Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۵، صفحه ۷۴۴-۷۳۱ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.123589.2407
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.731.97.5.1575.1593

اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک، متیل‌جاسمونات و NaCl بر ترکیب‌های بیوشیمیایی کالوس استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در محیط‌کشت‌های جامد و مایع

مارال سلملیان[۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۲*] و کامبیز مشایخی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته گیاهان دارویی ادویه‌ای و نوشابه‌ای، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: aghasemnajad@hotmail.com

۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

استفاده از محرک‌ها روشی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی در شرایط برون و درون شیشه‌ای به‌شمار می‌رود. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر شوری صفر و ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات با غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومولار در دو محیط کشت جامد و مایع بر صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) کالوس گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. این تحقیق با آرایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گردید. محرک‌های مورد استفاده، محیط کشت و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر صفات اندازه‌گیری شده داشتند. بیشترین میزان تولید فنل و فلاونوئید، در تیمار اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ و تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت جامد دیده شد. تیمارهای شوری ۵۰ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و متیل‌جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ در محیط کشت جامد سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به سایر تیمارها شدند. بین آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، فنل و فلاونوئید همبستگی مثبت دیده شد. تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار همچنین سبب افزایش اسید آمینه پرولین شد. بنابراین برای بهبود تولید ترکیب‌های ثانویه‌ای مانند فنل، فلاونوئید و همچنین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در استویا، استفاده از تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید (۱۰۰ میکرومولار) و شوری (۵۰ میکرومولار) در شرایط کشت جامد توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، پرولین، کشت بافت، فنل کل، فلاونوئید کل، محیط کشت مایع.

مقدمه

سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی توانمندی بارزی دارند. بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را داراست، ازاین‌رو این توانایی را دارد تا دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والدینی یافت می‌شود، تولید نماید (Rao & Ravishankar, 2002). کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

دارویی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام (Tripathi & Tripathi, 2003). قوه نامیه بذرهای استویا بسیار پایین بوده و درصد بسیار اندکی از آنها سبز می‌شوند، به همین دلیل روش‌های تکثیر غیرجنسی، نسبت به ازدیاد از طریق بذر کارایی بیشتری دارند و در کشور ما نیز روش کشت بافت موفق‌تر از سایر روش‌های تکثیر بوده است (Azarpour *et al*., 2014). استفاده از محرک‌ها یکی از مهمترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی بوده و اثر آن تحت تأثیر نوع محرک و گیاه متفاوت است (Zhao *et al*., 2005). میزان اثر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت معمولاً به غلظت اضافه شده و مرحله رشدی نمونه گیاهی وابسته است (Wang & Wu, 2010). از شوری، هورمون اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌توان به‌عنوان الیسیتورهای (Elicitors) غیرزیستی برای افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه بهره برد. در شرایط درون شیشه‌ای رشد سلول‌ها را می‌توان به‌صورت خودکار کنترل کرد و فرایندهای متابولیکی را تنظیم نمود، فرآورده‌های مفید را می‌توان تحت شرایط کنترل‌شده تولید کرد و محصولات خالص‌تر و مطمئن‌تر به بازار عرضه نمود. به‌علاوه از کشت سلولی می‌توان برای مطالعه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد (Bourgaud *et al*., 2002؛ Rao & Ravishankar, 2002). تنش‌های غیرزیستی از قبیل شوری، فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی را که تعداد زیادی از آنها در سطح سلولی بررسی شده است، تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعه تأثیر تنش شوری بر متابولیت‌ها در بافت کالوس، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Niknam *et al*., 2004). اثر تنش شوری بر گیاهان در بافت چهار گونه شنبلیله (*Trigonella*) (Niknam *et al*., 2006)، پروانش (Neelam *et al*., 2014)، ریحان سبز (Delavari Parizi, 2010)، شنبلیله (Esam & Esam, 2011) و کنگرفرنگی (Rezazadeh *et al*., 2012) مورد بررسی قرار گرفت. یکی از روش‌های متابولیسمی بارز در تجمع پرولین واکنش به تنش اسمزی است که سازوکار احتمالی افزایش تولید آن توسط پژوهشگران مشخص شده است (Arshi *et al*., 2002). از سازوکارهای بیوشیمیایی بسیار مهم گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که دارای دو قسمت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (Phenylalanine ammonia lyase)، کاتالاز (Catalase)، پراکسیداز (Peroxidase)) و غیر آنزیمی (مانند ترکیب‌های فنیل‌پروپانوئیدی (phenylpropanoid compounds)، گلوتاتیون (Glutathione)، کاروتنوئید (Carotenoid)) می‌باشد (Abdul Jaleel *et al*., 2009). به‌طور کلی، تنش‌های وارده سبب تغییر در بیان و فعالیت آنزیم‌های دفاعی و کلیدی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌شوند که این آنزیم در بیوسنتز ترکیب‌های فنیل‌پروپانوئیدی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین و سایر ترکیب‌ها نقش اساسی دارد. استفاده از الیسیتورها روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌باشد و نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کند (Ali *et al*., 2007). مطالعات فراوانی بر روی اثر محرک‌های رشد اسید سالیسیلیک (Salicylic acid) و متیل‌جاسمونات (methyl jasmonate) بر گیاهانی مانند گل راعی (Sonja *et al*., 2007)، گونه‌ای گل‌گندمی (*Chlorophytum borivilianum*) (Babel *et al*., 2014)، کنگر فرنگی (Samadi, 2013) و سویا (Simaei *et al*., 2012) انجام شده که گویای تأثیر بسیار محرک‌های رشد بر صفات بیوشیمیایی گیاهان می‌باشد. آنزیم PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها است و عمل اصلی آن آمین‌زدایی از اسیدآمینه ال–فنیل‌آلانین (L-Phenylalanine) و تبدیل آن به ترانس سینامیک‌اسید (Cinnamic Acid trans) می‌باشد، این ترکیب به‌عنوان اولین و مهمترین حد واسط در مسیر تولید ترکیب‌های فنولی شناخته شده است (Achnine *et al*.,

www.SID.ir

Archive of SID

2004). با افزایش سطح شوری مقدار تنظیم‌کننده‌های اسمزی از قبیل پرولین افزایش می‌یابد که گیاه می‌تواند تنش‌های محیطی را تحمل نماید. افزایش در تولید پرولین، نوعی راهبرد تنظیم اسمزی است که می‌تواند منجر به کاهش رشد گیاه شود (Mirza Masoumzadeh *et al*., 2012). استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گونه‌ای چند ساله، بوته‌ای و کوتاه قد از خانواده Asteraceae و بومی نواحی شمالی آمریکای جنوبی می‌باشد. از برگ‌های استویا به‌عنوان افزودنی و شیرین‌کننده در صنایع غذایی استفاده می‌شود که در کنار غلظت بالای استویوزید (stevioside)، این گیاه منبع خوبی از پروتئین، فیبر رژیمی، مواد معدنی و اسید آمینه‌های ضروری می‌باشد (Abou-Arab *et al*., 2010). بذر گیاه استویا درصد جوانه‌زنی پائینی دارد و ازدیاد رویشی از طریق قلمه توسط تعداد کمی از افراد انجام می‌شود (Jain *et al*., 2009). ازاین‌رو کشت بافت به‌عنوان سریعترین روش برای افزایش انبوه استویا مورد توجه است. در این تحقیق سعی بر این است تا مناسب‌ترین محرک و محیط کشت در افزایش تولید خصوصیات بیوشیمیایی کالوس استویا مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در طول سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ریزنمونه برگ گیاه استویا به اندازه یک سانتی‌متر جداسازی شده و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS: Murashig & Skoog medium) حاوی محرک رشد BA (Benzyladenine) به مقدار ۰/۵ و NAA (Naphthalene acetic acid) به مقدار یک میلی‌گرم بر لیتر کشت شد و پس از تهیه کالوس به اندازه مورد نیاز، کالوس در اندازه‌های تقریبی یکسان (یک نخود) در محیط حاوی تیمارهای آزمایشی کشت شد. تیمارها شامل شوری در دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات هریک در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار، تیمارهای ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و متیل‌جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ در دو محیط کشت مایع و جامد در شرایط استریل کشت شدند. پس از گذشت چهار هفته از اعمال تیمار، میزان ترکیب‌های بیوشیمیایی فنل (Dos Santos *et al*., 2009)، فلاونوئید (Toor & Savage., 2005)، پرولین (Bates *et al*., 1973) و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) کالوس‌ها (Saunders & Mcclure., 1974) اندازه‌گیری شدند. این تحقیق به‌صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. تیمارها شامل محیط کشت (در دو سطح محیط مایع و محیط جامد) و محرک متابولیت در ۶ سطح، شامل شوری در دو سطح صفر و۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات هریک در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار، تیمارهای ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و متیل‌جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ بودند. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 انجام شد. همچنین از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر محرک‌ها، محیط کشت و اثر متقابل آنها بر تمامی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. محرک‌ها بر محتوای ترکیب‌های فنلی کالوس استویا اثر معنی‌داری داشتند، به‌طوری که وجود اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در محیط کشت سبب کاهش معنی دار محتوای فنل کالوس‌ها شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده‌است، اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت تغییرات فنل کل را به شکل معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. به‌نحوی که بیشترین میزان ترکیب فنلی در تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری۵۰ و محیط کشت جامد مشاهده شد که با تیمار شوری ۵۰ در محیط جامد از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت. همچنین تیمار شوری

www.SID.ir

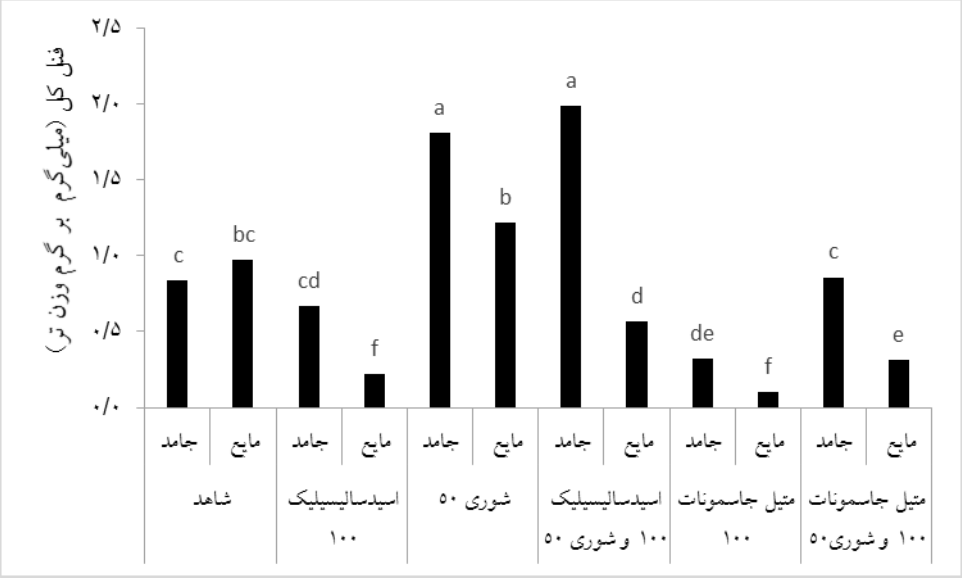
Archive of SID

۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت مایع نیز میزان فنل بالایی داشت. به‌طوری که میزان فنل کل تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در محیط‌های کشت مایع کمترین مقدار را داشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس آنزیم فنیل‌آلانین، فنل، فلاونوئید و پرولین کالوس استویا تحت تأثیر محرک‌ها و محیط کشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز	فنل	فلاونوئید	پرولین
محرک‌ها	۵	۲۷/۰۳**	۲/۰۱۳**	۰/۱۵۶**	۷۹/۲۷**
محیط کشت	۱	۲۴۵/۳۲**	۳/۱۸۱**	۰/۷۷۳**	۸۰۳/۵۰**
محرک × محیط	۵	۱۵/۴۱**	۰/۵۳۷**	۰/۰۱۳**	۱۹/۷۶**
خطا	۳۶	۱/۱۲	۰/۰۳۰	۰/۰۰۰۴	۱/۱۶۷
ضریب تغییرات		۴/۵۷	۱۴/۲۱	۷/۱۷	۱۹/۲۳

**، * و n.s: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪، ۵٪ و عدم معنی‌دار

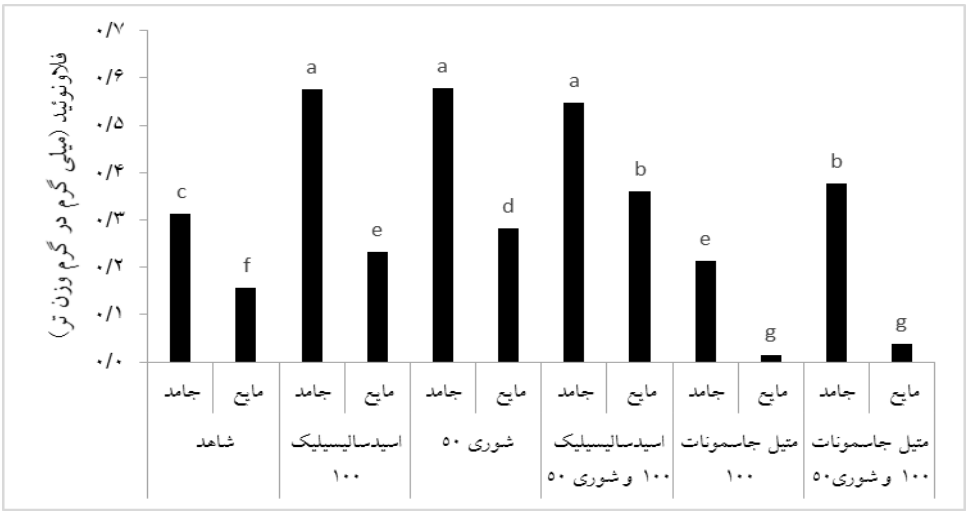


شکل ۱- اثر متقابل نوع محرک و محیط کشت بر تجمع فنل کل

در این آزمایش طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها در شرایط تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ بیشترین میزان فلاونوئید مشاهده شد که بیانگر اثر مثبت شوری بر اسید سالیسیلیک در تولید ترکیب‌های فلاونوئیدی می‌باشد. نمونه‌های رشدکرده در محیط حاوی متیل‌جاسمونات کمترین تجمع فلاونوئید را نشان دادند. بیشترین میزان این ترکیب‌ها در تیمارهای اسید سالیسیلیک ۱۰۰، شوری ۵۰ و تیمار توأم اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط کشت جامد به ثبت رسید. تحت این تیمارها میزان فلاونوئید عصاره کالوس حدود ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. به‌طوری که کمترین مقدار این ترکیب در کشت‌های مایع متیل‌جاسمونات و تیمار ترکیبی متیل‌جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ مشاهده شد (شکل ۲).

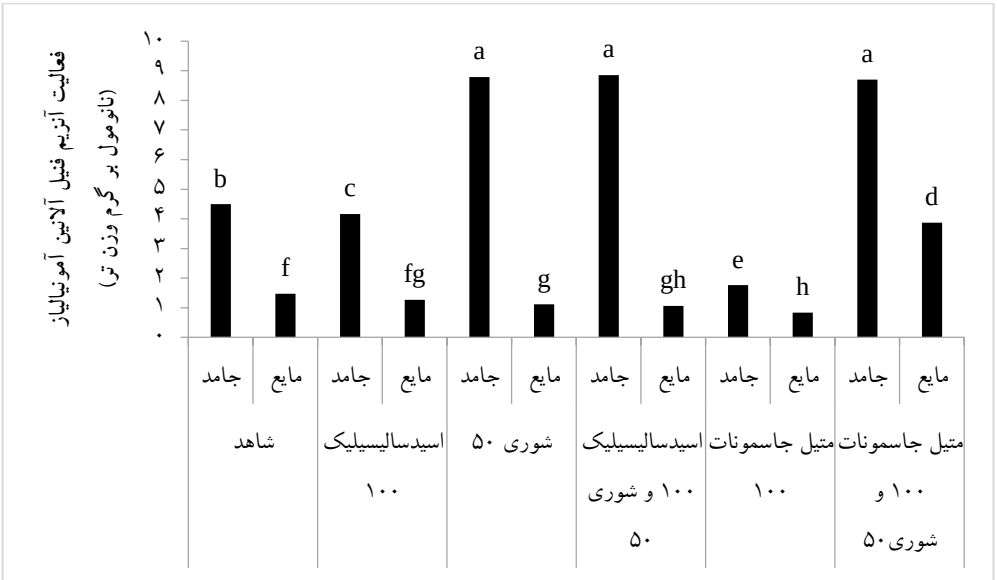
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر فلاونوئید کل

بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در تیمار ترکیب متیل‌جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ انجام شد. این در حالیست که کمترین میزان فعالیت PAL در محیط حاوی ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات مشاهده شد. محیط کشت جامد تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم PAL داشت. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط کشت جامد بدون اختلاف معنی‌داری با تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار در محیط جامد و تیمار ترکیبی متیل‌جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط جامد مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت PAL در تیمار متیل‌جاسمونات ۱۰۰ محیط مایع مشاهده شد. البته با تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ و شوری ۵۰ در محیط مایع اختلاف معنی‌داری نداشت.



شکل ۳- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

www.SID.ir

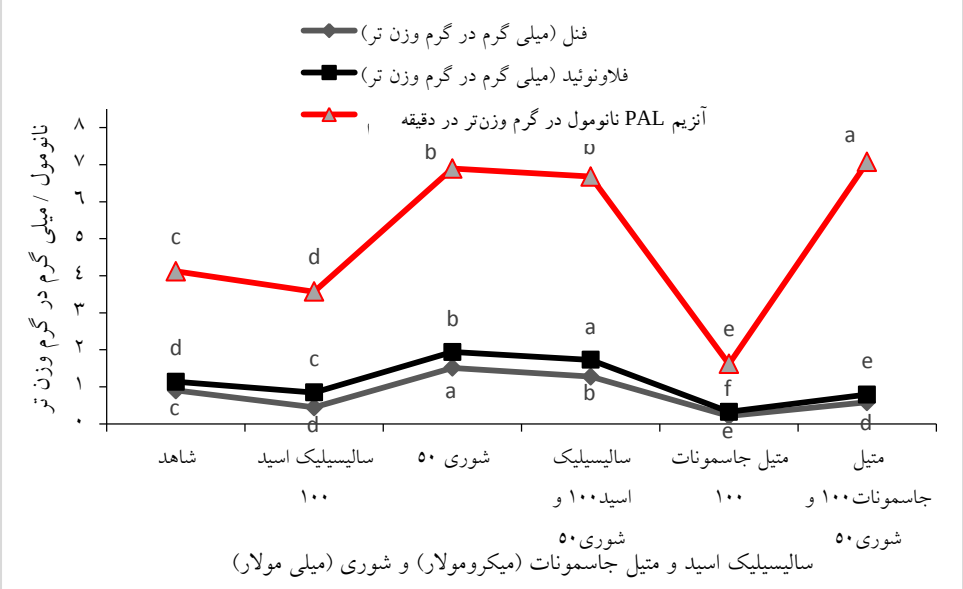
Archive of SID

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی تحت تیمار محرک‌ها و محیط کشت همبستگی مثبتی را در سطح ۱٪ نشان دادند.

محرک‌ها اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی (فنلی و فلاونوئیدی) کالوس استویا داشتند (جدول ۲). همچنین روند تغییر ترکیب‌های فنیل‌پروپانوئیدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت را نشان داد. به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در ترکیب متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ دیده شد. بیشترین تجمع ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی به‌ترتیب در تیمارهای شوری ۵۰ و ترکیب اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ حاصل شد (شکل ۴).

جدول ۲- همبستگی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز با میزان تجمع فنل کل و فلاونوئید کل

	آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز	فنل کل	فلاونوئید
آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز	۱		
فنل کل	۰/۶۷۰**	۱	
فلاونوئید	۰/۶۵۶**	۰/۶۹۸**	۱

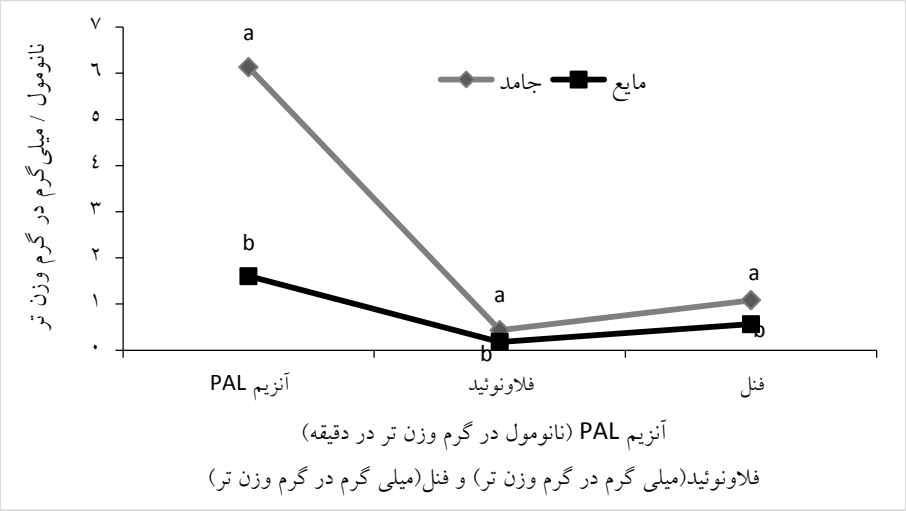


شکل ۴- اثر محرک‌ها بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

محیط کشت اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی (فنلی و فلاونوئیدی) کالوس استویا داشت. روند تغییرات فنیل پروپانوئیدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت نشان داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم و تجمع ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در محیط کشت جامد حاصل شد (شکل ۵).

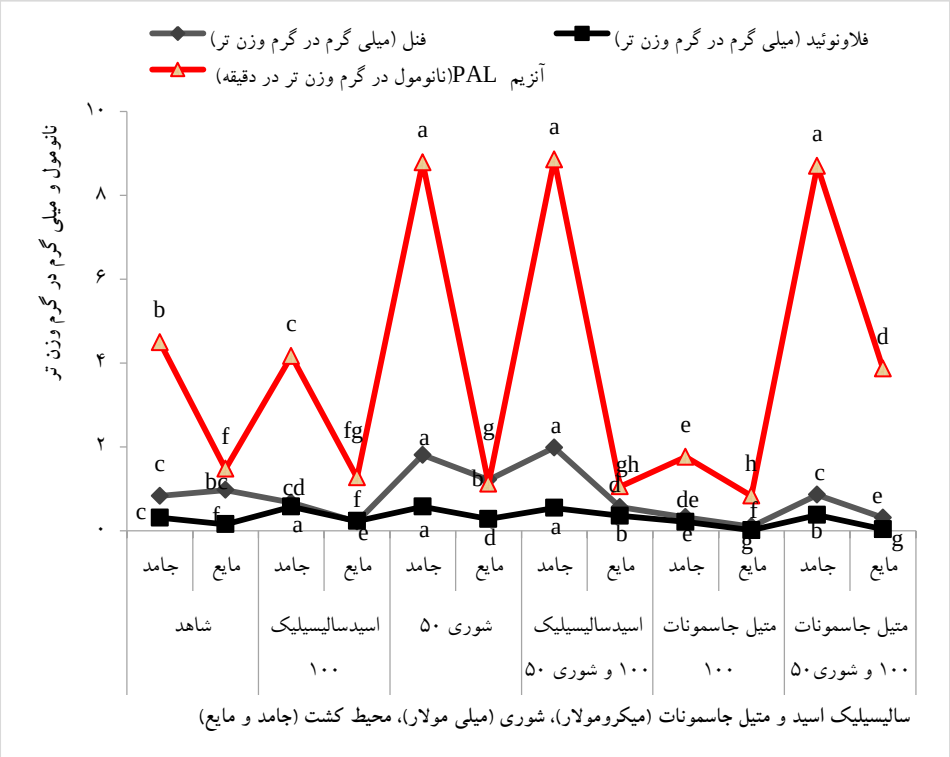
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- اثر محیط کشت بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۵۰ میلی‌مولار شوری+ محیط کشت جامد مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمارهای ۵۰ میلی‌مولار شوری+ محیط کشت جامد و تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات و ۵۰ میلی‌مولار شوری+ محیط کشت مایع نداشت (شکل ۶).

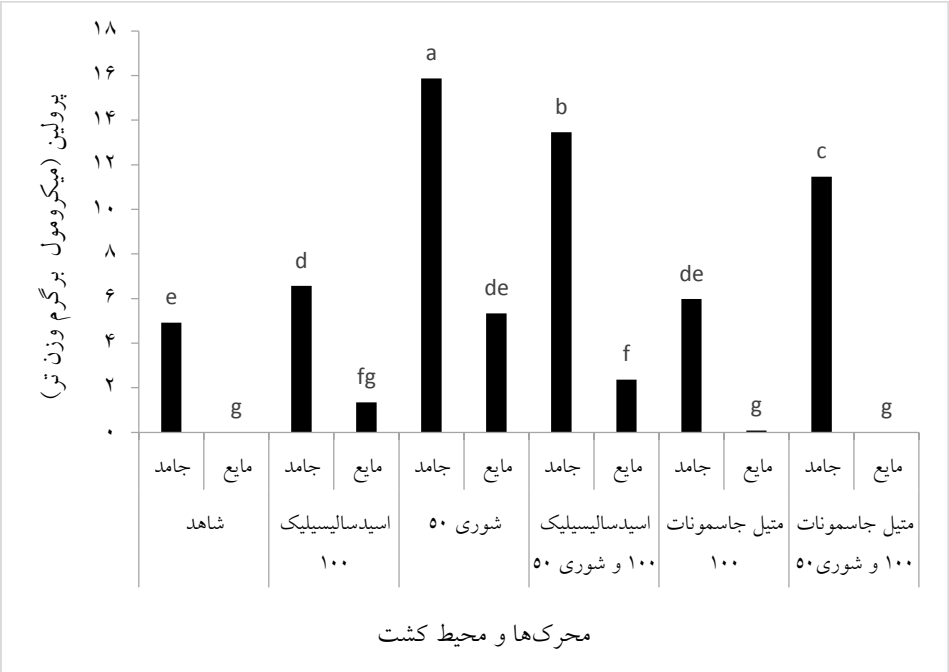


شکل ۶- اثر محیط کشت بر فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

www.SID.ir

Archive of SID

شوری بر میزان پرولین کالوس استویا اثر معنی داری داشت. به‌طوری که بیشترین میزان پرولین در تیمار شوری مشاهده شد. میزان پرولین در محیط کشت جامد بیشتر از مایع دیده شد. علت این امر احتمالاً جذب بیشتر آب در محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد و افزایش وزن کالوس در اثر این افزایش آب درون سلول‌ها می‌باشد. با توجه به شکل ۷، بیشترین میزان پرولین در تیمار ۵۰ میلی‌مولار شوری و در محیط کشت جامد مشاهده شد که افزایش ۴ برابری را نسبت به شاهد داشته است. میزان پرولین در محیط کشت مایع کمتر شد و کمترین میزان پرولین نیز در تیمارهای شاهد و متیل‌جاسمونات ۱۰۰ و ترکیب شوری ۵۰ + متیل‌جاسمونات ۱۰۰ در محیط کشت مایع دیده شد.



شکل ۷- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر میزان پرولین کالوس

بحث

شوری چه در شرایط طبیعی و چه در شرایط درون شیشه‌ای بدون در نظر گرفتن نوع گیاه سبب اختلال در رشد گیاه و تغییر فعالیت‌های متابولیکی آن می‌شود. اگرچه این تغییرات ممکن است تحت تأثیر نوع گونه گیاهی متفاوت باشد. بررسی‌ها نشان داد که اثر تنش شوری (NaCl) بر بافت کالوس چهار گونه شنبلیله ایرانی (*T. tehranica*، *T. eliptica*، *T. aphanoneura* و *T. foenum-graecum*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای سبب افزایش فنل کل شد (Niknam *et al.*, 2006). همچنین در بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر میزان تولید ترکیب‌های فنلی در گیاه *Hypericum perforatum* L. نشان داده شد که افزایش غلظت محرک سبب کاهش میزان تولید این ترکیب‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار شده است (Sonja *et al.*, 2007). تأثیر متیل‌جاسمونات بر سنتز ترکیب‌های فنلی به غلظت آن وابسته است (Horbowicz *et al.*, 2011). Babel و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که مقادیر پایین اسید سالیسیلیک (۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در گیاه *Chlorophytum borivilianum* سبب افزایش فنل کل شد. در مقابل افزایش بیشتر این اسید در محیط کشت روند کاهشی بر تجمع فنل کل داشت. بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر محتوای فنلی کالوس

www.SID.ir

Archive of SID

کنگرفرنگی نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکرومولار میزان تجمع ترکیب‌های فنلی افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار کاهش یافت که می‌تواند به‌دلیل محدود بودن توانمندی سلول‌ها در پاسخ به عامل تنش‌زا و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها مرتبط باشد (Samadi *et al*., 2013). Ehsanpour و Amini (۲۰۰۱) بیان کردند که استفاده از محیط کشت مایع ترکیب های فنلی و تولیدات سمّی را رقیق‌تر می‌کند. اسید سالیسیلیک با سازوکار کنترل شوری حاصل از نمک در جهت دفاع از گیاه اثر خود را بر افزایش فنل در کالوس استویا گذاشته است، این نتیجه در گیاهانی مانند پروانش (Neelam *et al*., 2014) و ریحان سبز (Delavari Parizi, 2010) نیز گزارش شده است. فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه ترکیب‌های فنلی هستند که نقش دفاعی مهمی در مقابل تنش‌ها ایفاء می‌کنند (Myung-Min *et al*., 2009). در آزمایشی روی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تنش شوری مقدار فلاونوئید افزایش یافت (Esam & Esam, 2011). در تنش شوری، تیمار با اسید سالیسیلیک می‌تواند فلاونوئیدها را افزایش دهد و سبب مقاومت به شوری در دانهال سویا شود (Simaei *et al*., 2012). در بررسی اثر محرک متیل‌جاسمونات در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، نتایج نشان داد که استفاده از متیل‌جاسمونات باعث کاهش تولید ایزولیکویریتیجین (Isoliquiritigenin) شد که این ترکیب پیش‌ماده تولید ترکیب‌های فلاونوئیدی است (Shirazi *et al*., 2012). فلاونوئیدها یکی از متنوع‌ترین ترکیب‌های طبیعی هستند که توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. مشاهدات ثابت می‌کند که غلظت ۲۰µM اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئیدها در گیاه *Panax ginseng* افزایش قابل توجهی را به‌همراه داشت (Yu *et al*., 2006؛ Ali *et al*., 2007). همچنین نشان داده شد که با افزایش تنش‌های محیطی و به‌علت نقص در متابولیسم گیاه، بر غلظت یون‌ها، مولکول‌ها و ترکیب‌های شیمیایی ناپایدار که تحت عنوان رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند، افزوده می‌شود. به‌طوری که با افزایش این ترکیب‌ها در سیتوپلاسم سلولی، واکنش‌های ضد اکسیداسیونی سلول شروع شده که نمونه بارز آن تجمع فلاونوئید است. Rezazadeh و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که شوری سبب افزایش معنی‌داری در ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی گیاه دارویی کنگرفرنگی شده است. Dash Agha و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که میزان فلاونوئیدهای تحت تنش شوری و تیمار اسید سالیسیلیک افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد که شوری سبب بهبود عملکرد اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات شده و اثر کاهشی آنها را از بین می‌برد. شوری حاصل از نمک NaCl سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد. ازاین‌رو برای مقابله با تنش بوجود آمده سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه فعال می‌شود که در ادامه افزایش بیان و فعالیت آنزیم PAL را سبب می‌گردد. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشاء سبب تولید اکسیژن‌های فعال، NO، پروتئین‌کینازها، اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات می شود (Andi *et al*., 2001؛ Raman & Ravi, 2011). تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌شوند. این ترکیب‌ها خود به‌طور مستقیم به‌عنوان عامل دفاعی عمل نمی‌کنند، بلکه با فعال‌سازی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه سبب حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. افزایش اسیدسالیسیلیک تا حدی فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهد و با توجه به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیکی سلول افزایش بیش از حد آستانه تحمل این ترکیب سبب کاهش این ترکیب‌ها نیز می شود. این مورد علاوه‌بر اسید سالیسیلیک، در مورد سایر محرک‌هایی مانند متیل‌جاسمونات و شوری نیز صدق می کند. Mizukami و همکاران (۱۹۹۳) بیان کردند که فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در *Lithospermum erythrorhizon* تا ۷۲ ساعت اولیه افزایش و در غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر کاهش یافت. همانطور که پیش‌تر اشاره شد

www.SID.ir

Archive of SID

کاربرد نمک NaCl سبب القای تنش شوری به گیاه گردید که به‌دنبال آن، به‌منظور خنثی‌سازی اثرهای زیان‌بار تنش‌هایی مانند تنش اکسیداتیو حاصل از تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، سازوکارهای دفاعی در گیاه فعال می‌گردد. ازجمله پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش‌ها می توان به افزایش فعالیت آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین آمونیالیاز اشاره کرد. متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک مسیر سیگنالینگ اختصاصی داشته، اما هر یک از آنها قابلیت بازدارندگی و یا تحریک‌کنندگی بر همدیگر را نیز دارند. برخی از مطالعات عامل اصلی این ارتباط را هورمون اتیلن می‌دانند. در واقع متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز سبب فعالسازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیب‌های فنلی می شوند (Wang & Wu, 2010). بیان و فعالیت آنزیم PAL رابطه مستقیم با میزان فنیل‌پروپانوئید دارد، به‌طوری که افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوئیدی می‌گردد (Bagal *et al*., 2012). در مطالعه‌ای تیمارهای اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در کشت سوسپانسیون ریشه پاناکس و شیرین‌بیان باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز شد (Ali *et al*., 2007). در شرایط تنش‌های محیطی ازجمله تنش شوری، ترکیب‌هایی مانند اسید سالیسیلیک با فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیب‌های دفاعی سبب افزایش مقاومت گیاهان می شوند که این اثر اسید سالیسیلیک به سازوکار اثر محرک آن بر تغییر بیان ژن‌های سازنده آنزیم‌های درگیر در فرایندهای دفاعی در گیاهان بازمی‌گردد (He & Zhu, 2008). استفاده از ترکیب‌هایی مانند نمک NaCl به عنوان الیسیتور، سبب القای تنش شوری در گیاهان شده و به‌دنبال آن سازوکارهای تدافعی گیاه برای بقاء فعال می شود که در نهایت منجر به افزایش بیان آنزیم PAL و نیز بیوسنتز مواد مؤثره وابسته می‌گردد. ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی در اندام‌های مختلف گیاهان وجود دارند که آنزیم‌های مختلفی نقش سنتز این ترکیب‌های مهم را بر عهده دارند. Chen و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که دآمینه شدن فنیل آلانین و تولید سینامیک اسید مهمترین مرحله در تولید و بیوسنتز فنل‌ها می‌باشد. افزایش فعالیت PAL منجر به افزایش ترکیب‌های فنلی می شود که این واکنش از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش می‌باشد (Huang *et al*., 2010). داده‌های زیادی همبستگی بین تجمع ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم PAL را نشان می دهند که فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین منجر به افزایش تجمع ترکیب‌های فنیل‌پروپانوئیدی می‌شود (Gallao *et al*., 2010). بررسی‌های Jacobo-Velázquez (۲۰۱۱) نشان داد ه که آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش یافته و با بیشتر شدن فعالیت ویژه آنزیم فنیل آلانین، متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابند. Koushesh و همکاران (۲۰۱۲) همبستگی مثبت بین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و ترکیب‌های فنلی را به اثبات رسانده‌اند. یکی از روش‌های متابولیسمی بارز در واکنش به تنش اسمزی، تجمع پرولین است که سازوکار احتمالی افزایش تولید آن توسط پژوهشگران مشخص شده است (Arshi *et al*., 2002). تنش شوری سبب بروز تنش اسمزی (تنش آبی) می‌گردد، در چنین شرایطی گیاهان برای مقابله با تنش بوجود آمده از سازوکارهای متنوعی استفاده می‌نمایند تا اثرهای ناشی از تنش را تخفیف دهند. افزایش سنتز و تجمع اسمولیت‌ها از روش‌های مهم تداوم جذب آب و کنترل تنش اسمزی است که اهمیت تجمع پرولین در حفظ وضعیت آبی گیاه بسیار زیاد بوده و به عنوان وسیع‌ترین اسمولیت انباشته شده در تنش عمل می‌کند (Rhodes *et al*., 2002). میزان پرولین در محیط کشت جامد بیشتر از مایع بود. علت این امر احتمالاً جذب بیشتر آب در محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد و افزایش وزن کالوس در اثر این افزایش آب درون سلول ها می باشد. همچنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرایند طبیعی سلولی ممانعت بعمل می‌آورد. استفاده از ترکیب‌هایی مانند اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات، مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش می دهند و موجب بهبود فعالیت‌های متابولیکی گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

می شوند. پرولین باعث محافظت غشای سلولی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. آزمایش‌های Sairam و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که افزایش پرولین و قند احیاء باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر شوری می‌شود. در محیط درون شیشه‌ای پرولین نقش یک جاروکننده ROS را بر عهده دارد و باعث افزایش سنتز سلولی در طول تنش در گیاهان می شود. البته افزایش میزان پرولین در این آزمایش می تواند به‌دلیل افزایش سنتز پرولین یا کاهش تجزیه آن به‌منظور مقابله با تنش شوری باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی میتوان گفت که به‌دلیل اهمیت بسیار ترکیب‌های ثانوی گیاهان دارویی و کاربرد این ترکیب‌ها در صنایع مختلف، دستیابی به روش‌های مفید برای تولید اقتصادی این ترکیب‌ها بسیار حائز اهمیت است. کاربرد ایلیسیتورها و ایجاد تنش به‌منظور تحریک بیوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه، یکی از مهمترین روش‌های افزایش متابولیت های ثانویه است. در این آزمایش اثر شوری و اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌عنوان ایلیسیتور در دو محیط کشت جامد و مایع استفاده شد و نتایج نشان داد که فعالیت‌های بیوشیمیایی کالوس تحت تأثیر ایلیسیتورها و همچنین محیط کشت قرار دارد. با توجه به نتایج بدست‌آمده به نظر می‌رسد که در کشت استویا در صورت تمایل به تولید متابولیت به‌ویژه توجه به مقوله کشت متابولیتی در شرایط درون شیشه‌ای بهتر است که از سیستم کشت مایع استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

- Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. and Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3): 427-436.
- Abou-Arab, E.A., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, F.M., 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant. African Journal of Food Science, 4(5): 269-281.
- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. and Dixon, R.A., 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell, 16: 3098-3109.
- Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2007. Methyl jasmonat and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolic in Panax ginseng Bioreactor root suspension culture. Journal of Molecules, 12: 607-621.
- 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 Cell Physiology, 42(4): 446-449.
- Arshi, A., Abdin, M.Z. and Iqbal, M., 2002. Growth and metabolism of senna as affected by salt stress. Biologia Plantarum, 45(2): 295-298.
- Azarpour, E., Motamed, M.K. and Bozorgi, H.R., 2014. *Stevia* cultivation and promotion. Lahijan of Islamic Azad University Press, Lahijan.
- Babel, P., Devpura, V. and Purohit, S.D., 2014. Salicylic acid induced changes in growth and some biochemical characteristics in vitro cultures shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. Et Fernand. International Journal of Recent Scientific Research, 5(4): 774-779.
- Bagal, U.R., Leebens Mack, J.H., Walter Lorenz, W. and Dean, J.F.D., 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. BMC Genoms, 13(3): 1471-2164.
- Bates, L., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E., 2002. Production of plant secondary metabolites. Plant Science 161: 839-851.
- Chen, J.Y.W., Kong, P.F., Pan, W.F., Wan, Q.H. and Huang, W.D., 2006. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. Journal of Plant Physiology, 163(2): 115-127.
- Dash Agha, Z., Mazaheri Tirani, M. and Ghasemi Khorasgani, M., 2014. The effect of acid-salicylic on some growth and biochemical parameters of wheat and maize under salt stress in laboratory conditions. Journal of Crop Production and Processing, 4(11): 207-216.
- Delavari Parizi, M., 2010. The effects of Salicylic acid and salinity stress on the some physiological and biochemical changes in *Ocimum basilicum* L.

www.SID.ir

Archive of SID

- Mirza Masoumzadeh, B., Imani, A.A. and Khayamaim, S., 2012. Salinity stress effect on proline and chlorophyll rate in four beet cultivars. Annals of Biological Research, 3(12): 5453-5456.
- Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B.E., 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 12(12): 706-709.
- Myung-Min, H., Trick, H.N. and Rajasheka, E.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology, 166: 180-191.
- Neelam, M., Rahul, M., Ajiboye, M., Kafayat, Y. and Lateefat, Y., 2014. Salicylic acid alters antioxidant and phenolic metabolism in *Catharanthus roseus* grown under salinity stress. African Journal of Traditional, Complementry and Alternative Medicines, 11(5): 118-125.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H. and Sokhansanj, A., 2004. Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. Biologia Plantarum, 48: 613-615.
- Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifizadeh, B., 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. Biologia Plantarum, 50(4): 591-596.
- 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.
- Rao, R.S. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant tissue cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.
- Rezazadeh, A., Ghasemnezhad, A. and Barani, M., 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. Journal of Medicinal Plant, 63: 242-252.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. and Rich, P.J., 2002. Salinity, osmolytes compatible solutes: 181-204. In: Lauchli, A. and Luttge, U., (Eds.). Salinity: Environment-Plants-Molecules. Kluwer Academic Publ., Boston, 552p.
- Sairam, R.K., Tyagi, A. and Chinnusamy, V., 2006. Salinity tolerance: cellular mechanisms and gene regulation: 121-176. In: Huang, B., (Ed.). Plant-Environment Interactions. CRC Press, Boca Raton, FL, 416p.
Master thesis, Department of Biology, Payame Noor University.
- Dos Santos, V.L., de Souza Monteiro, A., Braga, D.T. and Santoro, M.M., 2009. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. Journal of Hazardous Material, 161: 1413-1420.
- Ehsanpour, A. and Amini, F., 2001. Plant Cell and Tissue Culture. JDM Press, 181p.
- Esam, A.H. and Esam M.A., 2011. Effect of mannitol and sodium chloride on some total secondary metabolites of fenugreek calli cultured in vitro. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 21(1): 35-43.
- Gallao, M.I., Cortelazzo, A.L., Salema Fevereiro, M.P. and Brito, E.S., 2010. Biochemical and morphological responses to abiotc elicitor chitin in suspension-cultured sugarcane cells. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(2): 8-18.
- He, Y. and Zhu, Z.J., 2008. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. Biologia Plantarum, 52(4): 792-795.
- Horbowicz, M., Chrzanowski, G., Koczkodaj, D. and Mitrus, J., 2011. The effect of methyl jasmonate vapors on concentration of phenolic compounds in seedlings of commom buckwheat (*Fagopyrume sculentum* Moench). Acta Societiatis Botanicorum Poloniae, 80(1): 5-9.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. and Chen, Z., 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development and response to environmental stress. Plant Physiology, 153(4): 1526-1538.
- Jacobo-Velázquez, D.A., Martínez-Hernández, G.B., Del C Rodríguez, S., Cao, C.M. and Cisneros-Zevallos, L., 2011. Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(12): 6583-6593.
- Jain, P., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L., 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae, 119(3): 315-319.
- Koushesh, M., Arzani, K. and Barzegar, M., 2012. Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 8947-8953.

www.SID.ir

Archive of SID

elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant Cell Tissue Organ Culture, 89: 1-13.
- Toor, R.K. and Savage, G.P., 2005. Antioxidant activities in different fractions of tomato. Food Research International, 38: 487-494.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
- Wang, J.W. and Wu, J.Y., 2010. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. Application Microbiology Biotechnology, 88: 437-449.
- Yu, Z.Z., Fu, C.X., Han, Y.S., Li, Y.X. and Zhao, D.X., 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnology Letter, 28: 1027-1031.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23(4): 283-333.
- Samadi, S., 2013. Effect of elicitors (salicylic acid, methyl jasmonate) on biochemical conditions of *Cynara scolymus*. M.Sc. thesis. Department of Agricultural Science and Natural Resourses, The Gorgan University.
- Saunders, J.A. and Mcclure, J.W., 1974. The suitability of a quantitive spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity in barely, buckwheat and pea seadlings. Journal of Plant Physiology, 54: 412-413.
- Shirazi, Z., Piri, Kh., Mirzaie Asl, A. and Hasanloo, T., 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrriz glabra*. Journal of Medicinal Plants Research, 31: 4640-4646.
- Simaei, M., Khavari-Nejad, R.A. and Bernard, F., 2012. Exogenous application of salicylic acid and nitric oxide on the ionic contents and enzymatic activities in nacl-stressed soybean plants. American Journal of Plant Sciences, 3: 1495-1503.
- Sonja, G., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C. and Hagege, D., 2007. Jasmonic acid

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of salicylic acid, methyl jasmonate and NaCl stimulants on biochemical compounds of stevia's callus in solid and liquid media

M. Salmalian[1], A. Ghasemnejad[2*] and K. Mashayekhi[3]

1- M.Sc. student in Medicinal and Aromatic Plants, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
E-mail: aghasemnajad@hotmail.com
3- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: October 2018 Revised: July 2019 Accepted: July 2019

Abstract

Using stimulants is an efficient way to increase the production of secondary metabolites of medicinal plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. The present study aimed to investigate the effect of NaCl (0 and 50 mM), salicylic acid, and methyl jasmonate (each in 0 and 100 µM) in solid and liquid culture media on the biochemical properties and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity of stevia callus under *in vitro* conditions. This study was conducted in a completely randomized design with a two-factor factorial arrangement in four replications. The stimuli used, culture medium and their interactions had a significant effect on the measured traits. The highest amount of phenol and flavonoid production was observed in salicylic acid 100 + salinity 50 and salinity 50 treatments in solid culture medium. Treatments including salinity 50, salicylic acid 100 + salinity 50 and methyl jasmonate 100 + salinity 50 in the solid medium increased PAL enzyme activity compared to other treatments. PAL enzyme, phenol and flavonoid were positively correlated each other. The 50 mM salinity treatment also increased proline amino acid content. Therefore, in order to improve the production of secondary compounds such as phenol, flavonoids and also PAL enzyme activity in stevia, a combination of salicylic acid (100 µM) and salinity (50 mM) is recommended under solid culture medium conditions.

Keywords: Phenylalanine ammonialyase, proline, tissue culture, phenol, flavonoid, liquid media.

www.SID.ir