Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth

Ziba Ghasimi Hagh [1*], Somayyeh Jokar [1], Hojatollah Bodaghi [1], Masoomeh Modarres [2]
[1] Department of Horticulture science and plant protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Hasheminegad Campus, Farhangian University, Mashhad, Iran

Abstract
In this study, callus formation of *Salvia leriifolia* Benth by stem and leaf explants in the combination of NAA and 2,4-D with Kin and the effect of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors (50, 100, 150 mM) in callus on some secondary metabolites were studied. NAA in combination with Kin had no callus production in both of stem and leaf explants, while the most appropriate callus produced by leaf explant at a concentration of 1 mg/L Kin with 2 mg/L 2,4-D. The highest fresh and dry weight, total phenol and flavonoids content were observed in calluses treated with 100 µM of methylisammonate, however, with increasing salicylic acid concentration, fresh and dry weight, total phenol content, flavonoids, rosmarinic acid increased, and the highest content of rusamicin acid and caffeic acid was observed in calluses treated with 100 and 150 µM salicylic acid, respectively .According to the results, it is stated that, by optimizing the concentrations of the ellicetors, it is possible to produce the desired secondary metabolites of salvia in *in vitro* conditions.

Keywords: *Salvia leriifolia* B., salicylic acid, methyl jasmonate, rosemaric acid, caffeic acid

* Corresponding Author: zghasimi@shahroodut.ac.ir

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و پنجم، بهار ۱۳۹۷، صفحهٔ ۸۰-۶۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷ و ۹۷/۰۲/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵

تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت کالوس نوروزک (*Salvia lerrifolia* Benth.)

زیبا قسیمی حق [۱*]، سمیه جوکار [۱]، حجت اله بداقی [۱]، معصومه مدرس [۲]
[۱] گروه علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، پردیس شهید هاشمی نژاد، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

چکیده
در پژوهش حاضر، کالوس‌زایی گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) با جداکشت ساقه و برگ در ترکیب اکسین‌های ۱ – نفتالن استیک اسید (NAA) و2, 4-D با سیتوکینین Kin و سپس اثر الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار) در کالوس بر محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه بررسی شدند. ۱ – نفتالن استیک اسید با Kin در جداکشت ساقه و برگ کالوس‌زایی نکرد؛ درحالی‌که با جداکشت برگ در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D مناسب‌ترین کالوس تولید شد. بیشترین میزان وزن تر و خشک، محتوای فنل کل و فلاونوئید در کالوس‌های تیمارشده با ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات مشاهده شدند؛ باوجوداین با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، وزن تر و خشک، محتوای فنل کل، فلاونوئید، رزمارینیک اسید روند روبه‌افزایش داشتند و بیشترین مقدار رزمازینیک اسید و کافئیک اسید به‌ترتیب در کالوس‌های تیمارشده با سالیسیلیک اسید ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار مشاهده شدند. نتایج نشان دادند بهینه‌کردن غلظت الیسیتورها، بر تولید متابولیت‌های ثانویهٔ مدنظر در نوروزک در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر می‌گذارد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، سورگوم، فنیل آلانین آمونیا لیاز، کربوهیدرات‌ها، کمبود آهن، کمبود بور

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zghasimi@shahroodut.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۲۳۳۲۳۳۷۷۴۸

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) متعلق به خانوادهٔ نعناعیان (Lamiaceae) و گیاهی چندساله، علفی است که برگ و گل‌های معطر دارد و ازجمله گیاهان باارزش مناطق کویری ایران ازجمله استان خراسان رضوی و سمنان است. این گیاه از جنس مریم گلی (*Salvia*) است که ۹۰۰ گونهٔ آن در سراسر جهان شناسایی شده‌اند و حدود ۱۷ گونه از آنها بومی ایران هستند (Hedge, 1986). ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها از متابولیت‌های ثانویهٔ باارزش موجود در گیاه نوروزک هستند (Tabatabai Yazdi, 1995) که از این مواد، کافئیک اسید و رزمارینیک اسید با خواص آنتی‌اکسیدانی در گروه فلاونوئیدها قرار دارند (Kahkonen *et al*., 1999). کافئیک اسید در گونه‌های مریم گلی، واحد سازندهٔ انواع متابولیت‌های فنلی از مونومرهای ساده تا انواع فراورده‌های الیگومری است و رزمارینیک اسید فراوان‌ترین دایمرکافئیک اسید و مهم‌ترین ترکیب فنلی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مریم‌گلی را بیشتر به‌علت وجود این ترکیب می‌دانند (Lu and Foo 2002; Kamatou *et al*., 2008). استفاده از کالوس‌های حاصل از کشت‌بافت گیاهی راهکاری مناسب برای تولید پایدار با کارایی زیاد و بدون وابستگی به فصول کشت گیاهی چنین متابولیت‌هایی است. تولید کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای متأثر از عواملی مانند ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط‌کشت، نوع کربوهیدرات، نوع جداکشت و شرایط محیطی است (Han *et al*., 2011). Modarres و همکاران (۲۰۱۳، ۲۰۱۴) در گیاه نوروزک با جداکشت برگ در محیط‌کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۶ - بنزیل آمینو پورین (BAP) با ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱ – نفتالن استیک اسید (NAA) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و با جداکشت مریستم جوانهٔ انتهایی حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D کالوس‌زایی مشاهده کردند. کاربرد الیسیتورهای غیرزیستی یکی از راهکارهای مهم برای القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند درمحیط‌های کشت‌بافت است. الیسیتورهای غیرزیستی با فعال‌کردن سازوکارهای دفاعی، تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های بیش حساس را القا می‌کنند. عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط‌کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط‌کشت و مدتی که محیط یا جداکشت در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Vasconsuelo and Boland, 2007). الیسیتورهایی مانند سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ دارای ارزش دارویی، نقش کلیدی دارند و با سرعت‌دادن به تشکیل متابولیت‌های ثانویه زمان دست‌یابی را به مقادیر زیاد متابولیت‌ها کاهش می‌دهند (Singh and Dwivedi, 2018). سالیسیلیک اسید در گیاه سیاه‌دانه فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمولیاز (PAL) و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی (Kabiri *et al*., 2014)؛ در کشت سلولی پونه، مادهٔ مؤثر بتاکاریوفیلن (Darvishi *et al*., 2017) و در گل همیشه‌بهار مقدار فلاونوئید را

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش داد (Pacheco *et al*., 2013). Samadi و همکاران (۲۰۱۴) با کاربرد سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به‌تنهایی و باهم در کالوس کنگرفرنگی مشاهده کردند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، افزایش فنیل پروپانوئید را سبب شد؛ ولی با افزایش غلظت الیسیتورها کاهش چشمگیری در مقدار فنل کل مشاهده شد. باتوجه‌به‌اینکه گزارشی دربارهٔ اثر اکسین ۱ – نفتالن استیک اسید با سیتوکینین Kin در جداکشت ساقه و برگ و 2, 4-D با سیتوکینین Kin در جداکشت ساقه پس از بهینه‌کردن کالوس‌زایی وجود ندارد، اثر الیسیتورهای غیرزیستی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر محتوای فنلی، فلاونوئیدی، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید گیاه نوروزک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ گیاهان استریل درون‌شیشه‌ای: این آزمایش در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. برای دست‌یابی به جداکشت‌های برگ و ساقهٔ استریل، ابتدا بذرهای گیاه نوروزک از منطقهٔ بجستان واقع در استان خراسان رضوی در خردادماه جمع‌آوری شدند. بذرها پس از انتقال به آزمایشگاه به‌مدت سه هفته در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا نیاز سرمایی برای جوانه‌زنی بذرها رفع شود. ضدعفونی‌کردن بذرها با روش Modarres و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. برای ضدعفونی‌کردن بذرهای نوروزک پس از جداکردن پوستهٔ سخت آنها در زیر هود، ابتدا به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار داده شدند؛ سپس بذرها ۳ بار با آب مقطر استریل آب‌شویی شدند و پوستهٔ نازک بذرها با پنس و سوزن‌های استریل جدا شد. در این مرحله، رویان‌های چندمیلی‌متری با پنس و سوزن‌های استریل، با دقت از داخل لپه‌ها جدا و در شیشه‌های کشت حاوی محیط‌کشت MS کشت داده شدند و به شرایط تاریکی به‌مدت یک هفته با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از یک هفته جنین‌های با رشد اولیه به اتاق رشد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافتند و پس از ۴ هفته گیاهان استریل نوروزک درون‌شیشه‌ای به دست آمدند.

تأثیر اکسین‌های ۱ – نفتالن استیک اسید و 2, 4-D با Kin در کالوس‌زایی از جداکشت‌های ساقه و برگ: برای بهینه‌کردن کالوس‌زایی، چهار آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و در هر تکرار با پنج جداکشت ساقه یا برگ در محیط‌کشت MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز انجام شدند. ۱ – نفتالن استیک اسید با چهار غلظت (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و 2, 4-D با پنج غلظت (صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) با سه غلظت سیتوکینین Kin (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. از گیاهان نوروزک چهارهفته‌ای استریل، جداکشت‌های ساقه و برگ ۱ سانتی‌متری تهیه شدند. جداکشت‌ها برای تولید کالوس در تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت چهار هفته صفات مورفولوژیک کالوس‌ها اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک کالوس‌ها: پس از گذشت ۴ هفته (اوایل هفتهٔ پنجم)

Archive of SID

www.SID.ir

ویژگی‌های ظاهری کالوس‌ها مانند درصد کالوس‌زایی، رنگ، شکل و نوع کالوس یادداشت‌برداری شدند. درصد کالوس‌زایی براساس نسبت تعداد جداکشت‌های دارای کالوس به تعداد کل جداکشت‌های کشت‌شده در یک ظرف کشت به دست آمد. میانگین وزن آنها به‌صورت میانگین مجموع وزن تر بررسی شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌های مدنظر در ورق آلومینیومی بسته‌بندی شدند و به‌مدت ۳۶ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و درنهایت، وزن کالوس محاسبه شد.

القای الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات: پس از بهینه‌کردن کالوس‌زایی، برای بررسی اثر الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) آزمایشی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار با پنج جداکشت) انجام شد. باتوجه‌به ناپایداری این دو ماده در دمای زیاد، پس از اتوکلاوکردن محیط‌کشت در زیر هود لامینار و در شرایط استریل، زمانی‌که دمای محیط‌کشت به حدود ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد رسید با فیلتر سلولزی ۰/۲ میکرون، استریل و به محیط‌کشت اضافه شدند. جداکشت‌های تیمارشده به اتاقک رشد تاریک با همان شرایط نگهداری کالوس انتقال یافتند.

اندازه‌گیری فنل کل: سنجش فنل کل با روش فولین – سیوکالتیو انجام شد (Singleton and Rossi, 1965). ابتدا ۰/۵ گرم از کالوس‌های تازه در ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد و به‌مدت ۳ ساعت در بن ماری (مدل WNB 14، شرکت Memmert، آلمان) با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفیوژ (مدل 5810R، شرکت Eppendorf، آلمان) و عصارهٔ متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل و فلاونوئید استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین – سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل، پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه با دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل 2150، شرکت Unico، آمریکا) با طول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد . میزان ترکیبات فنلی برمبنای مقدار جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین – سیوکالتیو و براساس مقایسهٔ آن با محلول‌های استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. برای شاهد نیز به‌جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. آزمایش سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: سنجش فلاونوئید کل نیز براساس نمودار استاندارد Rutin سنجیده شد. به یک میلی‌لیتر از عصارهٔ متانولی ۲۵۱ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید مطابق با رابطهٔ به‌دست‌آمده از نمودار استاندارد محاسبه شد (Akkol *et al*., 2008).

اندازه‌گیری رزمارینیک اسید: عصاره‌گیری و سنجش رزمارینیک اسید با روش Tepe (۲۰۰۷) انجام شدند. در این روش ۰/۵ گرم کالوس تر پس از توزین، در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد به‌خوبی

Archive of SID

www.SID.ir

ساییده و به‌مدت یک ساعت در بن ماری ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از آن با روتاری (شرکت دنا، ایران)، حلال اتانول از محلول حذف و باقی‌مانده‌های کالوس در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد. در این مرحله محلول به‌مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شد. درنهایت، محلول برای فیلترشدن، دو مرتبه از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ عبور داده شد و محلول صاف حاصل از آن تا زمان سنجش رزمارینیک اسید به یخچال با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد. برای سنجش، عصاره‌های گرفته‌شده درون سل‌های پلاستیکی سه میلی‌لیتری ریخته و جذب آنها در طول‌موج ۳۲۷ نانومترخوانده شد. غلظت رزمارینیک اسید در هر نمونه با نمودار استاندارد رزمارینیک اسید برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد. برای شاهد از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد.

اندازه‌گیری کافئیک اسید: برای سنجش کافئیک اسید، روش Sauvesty و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. نمونه‌ها روی یخ و با متانول ۸۰ درصد با نسبت حجمی - وزنی ۱/۵ تا ایجاد یک محلول همگن ساییده شدند. همگنای حاصل به‌مدت سه ساعت در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد هم زده شد؛ سپس به‌مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از روشناور حاصل برای سنجش کافئیک اسید استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی ۸۰ درصد برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر معرف آرنو (سدیم مولیبدات ۱۰ درصد و سدیم نیترات درصد)، ۱ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار و ۱ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار افزوده شد تا حجم نهایی به ۱۰ میلی‌لیتر رسید؛ سپس نمونه‌ها ورتکس شدند و بلافاصله جذب آنها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در نمونهٔ شاهد به‌جای عصاره، ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد.

نتایج و بحث

اثر اکسین ۱ – نفتالن استیک اسید با Kin در کالوس‌زایی با جداکشت ساقه و برگ: جداکشت‌های ساقه و برگ گیاه نوروزک پس از چهار هفته در غلظت‌های مختلف ۱ – نفتالن استیک اسید و Kin،کالوس‌زایی نشان ندادند. در گیاه *S. nemoroza* با جداکشت برگ مطابق با نتایج این آزمایش کالوس‌زایی مشاهده نشد (Ewa and Halina, 2004)؛ درحالی‌که در *S. canariensis* با جداکشت ساقه در محیط حاوی ۱ – نفتالن استیک اسید در ترکیب با ۶ - بنزیل آمینو پورین کالوس‌زایی مشاهده شد (Mederos-Molin, 2004).

اثر اکسین 2, 4-D با Kin در کالوس‌زایی با جدا کشت‌های ساقه و برگ: نتایج محاسبهٔ میزان کالوس‌زایی در ساقه در غلظت‌های مختلف Kin و 2, 4-D نشان دادند در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد؛ درحالی‌که بیشترین میزان کالوس‌زایی و وزن تر و خشک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر2, 4-D با ۰/۳ میلی‌گرم بر لیترKin به دست آمد. نتایج بافت کالوس‌ها هیچ تفاوتی بین تیمارها نشان ندادند و کالوس‌ها متراکم بودند؛ ولی رنگ کالوس‌ها در تیمار ۱ و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌ترتیب در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D کرمی و در سایر تیمارها سفید بودند (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج محاسبهٔ میزان کالوس‌زایی در برگ در غلظت‌های مختلف Kin و 2, 4-D نشان دادند در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر2, 4-D هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد. بیشترین میزان کالوس‌زایی و وزن تر و خشک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر2, 4-D با ۱ میلی‌گرم بر لیترKin به دست آمد. در همهٔ تیمارها کالوس‌های کرم‌رنگ و متراکم مشاهده شدند (جدول ۲).

جدول۱- مقایسهٔ مقدار کالوس‌زایی و ویژگی‌های کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ساقه در محیط MS حاوی 2, 4-D و Kin

نوع تیمار (میلی‌گرم بر لیتر)	مقدار کالوس‌زایی پس از سه هفته (درصد)	وزن تر کالوس (گرم)	وزن خشک کالوس (گرم)	ویژگی‌های بافت کالوس
2, 4-D 0, Kin0	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1, Kin 0.3	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1, Kin 1	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1.5, Kin 0.3	۵۸/۳۳ ± ۱/۸ c	۰/۳۱ ± ۰/۰۲ b	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۳ b	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 1.5, Kin 1	۵۷ ± ۱/۵ c	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ d	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۱ c	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2, Kin 0.3	۶۶/۶۷ ± ۱/۳ b	۰/۳۲ ± ۰/۰۳۶ b	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۲ b	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2, Kin1	۵۸/۳۳ ± ۱/۴ c	۰/۲۵ ± ۰/۰۳ c	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۱ b	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 0.3	۷۵ ± ۲/۷ a	۱/۰۳ ± ۰/۰۸ a	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۰۵ a	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 1	۵۲ ± ۱/۱ d	۰/۲۷ ± ۰/۰۱ c	۰/۰۲۱ ± ۰/۰۰۲ b	سفیدرنگ، متراکم

مقادیر، میانگین پنج تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) ± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

در پژوهش حاضر، القای کالوس در ساقه و برگ گیاهان نوروزک ۴ هفته‌ای (۵ تا ۶ برگی) حاصل از کشت رویان، انجام شد که با نتایج گزارش‌های قبلی در گونه‌های جنس *Salvia* هم‌راستا است (Kintzios *et al*., 1999; Mederos-Molina, 2004). در هر دو جداکشت ساقه و برگ، القای کالوس در غلظت‌های زیاد 2, 4-D انجام شد و غلظت‌های کمتر از ۲ میلی گرم بر لیتر در برگ تأثیری نداشتند؛ هرچند با جداکشت ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D کالوس‌زایی مشاهده شد. بیشترین میزان کالوس‌زایی در جداکشت ساقه، ۷۵ در صد و در برگ، ۱۰۰ درصد بود که علاوه‌بر کالوس‌زایی فراوان در برگ، کالوس‌ها بزرگ‌تر و بهتر بودند. Mederos-Molina (۲۰۰۴) و Kintzios و همکاران (۱۹۹۹) نتایج مشابهی در گونهٔ *canariensis* گزارش کردند. به‌طورکلی استفادهٔ هم‌زمان از 2, 4-D و Kin با نسبت‌های زیاد 2, 4-D به Kin بر کالوس‌زایی در جداکشت های برگ گیاه نوروزک تأثیر بسزایی دارد پس نوع، غلظت اکسین و جداکشت بر کالوس‌زایی مؤثر هستند. به نظر می‌رسد شرایط محیطی انتخاب‌شده برای القا و رشد کالوس مناسب بوده‌اند؛ به‌طوری‌که کالوس‌ها بافت متراکم و رنگ سفید تا کرمی به

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسهٔ مقدار کالوس‌زایی و ویژگی‌های کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ساقه در محیط MS حاوی 2, 4-D و Kin

نوع تیمار (میلی‌گرم بر لیتر)	مقدار کال‌زایی پس از سه هفته (درصد)	وزن تر کالوس (گرم)	وزن خشک کالوس (گرم)	ویژگی‌های بافت کالوس
2, 4-D 0,Kin0	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1,Kin 0.3	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1,Kin 1	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1.5 ,Kin 0.3	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 1.5 ,Kin 1	۰ e	۰ e	۰ d	–
2, 4-D 2 ,Kin 0.3	۶۵/۴±۸/۸c	۰/۲۴±۰/۰۶d	۰/۰۱۷±۰/۰۰۴c	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2 ,Kin 1	۱۰۰±۰a	۲/۳±۰/۱۲a	۰/۱۶۳±۰/۰۰۹a	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2.5 ,Kin 0.3	۲۲±۴/۵d	۰/۲۹±۰/۰۴c	۰/۰۲۱±۰/۰۰۲c	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2.5 ,Kin 1	۸۱/۶۹±۸/۹b	۰/۷۶±۰/۰۸b	۰/۰۸۲±۰/۰۰۶b	کرم‌رنگ، متراکم

مقادیر، میانگین پنج تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) ± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

دست آوردند. تفاوت در کارایی 2, 4-D نسبت به ۱ – نفتالن استیک اسید در پژوهش حاضر ممکن است از یک‌سو به ساختار این ترکیبات و از سوی دیگر به تخصصی‌شدن گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف گیاهان برای نوع اکسین مربوط باشد که 2, 4-D ترکیبی فنوکسی است؛ درحالی‌که ۱ – نفتالن استیک اسید ترکیبی نفتالینی است (Moore, 1989).

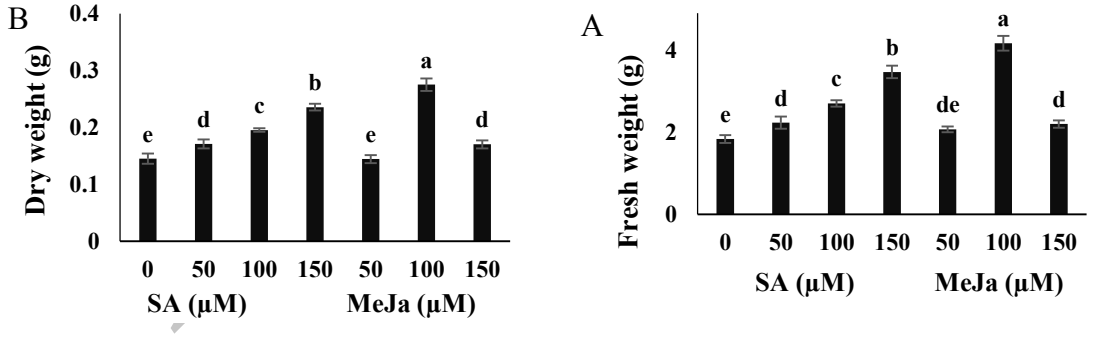
صفات مورفولوژیک کالوس‌های تیمارشده با الیسیتورها: نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، نشان دادند الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات تأثیری بر میزان کالوس‌زایی نداشتند و در همهٔ محیط‌ها ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد. بررسی جداکشت‌ها نشان داد نخستین توده‌های کالوس، ۱۰ روز پس از کشت ایجاد شدند و با روند افزایش دوره تا چهار هفته کالوس‌های بزرگ تشکیل شدند. رنگ کالوس‌ها با گذشت زمان از سبز به کرمی در حال تغییر بود که البته تغییر رنگ به کرمی در جداکشت‌های تیمارشده با سالیسیلیک اسید کمتر و در تیمار متیل جاسمونات و شاهد بیشتر بودند. سالیسیلیک اسید از فعالیت آنزیم ACC سنتاز ممانعت می‌کند که به کاهش تولید اتیلن منجر می‌شود و به‌دنبال آن از تخریب کلروفیل در سلول‌ها جلوگیری می‌شود (Li *et al*., 1992). اثر کمتر متیل جاسمونات بر جلوگیری از تغییر رنگ کالوس نسبت به سالیسیلیک اسید ممکن است به‌علت محافظت‌کنندگی غیریکسان کلروفیل a و b

Archive

www.SID.ir

و توانایی کمتر متیل جاسمونات در حفظ محتوای کلروفیل b باشد (Hanaka *et al*., 2015).

بیشترین وزن تر و خشک به‌ترتیب ۴/۱۶۷ و ۰/۲۷۵۰ گرم در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شدند و کمترین وزن تر (۱/۸۳ گرم) در کالوس شاهد و کمترین وزن خشک (۰/۱۶۴۳ گرم) در تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات حاصل شد. وزن تر و خشک کالوس‌ها با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید روند روبه‌افزایش داشتند (شکل ۱). نتایج پژوهش حاضر با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم بین سالیسیلیک اسید، تحریک سلول‌ها و فعالیت متابولیسم اولیه در کالوس روناس مطابقت دارند (Bulgakov *et al*., 2002). نوع ترکیب، غلظت سالیسیلیک اسید و گونهٔ گیاه، تعیین‌کنندهٔ وجود یا نبود ارتباط مستقیم بین غلظت‌های القاکنندگی و القای فعالیت‌های متابولیسمی اولیه هستند که به افزایش وزن سلول‌ها منجر می‌شوند (Namdeo, 2007). تیمارهای متیل جاسمونات ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار نسبت به شاهد وزن تر و خشک کالوس‌ها را افزایش دادند. در کشت کالوس‌های رودندرون هندی، افزایش وزن تر و خشک کالوس با افزایش غلظت متیل جاسمونات همراه بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Suan See *et al*., 2011). برخی از بررسی‌ها نشان دادند استفاده از غلظت‌های زیاد جاسمونات اثر تحریک‌کنندگی و بازدارندگی بر رشد و فعالیت متابولیک گیاهان دارد و آثار بازدارندگی مشابه آبسزیک اسید و اتیلن از خود نشان می‌دهد که تأییدکنندهٔ نتایج پژوهش حاضر در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات است (Swiatek *et al*., 2003 and Chong *et al*., 2005).

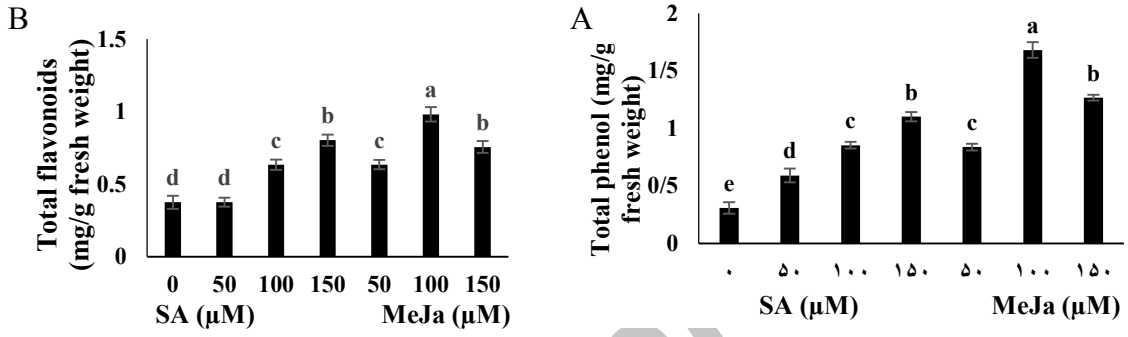


شکل ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید (SA) و متیل جاسمونات بر وزن خشک (A) و وزن تر (B) کالوس برگ گیاه نوروزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) ± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

باتوجه‌به شکل ۲ بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل در کالوس‌های تیمارشده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات وکمترین میزان، در کالوس‌های شاهد مشاهده شد. محتوای فنل و فلاونوئید کل با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید روند روبه‌افزایش نشان دادند؛ به‌طوری‌که این مقادیر در غلظت ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به‌ترتیب حدود ۳/۵ و ۲ برابر شاهد افزایش نشان

www.SID.ir

دادند (شکل ۲). افزایش محتوای فنل کل و فلاونوئید با تیمار سالیسیلیک اسید در پژوهش حاضر با نتایج بررسی‌های قبلی در شیرین‌بیان (Shabani and Ehsanpour, 2010)، گل همیشه‌بهار (Pacheco *et al*., 2013)، کنگرفرنگی (Samadi *et al*., 2014) و سیاه‌دانه (Kabiri *et al*., 2014) مطابقت دارد و با غلظت‌های متیل جاسمونات، با پژوهش‌های Samadi و همکاران (۲۰۱۴)، Mehrabani و همکاران (۲۰۱۳) و Kim و همکاران (۲۰۰۶) هم‌راستا است؛ زیرا چالکون سنتاز که پیش‌ساز فلاونوئیدها را تولید می‌کند با متیل جاسمونات القا می‌شود (Pinot *et al*., 1998).



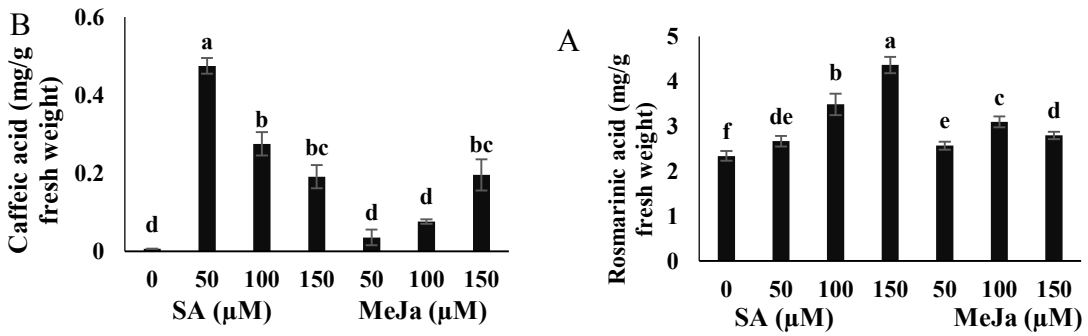
شکل ۲- تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار فلاونوئید کل (A) و فنل کل (B) کالوس برگ گیاه نوروزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداکشت)± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند مقدار کافئیک اسید در گیاه نوروزک به‌طورطبیعی بسیار ناچیز است؛ درحالی‌که با تیمار سالیسیلیک اسید افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشته است؛ ولی با افزایش غلظت، روند روبه‌کاهش داشته است و بیشترین کاهش، در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد. نتایج مربوط به اثر متیل جاسمونات بر محتوای کافئیک اسید نشان دادند تنها غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات میزان کافئیک اسید را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۳-A). نتایج مقایسهٔ میانگین اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای رزمارینیک اسید نشان دادند با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، مقدار رزمارینیک اسید نیز روند روبه‌افزایش داشته است؛ به‌طوری‌که با غلظت ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان رزمارینیک اسید حاصل و کمترین میانگین در شاهد مشاهده شد. همهٔ تیمارهای متیل جاسمونات نیز افزایش میزان رزمارینیک اسید را نسبت به شاهد سبب شدند؛ ولی نسبت به تیمارهای سالیسیلیک اسید تأثیر کمتری بر افزایش محتوای این ماده داشتند (شکل ۳-B).

داده‌های حاصل از سنجش مقدار کافئیک اسید در پژوهش حاضر با نتایج گزارش‌های قبلی در کنگرفرنگی (Samadi *et al*., 2014) و گیاه *Salvia miltiorrhiza* (Dong *et al*., 2010) هم‌راستا هستند. بسیاری از بررسی‌ها نشان می‌دهند افزودن سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات خارجی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار کافئیک اسید (A) و زمارینیک اسید (B) کالوس برگ گیاه نوروزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) ± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

احتمالاً با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، پروتئین کیناز‌ها، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات می‌شود (Andi *et al*., 2001; Raman and Ravi, 2011) و ازاین‌رو با تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه، تولید این ترکیبات را افزایش می‌دهند. درواقع متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، فعال‌کردن مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی را سبب می‌شوند (Wang *et al*., 2009; Wen *et al*., 2005).

جمع‌بندی

استفاده از اکسین ۱ – نفتالن استیک اسید و 2, 4-D پس از چهار هفته در کالوس‌زایی با جداکشت ساقه و برگ گیاه نوروزک نشان داد اکسین ۱ – نفتالن استیک اسید با غلظت‌های مصرفی با Kin کالوس تولید نکرد؛ درحالی‌که 2, 4-D در جداکشت ساقه نسبت به جداکشت برگ با غلظت کمتر، کالوس تولید کرد و باتوجه‌به بافت و اندازهٔ کالوس‌های حاصل، جداکشت برگ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D مناسب‌ترین کالوس را تولید کرد که در بررسی اثر الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات از آن استفاده شد. در آزمایش حاضر نشان داده شد میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه نوروزک به غلظت محرک محیط بستگی دارد. همچنین افزایش محرک بیش از مقدار معمول، افزایش متابولیت‌های ثانویه را در بر ندارد؛ بلکه تولید متابولیت‌های ثانویه را کاهش می‌دهد؛ بنابراین با بهینه‌کردن غلظت محرک در محیط کشت، بدون دست‌ورزی در ساختار ژنتیکی گیاه میزان تولید متابولیت‌های ثانویهٔ مدنظر افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

در اینجا از مسئولان و کارکنان دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود بابت فراهم‌کردن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

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

Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2001) Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. Plant and Cell Physiology 42(4): 446-449.

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

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

Darvishi, E., Kahrizi, D., Bahraminejad, S. and Mansouri, M. (2017) Study of yeast extract and salicylic acid elicitors effects on percentage of cell survival and the amount of beta-caryophyllene and isopulegone secondary metabolites in Pennyroyal (*Mentha pulegium*) cell culture. Journal of Cellular and Molecular Research 29(4): 370-381 (in Persian).

Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology 148(2): 99-104.

Ewa, A. and Halina, S. (2004) *In vitro* regeneration of *Salvia nemoroza* L. from shoot tips and leaf explants. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 40: 596-602.

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

Hanaka, A., Maksymiec, W. and Bednarek, W. (2015) The effect of methyl jasmonate on selected physiological parameters of copper-treated *Phaseolus coccineus* plants. Plant Growth Regulator 77: 167-177.

Hedge, I. C. (1986) Labiatae In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 150. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. (2014) Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* Plant under hydroponic culture. Plant Protection Science 50(1): 43-51.

Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(10): 3954-3962

Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N. and Viljoen, A. M. (2008) South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology 119: 664-672.

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

Kintzios, S., Nikolaou, A. and Skoula, M. (1999) Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf

Archive of SID

www.SID.ir

callus cultures. Plant Cell Reports 18: 462-466.

Li, N., Parsons, B. L., Liu, D. R. and Mattoo, A. K. (1992) Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. Plant Molecular Biology 18: 477-487.

Lu, Y. and Foo, L. Y. (2002) Polyphenolics of *Salvia*-a review. Phytochemistry 59: 117–140.

Mederos-Molina, S. (2004) *In vitro* Callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. Plant Tissue Culture 14: 167-172.

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

Modarres, M. Abrishamchi, P., Ejtehadi, H. and Ramezani, A. (2007) Propagation of *Salvia leriifolia* by embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15(2): 129-141 (in Persian).

Modarres, M., Asili, J., Gangali, A., Iranshahy, M. and Sahebkar, A. (2014) Simultaneous rosmarinic acid, salvianolic acid b and caffeic acid in *salvia leriifolia* benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diodearray detection technique. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 37(12): 1721-1730.

Modarres, M., Lahooti, M., Asili, J., Kafi, M. and Ramazani, A. (2013) Optimizing leaf callus culture in *Salvia leriifolia* for phenolic acids production. Plant Process and Function 2(2): 65-74.

Moore, T. C. (1989) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer Verlag, Inc., New York.

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

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

Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J. P. and Durst, F. (1998) Methyl jasmonate induces lauric acid ω-hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia sativa* seedlings. Plant Physiology 118(4): 1481-1486.

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

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

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

Shabani, L. and Ehsanpour, A. (2010) Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Biology 2(2): 691-703 (in Persian).

Singh, A. and Dwivedi, P. (2018) Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7(1): 750-757.

Singleton, V. L. and Rossi, A. J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Suan See, K., Bhatt, A. and Lai Keng, C. (2011) Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum*

Archive of SID

www.SID.ir

(Melastomaceae). Revista de Biología Tropical 59(2): 597-606.

Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E. and Van Onckelen, H. (2003) Stress messenger's jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. Bulgarian Journal of Plant Physiology 29: 172-178.

Tabatabai Yazdi, F. (1995) Antioxidant effects of essential oil and leaf extract of *Salvia leriifolia* and its phytochemical identification. MSc thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (in Persian)

Tepe, B. (2007) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret and Aucher ex Bentham) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. Bioresource Technology 99: 1584–1588.

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir