نوری مخلوط در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. محتوای MDA با استفاده از

طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. از گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد جهت تعیین محتوای فنول کل استفاده شد و در نهایت فنول کل به حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان گردید (۳۵).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز، مقدار ۰/۲ گرم از سلول‌های منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH ۶/۸) به صورت هموژن درآمد. مخلوط حاصل سپس در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای تعیین غلظت پروتئین موجود در سلول‌ها و سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده گردید. غلظت پروتئین به روش برادفورد تعیین گردید (۷). مخلوط واکنش شامل ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۲۲۵ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH ۶/۸) و ۲۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ده میلی‌مولار تهیه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه پراکسید هیدروژن و در نتیجه کاهش میزان جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده و به ازای میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی محاسبه گردید (۱۰).

تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز: جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار ۰/۲ گرم از سلول‌های منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با pH ۶/۱ سائیده شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰°C سانتریفوژ گردید. از بخش رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH ۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی بود. بلافاصله پس از افزودن عصاره، جذب نمونه‌ها در طول زمان یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید و فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان شد (۲۸).

ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید (۲۱).

سنجش مقدار نیتریک اکساید: جهت تعیین مقدار NO، ۰/۲ گرم توده سلولی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم در pH ۷ استخراج شد و در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴°C سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی همراه با ۷۵۰ میکرولیتر فسفات پتاسیم و ۵۰۰ میکرولیتر معرف گریس (1% sulfanilamide and 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) در دمای اتاق برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد (۱۸). جذب نوری نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شد و مقدار NO با استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش پراکسید هیدروژن: بمنظور اندازه‌گیری محتوای H_2O_2 ، ۰/۱ گرم بافت تر در ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد روی یخ سائیده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH ۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. مقدار H_2O_2 تولید شده در نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد (۴۵).

سنجش محتوای فنول کل: جهت سنجش محتوای فنول کل، ۰/۲ گرم از توده سلولی (وزن تر) در متانول هموژنیزه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. با افزودن ۳ میلی‌لیتر اتیل‌استات به محلول رویی، فاز فنولی جدا شده و بعد از تبخیر اتیل‌استات، رسوب حاصله در اتانول ۷۵٪ (v/v) حل گردید. جذب نوری نمونه‌ها در

فعالیت آنزیم PAL، مقدار ۰/۲ گرم توده سلولی در ۳ میلی‌لیتر بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار حاوی ۱۵ میلی‌مولار β مرکاپتواتانول در pH ۸/۲) هموزن گردید و مخلوط حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. یک میلی‌لیتر بافر استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر L-فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. مخلوط واکنش توسط ۰/۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار متوقف و اسید سینامیک توسط اتیل استات استخراج شد. سپس اتیل استات تبخیر و باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار حل و جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL بطور مشابه با آنزیم PAL انجام شد، با این تفاوت که از L-تیروزین ۰/۱ مولار به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده و جذب نمونه‌ها در ۳۲۰ نانومتر بررسی شد. فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL بترتیب بر حسب میکرومول اسید سینامیک و p کوماریک اسید در میلی‌گرم پروتئین در ساعت تعیین شد.

سنجش ترکیبات فنولی به روش HPLC: برای بررسی میزان اسیدهای فنولی از دستگاه HPLC مدل (Waters, USA e2696) استفاده شد. ۰/۱ گرم از نمونه خشک سلولی (freeze dry) با ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱٪ بطور کامل همگن شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و محلول رویی بعد از جدا شدن توسط هوادهی خشک شد. پس از تبخیر حلال در دمای اتاق به رسوب خشک حاصله ۳۵۰ میکرولیتر متانول خالص اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. محلول فوقانی برای انجام HPLC با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ μ M میکرون صاف گردید. برای شستشوی ستون از یک برنامه زمانی با شیب خطی استفاده شد. فاز متحرک شامل دو سیستم محلول A شامل متانول

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: ۰/۲ گرم از سلول منجمد شده در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷/۸) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA عصاره‌گیری و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ °C سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل بافر HEPES-KOH با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH ۷/۸ حاوی EDTA با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم (NBT) با غلظت ۷۵ میکرومولار و کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۱۰/۲)، ریوفلاوین ۱ میکرومولار، L-متیونین ۱۲ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی بود. میزان جذب نوری در لوله‌های محتوی مخلوط واکنش قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض نور فلورسنت در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم در میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان گردید (۱۵).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: برای استخراج پلی‌فنل‌اکسیداز، ۰/۲ گرم توده سلولی منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار (pH ۶/۸) در هاون روی یخ تا همگن شدن نمونه‌ها ساییده شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم PPO استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم (۲۰ mM, pH ۶/۵)، ۴ میلی‌مولار عصاره آنزیمی بود. جذب نمونه‌ها در طول زمان یک دقیقه در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیم برحسب میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۲۲).

سنجش فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL: فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL بر اساس روش Beudoin-Thorpe و Eagan انجام شد (۶). برای اندازه‌گیری

۳۶۰ میکرومولار مشاهده شد و رشد سلولی بترتیب ۱۲/۳۸٪ و ۲۷/۴۱٪ در مقایسه با گروه شاهد کاهش نشان داد (شکل ۲).

تعیین محتوای MDA، H₂O₂ و NO: نتایج نشان داد که تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۹۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی سلول و مقدار MDA در مقایسه با گروه شاهد گردید (بترتیب ۱۳۶٪، ۱۳۶٪ و ۱۱۸٪) (شکل ۳ الف). مقدار H₂O₂ در سلول‌های تیمار داده شده با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد و بیشترین مقدار H₂O₂ در غلظت ۹۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد (شکل ۳ ب). همچنین محتوای NO در غلظت‌های ۹۰ و ۱۸۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری را در حدود ۱۳۵٪ و ۱۱۸٪ به ترتیب نسبت به گروه شاهد نشان داد (شکل ۳ ج).

اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم SOD افزایش معنی‌داری را در غلظت‌های بکار رفته ۹۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار نشان داد. بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۹۰ میکرومولار در حدود ۱/۵ برابر و در غلظت‌های ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد در حدود ۱/۲ برابر افزایش نشان داد (جدول ۱). با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم CAT در مقایسه با گروه شاهد بطور معنی‌داری افزایش نشان داد و بیشترین میزان افزایش فعالیت در غلظت ۳۶۰ میکرومولار مشاهده شد، بطوریکه در این غلظت فعالیت آنزیم ۲/۷ برابر در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (جدول ۱). همچنین فعالیت آنزیم POX در سلول‌های تیمار شده افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. در غلظت ۹۰ میکرومولار، فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲/۶ برابر و در غلظت‌های ۱۸۰ و ۳۶۰

خالص و محلول B حاوی آب اسیدی ۳٪ (V/V) بود. جذب متابولیت‌های ثانویه با استفاده از آشکارساز فرابنفش (UV) در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. اندازه‌گیری ترکیبات فنولی به کمک مقایسه زمان بازداری نمونه‌ها با ماده استاندارد (Sigma-Aldrich) و محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام حاصل از HPLC با استفاده از منحنی استاندارد صورت گرفت (۵).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. جهت تحلیل داده‌ها و رسم منحنی‌های مربوطه از نرم‌افزار Excel و SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج

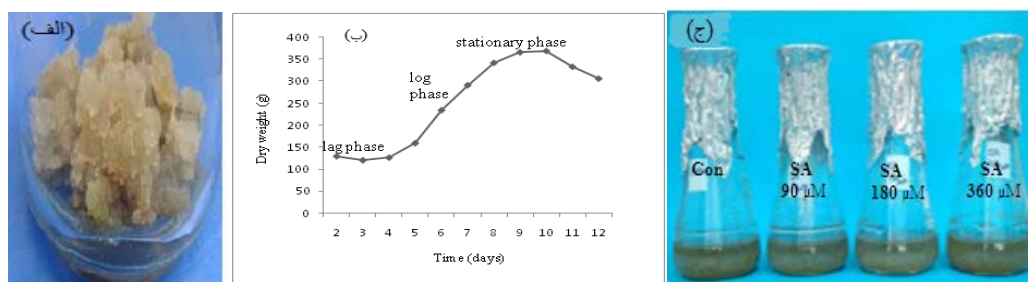
ترسیم منحنی رشد و بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر رشد سلولی: بمنظور بررسی زمان مناسب برای افزودن تیمار سالیسیلیک اسید، از منحنی رشد بدست آمده از سلول‌های آویشن شیرازی استفاده گردید. منحنی رشد نشان داد که سلول‌ها در ۳-۴ روز اول رشد کندی دارند (فاز تأخیری). رشد تصاعدی این سلول‌ها مطابق با روز ۴ تا ۱۰ پس از واکشت یعنی در فاز لگاریتمی می‌باشد (شکل ۱ ب). در این مرحله شیب رشد سلول‌ها افزایش یافته و به شدت سلول‌ها در حال تقسیم هستند. زمان مناسب تیماردهی با استفاده از منحنی رشد کشت تعلیقی سلول‌های آویشن شیرازی تیمار داده شده در روز هفتم از مرحله لگاریتمی انتخاب شد. سلول‌ها به مدت سه روز تحت تیمار قرار گرفتند. در تحقیق حاضر آنالیز اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر رشد سلولی با استفاده از وزن خشک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، رشد سلولی کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. بیشترین کاهش در رشد در غلظت‌های ۱۸۰ و

تعیین پروفایل متابولیت های ثانویه: سالیسیلیک اسید باعث القای متابولیت های ثانویه مانند ۴- هیدروکسی بنزوئیک اسید، اسید بنزوئیک، اپی کاتکین و اسید سیرنجیک در کشت‌های سلولی آویشن شیرازی گردید. محتوای اسید سینامیک و p- کوماریک اسید در حضور همه غلظت های اسید بطور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. در غلظت های ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید القای تولید اپی کاتکین ($10 \pm$) ۱۱۲/۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و آپیزین ($2 \pm$) ۲۵/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک) بترتیب در غلظت های ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد (جدول ۲). بیشترین مقدار رزوسینول (0.1 ± 61.7) میکروگرم بر گرم وزن خشک)، ۴- هیدروکسی بنزوئیک اسید (0.4 ± 43.9) میکروگرم بر گرم وزن خشک) و اسید سیرنجیک (3 ± 74.7) میکروگرم بر گرم وزن خشک) در غلظت ۱۸۰ میکرومولار مشاهده شد. محتوای گالیک اسید در غلظت ۹۰ میکرومولار بطور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد ۴/۹ برابر افزایش نشان داد (جدول ۲)

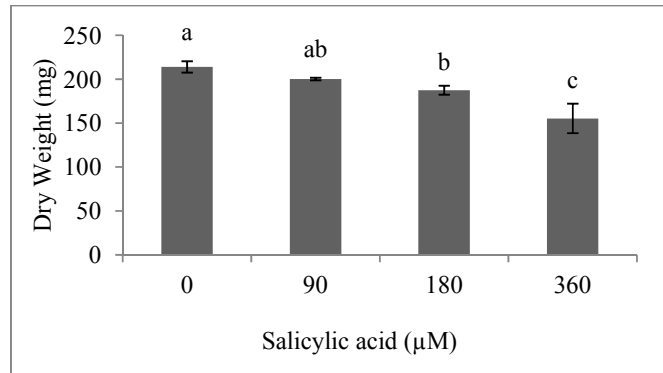
میکرومولار فعالیت آنزیم در مقایسه با گروه شاهد در حدود ۲ برابر افزایش یافت (جدول ۱).

فعالیت آنزیم‌های PAL، TAL و PPO: تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت های ۹۰ و ۱۸۰ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئیدی، PAL و TAL گردید. فعالیت آنزیم PAL در این غلظت‌ها در مقایسه با گروه شاهد در حدود ۱/۲ برابر و فعالیت آنزیم TAL در حدود ۱/۴-۱/۳ برابر افزایش نشان داد. همچنین در این غلظت‌ها فعالیت آنزیم PPO در حدود ۱/۷-۱/۵ برابر افزایش نشان داد (جدول ۱).

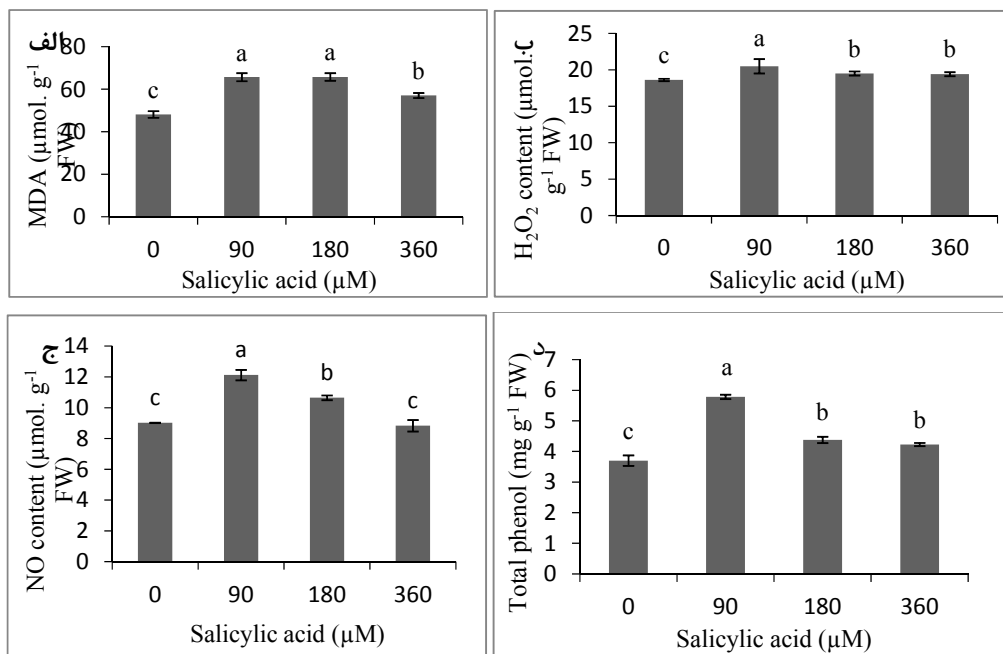
تعیین محتوای فنول کل: تیمار سلول‌های آویشن شیرازی با سالیسیلیک اسید، محتوای فنول کل را افزایش داد. بیشترین افزایش در محتوای فنول کل در غلظت ۹۰ میکرومولار (0.12 ± 5.79) میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در غلظت های ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار بترتیب میزان فنول کل 0.17 ± 4.38 و 0.09 ± 4.23 میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش نشان داد که این افزایش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳ د).



شکل ۱- تشکیل کالوس نرم و شکننده آویشن شیرازی *Z. multiflora* در محیط کشت جامد B5، محتوی ۱/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بعد از ۲۰ واکشت (الف)، منحنی رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی آویشن شیرازی در محیط کشت B5 مقادیر نشان داده شده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد (ب)، سوسپانسیون سلولی از سلول‌های آویشن شیرازی تیمار داده شده با سالیسیلیک اسید در محیط کشت مایع B5، محتوی ۱/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در مرحله لگاریتمی رشد (ج).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر رشد در سلول‌های *Z. multiflora* پس از سه روز از تیمار. مقادیر نشان داده شده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ هستند.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر محتوای MDA (الف)، H₂O₂ (ب)، NO (ج) و فنول کل (د) در سلول‌های *Z. multiflora* پس از سه روز از تیمار. مقادیر نشان داده شده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ هستند.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مسیر فنیل پروپانوییدی در سلول‌های *Z. multiflora* پس از سه روز از تیمار. مقادیر نشان داده شده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ هستند.

Salicylic acid (μM)	CAT (ΔAbs 240/mg protein)	POX (ΔAbs 470/mg protein)	SOD (U/mg protein)	PPO (ΔAbs 410/mg protein)	PAL (μmolcinna mic.acid/mg protein./h)	TAL (μmol coumaric acid/mg protein/h)
0	42.92±1.76 ^d	10.92±2.24 ^c	78.54±1.04 ^c	2.69±0.31 ^c	1.57±0.03 ^c	0.44±0.01 ^b
90	62.13±0.81 ^c	28.25±1.23 ^a	114.44±5.51 ^a	4.08±0.10 ^b	2.05±0.03 ^b	0.55±0.04 ^a
180	67.62±2.22 ^b	22.84±1.13 ^b	90.35±0.79 ^b	4.57±0.23 ^a	2.15±0.02 ^a	0.53±0.02 ^a
360	113.80±1.52 ^a	21.41±1.05 ^b	88.42±3.55 ^b	6.02±0.10 ^d	1.33±0.02 ^d	0.41±0.01 ^b

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر محتوای متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های *Z. multiflora* پس از سه روز از تیمار. مقادیر نشان داده شده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ هستند.

Phenolic Compound ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	Salicylic acid (μM)			
	Control	90	180	360
Apigenin	ND	ND	ND	25.9 \pm 2 ^a
Epicatechin	ND	ND	112.5 \pm 10 ^a	ND
ρ -Coumaric acid	7 \pm 0.1 ^a	ND	5.2 \pm 0.5 ^b	3.3 \pm 0.5 ^c
Cinnamic acid	56 \pm 1 ^a	24.3 \pm 4 ^b	21.3 \pm 0.1 ^c	19.6 \pm 0.2 ^c
Gallic acid	8 \pm 0.4 ^b	39 \pm 2 ^a	ND	ND
Resosinol	26 \pm 0.3 ^b	25.1 \pm 0.2 ^b	61.7 \pm 0.1 ^a	17.5 \pm 0.3 ^c
4-Hydroxy benzoic acid	ND	10.5 \pm 0.5 ^b	43.9 \pm 0.4 ^a	9.5 \pm 0.1 ^c
Syringic acid	ND	25.3 \pm 7 ^c	74.7 \pm 3 ^a	45.9 \pm 0.2 ^b
Benzoic acid	ND	1.1 \pm 0.05 ^c	4.6 \pm 0.1 ^b	4.9 \pm 0.2 ^a

ND: Non detected

باعث سمیت در سلول و تخریب غشاهای سلولی و سایر ماکرو مولکول‌ها مانند DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌شوند (۲۴). بر این اساس میزان این ترکیبات در سلول باید به شدت کنترل شود. سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات غیر آنزیمی این عملکرد مهم را بر عهده‌دارند (۳۳). در پژوهش حاضر، تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف منجر به افزایش معنی‌داری در محتوای H_2O_2 گردید که در غلظت ۹۰ میکرومولار به بیشترین حد خود رسید. این میزان با تغییرات MDA مطابق بوده و با افزایش مقدار H_2O_2 پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی افزایش یافته است. در مقابل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، CAT، POX نیز با افزایش غلظت تیمار سالیسیلیک اسید با الگوهای مختلف افزایش پیدا کرد (جدول ۲). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مکانیسمی برای کنترل سطح مولکول‌های ROS بوده و مانع از تخریب سلول‌ها و مرگ آن‌ها می‌شود. همچنین سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه با تنظیم سطح مولکول علامت رسان H_2O_2 می‌تواند در القای مسیرهای بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه نقش داشته باشد. NO بعنوان یک مولکول کلیدی می‌تواند در تحمل تنش اکسیداتیو توسط سلول‌های گیاه نقش داشته باشد. بنظر می‌رسد که این مولکول از طریق افزایش بیان ژن‌های کد کننده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، POX و

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در کشت سلولی آویشن شیرازی با افزایش غلظت تیمار سالیسیلیک اسید، رشد سلولی کاهش می‌یابد. بنظر می‌رسد که محرک‌های مختلف با اثر بر تقسیم سلولی و توقف چرخه سلولی در مرحله G1 منجر به کاهش تعداد سلول‌ها و در نتیجه توقف یا کاهش رشد سلول می‌گردند (۳۱). همچنین با توجه به شکل‌های ۲ و ۳ می‌توان نتیجه گرفت که کاهش رشد می‌تواند در اثر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی تحت تأثیر تیمار با سالیسیلیک اسید باشد. میزان MDA بعنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و شاخص بیوشیمیایی تنش اکسیداتیو، افزایش معنی‌داری را در غلظت‌های مختلف بکار رفته در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (شکل ۳). بنظر می‌رسد که غلظت‌های مختلف تیمار سالیسیلیک اسید با ایجاد تنش اکسیدتیو و تولید ROS منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و در نتیجه کاهش رشد سلولی شده‌اند (۱۴).

H_2O_2 و NO بعنوان مولکول‌های علامت رسان نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان و تنظیم پاسخ‌های دفاعی بویژه تولید متابولیت‌های ثانویه دارند (۱۲). مولکول‌های ROS بویژه H_2O_2 در غلظت‌های پایین بعنوان مولکول‌های علامت‌رسان در راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی سلول نقش دارند، درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر

نقش داشته باشند (۴۱). بر این اساس، افزایش در فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL به موازات افزایش در محتوای NO و H_2O_2 در غلظت‌های ۹۰ و ۱۸۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید می‌تواند تائید کننده این اثر در کشت سلولی آویشن شیرازی باشد (شکل ۳). فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بعنوان اکسید کننده ترکیبات پلی فنولی مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات نشان می‌دهند که این آنزیم در تقویت سیستم ایمنی گیاهان در برابر محرک‌ها و تنش‌ها نقش ایفا می‌کند (۱۱). در همه غلظت‌های بکار رفته تیمار سالیسیلیک اسید، فعالیت این آنزیم نیز افزایش پیدا کرد. بنظر می‌رسد که این افزایش فعالیت بعنوان یک پاسخ دفاعی برای به حداقل رساندن تولید و اثرات مخرب ROS در سلول‌ها باشد (۴۲). القا و افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL منجر به افزایش ترکیبات فنولی می‌شود. ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند سلول‌ها را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کنند (۳۲). همچنین این ترکیبات دارای خواص دارویی زیادی برای انسان هستند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که محرک‌های مختلف زیستی و غیر زیستی منجر به افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی، ریشه‌های مویین و کالوس می‌گردند (۱، ۲ و ۱۷). رضایی و همکاران در بررسی تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر کشت سلولی *Taxus baccata* نشان دادند که غلظت ۳۶۰ میکرومولار منجر به افزایش ۶/۱ برابری تولید تاکسول می‌گردد (۳۹). سالیسیلیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در کشت سلولی *Orostachys cartilaginosa* باعث القای تولید فنولیک اسید و فلاونوئیدها (۴۶) و در *Gardenia jasminoides* منجر به تولید اسید کلروژنیک و مشتقات آن گردید (۲۹). غلظت ترکیبات فنولی در سلول‌های تحت تیمار آویشن شیرازی در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید پاسخ‌های متفاوتی را نشان دادند. سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف باعث القای

در جهت تنظیم عملکرد و سمیت پراکسید هیدروژن عمل می‌کند (۱۶ و ۳۶). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که NO می‌تواند به صورت مستقیم بر فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات فنولی نقش داشته باشد (۲۷). در این مطالعه مشاهده شد که غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در سلول‌های گیاه آویشن شیرازی منجر به افزایش سطح NO شدند. بنظر می‌رسد که این افزایش در سطح مولکول‌های علامت‌رسان می‌تواند در ارتباط با تنظیم حالت اکسیداتیو، جهت‌گیری سلول‌ها به سمت القای پاسخ‌های دفاعی و فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوییدی در سلول‌های تحت تیمار باشد. Gue و همکاران نیز افزایش در محتوای H_2O_2 و NO را در کشت‌های سلولی *Orostachys cartilaginosa* و *Salvia miltiorrhiza* تیمار شده با سالیسیلیک اسید گزارش کرده‌اند (۱۹ و ۴۶). دو آنزیم PAL و TAL نقطه ارتباط متابولیت‌های اولیه و مسیر فنیل پروپانوییدی محسوب می‌شوند و القای آن‌ها در برابر بسیاری از محرک‌های زیستی و غیر زیستی از اولین پاسخ‌های دفاعی سلول گزارش شده است. این دو آنزیم آمینواسیدهای فنیل آلانین و تیروزین را به اسیدهای فنولی سینامیک اسید و کوماریک اسید تبدیل می‌کنند. بدلیل داشتن این نقش کلیدی، این آنزیم‌ها نقطه‌ی تنظیمی مهمی در بیوستز ترکیبات فنولی محسوب شده و بسیاری عوامل تنظیمی و محرک‌ها بیان ژن و فعالیت آن‌ها را هدف قرار می‌دهند (۴۱ و ۴۲). بمنظور بررسی ارتباط بین القای ترکیبات فنولی و تیمار سالیسیلیک اسید، فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آن‌ها در راستای افزایش سطح محتوای فنول کل سلول‌های آویشن شیرازی در غلظت‌های ۹۰ و ۱۸۰ میکرومولار افزایش یافت. مطالعات نشان می‌دهد که مولکول‌های علامتی NO و H_2O_2 می‌توانند بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL تحت تأثیر قرار داده و از این طریق در هدایت متابولیت‌های اولیه به سمت تولید ترکیبات فنولی

می‌توان بیان کرد که با توجه به ترکیبات دارویی با ارزش موجود در گیاه بومی آویشن شیرازی، استفاده از تکنیک کشت سلول و استفاده از محرک سالیسیلیک اسید روش مؤثری برای افزایش تولید این ترکیبات می‌باشد و عوامل مختلف مانند غلظت محرک در انباشت ترکیبات فنولی مختلف نقش دارند. همچنین بنظر می‌رسد که مولکول‌های کلیدی NO و H₂O₂ همراه اثر تنظیمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند در القای تولید ترکیبات فنولی مانند اپی کاتکین، آپیزین، ۴- هیدروکسی بنزوئیک اسید، اسید بنزوئیک و اسید سرینجیک در کشت سلولی آویشن شیرازی تیمار شده با سالیسیلیک اسید نقش داشته باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه‌های خوارزمی و تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله، مراتب قدردانی خود را از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی و تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

اسیدهای فنولی ۴- هیدروکسی بنزوئیک اسید، اسید بنزوئیک و اسید سرینجیک در سلول‌های آویشن شیرازی گردید. بیشترین محتوی اسیدگالیک در غلظت ۹۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. القا تولید فلاونوئیدهای اپی کاتکین و آپیزین بترتیب در غلظت‌های ۱۸۰ و ۳۶۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشخص گردید و میزان سینامیک اسید و کوماریک اسید در مقایسه با نمونه شاهد در غلظت‌های مختلف کاهش یافت (جدول ۲). بر این اساس کاهش دو اسید فنولی ابتدایی مسیر فنیل پروپانوئیدی یعنی سینامیک و کوماریک اسید تحت تأثیر سالیسیلیک اسید بدلیل مصرف آن‌ها و تبدیل به سایر ترکیبات فنولی بوده است. بطور کلی بنظر می‌رسد برای افزایش ترکیبات فنولی مختلف با استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید غلظت‌های مختلفی مورد نیاز است چرا که هر کدام از ترکیبات در غلظت خاصی بیشترین مقدار را نشان داده‌اند. این پژوهش اولین گزارش در ارتباط با تعیین پروفایل ترکیبات فنولی در کشت سلولی آویشن شیرازی تحت تأثیر محرک سالیسیلیک اسید می‌باشد. بطور کلی

منابع

- ۱- جامی، س. اسمعیل زاده بهابادی، ص. و مدرس، م. (۱۳۹۷). تأثیر کیتوزان بر ریز ازدیادی، محتوی متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروک (*Salvia leriifolia* Benth.). مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۱، شماره ۳، صفحات ۵۶۸-۵۷۸.
- ۲- شاهرودی، ا. برنارد، ف. مینایی تهرانی، د. و حسنی، س.ب. (۱۳۹۹). اثر تحریکی سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی آمین اکسیداز در کالوس آویشن دناپی. مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۳، شماره ۱، صفحات ۱۴۷-۱۵۷.
- 3- Ahmad, P., Abdel Latif, A.A., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Gucel, S., Tran, L.S.P., 2016. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 7, PP: 347-357.
- 4- Balintova, M., Brunakova, K., Petijova, L., and Cellarova, E., 2019. Targeted metabolomic profiling reveals interspecific variation in the genus *Hypericum* in response to biotic elicitors. *Plant physiology and biochemistry*, 135, PP: 348-358.
- 5- Barreca, D., Lagana, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., and Bellocco, E., 2016. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls, *Food Chemistry*, 196, PP: 493-502.
- 6- Beaudoin-Eagan, L.D., and Thorpe, T.A., 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures, *Plant Physiology*, 78, PP: 438-441.
- 7- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, PP: 72, 248-254.

- 8- Cai, Z., Kastell, A., and Smetanska, I., 2014. Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus domestica* Borkh. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 89(1), PP: 93-99.
- 9- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., and Smetanska, I., 2012. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(3), PP: 401-409.
- 10- Cakmak, I., and Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant physiology, 98(4), PP: 1222-1227.
- 11- Constabel, C. P., and Barbehenn, R., 2008. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In induced plant resistance to herbivory (pp. 253-270). Springer, Dordrecht.
- 12- Falahi, H., Sharifi, M., Chashmi, N. A., and Maivan, H. Z., 2018. Water stress alleviation by polyamines and phenolic compounds in *Scrophularia striata* is mediated by NO and H₂O₂. Plant Physiology and Biochemistry, 130, 139-147.
- 13- Farag, M. A., Al-Mahdy, D. A., Meyer, A., Westphal, H., and Wessjohann, L. A., 2017. Metabolomics reveals biotic and abiotic elicitor effects on the soft coral *Sarcophyton ehrenbergi* terpenoid content. Scientific reports, 7(1), PP: 1-11.
- 14- Ganesan, V., and Thomas, G., 2001. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. Plant Science, 160(6), PP: 1095-1106.
- 15- Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant physiology, 59(2), PP: 309-31.
- 16- Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Macovei, A., and Tuteja, N., 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 63, PP: 254-261.
- 17- Gorelick, J., and Bernstein, N., 2014. Elicitation: an underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. Advances in agronomy, 124, PP: 201-230.
- 18- Green, L.C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, Analytical Biochemistry, 126, PP: 131-138.
- 19- Guo, H., Dang, X., and Dong, J., 2014. Hydrogen peroxide and nitric oxide are involved in salicylic acid-induced salivianolic acid B production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Molecules, 19(5), PP: 5913-5924.
- 20- Haida, Z., Syahida, A., Ariff, S. M., Maziah, M., and Hakiman, M., 2019. Factors affecting cell biomass and flavonoid production of *Ficus deltoidea* var. *kunstleri* in cell suspension culture system. Scientific reports, 9(1), PP: 1-8.
- 21- Heath, R.L., and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 125, PP: 189-198.
- 22- Heidarabadi, M. D., Ghanati, F., and Fujiwara, T., 2011. Interaction between boron and aluminum and their effects on phenolic metabolism of *Linum usitatissimum* L. roots. Plant Physiology and Biochemistry, 49(12), PP: 1377-1383.
- 23- Jamshidi, M., and Ghanati, F., 2017. Taxanes content and cytotoxicity of hazel cells extract after elicitation with silver nanoparticles. Plant physiology and biochemistry, 110, PP: 178-184.
- 24- Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H. Z., Behmanesh, M., and Chashmi, N. A., 2016. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry, 107, PP: 374-384.
- 25- Khazdair, M. R., Ghorani, V., Alavinezhad, A., and Boskabady, M. H., 2020. Effect of *Zataria multiflora* on serum cytokine levels and pulmonary function tests in sulfur mustard-induced lung disorders: A randomized double-blind clinical trial. Journal of Ethnopharmacology, 248, PP: 1-9.
- 26- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., and Thiem, B., 2012. Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L. Acta Physiologiae Plantarum, 34(6), PP: 2425-2433.
- 27- Kovacik, J., Grúz, J., Klejdus, B., Stork, F., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., 2010. Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H₂O₂ and NO in this process. Plant Science, 179, PP: 383-389.

- 28- Lin, J. S., and Wang, G. X., 2002. Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. *Plant Science*, 163(3), PP: 627-637.
- 29- Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shangguan, X. C., Peng, D. Y., Lu, T., and Lin, P., 2018. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(1), PP: 79-93.
- 30- Mendhulkar, V. D., and Vakil, M. M. A., 2013. Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology*, 4(2), PP: 1-9.
- 31- Mendoza, D., Cuaspuud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., and 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, PP: 1-9.
- 32- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), PP: 523-530.
- 33- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), PP: 405-410.
- 34- Naik, P.M., Al-Khayri, and J.M., 2016. Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants. Recent Advances and Future Perspectives*. PP: 247-277.
- 35- Pirie, A., Mullins, and M.G., 1976. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid, *Plant Physiology*, 58, PP: 468-472.
- 36- Qiao, W., Li, C., and Fan, L. M., 2014. Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 84-93.
- 37- Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., and 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, PP: 459-467.
- 38- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., and Palazon, J., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), PP: 182-205.
- 39- Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., and Mokhtari-Dizaji, M., 2011. Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(11), PP: 1938-1947.
- 40- Salehi, F., Behboudi, H., Kavooosi, G., and Ardestani, S.K., 2017. Monitoring ZEO apoptotic potential in 2D and 3D cell cultures and associated spectroscopic evidence on mode of interaction with DNA. *Scientific Reports*, 7, PP: 1-14.
- 41- Samari, E., Sharifi, M., Ghanati, F., Fuss, E., and Chashmi, N. A., 2020. Chitosan-induced phenolics production is mediated by nitrogenous regulatory molecules: NO and PAs in *Linum album* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140 (3), PP: 563-576.
- 42- Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., and 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), PP: 489-498.
- 43- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., and Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, PP: 1-12.
- 44- Vasconsuelo A., and Boland R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), PP: 861-875.
- 45- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*, 151(1), PP: 59-66.
- 46- Wen, T., Hao, Y. J., An, X. L., Sun, H. D., Li, Y. R., Chen, X., Piao, X. C. & Lian, M. L., 2019. Improvement of bioactive compound accumulation in cell cultures of *Orostachys cartilaginosa* A. Bor. through elicitation with salicylic acid and effect of cell extract on bioactive activity. *Industrial Crops and Products*, 139, 111570.

- 47- Zargari, A., 1990. Medicinal Plants, vol. 4. Tehran University Press, Tehran, PP: 1-57.
- 48- Zhao, J. L., Zhou, L. G., and Wu, J. Y., 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(1), 137-144.

Stimulation of phenolic compounds production in *Zataria multiflora* Boiss. cell suspension culture through salicylic acid elicitation

Bavi Kh.¹, Khavari-Nejad R.A.¹, Najafi F.¹ and Ghanati F.²

¹Dept. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

²Dept. of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Zataria multiflora is medicinal plant with a wide range of biological properties due to having phenolic and terpenoid compounds. Induction of secondary metabolites in plant cell culture systems by elicitors is one of the most important strategies to improve the production of medicinal metabolites. In the present study, a cell line was established from *Z. multiflora* in B5 medium and the effects of salicylic acid at 90, 180 and 360 μM on suspension-cultured cells was evaluated for 3 days in their logarithmic growth phase. The activity of phenylpropanoid biosynthetic pathway and antioxidant enzymes, the level of regulatory molecules hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) and also the amount of phenolic compounds were determined by spectroscopy and HPLC techniques. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) and also H_2O_2 and NO content increased in different concentration of elicitor. Salicylic acid at 90 and 180 μM concentrations significantly enhanced the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), about 1.2 fold, tyrosine ammonia-lyase (TAL), 1.3 - 1.4 fold and polyphenol oxidase (PPO), 1.5 - 1.7 fold as well as total contents of phenol (5.79 and 4.38 mg g^{-1} FW) compared to control, respectively. In addition, the production of 4-hydroxy benzoic acid, benzoic acid, epicatechin and syringic acid were induced in *Z. multiflora* at different concentrations of salicylic acid. This study indicates that *Z. multiflora* cell suspension culture combined with optimal concentrations of salicylic acid could be a useful and efficient system for sustainable production of valuable secondary metabolites.

Key words: *Zataria multiflora*, Salicylic acid, Nitric oxide, Phenolic compounds, Antioxidant enzymes