Archive of SID

القاء آنزیمهای آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

لیلا شبانی[۱] و علی اکبر احسان پور*[۲]

[۱] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۹

چکیده

در این پژوهش اثرات متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید به عنوان دو القاء کننده (elicitor) بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پرکسیداز در ریشه و اندام هوایی، و محتوای ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل، و همچنین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ریشه گیاهچه های ٦٥ روزه شیرین بیان مورد مطالعه قرار گرفته است. افزایش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار با متیل جاسمونات در اندام هوایی گیاهچه ها، ٢٤ ساعت پس از تیمار با غلظت ۲ میلی مولار و در ریشه ها در غلظت ۱و ۲ میلی مولار در ٤٨ ساعت پس از تیمار مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه در تیمار با غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید پس از ٢٤ ساعت افزایش یافت. با گذشت ٤٨ ساعت فعالیت کاتالاز در تمام غلظتهای سالیسیلیک اسید و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید کاهش نشان داد. همچنین افزایش معنی داری در ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها بعد از ٢٤ ساعت القاء با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مشاهده گردید. فعالیت آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید، فنیل آلانین آمونیا لیاز به طور موقتی ٢٤ ساعت پس از القاء (elicitation) با هر دو القاء کننده ها افزایش نشان داد که با افزایش معنی دار مقدار ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئید ها پس از ٢٤ ساعت القاء هماهنگ می باشد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، سالیسیلیک اسید، شیرین بیان،فنیل آلانین آمونیا لیاز، متیل جاسمونات.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۱۱۳۵۵۲۰، پست الکترونیک:ehsanpou@yahoo.com

مقدمه

جاسمونات ها و استر متیل آنها (متیل جاسمونات) گروه جدیدی از تنظیم کنندگان رشد گیاهان، و از مشتقات لینولنیک اسید محسوب می شوند که از طریق مسیر بیوسنتزی اکتادکانوئید سنتز شده و مشابه سایر هورمونهای گیاهی، اثرات بیولوژیکی متنوعی نظیر افزایش پیری و ریزش برگ، پیچش، بسته شدن روزنه، ممانعت رشد ریشه و جوانه زنی بذرهایی که خواب ندارند، اعمال می کنند (۸ و ۱۷). جاسمونات ها به عنوان ترکیبات پیام رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیتهای ثانویه می شود معرفی شده اند (۱۱،۱۰، ۲۱ و ٢٤).

سالیسیلیک اسید نیز یکی دیگر از ملکولهای پیام رسان در تنشهای سلولی محسوب می شود که در خصوص نقش آن در تأثیر بر مقاومت گیاه در برابر پاتوژنها و سایر تنشهای زیستی مطالعات زیادی صورت گرفته است (۲۳). درواقع، سالیسیلیک اسید به عنوان یک جزء پیام رسان کلیدی در فعال سازی پاسخهای اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می شود. پاسخهای دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات ثانویه گیاهی می گردد، لذا القاء به عنوان راهکاری مؤثر برای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولیک و فیتوالکسین ها شناخته شده است (١٤). گیاهان می توانند از طریق القاء آنزیمهای دفاعی آنتی اکسیدان (پارا اکسایشی) که حفاظت علیه آسیب بیشتر را فراهم می کنند، به طیف وسیعی از تنشها (مانند دما، خشکی، شوری، ازن، UV و حمله پاتوژنها)، پاسخ دهند (٣). متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید طیف وسیعی از پاسخهای نموی گیاه را تنظیم می کنند. با حمله پاتوژنها یا زخمی شدن گیاه، القاء بیوسنتز آنها منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن شامل H_2O_2، آنیونهای سوپراکسید و رادیکالهای هیدروکسیل می شود (٤).

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، یکی از گیاهان مهم دارویی و اقتصادی از خانواده لگومینوزه است. این گیاه دارای ریشه ها و ریزومهایی است که منبعی غنی از ترکیبات طبیعی و فعال از نظر زیستی می باشد. یک گروه مهم از این ترکیبات تری ترپن ساپونینها است که گیاه را با فعالیتهای ضد میکروبی، ضد حشره و ضد التهابی خود حفاظت می کند. همچنین ترکیبات فنولیک گروه مهم دیگری از متابولیتهای ثانویه در گیاه شیرین بیان می باشد. تاکنون بیش از ٣٠٠ نوع ترکیب فلاونوئیدی از گونه های مختلف جنس *Glycyrrhiza* گزارش شده است که در حدود ٧٠ نوع از این ترکیبات از گونه *Glycyrrhiza glabra* جدا شده اند. فلاونوئیدها از طریق مسیر شیکیمات ساخته می شوند. این ترکیبات سه حلقه ای دارای خواص دارویی بسیاری بوده و حاوی اثراتی نظیر فعالیت آنتی اکسیدان، استروژنی و ضد توموری می باشند (١٢). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیم کلیدی متابولیسم فنیل پروپانوئید می باشد که در تولید چندین ترکیب حفاظتی قوی مانند فلاونوئیدها،فیتوآلکسینها، فورانوکومارینها و ترکیبات دیواره سلولی نقش دارد. این آنزیم اولین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانوئید که نقطه انشعاب متابولیسم اولیه و ثانویه است را کاتالیز می کند. اغلب مشاهده شده است که مسیرهای بیوسنتز فنیل پروپانوئید، فلاونوئید و تری ترپنها به دنبال تیمار بافت گیاه یا سلولهای کشت شده با القاء کننده ها القاء می شوند.

با توجه به اینکه تا کنون گزارشی مبنی بر اثر القاء کننده ها در تغییر رشد گیاه شیرین بیان منتشر نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی پاسخهای فیزیولوژیک شیرین بیان به تیمار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید از طریق مطالعه فعالیت برخی از آنزیمهای آنتی اکسیدان و سنتز ترکیبات فنولی است تا از این طریق درک بهتر مسیر القاء (elicitation) و عکس العمل گیاه شیرین بیان امکان پذیر گردد.

مواد و روشها

بذرهای گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* var. *glabra*) جمعیت اصفهان از شرکت پاکان بذر تهیه گردید. بذرها با سولفوریک اسید (١٠٠ درصد) به مدت ٢٠ دقیقه ضدعفونی شد و سپس به مدت ١٥ دقیقه در ٣ درصد NaClO قرار داده شد و با آب مقطر استریل سه مرتبه مورد شستشو قرار گرفت. به منظور جوانه زنی بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب در پتری دیش در اتاق کشت در تاریکی قرار داده شد. گیاهچه های سه روزه به محیط جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ١/٢ غلظت، ٢ درصد ساکارز، ٠/٧ درصد آگار و ٠/٥ میلی گرم در لیتر IBA (Indole-3-butyric acid)، pH 8/5 = منتقل گردید و در اتاق کشت دارای تناوب نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی، دمای ٢±٢٥ درجه سانتی گراد و شدت نوری ٢٢٠٠ لوکس قرار داده شدند و گیاهچه های ٦٥ روزه به عنوان مواد گیاهی برای آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. محلول متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید ابتدا توسط فیلتر با قطر منافذ ٢٢/. میکرومتر استریل و سپس به محیطهای کشت مایع MS ١/٢ در غلظتهای ٠/٠١، ٠/١، ١ و ٢ میلی مولار افزوده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت کنترل با افزودن اتانول به جای متیل جاسمونات و آب مقطر به جای سالیسیلیک اسید به محیط کشت مایع مورد استفاده قرار گرفت.

ترکیبات فنولیک کل: محتوای ترکیبات فنولیک کل در ریشه های شاهد و تحت تیمار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مطابق با روش Singleton و همکاران (۲۰) اندازه گیری شد. برای این منظور ۳۰mg از بافتهای ریشه و ساقه گیاهان شاهد و تیمار شده لیوفیلیزه و پودر گردید. سپس با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در ۵ml متانول ۸۰ درصد همگن شده و در دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. یک میلی لیتر از عصاره متانولی با ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ٢٤ درجه نگهداری شد. به محلول فوق مقدار ۱ میلی لیتر Na_2CO_3 ۱۲ درصد اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ٢٤ درجه قرار داده شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۳۹ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. مقدار ترکیبات فنولیک کل در ریشه ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) به دست آمد.

ترکیبات فلاونوئید کل: برای عصاره گیری ۳۰ میلی گرم از بافتهای ریشه لیوفیلیزه و پودر شده گیاهان شاهد و تحت تیمار در ۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شده و برای ٢٤ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شدند. سپس عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور rpm 14000 سانتریفوژ شدند. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش Guan و همکاران (۱۳) اندازه گیری شد. به یک میلی لیتر از عصاره نمونه ها ٤/٤ میلی لیتر آب اضافه شد. سپس مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر $NaNO_2$ ۱۰ درصد به آن اضافه و پس از ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر به آن $AlCl_3$غلظت ۵ درصد اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه به آن ٤ میلی لیتر NaOH یک نرمال اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. مقدار ترکیبات فلاونوئید کل در ریشه ها با رسم منحنی استاندارد کاتکین (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) به دست آمد.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز: مقدار ۰/۱ گرم از ریشه گیاهان شاهد و تحت تیمار درون هاون چینی قرار داده شده و ۱ میلی لیتر محلول عصاره گیری ۰/۱ مولار بافر بورات (pH= ۸/۸) حاوی ۳۸ گرم بوراکس (دی سدیم تترا بورات)، ٦ گرم PVP (Polyvinylpyrrolidon)، چند قطره بتامرکاپتواتانول ۵ میلی مولار و ۲ میلی مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) به تدریج به آن افزوده گردید. ضمن افزودن این حجم از محلول بافتها سائیده شدند (تمام مراحل روی ظرف یخ صورت گرفت). عصاره های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱٤۰۰۰rpm در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز استفاده گردید. به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ٤۰۰ میکرولیتر بافر بورات ۰/۱ مولار (pH= ۸/۰) حاوی ۳ میلی مولار فنیل آلانین افزوده شده و برای ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. واکنش از طریق افزودن ۵۰۰ میکرولیتر 5 HCl نرمال متوقف شد. تعیین فعالیت آنزیم با استفاده از روش Cheng و همکاران (۵) صورت گرفت. افزایش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به واسطه تشکیل ترانس سینامات با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز به صورت تغییر در OD_{290}/h/mg protein بیان گردید.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای بررسی فعالیت پراکسیداز، اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها بعد از تیمار القاء نمونه برداری شدند و ۰/۱ گرم از بافتهای ریشه و اندام هوایی گیاهان شاهد و تحت تیمار مورد بررسی پس از توزین درون هاون چینی از پیش سرد شده قرار داده شدند. برای استخراج پروتئین محلول از بافتها، ۱/۵ میلی لیتر محلول

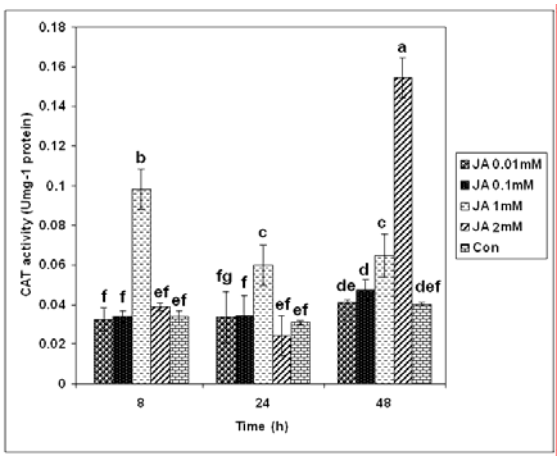
www.SID.ir

Archive of SID

بافر عصاره گیری سالین فسفات pH=۷/۸ (حاوی نمکهای فسفات و کلرید سدیم و پتاسیم) به تدریج به آن افزوده گردید. ضمن افزودن این حجم از محلول بافتها سائیده شدند (تمام مراحل روی ظرف یخ صورت گرفت). عصاره های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور13000 rpm در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان استفاده گردید. سنجش فعالیت این آنزیم به روش Nakano و همکاران (۱۵) صورت گرفت. به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی در ابتدا مقدار ٦۷۵ میکرولیتر از بافر سالین فسفات حاوی ۰/۲ میلی مولار EDTA افزوده گردید، سپس مقدار ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید و ۵۰ میکرولیتر آلبومین ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به محلول فوق اضافه شده و در نهایت برای شروع واکنش مقدار ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن افزوده شد و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت ۱۲۰ ثانیه رسم گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس سرعت اکسید ۱μmol min-1 آسکوربیک اسید در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بیان گردید.

فعالیت کاتالاز: برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز، ابتدا پروتئین محلول اندام هوایی و ریشه ها (مطابق با روش ذکر شده در مورد آنزیم پراکسیداز) استخراج شد و سپس از روش Aebi برای سنجش فعالیت این آنزیم استفاده گردید (۱). به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی ۹۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش حاوی ۱۰mM آب اکسیژنه در بافر سالین فسفات افزوده و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر در مدت ۱۲۰ ثانیه رسم گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف ۱μmol min-1 آب اکسیژنه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بیان گردید.

آزمایشات در قالب طرح کامل تصادفی و داده ها براساس آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range Test (DMRT با حداقل ۳ تکرار و هر تکرار خود شامل ۳ نمونه گیاهی انجام شد. آنالیزهای آماری به کمک نرم افزار SAS ver.8.02 و MSTATC با اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel 2003 رسم گردید.



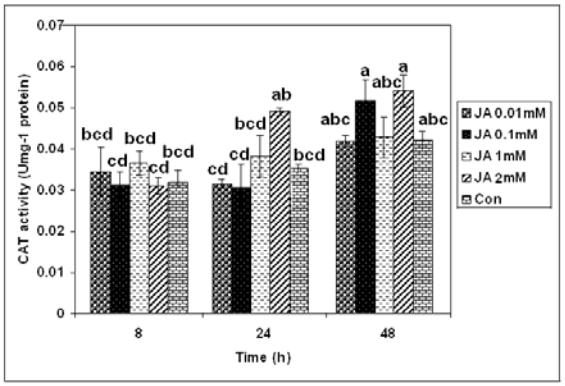
شکل (۱)- اثر غلظتهای مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های گیاه شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

نتایج

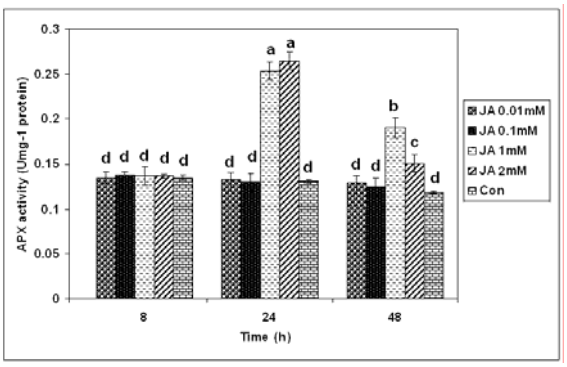
تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان: نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات (شکل۱) نشان داد که فعالیت این آنزیم در غلظت ۱ میلی مولار نسبت به سایر غلظتها پس از ۸ ساعت افزایش معنی دار داشته و این افزایش تا ۲٤ ساعت ادامه یافت. فعالیت این آنزیم در تیمار ریشه با غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار میلی مولار جاسمونات، پس از ٤۸ ساعت افزایش معنی دار نشان داد به طوری که در غلظت ۲ میلی مولار متیل جاسمونات حدود ۵ برابر نسبت به شاهد مربوطه رسید. تأثیر معنی دار متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز تنها در غلظت ۰/۰۱، ۰/۱ و ۲ میلی مولار در اندام هوایی، پس از ۲٤ ساعت تیمار مشاهده شد (شکل۲).

www.SID.ir

Archive of SID

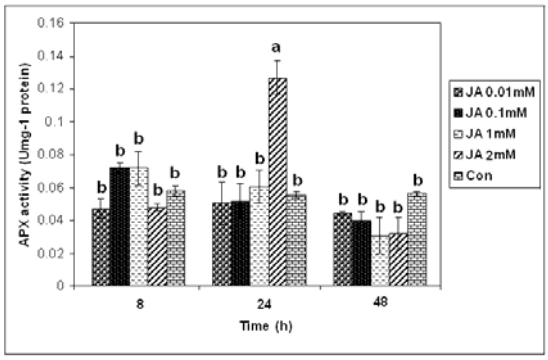


شکل (۲)- اثر غلظتهای مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی گیاه شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

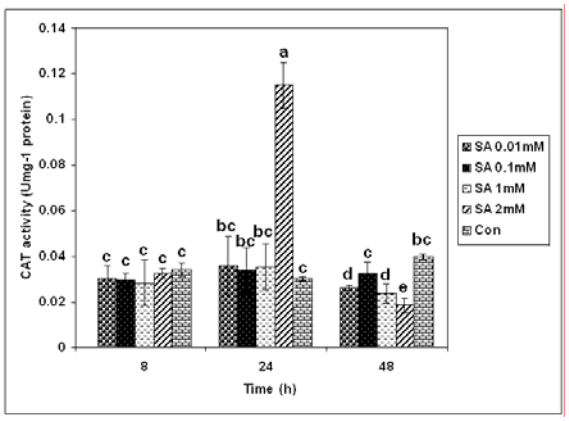


شکل (۳)- اثر غلظتهای مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات (شکل۳) نشان داد که فعالیت این آنزیم در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار نسبت به سایر غلظتها پس از ۲٤ ساعت افزایش معنی دار داشته و این افزایش تا ٤۸ ساعت ادامه یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی تنها در غلظت ۲ میلی مولار متیل جاسمونات پس از ۲٤ ساعت افزایش معنی دار یافت (شکل٤).



شکل (٤)- اثر غلظتهای مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

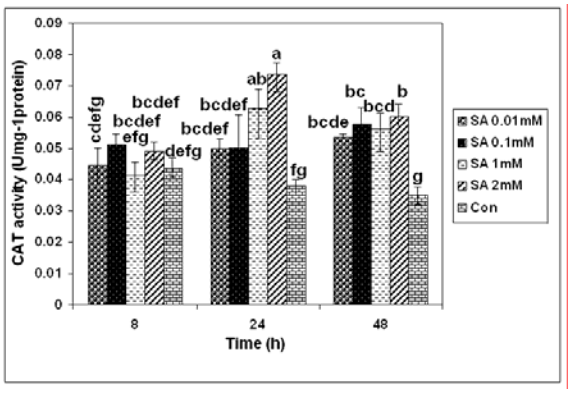


شکل (۵)- اثر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

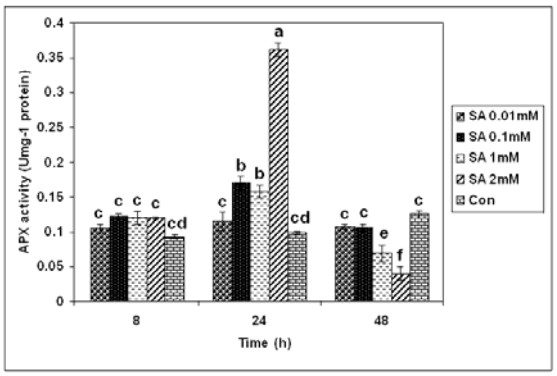
نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید (شکل۵) در غلظت ۲ میلی مولار پس از ۲٤ ساعت افزایش و پس از ٤۸ ساعت کاهش معنی دار نشان داد. فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار پس از ۲٤ ساعت افزایش معنی دار یافت. همچنین فعالیت این آنزیم در اندام هوایی در تمام غلظتهای سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد، پس از ٤۸ ساعت افزایش معنی دار یافت (شکل٦).

www.SID.ir

Archive of SID

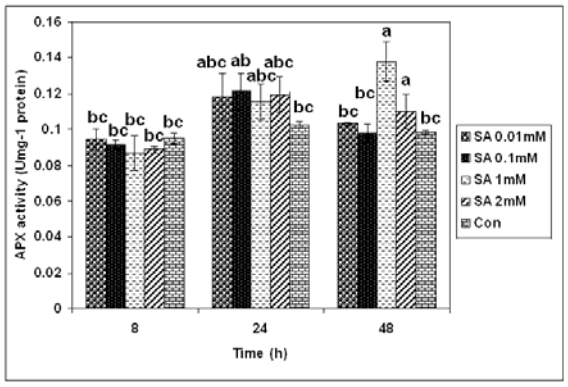


شکل (٦)- اثر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.



شکل (۷)- اثر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید (شکل۷) در غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار پس از ٢٤ ساعت افزایش معنی دار نشان داد. فعالیت این آنزیم در تیمار ریشه در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید، پس از ٤٨ ساعت به طور معنی داری کاهش یافت. فعالیت این آنزیم در اندام هوایی در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید، پس از ٤٨ ساعت افزایش معنی دار یافت (شکل ۸).



شکل (۸)- اثر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی شیرین بیان در زمانهای مختلف. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

بررسی ممانعت غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیتهای آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ریشه ها در جدول (۱) نشان داده شده است. غلظتهای استفاده شده (۰/۰۱، ۱ و ۲ میلی مولار) سالیسیلیک اسید باعث ممانعت معنی دار در فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه ها شده اند. کمترین ممانعت فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۰/۰۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید و بیشترین ممانعت آن در غلظت ۲ میلی مولار مشاهده می شود. در رابطه با آنزیم آسکوربات پراکسیداز تنها در دو غلظت ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید ممانعت فعالیت مشاهده می شود. بیشترین ممانعت در غلظت ۲ میلی مولار سالیسلیک اسید رخ می دهد.

تأثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تجمع متابولیتهای ثانویه: نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولیک کل در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات (شکل ۹) نشان داد که میزان این ترکیبات در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار پس از ٢٤ ساعت افزایش یافته و تا ٤٨ ساعت ادامه پیدا می کند. همچنین میزان این ترکیبات در تیمار ریشه با غلظت ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات، پس از ٤٨ ساعت افزایش یافت. بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک کل برای غلظت ۱ میلی مولار متیل

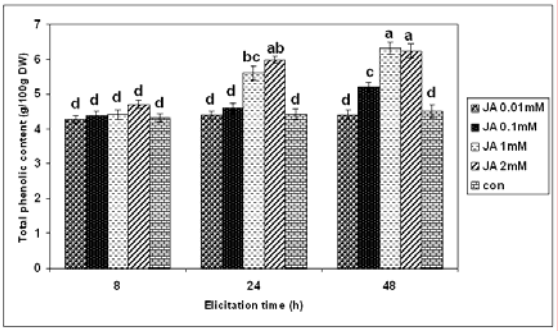
www.SID.ir

Archive of SID

جاسمونات در مدت ٤٨ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ١/٤ برابر افزایش نشان داد.

جدول (١)- تأثیر سالیسیلیک اسید بر ممانعت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان.

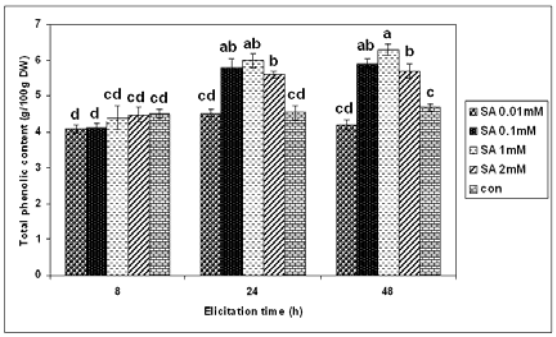
	کاتالاز		آسکوربات پراکسیداز	
سوبسترا	فعالیت	ممانعت ٪	فعالیت	ممانعت ٪
کنترل (آب مقطر)	٠/٠٤±٠/٠٠٢	-	٠/١٢٥±٠/٠٠٦	-
٠/٠١ میلی مولار سالیسیلیک اسید	٠/٠٢٦±٠/٠٠١	٣٥	-	-
٠/١ میلی مولار سالیسیلیک اسید	٠/٠٣٢±٠/٠٠٥	٢٠	-	-
١میلی مولار سالیسیلیک اسید	٠/٠٢٣±٠/٠٠٤	٤٣	٠/٠٦٩±٠/٠١١	٤٥
٢ میلی مولار سالیسیلیک اسید	٠/٠١٨±٠/٠٠٣	٥٥	٠/٠٤±٠/٠١	٦٨



شکل (٩)- ترکیبات فنولیک کل در ریشه های شیرین تحت تیمار با غلظتهای مختلف متیل جاسمونات. مقادیر میانگین ٣ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولیک کل در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید (شکل ١٠) نشان داد که میزان این ترکیبات در غلظتهای ٠/١، ١ و ٢ میلی مولار پس از ٢٤ ساعت افزایش یافته و تا ٤٨ ساعت ادامه پیدا می کند. بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک کل برای غلظت ١ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت ٤٨ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ١/٣ برابر افزایش نشان داد.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار ترکیبات فلاونوئید کل در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات (شکل ١١) مشابه با نتایج تأثیر بر مقدار ترکیبات فنولیک کل بود. بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئید کل برای غلظت ١ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت ٤٨ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ١/٥ برابر افزایش نشان داد.



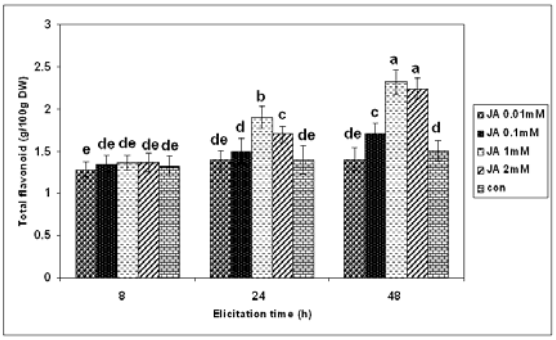
شکل (١٠)- ترکیبات فنولیک کل را در ریشه های شیرین بیان تیمار با غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید نشان می دهد. مقادیر میانگین ٣ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار ترکیبات فلاونوئید کل در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید (شکل ١٢) نشان داد که میزان این ترکیبات در غلظت ١ میلی مولار پس از ٢٤ ساعت افزایش یافته و تا ٤٨ ساعت ادامه پیدا می کند. بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئید کل

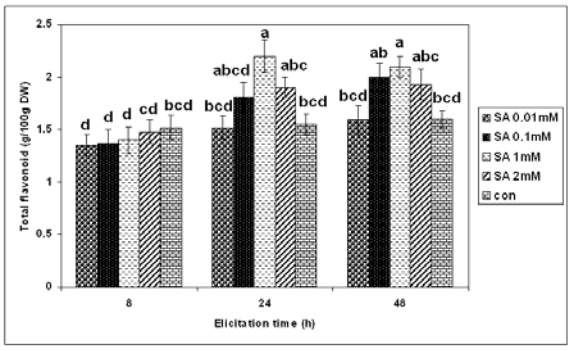
www.SID.ir

Archive of SID

برای غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت ٤٨ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/٤ برابر افزایش نشان داد.

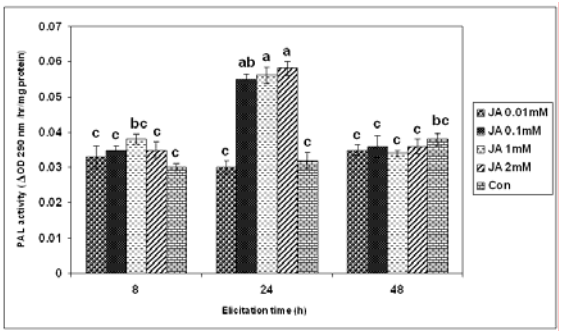


شکل (۱۱)- ترکیبات فلاونوئید کل در ریشه شیرین بیان تحت تیمار با غلظتهای مختلف متیل جاسمونات. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن و سطح معنی داری ($p < 0.05$) می باشد.



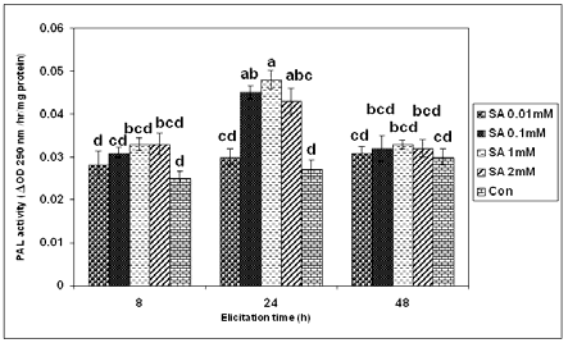
شکل (۱۲)- مقادیر ترکیبات فلاونوئید کل را در مدت ٤٨ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز: نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با متیل جاسمونات (شکل ۱۳) نشان داد که فعالیت این آنزیم در غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار پس از ۲٤ ساعت افزایش یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم برای غلظت ۲ میلی مولار متیل جاسمونات در مدت ۲٤ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۸ برابر افزایش نشان داد.



شکل (۱۳)- مقادیر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را در تیمار با غلظتهای مختلف متیل جاسمونات در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ریشه های شیرین بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید (شکل ١٤) نشان داد که فعالیت این آنزیم در غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار پس از ۲٤ ساعت افزایش یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم برای غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در مدت ۲٤ ساعت به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۷ برابر افزایش نشان داد.



شکل (١٤)- مقادیر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را در تیمار با غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید در ریشه های شیرین بیان نشان می دهد. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می باشند. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) می باشد.

بحث

شیرین بیان طیف وسیعی از ترکیبات فنولیک را تولید می کند ولی تحقیقات اندکی در زمینه بررسی تغییرات این

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات توسط القاء کننده هایی مانند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید صورت گرفته است. کشت بافت گیاهان به عنوان یک سیستم مطالعه در چندین گونه مدل به طور موفقیت آمیزی برای مطالعه تغییرات بیوشیمیایی مرتبط با پاسخهای دفاعی گیاه علیه پاتوژنها استفاده شده است (۷). کشت بافت سیستم خوبی برای دست ورزی و فراهم کردن کنترل بهتری از فاکتورهای خارجی که با فعالیتهای متابولیکی تداخل دارند، می باشد و بنابراین ارزیابی تأثیر متقابل پاتوژن- گیاه نسبتاً آسان تر است. تشکیل بسیاری از متابولیتهای ثانویه و آنزیمها در گیاهان معمولاً با پاسخهای دفاعی گیاهان به شرایط تنش متفاوت مرتبط است (۱۱ و ۲۵). ترکیباتی که قادر به کاهش اثرات تنشهای معین بوده، از نقطه نظر تئوری و تجربی حائز اهمیت می باشند.

مطالعات اخیر پیشنهاد می کند که تنشهای محیطی می تواند آسیب القاء شده توسط اکسیژن به سلولها را به واسطه تولید زیاد ROS، افزایش دهد. افزایش ROS پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را باعث شده که منجر به آسیب غشاء می گردد (۱۹). القاء تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تیمار متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید گزارش شده است (٦ و۲۲). چون متیل جاسمونات تولید ROS را در گیاهان القاء می کند، بنابراین یک سیستم آنتی اکسیداتیوی مؤثر برای گیاهان برای حفظ عملکردهای متابولیکی تحت شرایط القاء ضروری می باشد. به عنوان مثال، در مطالعات حاضر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه های شیرین بیان در غلظت ۱ میلی مولار در تمام طول مدت القاء حدود ۳ برابر و غلظت ۲ میلی مولار در ٤۸ ساعت پس از تیمار حدود ٤ برابر نسبت به شاهد با متیل جاسمونات افزایش نشان داد. مشابه با اندامهای هوایی، ریشه های شیرین بیان افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم بیش از دو برابر و کمتر از دو برابر به ترتیب پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت از تیمار با متیل جاسمونات در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار نشان دادند.

در این تحقیق متیل جاسمونات احتمالاً محتوای H_2O_2 را افزایش داده است و بنابراین می تواند به عنوان فاکتور تنش یا مولکول انتقال دهنده پیام رسان همانند سایر تنشها عمل کند. نشان داده شده است که بعضی از غلظتهای متیل جاسمونات ممکن است NADPH اکسیداز که احتمالاً مسئول تولید سریع H_2O_2 در زمان تنش می باشد، را القاء کند (۱٦). تولید سریع H_2O_2 همچنین در گیاهان گوجه فرنگی در طی ۳ دقیقه بعد از تیمار با متیل جاسمونات مشاهده شده است (۹). از آنجا که H_2O_2 سوبسترای آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می باشد می توان فرض کرد که فعالیت افزایش یافته کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ممکن است در بخشی نتیجه ای از تولید H_2O_2 در گیاهچه های تیمار شده با متیل جاسمونات در مقایسه با شاهد باشد. با این حال هنوز مشخص نیست که متیل جاسمونات چگونه برای تغییر سیستمهای آنتی اکسیدان عمل می کند. ممکن است متیل جاسمونات فعالیت آنزیمها را از طریق تغییر در رونویسی ژن، تغییر در ترجمه یا پس از ترجمه تحت تأثیر قرار دهد.

افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه های شیرین بیان پس از ۲٤ ساعت القاء به ویژه در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. پس از گذشت ٤۸ ساعت در تمام غلظتهای سالیسیلیک اسید کاهش فعالیت آنزیم در ریشه های شیرین بیان مشاهده شد و بیشترین کاهش در غلظت ۲ میلی مولار حدود ۲ برابر بود. افزایش معنی دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی شیرین بیان ٤۸ ساعت بعد از تیمار در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده گردید. همچنین افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه های شیرین بیان ۲٤ ساعت بعد از تیمار در غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید یافت شد، البته پس از گذشت ٤۸ ساعت در غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم به نصف کاهش یافت.

www.SID.ir

Archive of SID

محققین نشان دادند که سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را در برگها و کشتهای سوسپانسیون تنباکو ممانعت می کند (۷). با توجه به اینکه در تنباکو کاتالاز به عنوان رسپتور سالیسیلیک اسید شناخته شده است، و از این طریق در شرایط این ویترو و این ویو ممانعت می شود، بنابراین پیشنهاد شده که مکانیسم عمل سالیسیلیک اسید احتمالاً افزایش مقدار ROS از طریق توقف توانایی کاتالاز برای تجزیه H_2O_2 می باشد. کاتالاز که عمدتاً در پراکسی زومها قرار دارد، تجزیه و غیرسمی کردن H_2O_2 را بر عهده دارد. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تحقیق حاضر ممکن است در اثر غیرفعال سازی این آنزیم یا بازداری سنتز آنزیم جدید باشد. کاهش فعالیت این آنزیم معمولاً به عنوان کاهش توانایی ریشه ها برای تجزیه H_2O_2 در نظر گرفته می شود علاوه بر این، کاهش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه های شیرین بیان تیمار شده با سالیسیلیک اسید ممکن است نتیجه ای از غیر فعال شدن آنزیم، از طریق تأثیر متقابل با گونه های اکسیژن فعال، و یا به عنوان نتیجه ای از تنظیم آنزیم از طریق مولکولهای تأثیر گذار مرتبط با تنش باشد. از طرفی احتمال دارد که کاهش فعالیت این آنزیمها به دلیل نیاز کمتر سلولها برای متابولیسم آنتی اکسیداتیوی پس از دو روز تیمار با القاء کننده ها باشد. همچنین تغییرات القاء شده در فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان به شدت و مدت تیمار و همچنین گونه و سن گیاه وابسته می باشد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز اولین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانوئید که نقطه انشعابی میان متابولیسم اولیه و ثانویه است را کاتالیز می کند. این آنزیم همچنین نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئیدها، لیگنینها و بسیاری از ترکیبات دیگر ایفاء می کند.

در این تحقیق متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید به طور قابل توجهی میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل را در ریشه گیاهچه های شیرین بیان افزایش داده اند. به خوبی شناخته شده است که این ترکیبات از طریق مسیر فنیل پروپانوئید ساخته می شوند و آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیم کلیدی این مسیر متابولیکی مهم می باشد. همچنان که گفته شد گیاهچه های شاهد هیچ تغییر کمی در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز نشان ندادند در حالی که تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (بیش از ۰/۱ میلی مولار) فعالیت آن را در طی ۲٤ ساعت افزایش داد. فعالیت این آنزیم در ۲٤ ساعت به حد اکثر رسید، و به دو برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در این تحقیق مشابه نتایج Sharan و همکاران می باشد. آنها نشان دادند که تیمار سوسپانسیون سلولی تنباکو با متیل جاسمونات منجر به افزایش موقتی در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ۲ ساعت پس از تیمار شده و به ۲۳ برابر بعد از ۱۷ ساعت تیمار در سلولهای تیمار شده با متیل جاسمونات می رسد (۱۸). همچنین Ali و همکاران نشان دادند که تیمار ۰/۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید در کشت سوسپانسیون ریشه پاناکس باعث افزایش ۲ برابری در فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز می گردد (۲).

در مطالعات ما تیمار ریشه ها با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (بیش از ۰/۱ میلی مولار) میزان تجمع ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل را در طی ۲٤ ساعت افزایش داده و تا ٤۸ ساعت پس از تیمار این افزایش ادامه یافت. بنابراین فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز همزمان و یا قبل از تجمع ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل در ریشه های تیمار شده القاء می شود. این یافته پیشنهاد می کند که این آنزیم برای تجمع این ترکیبات ضروری می باشد. القاء با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را افزایش داده است، که روند افزایش آن کم و بیش موازی با الگوی تجمع ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل می باشد. این نتایج پیشنهاد می کند که این دو (الیسیتور) القاء کننده تجمع ترکیبات فنولیک کل به واسطه افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز می باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین متیل جاسمونات و سالیسیلک اسید نقش مهمی را در فرآیند انتقال پیام رسان ایفا می کنند که بیوسنتز ترکیبات فنولیک کل و بیان ژنهای دفاعی در گیاه را القاء می کنند.

تولید متابولیت ثانویه در ریشه های شیرین بیان می تواند در بخشی از طریق القاء با القاء کننده های مختلف تغییر یابد، و کشتهای خوب کنترل شده می توانند به عنوان منبعی برای تولید سریع و افزایش یافته فنیل پروپانوئیدها استفاده شوند. از طرفی، از آنجا که این دو القاء کننده می تواند شرایط تنش را در گیاه تقلید کنند، می توان پیشنهاد کرد که ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها ممکن است در راه کار دفاع در گیاهچه های تیمار شده با متیل جاسمونات و سالیسلیک اسید نقش ایفا کنند. بنابراین متیل جاسمونات و سالیسلیک اسید می توانند به عنوان القاء کننده های مؤثر در تولید ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئید استفاده شوند.

تشکر و قدردانی: نویسنگان مقاله از معاونت پژوهشی، مدیریت محترم و اعضاء محترم شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت صمیمانه از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1-Aebi, H.E., (1983). Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis, Vol. III, 3rd eds. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 273–286.

2-Ali, M. B., Hahn, E. J. and Paek, K. Y.,(2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules. 12: 607-621.

3-Asada, K. and Takahashi, M., (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, D.J., eds. Photoinhibition. Amsterdam: Elsevier, 227–87.

4-Chen, Z., Ricigliano, J. W. and Klessig, D. F., (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid-Binding protein from tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90: 9533-9537.

5-Cheng, G.W. and Breen, P. J. (1991). Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. Journal of American Society Horticultural Science. 116: 865-869.

6-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 *Morinda elliptica*. Enzyme and Microbial Technology. 36: 469-477.

7- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. and Mauch-Mani, B., (2002). Priming in plant–pathogen interactions. Trends in Plant Science. 7: 210-216.

8-Creelman, R. A. and Mullet, J. E., (1997). Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. American Society of Plant Biology. 9: 1211-1223.

9-Creelman, R. A., Tierney, M. L. and Mullet, J. E., (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 4938-4941.

10-Dong, H.D. and Zhong, J.J. (2001). Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. Biochem. Eng. J. 8:145–50.

11-Ebel, J. and Mithofer, A. (1998). Early events in the elicitation of plant defense. Planta. 206 :335–348.

12-Fukai, T., Cai, B. S., Maruno, K., Miyakawa, Y., Konishi, M. and Nomura, T., (1998). Phenolic constituents of *Glycyrrhiza* species. An isoprenylated flavanone from *Glycyrrhiza glabra* and REC-assay of licorice phenols. Phytochemistry. 49: 2005-2013.

13-Guan, J. Y., Wang, W. W., Ma, M. T., Zhang, S. Y. and Xing, Y. (1995). Investigation of technological preparation on soak of *Saussurea involucrate*. Journal of Shenyang Pharmacology University. 12: 209-211.

14-Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M.H., (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proceedings

www.SID.ir

Archive of SID

of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90:7490–4

15-Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22:867–880.

16-Orozco-Cardenas, M. L., Narvaez-Vasquez, J. and Ryan, C. A., (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Cell. 13: 179-191.

17-Schaller, F. (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. J. Exp. Bot. 52:11–23.

18-Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. and Okazaki, M., (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonialyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. Plant Science. 132: 13–19.

19-Scandalios, J. G., (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology. 101: 7-12.

20-Singleton, V.L. And Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. Am. J. Etnol. Viticult. 16:144-158.

21-Szabo, E., Thelen, A. and Peterson, M. (1999). Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep. 485–9.

22-Yu, D. Q., Cen, C. A., Yang, M. L. and Li, B. J., (1999). Studies on the salicylic acid inducted lipid peroxidation and defense gene expression in tobacco cell culture. Acta Botanica Sinica. 41: 977-983.

23-Yu, L.J, Lan, W.Z., Qin, W.M. and Xu, H.B.(2001). Effects of salicylic acid on fungal elicitor induced membrane-lipid peroxidation and Taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Process. Biochem. 37:477–82.

24-Yu, K.W., Gao, W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2002). Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochem. Eng. J.11:211–5.

25-Zhao, J., Lawrence, C.D. and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Res Rev. Paper Biotechnol. Adv. 23:283–333.

www.SID.ir

Archive of SID

Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid

Shabani L. [1] **and Ehsanpour A.A**[2]

[1] **Biology Dept., University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of IRAN**

[2] **Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. of IRAN**

Abstract

Effects of two elicitors methyl jasmonate (MJA) and salicylic acid (SA) on the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), and activity of phenyl alanin ammonialyase (PAL), and contents of phenolics and flavonoids in 65-days old roots of in vitro cultured plants were studied. Activities of CAT and APX enzymes in aerial parts were increased after 24 h post treatment with 2mM MJ, while similar increment was observed in roots after 48 h. Activities of these enzymes increased in roots of treated plants with 1 and 2 mM SA after 24h. Activity of CAT decreased in roots of all treated plants; while activity of APX was decreased in roots of treated plants with 1 and 2 mM SA after 48h. Moreover, significant increase in contents of phenolics and flavonoids was observed after 24 h elicitation with MJ and SA. The activity of PAL increased after 24h elicitation and for both elicitors. This observation was in accordance with increment of phenolics and flavonoids contents at similar times of elicitation.

Keywords: Antioxidant, *Glycyrrhiza glabra*, Methyl jasmonate, Salicylic acid, Phenylalanine ammonia-lyase

www.SID.ir