

Optimization of nettle (*Urtica dioica* L.) callogenesis and the effect of methyl jasmonate elicitor on biochemical properties of callus

Minoo Sarrafi¹, Mohsen Mahmoodnia Meimand^{2*}, Maryam Dahajipour Heidarabadi¹ and Mohammad Reza Dehghani¹

1- Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

2*- Corresponding author, Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
E-mail: m.mahmoodnia@vru.ac.ir

Received: August 2023

Revised: October 2023

Accepted: December 2023

Abstract

Background and objectives: In recent years, *Urtica dioica* L. has attracted the attention of researchers due to its significant effect on many diseases, especially diabetes. However, more research needs to be done in the field of tissue culture and the effect of elicitors on antioxidant properties and the production of its secondary metabolites. This research aimed to investigate the best hormonal combination and light conditions effective on nettle callogenesis and the effect of methyl jasmonate elicitor on its biochemical properties.

Methodology: For this purpose, using stem explants, the effect of different levels of auxin hormones, naphthalene acetic acid (NAA) (1.5 and 3 mg/l) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4 D) (0.5 and 1.5 mg/l) and cytokinin hormone, benzylaminopurine (BAP) (0.5 and 1.5 mg/l) were evaluated in two light conditions (light and dark) by measuring fresh weight, dry weight and percentage of callogenesis. The nettle plant's callus growth curve was obtained using liquid culture. After starting the suspension culture, methyl jasmonate treatment was applied with three levels of 1, 0.1 and 0.01 mM, and sampling was done at 24, 48 and 96 hours. The enzyme activity of phenylalanine ammonialyase and polyphenol oxidase and total protein content by extracting in 50 mM Tris-HCl buffer with 8.8 acidity and total phenol, total flavonoid content by extracting in 80% methanol was measured using spectrophotometric and standard methods for control samples and those under different treatments of methyl jasmonate. Also, three metabolites of quercetin, kaempferol and rutin were measured using an HPLC device with a UV detector and 18C column stationary phase. Data from the callogenesis experiment were analyzed in a two-factor experiment in a completely randomized design. The data from the biochemical and HPLC experiments were analyzed in a split-plot in time design, and the means were compared with Duncan's test.

Results: According to the results, the best hormonal combination to produce fresh and dry weight in light conditions includes 1.5 mg/l of NAA and 1.5 mg/l of BAP and in dark conditions, it includes 1.5 mg/l naphthalene acetic acid and 0.5 mg/l of benzyl aminopurine. Also, according to the results, naphthalene acetic acid (62.5%) performed better than 2,4-D (43.5%) in the nettle callogenesis percentage. Lighting was determined as the best light condition for callogenesis in nettle, so the amount of fresh and dry weight and percent of callogenesis in light compared to darkness increased by 4.79, 4.91 and 1.92 times, respectively. There was an increase in polyphenol oxidase enzyme activity, total phenol and total protein in some samples treated with methyl jasmonate compared to the control, and no significant increase was observed in the activity of phenylalanine ammonialyase enzyme and total flavonoid content. According to the HPLC results, the highest amount of rutin metabolite was obtained in 96 hours after the addition of the elicitor and at the concentration of 0.01 mM methyl jasmonate.

Conclusion: The naphthalene acetic acid hormone was more effective than the 2,4-D hormone



and light conditions than darkness in nettle callogenesis. Methyl jasmonate elicitor increased the antioxidant property of nettle (48 hours after treatment) by increasing the polyphenol oxidase enzyme activity. However, compared to the control, it had no significant effect on the phenylalanine ammonialyase enzyme activity and total flavonoid. It is suggested that other concentrations of methyl jasmonate be tested to reach optimal conditions for increasing the production of secondary metabolites in nettle in vitro culture conditions.

Keywords: Auxin, antioxidant, polyphenol oxidase, secondary metabolite, rutin, nettle (*Urtica dioica* L.).

بهینه‌سازی کالوس‌زایی گزنه (*Urtica dioica* L.) و تأثیر الیستور متیل جاسمونات بر ویژگی‌های بیوشیمیایی کالوس

مینو صرافی^۱، محسن محمودنیا میمند^{۲*}، مریم دهجی پور حیدرآبادی^۳ و محمدرضا دهقانی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

پست الکترونیک: m.mahmoodnia@vru.ac.ir

۳- استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر گیاه دارویی گزنه (*Urtica dioica* L.) به دلیل تأثیرگذاری قابل توجه بر بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری دیابت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. با وجود این، تحقیقات کمی در زمینه کشت بافت و تأثیر الیستورها بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و تولید متابولیت‌های ثانویه آن انجام شده است. این پژوهش با هدف بررسی بهترین ترکیب هورمونی و شرایط نوری مؤثر بر کالوس‌زایی گزنه و تأثیر الیستور متیل جاسمونات بر ویژگی‌های بیوشیمیایی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای این منظور با استفاده از ریزنمونه ساقه، اثر سطوح مختلف هورمون‌های اکسین نفتالین استیک اسید (۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و ۲ و ۴-دی کلروفوکسی استیک اسید (2,4-D) (۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و سیتوکینین بنزیل آمینوپورین (۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در دو شرایط نوری (روشنایی و تاریکی) با اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک و درصد کالوس‌زایی بررسی شد. با استفاده از کشت مایع، منحنی رشد کالوس گیاه گزنه بدست آمد. پس از راه‌اندازی کشت تعلیقی، تیمار متیل جاسمونات با سه سطح ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار اعمال شد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت نمونه‌برداری انجام شد. فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز، پلی فنل اکسیداز و محتوای پروتئین کل با عصاره‌گیری در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ و محتوای فنل کل، فلاونوئید کل با استخراج در متانول ۸۰٪ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و روش‌های استاندارد برای نمونه‌های شاهد و تحت تیمارهای مختلف متیل جاسمونات اندازه‌گیری شد. همچنین میزان سه متابولیت کوئرستین، کامفرول و روتین با استفاده از دستگاه HPLC دارای آشکارساز UV و فاز ثابت ستون C₁₈ اندازه‌گیری شد. تجزیه داده‌های آزمایش کالوس‌زایی براساس آزمایش دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی و داده‌های آزمایش بیوشیمیایی و HPLC در قالب طرح خرد شده در زمان انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گردید.

نتایج: براساس نتایج، بهترین ترکیب هورمونی برای تولید وزن تر و خشک در شرایط روشنایی، شامل ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین و در شرایط تاریکی شامل ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین بود. همچنین با توجه به نتایج، نفتالین استیک اسید (۶۲/۵٪) نسبت به 2,4-D (۴۳/۵٪) عملکرد بهتری در درصد کالوس‌زایی گزنه نشان داد. روشنایی به‌عنوان بهترین شرایط نوری برای کالوس‌زایی در گزنه تعیین شد، به طوری که میزان وزن تر، وزن خشک و درصد کالوس‌زایی در روشنایی نسبت به تاریکی به ترتیب افزایش ۴/۷۹، ۴/۹۱ و ۱/۹۲ برابری داشت. افزایش در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، فنل کل و پروتئین کل در بعضی نمونه‌های تحت تیمار متیل جاسمونات نسبت به شاهد دیده شد و در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و محتوای فلاونوئید کل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. براساس نتایج HPLC بیشترین میزان متابولیت روتین در زمان ۹۶ ساعت پس از افزودن الیستور و در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات بدست آمد.

نتیجه‌گیری: هورمون نفتالین استیک اسید نسبت به هورمون 2,4-D و شرایط روشنایی نسبت به تاریکی در کالوس‌زایی گزنه مؤثرتر واقع شد. الیستور متیل جاسمونات باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گزنه (۴۸ ساعت پس از تیمار) به وسیله افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

شد ولی اثر معنی‌داری در تغییر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا‌لیاز و فلاونوئید کل نسبت به شاهد نداشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود غلظت‌های دیگر متیل جاسمونات به منظور رسیدن به شرایط بهینه برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت درون شیشه گزنه بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، آنتی‌اکسیدان، پلی‌فنل اکسیداز، متابولیت ثانویه، روتین، گزنه (*Urtica dioica L.*).

مقدمه

گزنه با نام علمی *Urtica dioica L.* گیاهی چند ساله، دوپایه با برگ‌های متقابل و دندان‌دار، گوشوارک‌های پایدار متعلق به خانواده Urticaceae و راسته Rosales است که ارتفاع آن به ۱-۲ متر می‌رسد (Asgarpanah & Mohajerani, 2012; Pinelli et al., 2008). برگ‌ها و ساقه‌های آن دارای کرک‌های گزنده زیادی هستند (Said et al., 2015) و به‌طور گسترده در مناطق گرمسیری و معتدل پراکنده شده است (Friis, 1993). این گیاه احتمالاً بومی سراسر اروپا و آسیا از مدیترانه تا نواحی قطب شمال است و در سایر مناطق طبیعی معتدل جهان مانند هند، چین، استرالیا، نیوزیلند، شمال و جنوب آفریقا، شمال و جنوب آمریکا وجود دارد (Šrútek & Teckelmann, 1998). انتشار این گیاه در نقاط مرطوب ایران، به‌ویژه نواحی شمالی، غربی، مرکزی و ارتفاع ۳۰۰۰ متری از سطح دریا است و در بعضی شهرهای استان‌های گلستان، مازندران، آذربایجان، لرستان، خوزستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، بوشهر، اصفهان، شاهرود، بسطام و کاشان به فراوانی دیده می‌شود (Babashpour-Asl et al., 2014).

گزنه از جمله گیاهان دارویی است که قرن‌هاست برای مقابله با انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود. گزنه به‌دلیل محتوای بالای مواد مغذی و ترکیبات زیست فعال مانند پلی‌فنل‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی دارای ارزش غذایی بسیار زیاد و اثرهای دارویی فراوانی از جمله فعالیت ضد تکثیر، ضد التهاب، ضد دیابت، آنتی‌اکسیدانی، ضد درد، تقویت سیستم ایمنی (تحریک ایمنی)، ضد عفونی، کاهش فشار خون، بهبود زخم و پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی است (Said et al., 2015). این اثرهای مفید گزنه به طیف گسترده‌ای از ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف

گیاه از جمله پلی‌فنل‌ها، کومارین‌ها، تریپنویئیدها، استرول‌ها، فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و لکتین نسبت داده می‌شود (El Haouari & Rosado, 2019).

طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی حدود ۸۰٪ مردم هنوز به‌طور عمده از گیاهان دارویی به‌عنوان دارو استفاده می‌کنند (Tripathi & Tripathi, 2003). ترکیبات مورد استفاده برای تولید داروها نیز به‌طور مستقیم و غیرمستقیم از گیاهان بدست می‌آیند. تعداد زیادی از گونه‌های گیاهان دارویی به دلیل بهره‌برداری بیش از حد در معرض خطر نابودی قرار دارند و این جمع‌آوری اجتناب‌ناپذیر گیاهان دارویی از زیستگاه‌های طبیعی نه تنها ناپایداری‌های زیست محیطی و ایجاد خطر برای بقای آنها را به‌وجود آورده است بلکه بسیاری از گیاهان به‌دلیل استفاده بی‌رویه در آستانه انقراض قرار گرفته‌اند و سنتز شیمیایی بسیاری از این ترکیبات امکان‌پذیر نبوده و یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. این موضوع صنایع و دانشمندان را بر آن داشته تا فناوری‌های جایگزینی را برای تولید داروهای گیاهی بیابند تا بتوان زیستگاه طبیعی گیاهان را حفظ کرد. به این سبب استفاده و پیشرفت در کشت بافت گیاهی امکان تکثیر سریع و استفاده پایدار از گیاهان دارویی را برای نسل‌های آینده فراهم می‌کند. تولید کنترل شده متابولیت‌های گیاهی از طریق کشت سلولی جایگزین مناسبی نه تنها در کاهش فشار به رویشگاه‌های طبیعی گونه‌های گیاهی است، بلکه شرایط مناسب نیز برای تولید متابولیت‌های ثانویه را در طول سال‌ها فراهم می‌کند (Sidhu, 2011; Sood, 2020).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر رشد سلولی، تمایز و تشکیل متابولیت‌ها هستند. همچنین غلظت مناسب محیط یکی از عوامل تعیین‌کننده در کنترل رشد کالوس و تولید متابولیت است و نوع ریزنمونه و

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و اعمال تیمار کالوس‌زایی

بذرهای گیاه دارویی گزنه (*U. dioica* L.) در گلدان حاوی خاک برگ و خاک باغچه با نسبت ۳ به ۱ کشت شدند و پس از رسیدن به مرحله چهار تا شش برگی به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه ژنتیک و تولید گیاهی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان منتقل گردیدند. با توجه به نتایج تحقیقات Sarrafi و همکاران (۲۰۲۲) از ریزنمونه میانگره (ساقه) به‌عنوان بهترین ریزنمونه در کالوس‌زایی گیاه گزنه برای تعیین بهترین ترکیب هورمونی (اکسین و سیتوکینین) و تعیین بهترین شرایط نوری (روشنایی و تاریکی) استفاده شد. برای تهیه محیط کشت از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) شامل ۸٪ آگار و ۳٪ ساکارز با سطوح مختلف هورمون سیتوکینین بنزیل‌آمینوپورین و دو اکسین نفتالین‌استیک‌اسید و توفوردی استفاده گردید (جدول ۱). برای ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار از هیپوکلریت سدیم ۱/۲٪ (به مدت ۱۰ دقیقه) و اتانول ۷۰٪ (به مدت ۳۰ ثانیه) و بعد سه مرتبه آبشویی با آب مقطر استریل استفاده شد. ریزنمونه‌های تهیه شده، بعد از خراش‌دهی به محیط کشت منتقل شدند. سپس محیط‌های کشت به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) و شرایط تاریکی با دمای ۲۵ درجه منتقل شدند. هر یک از سطوح هورمونی (جدول ۱) با یک حرف از دیگری متمایز شد و در ادامه ارزیابی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش صفات وزن تر، وزن خشک و درصد کالوس‌زایی اندازه‌گیری شد.

تعیین منحنی رشد گیاه گزنه

برای تهیه منحنی رشد کالوس‌ها و پیدا کردن بهترین زمان اعمال الیسیتور، تعدادی ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع MS با همان ترکیب هورمونی محیط کشت جامد کالوس‌ها تهیه شد. میزان ۰/۵ گرم کالوس در هر ارلن که حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع بود قرار داده شد و به

شرایط نوری نیز تأثیر به‌سزایی در القای کالوس در گونه‌های مختلف دارد. برای تولید متابولیت‌های ثانویه از گیاهان دارویی، ایجاد شرایط بهینه کشت برای گونه‌های گیاهی خاص نیز حائز اهمیت است (Fazili et al., 2022). همچنین استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی در کشت بافت گیاهان باعث افزایش تولید متابولیت‌های آن می‌شود (Sood, 2020). اسید جاسمونیک (JA) و متیل استر آن (متیل جاسمونات MeJA)، به‌عنوان الیسیتور و ترکیبات پیام‌رسان مهم در فرایند تحریک که منجر به تولید بیش از حد متابولیت‌های ثانویه مختلف می‌شود، پیشنهاد شده‌اند (Wang et al., 2015). همچنین متیل جاسمونات در انتقال پیام و افزایش سرعت واکنش‌های آنزیمی مؤثر است و منجر به تشکیل ترکیبات خاصی مانند پلی‌فنل‌ها، تریپنوییدها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها می‌شود. این الیسیتور نقش کلیدی در افزایش استرس اکسیداتیو، ارتقای فعالیت آنزیم‌ها و افزایش سطح بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در گیاهان دارد (Liu et al., 2022).

در میان متابولیت‌های گیاهی، ترکیبات فنلی یکی از اصلی‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان و در میان آنها فلاونوئیدها مهمترین و بیشترین گروه‌های فنولیک گیاهی را تشکیل می‌دهند (Tapas et al., 2008). فلاونوئیدها به دلیل اثرهای مفیدشان بر سلامتی شناخته شده‌اند و این اثرها به خواص ضد اکسیداتیو، ضد التهابی، ضد جهش‌زایی، ضد سرطان‌زایی و تأثیر آنها بر تعدیل عملکرد آنزیم‌های کلیدی سلولی نسبت داده می‌شود. فلاونوئیدها جزء ترکیبات اصلی عصاره گیاه دارویی گزنه می‌باشند. ازجمله متابولیت‌هایی که در ترکیب اصلی ساقه‌های گزنه هستند، کوئرستین، روتین و کائمفرول و گلیکوزیدهای آنها می‌باشند (El Haouari & Rosado, 2019).

در همین راستا، این پژوهش با هدف تعیین بهترین ترکیب هورمونی و شرایط نوری بر کالوس‌زایی گیاه دارویی گزنه و تأثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر ویژگی‌های بیوشیمیایی آن انجام شد.

طبق نتایج بدست آمده منحنی رشد براساس وزن تر کالوس‌ها ترسیم گردید.

شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۰۰ دور بر دقیقه در شرایط روشنایی منتقل گردید. بعد از گذشت ۴ روز از کشت، یک روز در میان از کالوس‌ها نمونه برداری شد و

جدول ۱- سطوح مختلف اکسین و سیتوکینین جهت تعیین بهترین ترکیب هورمونی کالوس‌زایی گزنه

از ریزنمونه میانگه در محیط کشت MS

Table 1. Different auxin and cytokinin concentrations to determine the best hormonal combination of *Urtica dioica* callogenesis from internode explant in MS culture medium

Number	Code	Auxin + Cytokinin concentration (mg.L ⁻¹)
1	A	No hormones (Control)
2	B	1.5 NAA + 0.5 BAP
3	C	1.5 NAA + 1.5 BAP
4	D	3 NAA + 0.5 BAP
5	E	3 NAA + 1.5 BAP
6	F	0.5 2,4-D + 0.5 BAP
7	G	0.5 2,4-D + 1.5 BAP
8	H	1.5 2,4-D + 0.5 BAP
9	I	1.5 2,4-D + 1.5 BAP

اندازه‌گیری رشد کالوس‌ها

برای اندازه‌گیری رشد کالوس‌ها وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها محاسبه شد. وزن تر کالوس‌ها با انتقال بی‌درنگ کالوس از محیط کشت به ورق آلومینیومی وزن شده اندازه‌گیری شد. سپس با کم کردن وزن ورق آلومینیومی وزن تر کالوس بدست آمد. برای محاسبه وزن خشک نیز کالوس‌ها با ورق آلومینیومی به‌طوری که تبادل هوایی برقرار باشد بسته‌بندی شدند و در آون با دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت دو روز قرار گرفتند. بعد از گذشت دو روز، کالوس و ورق آلومینیومی دوباره وزن شدند و وزن خشک کالوس با کم کردن وزن ورق آلومینیومی بدست آمد (Sayed-Tabatabaei & Omid, 2021).

استخراج و سنجش پروتئین کل، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و پلی فنل اکسیداز
۰/۲ گرم نمونه کالوس منجمد با استفاده از هاون در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتو اتانول دو میلی‌مولار ساییده و بعد با سرعت ۶۰۰۰ دور در

اعمال تیمار متیل جاسمونات و نمونه برداری

به منظور اعمال تیمار، محیط کشت MS مایع هورمون‌دار (با بهترین ترکیب هورمونی کالوس‌زایی) استریل تهیه شد. سپس در زیر هود لامینار ایرفلو ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت به ارلن‌های استریل منتقل گردید و میزان مساوی از کالوس (۱/۵ گرم) درون آنها قرار گرفت و درب ارلن‌ها با استفاده از پارافیلیم بسته شد. ارلن‌ها به داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۰۰ دور بر دقیقه منتقل شدند. طبق منحنی رشد بدست آمده، بعد از گذشت ۹ روز تیمار نمونه‌ها انجام شد. استوک متیل جاسمونات در زیر هود لامینار از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد و بعد به ارلن‌های حاوی محیط کشت در غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار اضافه شد. تعدادی ارلن به‌عنوان شاهد بدون اضافه کردن متیل جاسمونات در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از کالوس‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از اضافه کردن متیل جاسمونات انجام شد و به‌سرعت نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و بلافاصله به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

20S اضافه و در دو زمان صفر و ۶۰ ثانیه در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب خوانده شد. سنجش پروتئین نیز همزمان با خواندن جذب آنزیم پلی فنل اکسیداز به وسیله روش برادفورد انجام شد.

استخراج و سنجش میزان فنل و فلاونوئید کل ابتدا مقدار ۰/۲ گرم نمونه منجمد شده کالوس در ۳ میلی لیتر متانول ۸۰٪ همگن و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس با سرعت ۶۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و روشناور حاصل برای سنجش فنل کل و فلاونوئید کل استفاده گردید. ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ سنجی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد. به ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کرنات سدیم ۷/۵٪ اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت جذب هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hola DB-20S در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و مقدار فنل کل برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد. غلظت های صفر تا ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده شد. اندازه گیری فلاونوئید کل با استفاده از روش کلرید-آلومینیوم انجام شد. ابتدا در لوله آزمایش ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میزان جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hola DB-20S در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از غلظت های صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده گردید. عصاره گیری برای انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای فرایند استخراج یا عصاره گیری در انجام HPLC، ۰/۰۸ گرم کالوس خشک با ۲ میلی لیتر محلول متانول و

دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. فاز رویی برای سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و پلی فنل اکسیداز استفاده شد. سنجش پروتئین کل براساس روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام گردید. ۵ میلی لیتر معرف برادفورد به ۰/۱ میلی لیتر نمونه اضافه و بعد از مخلوط شدن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hola DB-20S قرائت شد. آلومین سرم گاوی (Bovin Serum Albumin) با غلظت های صفر تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده گردید. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز به عنوان آنزیمی کلیدی در متابولیسم ترکیبات فنلی اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۱ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۸/۸، ۰/۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر عصاره استخراجی بود. نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (ماکزیمم فعالیت آنزیم) نگهداری و واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف شد. اسید سینامیک (فرآورده آنزیم PAL) موجود، سه بار با اتیل استات استخراج و توسط جریانی از هوای تصفیه شده خشک گردید. میزان اسید سینامیک پس از حل کردن در NaOH ۰/۰۵ مولار، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hola DB-20S در طول موج ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب میزان اسید سینامیک به ازای میلی گرم پروتئین در مدت یک ساعت بیان شد. محلول اسید سینامیک با غلظت صفر تا ۳۵ میکرومولار برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ۲ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار با اسیدیته ۶/۸ به همراه ۵۰۰ میکرولیتر پیروگالال ۰/۱۲ مولار را در لوله آزمایش مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در بن ماری قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه کرده و بلافاصله به سل دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Hola DB-

گیاهی توسط اتوسمپلر اتومات دستگاه به آن تزریق گردید و پس از بررسی زمان‌های نگهداری مختلف، زمان ۱۵ دقیقه برای قرائت نمونه‌ها در نظر گرفته شد و بعد از تجزیه و تحلیل، گراف‌ها توسط دستگاه رسم گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده‌های آزمایش مربوط به تعیین بهترین شرایط کالوس‌زایی به صورت آزمایش دو عاملی (ترکیب هورمونی و شرایط نوری) در قالب طرح کاملاً تصادفی و داده‌های مطالعات بیوشیمیایی و HPLC به صورت آزمایش تصادفی در قالب طرح خردشده در زمان انجام شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و تمامی ارزیابی‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس آزمایش کالوس‌زایی نشان داد ترکیب هورمونی، شرایط نوری و اثر متقابل آنها برای هر سه صفت وزن تر، وزن خشک و درصد کالوس‌زایی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد (جدول ۲).

طبق نتایج در شرایط روشنایی، وزن تر و وزن خشک کالوس در ۳ محیط B، C و D نسبت به بقیه محیط‌ها بیشتر است. براساس نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت محیط‌هایی که حاوی اکسین نفتالین‌استیک‌اسید هستند وزن تر و خشک بیشتری نسبت به اکسین توفوردی تولید می‌کنند. در میان محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف اکسین توفوردی نیز ترکیب هورمونی محیط F وزن تر و خشک بیشتری نسبت به بقیه دارد. نتایج وزن تر و خشک کالوس‌ها در شرایط تاریکی نیز نشان می‌دهد که محیط B عملکرد بهتری نسبت به سایر محیط‌ها داشته است و کالوس‌ها در این محیط وزن تر و خشک بیشتری نسبت به سایر محیط‌ها داشتند. با توجه به معنی‌دار شدن اثر شرایط نوری (جدول ۲) و مقایسه وزن تر و خشک کالوس‌ها در شرایط روشنایی و تاریکی (شکل‌های ۱ و ۲) مشخص است

اسید استیک به نسبت ۹ به ۱ در هاون چینی ساییده و همگن شد (Jaimand *et al.*, 2010). سپس عصاره‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفتند. بعد از انجام فرایند اولتراسوند عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از آن، عصاره‌ها با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. برای محلول روشن‌تر حاصل دوباره در همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ انجام گردید. محلول رویی جدا و تا انجام HPLC در یخچال نگهداری شد. قبل از انجام HPLC تمامی نمونه‌ها با فیلترهای ۰/۲ میکرون فیلتر شده و بعد استفاده شدند.

تهیه استوک استاندارد و ساخت سری استاندارد

از متابولیت‌های کوئرستین، کائمفرول و روتین استوک‌های ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. متابولیت‌های مورد نظر از شرکت سیگما (SIGMA) تهیه شدند. استوک‌های تهیه شده با فیلترهای ۰/۲ میکرون فیلتر و تا ساخت سری استاندارد و انجام HPLC در یخچال نگهداری شدند. سری استاندارد متابولیت‌ها در ۱۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با متانول گرید ساخته شد و پس از تزریق به دستگاه HPLC گراف‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش غلظت متابولیت‌ها با استفاده از دستگاه HPLC

برای سنجش متابولیت‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و دستگاه HPLC مدل Azura ساخت شرکت Knauer کشور آلمان دارای آشکارساز UV و فلورسنت استفاده شد. فاز ثابت ستون Eurospher-100 C₁₈ با ارتفاع ۳۰ و قطر ۲/۵ سانتی‌متر بود و فاز متحرک نیز شامل متانول: آب: اسید استیک (۵۰:۴۵:۵) استفاده شد (Jaimand *et al.*, 2010). طول موج ۲۵۷ نیز بکار برده شد (Zu *et al.*, 2006؛ Al-Rifai *et al.*, 2015) و میزان تزریق دستگاه ۲۰ ماکرولیتر بود. سری استاندارد و نمونه‌های عصاره

بر اساس مشاهدات، نوع تنظیم‌کننده رشد و شرایط نوری بر رنگ کالوس‌ها تأثیر داشت. کالوس‌های حاصل از اکسین نفتالین‌استیک‌اسید رنگ سبز پررنگ‌تر و کالوس‌های حاصل از اکسین توفوردی سبز کم‌رنگ متمایل به سفید بودند. همچنین کالوس‌های تحت شرایط تاریکی (تحت هر دو اکسین) تقریباً سفید رنگ بودند (شکل ۴).

تعیین منحنی رشد

برای تعیین منحنی رشد گیاه گزنه و تعیین بهترین زمان اعمال الیسیتور، با استفاده از داده‌های بدست آمده منحنی رشد کالوس گزنه ترسیم شد. بر اساس نتایج، حداکثر میزان رشد کالوس ۱۱ روز پس از کشت مایع بود و روز نهم بعد از کشت مایع به‌عنوان زمان القای الیسیتور انتخاب شد (شکل ۵).

که کالوس‌ها در شرایط روشنائی وزن تر و خشک بیشتری داشته و طبق نتایج بدست آمده شرایط روشنائی برای کالوس‌زایی گزنه توصیه می‌شود (شکل‌های ۱ و ۲). با مقایسه درصد کالوس‌زایی، در شرایط روشنائی بهترین درصد کالوس‌زایی در محیط‌های F، C، B و D بود. محیط C، B و D حاوی اکسین نفتالین‌استیک‌اسید و محیط F حاوی اکسین توفوردی بود. با وجود اینکه محیط F درصد کالوس‌زایی بالایی داشت اما وزن تر و خشک کمتر و کالوس‌های کوچک‌تری نسبت به محیط C تولید کرد (شکل‌های ۱-۴). همچنین با توجه به وزن حاصل از کالوس‌ها و نتایج کلی آزمایش، با مقایسه محیط کشت شاهد (بدون هورمون) با محیط‌های حاوی بهترین غلظت‌های اکسین و سیتوکینین برای کالوس‌زایی گزنه، اهمیت هورمون‌ها برای افزایش کالوس‌زایی گزنه مشخص می‌شود.

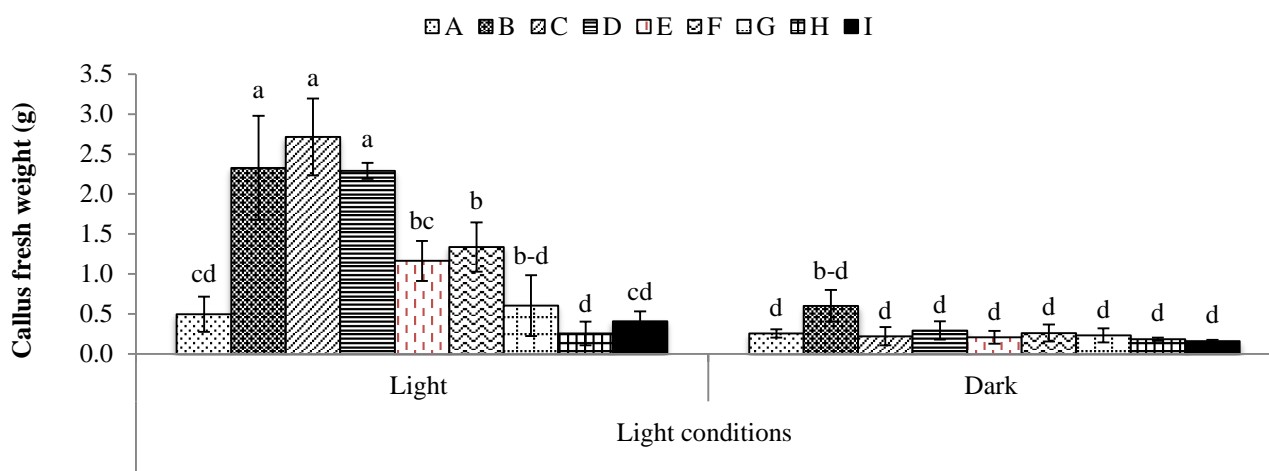
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ترکیب هورمونی و شرایط نوری بر صفات وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس و درصد کالوس‌زایی

گزنه از ریزنمونه میانگرمه در محیط کشت MS

Table 2. ANOVA of hormonal composition and light conditions effects on callus fresh weight, callus dry weight, and callogenesis percentage of *Urtica dioica* from internode explant in MS culture medium

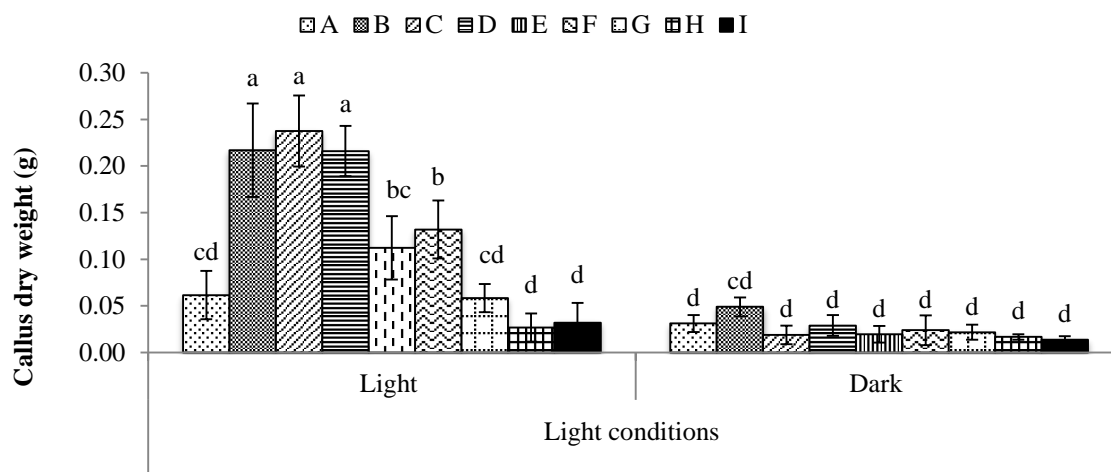
S.O.V.	d.f.	M.S.		
		Callus Fresh weight	Callus dry weight	Callogenesis percentage
Hormonal composition (H)	8	1.407**	0.011**	1240.773**
Light conditions (L)	1	12.322**	0.111**	12663.516**
H × L	8	1.077**	0.009**	771.085**
Experimental error	33	0.169	0.001	227.525
C.V (%)		29.5	25.7	29.1

** : significant at 1% probability level



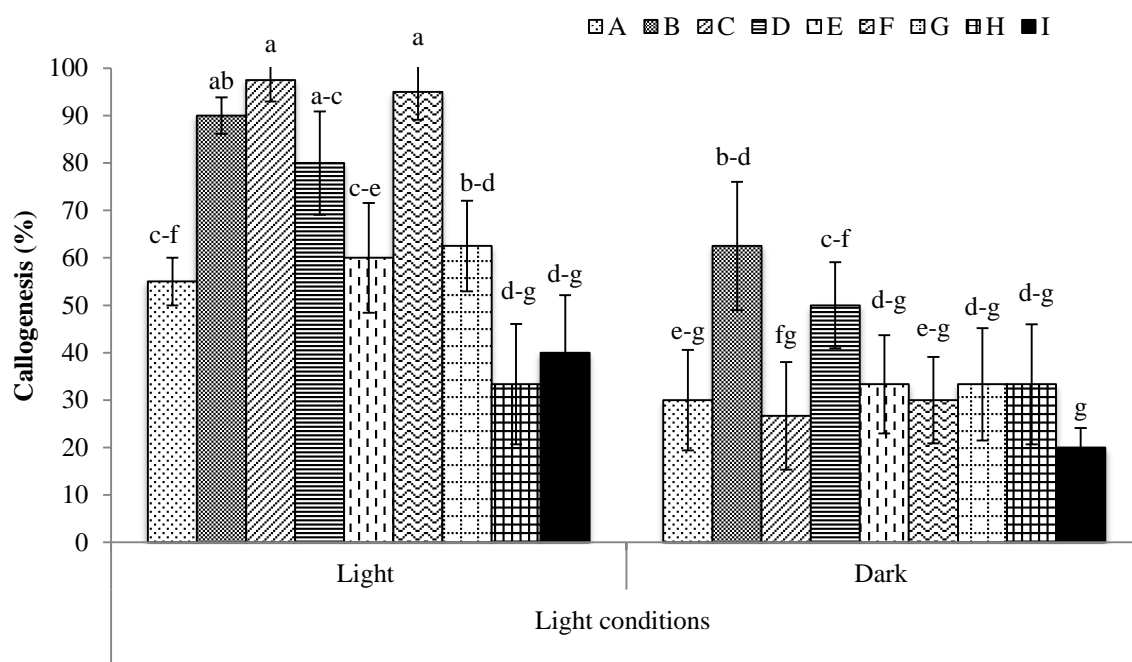
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمونی × شرایط نوری بر وزن تر کالوس گزنه از ریزنمونه میانگه در محیط کشت MS

Figure 1. Means comparison of hormonal composition × light conditions interaction on callus fresh weight of *Urtica dioica* from internode explant in MS culture medium
 A: No hormones (Control), B: 1.5 NAA + 0.5 BAP, C: 1.5 NAA + 1.5 BAP, D: 3 NAA + 0.5 BAP, E: 3 NAA + 1.5 BAP, F: 0.5 2,4-D + 0.5 BAP, G: 0.5 2,4-D + 1.5 BAP, H: 1.5 2,4-D + 0.5 BAP, I: 1.5 2,4-D + 1.5 BAP
 Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمونی × شرایط نوری بر وزن خشک کالوس گزنه از ریزنمونه میانگه در محیط کشت MS

Figure 2. Means comparison of hormonal composition × light conditions interaction on callus dry weight of *Urtica dioica* from internode explant in MS culture medium
 A: No hormones (Control), B: 1.5 NAA + 0.5 BAP, C: 1.5 NAA + 1.5 BAP, D: 3 NAA + 0.5 BAP, E: 3 NAA + 1.5 BAP, F: 0.5 2,4-D + 0.5 BAP, G: 0.5 2,4-D + 1.5 BAP, H: 1.5 2,4-D + 0.5 BAP, I: 1.5 2,4-D + 1.5 BAP
 Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



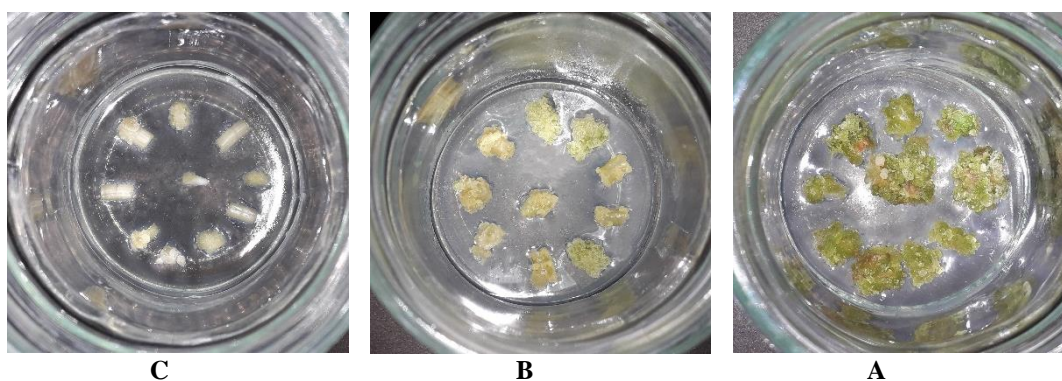
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمونی × شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی گزنه

از ریزنمونه میانگه در محیط کشت MS

Figure 3. Means comparison of hormonal composition × light conditions interaction on callogenesis percentage of *Urtica dioica* from internode explant in MS culture medium

A: No hormones (Control), B: 1.5 NAA + 0.5 BAP, C: 1.5 NAA + 1.5 BAP, D: 3 NAA + 0.5 BAP, E: 3 NAA + 1.5 BAP, F: 0.5 2,4-D + 0.5 BAP, G: 0.5 2,4-D + 1.5 BAP, H: 1.5 2,4-D + 0.5 BAP, I: 1.5 2,4-D + 1.5 BAP

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

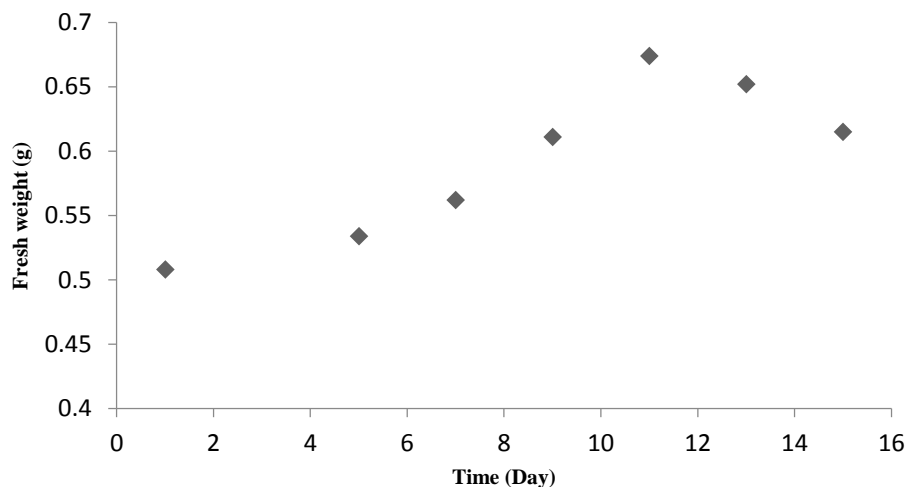


شکل ۴- (A) کالوس سبزرنگ حاصل از تیمار اکسین (NAA 1.5 mg.L⁻¹) و شرایط روشنایی، (B) کالوس سبز کم‌رنگ متمایل به سفید

حاصل از تیمار اکسین (2,4-D 1.5 mg.L⁻¹) و شرایط روشنایی و (C) کالوس حاصل از تیمار NAA و 2,4-D

در شرایط تاریکی از ریزنمونه میانگه گزنه در محیط کشت MS

Figure 4. A) Green callus obtained from NAA 1.5 mg.L⁻¹ treatment and light conditions, B) pale green callus with a tendency to white resulting from 2,4-D 1.5 mg.L⁻¹ treatment and light conditions, and C) callus obtained from NAA and 2,4-D treatment under dark conditions from *Urtica dioica* internode explant in MS culture medium



شکل ۵- منحنی رشد کالوس گزنه در محیط کشت مایع MS جهت تعیین بهترین زمان اعمال الیسیاتور

Figure 5. *Urtica dioica* callus growth curve in liquid MS culture medium to determine the best time of elicitor application

تفاوتی با تیمار ۱ میلی‌مولار نداشتند (شکل ۶).

مطالعات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس اثر معنی‌دار متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و محتوای فنل، فلاونوئید و پروتئین کل را نشان داد. همچنین زمان تنها بر آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و محتوای فلاونوئید کل اثر داشته و اثر متقابل متیل جاسمونات و زمان بر تمامی پارامترهای مورد آزمایش معنی‌دار بود (جدول ۳).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

در بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در زمان ۲۴ ساعت بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات بود و در ۴۸ ساعت بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات بود. در ۹۶ ساعت نیز بیشترین میزان در تیمار ۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل ۷).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

در بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در زمان ۴۸ ساعت اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس از لحاظ آماری بر فعالیت آنزیم تفاوت معنی‌داری نداشتند. در زمان ۲۴ ساعت بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم به ترتیب مربوط به غلظت ۱ و ۰/۱ مولار بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در ۹۶ ساعت نیز در تیمارهای شاهد، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولار بود که از لحاظ آماری

محتوای فنل کل

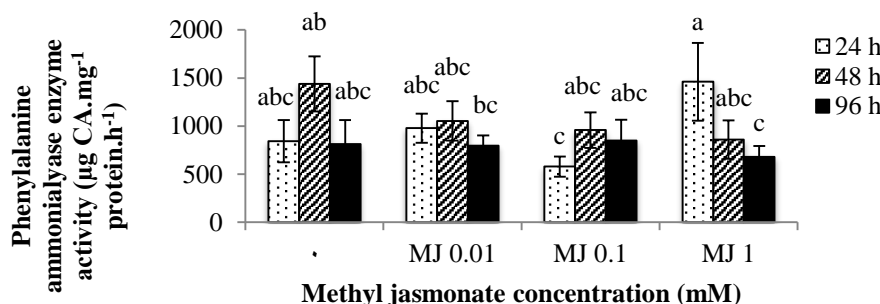
در بررسی محتوای فنل کل، بیشترین میزان فنل کل در ۲۴ ساعت در غلظت ۱ میلی‌مولار مشاهده شد و در ۴۸ ساعت نیز در غلظت ۱ میلی‌مولار بود که تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل نداشت. در ۹۶ ساعت نیز نمونه کنترل و ۱ میلی‌مولار بیشترین میزان فنل کل را داشت (شکل ۸).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر الیسیاتور و زمان پس از اعمال الیسیاتور بر فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیااز، فعالیت پلی فنل اکسیداز و میزان فنل کل، فلاونوئید کل و پروتئین کل در کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Table 3. ANOVA of elicitor and time after elicitor application effects on phenylalanine ammonia lyase activity, polyphenol oxidase activity, and content of total phenol, total flavonoids, and total protein in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		Phenylalanine ammonia lyase	Polyphenol oxidase	Total phenol	Total flavonoids	Total protein
Methyl jasmonate (M)	3	98276.984 ^{ns}	2376.387*	684524.84***	1159.766***	6336.20**
Experimental error1	8	140878.592	986.339	63474.906	454.229	689.839
Time (T)	2	260363.941 ^{ns}	1616.546*	36013.447 ^{ns}	1369.355**	1588.79 ^{ns}
M × T	6	260188.068*	5666.249***	179811.395**	1903.277***	2076.728*
Experimental error2	16	96156.110	380.813	26987.032	108.497	700.056
C.V (%)		28.84	9.1	6.72	19.65	9.7

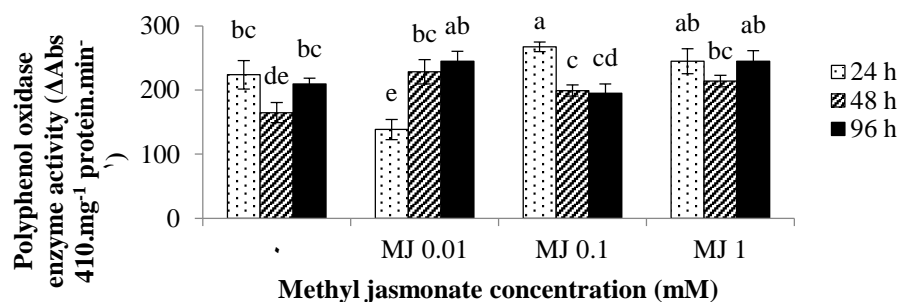
n.s., *, **, and ***: non-significant, significant at 5, 1, and 0.1% probability levels, respectively



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز در کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 6. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on phenylalanine ammonia lyase activity in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

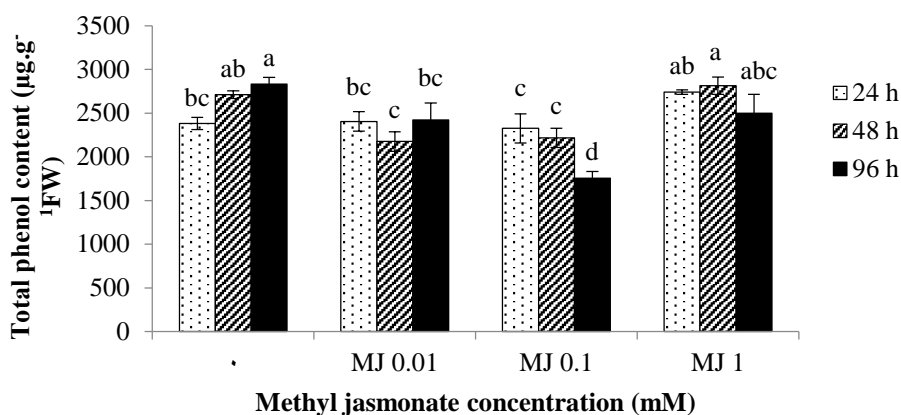
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 7. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on polyphenol oxidase enzyme activity in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر محتوای فنل کل در

کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 8. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on total phenol content in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

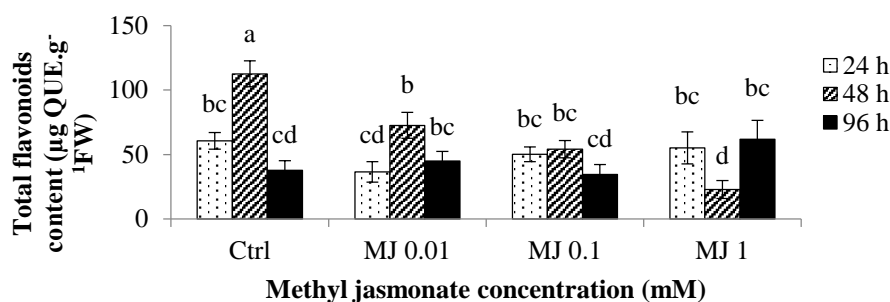
تولید ترکیبات ثانویه نسبت داد. در ۹۶ ساعت نیز از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود نداشت (شکل ۹).

محتوای پروتئین کل

در بررسی محتوای پروتئین کل در ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس و شاهد مشاهده شد. در ۹۶ ساعت نیز بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار ۱ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد که از نظر آماری تفاوتی با سایر غلظت‌ها نداشتند. در کل می‌توان گفت که تیمار ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس در طی سه زمان مورد بررسی از محتوای پروتئین کل بیشتری برخوردار بود (شکل ۱۰).

محتوای فلاونوئید کل

در بررسی میزان فلاونوئید کل، در ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس وجود نداشت، در ۴۸ ساعت بیشترین میزان فلاونوئید کل در نمونه شاهد بود و با افزایش غلظت متیل جاسمونات در زمان ۴۸ ساعت میزان فلاونوئید کل کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده از وزن کالوس‌ها، یکی از دلایل میزان بالای فلاونوئید کل در نمونه شاهد ۴۸ ساعت، تغییرات رشد سلولی در این نمونه است، زیرا میزان رشد و وزن کالوس در نمونه شاهد ۴۸ ساعت کاهش یافت و با توجه به اینکه در بیشتر موارد میزان رشد سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه رابطه عکس هم دارند، در نتیجه دلیل افزایش میزان فلاونوئیدها در این نمونه را می‌توان به دلیل کاهش رشد سلولی و صرف انرژی سلول برای

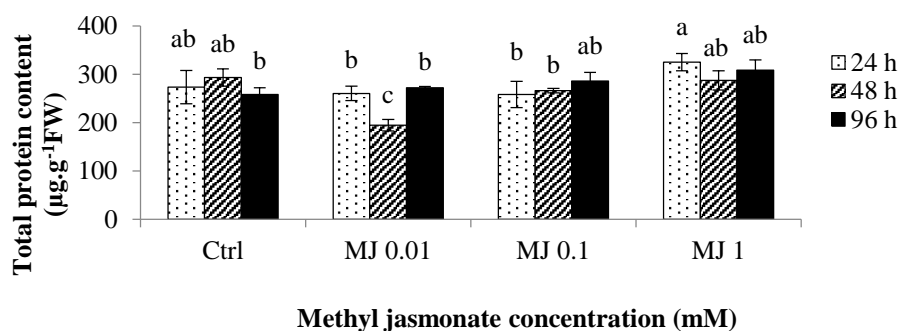


شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر محتوای فلاونوئید کل در

کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 9. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on total flavonoids content in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر محتوای پروتئین کل در

کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 10. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on total protein content in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

گیاهی که توسط دستگاه HPLC رسم شد، در نمونه‌های گیاهی جذبی مطابق با متابولیت کوئرستین مشاهده نشد و برای کائمبرول تنها در یک تیمار یافت شد که مقایسات آماری را در پی نداشت. در متابولیت روتین و زمان بازداری ۳/۸ دقیقه تطابق مشاهده و ثبت شد. نتایج تجزیه واریانس آن برای اثر متیل جاسمونات (غلظت)، زمان و اثر متقابل آنها معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ را نشان داد (جدول ۴).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

فلاونوئیدهای کوئرستین، کائمبرول و روتین در نمونه‌های شاهد و تیمار شده گیاه گزنه با متیل جاسمونات توسط دستگاه HPLC بررسی شدند. بعد از تزریق سری استاندارد به دستگاه HPLC، زمان بازداری (Retention time) هر یک از فلاونوئیدهای کوئرستین، کائمبرول و روتین به ترتیب ۱۲/۱۴۰، ۵/۱۹۰ و ۳/۴۶ برحسب دقیقه بدست آمد.

با توجه به گراف جذب نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر الیسیاتور و زمان پس از اعمال الیسیاتور بر محتوای روتین در

کالوس حاصل از ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

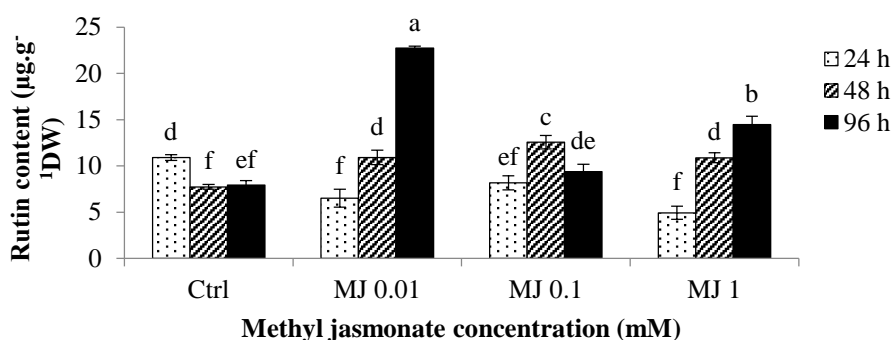
Table 4. ANOVA of elicitor and time after elicitor application effects on rutin content in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

S.O.V.	d.f.	M.S.
Methyl jasmonate (M)	3	22.752***
Experimental error1	4	0.038
Time (T)	2	72.093***
M × T	6	43.841***
Experimental error2	8	0.658
C.V. (%)		7.63

***: significant at 0.1% probability level

غلظت متابولیت روتین دیده شد. بیشترین میزان این متابولیت نیز در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در زمان ۹۶ ساعت بدست آمد.

با توجه به شکل ۱۱ در دو زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت در نمونه‌های غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در محیط کشت کالوس نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌دار در



شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر متقابل متیل جاسمونات × زمان بر محتوای روتین در کالوس حاصل از

ریزنمونه میانگره گزنه در محیط کشت مایع MS

Figure 11. Means comparison of methyl jasmonate × time interaction on rutin content in callus from *Urtica dioica* internode explant in MS liquid culture medium

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

تحقیقات زیست‌شناسی سلولی، ژنتیک و بیوشیمی است (Fazili et al., 2022). علاوه بر این، ترکیبات جدیدی که قبلاً در گیاهان یافت نشده‌اند یا هرگز به صورت شیمیایی سنتز نشده‌اند نیز می‌توانند توسط کشت سلولی تولید شوند (Vanisree & Tsay, 2007).

در این پژوهش نتایج حکایت از عملکرد بهتر اکسین نفتالین‌استیک‌اسید در مقایسه با توفوردی بر روی وزن تر، وزن

بحث

کشت سلول و بافت گیاهی یکی از روش‌های صنعتی ممکن برای تولید متابولیت‌های ثانویه است. این روش خودکفا بوده و به تغییرات جغرافیایی یا فصلی وابسته نیست و با اصلاح پارامترهای مختلف رشد انجام می‌شود. در حال حاضر، کشت سلولی گیاهی نقش مهمی در تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کند و دارای مزایایی در

فعالیت آنزیم‌ها و افزایش سطح بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در گیاهان دارد (Liu et al., 2022). تیمار متیل جاسمونات می‌تواند بیوستز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه را القاء کند و به‌عنوان محرک تولید متابولیت ثانویه عمل کند (Yao et al., 2021).

در این مطالعه افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز بین نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و شاهد مشاهده نشد که با نتایج تعدادی از مطالعات در گیاهان دیگر تفاوت داشت (Kim et al., 2006; Liu et al., 2014; Wang et al., 2015; Brouki milan et al., 2014; al., 2022). علت این تفاوت را می‌توان به تفاوت پاسخ گیاه گزنه نسبت به متیل جاسمونات و فعال شدن آنزیم‌های مسیره‌های دیگر در این گیاه نسبت داد و یا اینکه غلظت متیل جاسمونات استفاده شده در این تحقیق باعث تحریک سلول‌های کالوس گیاه گزنه و افزایش فعالیت این آنزیم نشده است. Ketabchi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز در گندم مشاهده کردند که در تمام تیمارها فعالیت این آنزیم دو روز پس از تلقیح نسبت به شاهد به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، اما فعالیتش در تمام تیمارها پنج روز پس از تلقیح در مقایسه با شاهد کاهش یافت. نوع رقم گیاهی در افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز مؤثر است، به این معنی که فعالیت این آنزیم در ارقام حساس کمتر از ارقام مقاوم است.

در نتایج فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در کالوس‌های تیمار شده با متیل جاسمونات، در نمونه‌های ۲۴ ساعت بعد از تیمار افزایشی نسبت به شاهد مشاهده نشد. در ۴۸ ساعت هر سه تیمار ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات نسبت به نمونه شاهد افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را داشتند و در ۹۶ ساعت هم دو تیمار ۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش فعالیت را دارا بودند. Brouki milan و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در رقم کشکنی لولوی ریحان، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم را در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده کردند و با افزایش غلظت متیل جاسمونات میزان فعالیت این

خشک و کالوس‌زایی گزنه داشت که در پژوهش‌های دیگری نیز این موضوع گزارش شده است (Zhao et al., 2008; Adhikari & Pant, 2013; Dar et al., 2021). به‌طور کلی توفوردی در غلظت‌های بالا باعث از بین رفتن دستگاه فتوسنتزی، کلروفیل سلولی و موجب مرگ سلول‌ها می‌شود و در کشت بافت گیاهی در غلظت بالا برای بافت‌های گیاهی سمی است (Colins et al., 1978). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از محیط‌های حاوی توفوردی می‌توان گفت در محیط F به دلیل کم بودن میزان توفوردی، کالوس‌زایی بیشتری نسبت به بقیه محیط‌های با مقدار توفوردی بالاتر وجود داشته است. البته میزان سیتوکینین بنزیل آمینو پورین هم به‌عنوان تکمیل کننده عمل اکسین نیز حائز اهمیت می‌باشد (Mungole et al., 2011). با مقایسه محیط شاهد (بدون هورمون) با محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، اهمیت حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کالوس‌زایی مشخص می‌شود. همچنین گزارش شده است مشخص کردن سطوح بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد شامل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در کالوس‌زایی ضروریست (Gopi & Vatsala, 2006). در مطالعاتی نیز بهتر بودن شرایط روشنایی نسبت به تاریکی در کالوس‌زایی و جنین‌زایی گزارش شده است (Kintzios et al., 1998; Kintzios et al., 2002; Alirezalo et al., 2011).

گیاهانی که تحت تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند بیشتر دچار آسیب اکسیداتیو می‌شوند، زیرا تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل و فعالیت خاموش‌کننده‌های آنتی‌اکسیدانی به هم می‌خورد. گیاهان سازوکارهایی را برای محافظت از سیستم‌های سلولی و درون سلولی در برابر اثرهای این رادیکال‌های اکسیژن فعال با استفاده از آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنل اکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، پراکسیداز و غیره تکامل داده‌اند (Agarwal & Pandey, 2004). الیستور متیل جاسمونات یک فیتوهورمون طبیعی و در همه جا موجود است که در مسیر انتقال سیگنال و پاسخ گیاه به عوامل استرس‌زای محیطی نقش دارد (Farooq et al., 2016). متیل جاسمونات نقش کلیدی در افزایش استرس اکسیداتیو، ارتقای

زمان بازداری ۳/۸ دقیقه در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. طبق نتایج بیشترین میزان فلاونوئید روتین در زمان ۹۶ ساعت بعد از اعمال تیمار و در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات حاصل شد و در غلظت بیشتر متیل جاسمونات مقدار روتین کاهش یافت. اثر بازداری متیل جاسمونات بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی در گیاهان نشان داده شده است. در پژوهشی جاسمونیک‌اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانندسازی را در کالوس توتون متوقف کرده و سلول را در مرحله رشد G1 نگه داشت (Zamani et al., 2019). استفاده از غلظت‌های نامناسب و بیش از حد معمول الیستور نه تنها افزایش متابولیت را دربر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌ها که به احتمال قوی تحت تأثیر کاهش بیان ژن مربوط است، تولید متابولیت را کم و یا متوقف می‌کند. بنابراین با بهینه‌سازی غلظت الیستور و ترکیبات غذایی محیط کشت می‌توان بدون دستکاری در ساختار ژنتیکی گیاه و با افزایش فعالیت آنزیم‌ها میزان برخی از متابولیت‌های ثانویه مورد نظر را افزایش داد (Samadi et al., 2019).

در نتایج این پژوهش تفاوت‌هایی در اثربخشی متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه با بعضی مطالعات دیگر دیده شد که می‌توان از دلایل آن گیاه مورد مطالعه، زمان‌های مورد بررسی و غلظت‌های مورد آزمایش باشد. از آنجایی که بر روی گیاه دارویی گزنه پژوهشی در زمینه اثرهای متیل جاسمونات بر فعالیت‌های گیاهی انجام نشده است، انجام پژوهش‌های بیشتری جهت روشن شدن اثر الیستور متیل جاسمونات و الیستورهای دیگر توصیه می‌شود.

نتایج نشان‌دهنده عملکرد بهتر اکسین نفتالین‌استیک‌اسید نسبت به توفوردی در کالوس‌زایی گزنه بود و شرایط روشنایی نیز نسبت به تاریکی مؤثرتر واقع شد. همچنین براساس نتایج بدست آمده حاصل از منحنی رشد کالوس، حداکثر میزان رشد در روز ۱۱ بود و بهترین زمان القای الیستور اواخر فاز نمایی و ۲ تا ۳ روز مانده به حداکثر میزان رشد می‌باشد. نتایج مطالعات بیوشیمیایی نشان داد

آنزیم کاهش یافت. البته اثر مهارکنندگی متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در کلم بروکلی نیز گزارش شده است (Guan et al., 2019). همچنین در مطالعه‌ای اثر معنی‌دار تیمار متیل جاسمونات بر کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین یعنی PAL، POD و PPO نشان داده شد (Cao et al., 2010).

افزایش محتوای فنل کل تنها در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات در ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن متیل جاسمونات مشاهده شد و افزایش معنی‌داری در محتوای فلاونوئید کل در بین نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و نمونه شاهد دیده نشد. با توجه به اینکه در این تحقیق افزایشی در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز که از اولین آنزیم‌های مسیر تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است مشاهده نشده، عدم افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در اینجا دور از ذهن نیست. در مطالعاتی کاهش فنل کل و فلاونوئید کل در اثر بعضی غلظت‌های تیمار متیل جاسمونات گزارش شده است (Guan et al., 2010؛ Ghanati et al., 2010؛ Hashemyan et al., 2020؛ 2019). همچنین Thiem و Krawczyk (۲۰۱۰) غلظت‌های پایین متیل جاسمونات در افزایش ایزوفلاونوئیدهای گیاه کودزو (*Pueraria tuberosa*) را در مقایسه با غلظت‌های بالاتر مؤثر دانستند.

نتایج سنجش پروتئین کل افزایش معنی‌دار بین نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و شاهد در ۹۶ ساعت بعد از اعمال تیمار را نشان داد. این افزایش میزان پروتئین کل ممکن است به دلیل تجمع پروتئین‌های پاسخ دهنده به استرس یا تنش باشد، زیرا گیاه متیل جاسمونات را به‌عنوان پیام تنش یا استرس می‌شناسد و با توجه به غلظت و اندازه تنش به آن پاسخ می‌دهد (Brouki milan et al., 2014). همچنین افزایش سنتز برخی از آنزیم‌ها و تولید پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی سلول نیز می‌تواند باعث افزایش تولید پروتئین کل شود (Chaoui et al., 1997).

در نتایج آزمایش‌های HPLC فلاونوئید کوئرستین قابل اندازه‌گیری نبود که می‌تواند به دلیل غلظت پایین این متابولیت در نمونه‌های استخراجی باشد. فلاونوئید روتین در

۱ میلی مولار نسبت به شاهد افزایش دیده شد. افزایش محتوای فنل کل نسبت به شاهد تنها در تیمار ۱ میلی مولار در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. طبق نتایج آزمایش‌های HPLC بیشترین میزان فلاونوئید روتین در تیمار ۰/۰۱ میلی مولار متیل جاسمونات حاصل شد.

الیستور متیل جاسمونات اثر معنی داری در افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز و فلاونوئید کل نسبت به شاهد نداشت. در آنزیم پلی فنل اکسیداز افزایش فعالیت آنزیم در ۴۸ و ۹۶ ساعت دیده شد که در ۴۸ ساعت تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش فعالیت داشتند و در ۹۶ ساعت در دو تیمار ۰/۰۱ میلی مولار و

References

- Adhikari, S.R. and Pant, B., 2013. Induction and proliferation of in vitro mass of callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Research in Plant Sciences*, 1(3): 58-61.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4): 555-560.
- Alirezalo, A., malekzadeh, M., Babaei, A. and Kosravi, H., 2011. The effect of different hormonal treatments on the callus formation of the leaves of the medicinal plant *Catharanthus roseus* L. and the evaluation of the amount of callus alkaloid. *Medicinal Plant National Congress*, Sari, Iran, 2-4 March.
- Al-Rifai, A.A., Aqel, A., Awaad, A. and Alothman, Z.A., 2015. Analysis of Quercetin and Kaempferol in an Alcoholic Extract of *Convolvulus pilosellifolius* using HPLC. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(11): 1411-1418.
- Asgarpanah, J. and Mohajerani, R., 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(46): 5714-5719.
- Babashpour-Asl, M., Baleghi, M., Sajadi, P. and Golalipour, M.J., 2014. Different Aspects and Results of Modern Studies of *Urtica Dioica*: A Review. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 16(3): 47-54.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Brouki Milan, E., Abdollahi Mandoulakani, B. and Kheradmand, F., 2014. The effect of methyl jasmonate on the activity of poly phenol oxidase and phenil alanin amonia lyase enzymes in basil (*Ocimum basilicum* L.). 13th Iranian Crop Sciences Congress & 3rd Iranian Seed Science and Technology Conference. Karaj, Iran, 24-26 August, Conference Hall Research institute for improvement and preparation of seedlings and seeds: 1-4.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H. and Tang, S., 2010. Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. *Food Chemistry*, 118(3): 641-647.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H. and El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127(2): 139-147.
- Colins, G.B., Vian, W.E. and Phillips, G.C., 1978. Use of 4-Amino-3, 5, 6-trichloropicolinic Acid as an Auxin Source in Plant Tissue Cultures. *Crop Science*, 18(2): 286-288.
- Dar, S.A., Nawchoo, I.A., Tyub, S. and Kamili, A.N., 2021. Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology Report*: 32: 1-5.
- El Haouari, M. and Rosado, J.A., 2019. Phytochemical, anti-diabetic and cardiovascular properties of *Urtica dioica* L. (Urticaceae): A Review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(1): 63-71.
- Farooq, M.A., Gill, R.A., Islam, F., Ali, B., Liu, H., Xu, J., He, S. and Zhou, W., 2016. Methyl jasmonate regulates antioxidant defense and suppresses arsenic uptake in *Brassica napus* L. *Frontiers in Plant Science*, 7(468): 1-16.
- Fazili, M.A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U. and Geelani, S.N., 2022. In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1): 1-12.
- Friis, I., 1993. Urticaceae. 612-613, In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G. and Bittrich, V. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 478p.
- Ghanati, F., Bakhtiyarian, S. and Abdolmaleki, P., 2010. Effects of methyl jasmonate on the secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *Modares Journal of Biotechnology*, 1(1): 21-33.
- Gopi, C. and Vatsala, T.M., 2006. In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R. Br. *African Journal of Biotechnology*, 5(12): 1215-1219.
- Guan, Y., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Sa, R., Feng, K., Zhao, M., Yu, J., Ji, Y., Hou, M. and Yang, X., 2019. Effect of Methyl Jasmonate on Phenolic Accumulation in Wounded Broccoli. *Molecules*, 24(19): 3537.

- Hashemyan, M., Ganjeali, A. and Cheniany, M., 2020. Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Elicitors on the Production of Secondary Metabolites and Antioxidant Capacity of *Teucrium polium* L. in-vitro. Iranian Journal of Plant Biology, 12(2): 61-76.
- Jaimand, K., Rezaee, M.B., Asareh, M.H., Tabaei Aghdaei, S.R. and Meshkizadeh, S., 2010. Extraction and determination of Kaempferol and Quercetin in petals of 10 genotypes of *Rosa damascena* Mill. from western Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25(4): 547-555.
- Ketabchi, S., Majzoob, Sh. and Charegani, H.A., 2015. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on phenylalanine ammonia-lyase activity and total phenol in wheat infected by *Pratylenchus thornei*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 48(1): 10-17.
- Kim, H.J., Chen, F., Wang, X. and Choi, J.H., 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). Journal of agricultural and food chemistry, 54(19): 7263-7269.
- Kintzios, S.E., Hiureas, G., Shortsiianitis, E., Sereti, E., Blouhos, P., Manos, C., Makri, O., Taravira, N., Drossopoulos, J.B. and Holevas, C.D., 1998. The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. In International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2, 461: 427-432.
- Kintzios, S., Papanastasiou, I., Tourgelis, P., Papastellatos, C., Georgopoulos, V. and Drossopoulos, J., 2002. The effects of light on callus growth and somatic embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: A preliminary study. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 9(2-3): 223-227.
- Liu, R., Wang, Z., Zheng, J., Xu, Z., Tang, X., Huang, Z., Zhang, N., Dong, Y. and Li, T., 2022. The effects of methyl jasmonate on growth, gene expression and metabolite accumulation in *Isatis indigotica* Fort. Industrial Crops and Products, 177: 1144-1182.
- Mungole, A.J., Doifode, V.D., Kamble, R.B., Alka, C. and Prakash, Z., 2011. In-vitro callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L. Annals of Biological Research, 2(2): 79-85.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Planetarium, 15(1): 473-479.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S. and Romani, A., 2008. Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(19): 9127-9132.
- Said, A.A.H., Otmani, I.S.E., Derfoufi, S. and Benmoussa, A., 2015. Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7(10): 8-14.
- Samadi, S. and Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M., 2019. Influence of Salicylic acid and Methyl jasmonate on fresh weight, total phenol, total flavonoids, antioxidant and PAL enzyme activity of Stevia callus. Plant Process and Function, 8(32): 324-337.
- Sarrafi, M., 2022. Optimization of nettle (*Urtica dioica*) callogenesis and the effect of methyl jasmonate elicitor on its biochemical properties. M.Sc. thesis, Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan.
- Sayed-Tabatabaei, B.E. and Omid, M., 2021. Plant Cell and Tissue Culture. University of Tehran Press, Tehran, 388p.
- Sidhu, Y., 2011. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist, 4(1): 432-449.
- Sood, H., 2020. Production of medicinal compounds from endangered and commercially important medicinal plants through cell and tissue culture technology for herbal industry. In: Sharma, K., Mishra, K., Kamal Senapati, K., Danciu, C., (Eds.). Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health. IntechOpen, United Kingdom, 358p.
- Šrůtek, M. and Teckelmann, M., 1998. Review of biology and ecology of *Urtica dioica*. Preslia Praha, 70: 1-19.
- Tapas, D.A., Sakarkar, D.M. and Kakde, R.B., 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical, 7(3): 1089-1099.
- Thiem, B. and Krawczyk, A., 2010. Enhanced isoflavones accumulation in methyl jasmonate-treated in vitro cultures of kudzu [*Pueraria lobata* Ohwi]. Herba Polonica, 56(1): 48-56.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.
- Vanisree, M. and Tsay, H.S., 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, 267-285.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y., 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresources and Bioprocessing, 2(1): 1-9.
- Yao, D., Zhang, Z., Chen, Y., Lin, Y., Xu, X. and Lai, Z., 2021. Transcriptome Analysis Reveals

Differentially Expressed Genes That Regulate Biosynthesis of the Active Compounds with Methyl Jasmonate in Rosemary Suspension Cells. *Genes*, 13(1): 2-21.

- Zamani, M., Moradi, H., Chalavi, V. and Kazemitabar, S.K., 2019. Effect of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Elicitors on Hypericin production in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) cv. Topas Callus culture. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49(4): 915-923.
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F.S. and Wang, W.J., 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(3): 178-185.
- Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C., 2006. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3): 714-719.