Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/IJRFPBGR.2024.363423.1449

Vol. 31, No. 2, Page 182-204 (2024)

The effect of different plant growth regulators on the amount of biochemical compounds and some secondary metabolites of callus tissue of fennel (*Foeniculum vulgare*) in *in vitro* culture conditions

Sh.Buorang[1], S.Jaahanbakhsh-Godekahriz[2*], R. Asghari-Zakaria[3], H. Parsa-Khankandi[4], M. Noruzpour[1]

1- Ph.D. Graduate, Dept. Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2*-Corresponding author, Prof. Dept., Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: jahanbakhsh@uma.ac.ir
3- Prof., Dept. Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
4- Assistant Professor, Dep. Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

Abstract

Background and purpose

The fennel plant, with its scientific name (*Foeniculum vulgare* L.), is a member of the Apiaceae family. The Fennel is considered a valuable medicinal plant in traditional medicine in Iran and other countries, and it has been used to treat many infectious, digestive, and other diseases. Among the compounds with high medicinal value found in this plant, we can mention the large family of flavonoids. Considering the unique properties of the fennel plant and its importance in the pharmaceutical and food industries, and the importance of new methods of plant tissue culture to produce and increase the amount of plant secondary metabolites, the present research is aimed at increasing the production of biochemical compounds and secondary metabolites such as rutin, quercetin, and kaempferol from the callus tissue obtained from this plant, was done using methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine as stimulating agents in different concentrations and durations.

Methodology

This research evaluated the effect of plant growth stimulants such as methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine in concentrations in three concentrations: 50, 100, and 200 mg/liter coupled with zero (as a control treatment), was treated for 24, 48, and 96 hours using a 10 × 3 factorial experiment based on the completely randomized design with three replications on the level of biochemical compounds including the amount of protein, the activity of peroxidase and catalase enzymes, accumulation of proline, anthocyanin, and flavonoids as well as the amount of rutin, quercetin, and kaempferol was analyzed. For this purpose, callus samples obtained from an MS culture medium containing two $mg.l^{-1}$ NAA and one $mg.l^{-1}$ Kin were treated with the mentioned growth stimulants for 24, 48, and 96 hours.

Results

According to the obtained results, the amount of protein, accumulation of amino acid proline, anthocyanin, and flavonoid, as well as the amount of rutin, quercetin, and kaempferol significantly and at the probability level of 1% under the influence of the two-way interaction of the type of stimulant the duration of it. Higher concentrations of methyl jasmonate or salicylic acid significantly increased the production of proline, flavonoid, and anthocyanin in callus samples

Copyright: © 2024 by the authors. Published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//). This article is an open- access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0),(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

collected from the culture medium. The highest amount of proline accumulation (0.93 µg/mg protein) was related to the callus tissue collected from the culture medium containing 200 mg/liter methyl jasmonate for 96 hours. The highest amounts of flavonoid and anthocyanin were 0.25 and 5.45 mg/g of callus weight, corresponding to the culture medium containing 200 $mg.l^{-1}$ of methyl jasmonate for 96 hours. The highest peroxidase and catalase enzyme activity was also related to the culture medium containing methyl-jasmonate at a concentration of 200 $mg.l^{-1}$ and 96 hours. On the other hand, according to the obtained results, by increasing the concentration of methyl-jasmonate to 200 $mg.l^{-1}$, the amount of rutin production in the sample of fennel plant callus increased. The highest amount of quercetin (5.24 mg/gram of callus weight) was related to the culture medium containing 200 $mg.l^{-1}$ of methyl jasmonate for 24 hours.

Conclusion

According to the results obtained in this research, treatment of callus with higher concentrations (100 and 200 $mg.l^{-1}$) of methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine increases the production of plant secondary metabolites (rutin, quercetin, and kaempferol) in this plant.

Keywords: Salicylic acid, Methyl jasmonate, Quercetin, Rutin, Plant tissue culture and *Foeniculum vulgare*.

تأثیر محرک‌های رشد گیاهی بر میزان ترکیبات بیوشیمیایی و برخی از متابولیت‌های ثانویه بافت کالوس گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

شیما بورنگ[۱]، سدابه جهانبخش گده کهریز[۲*]، رسول اصغری‌ذکریا[۳]، حامد پارسا خانکندی[۴] و مهران نوروزپور[۱]

۱- دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل. پست‌الکترونیک: jahanbakhsh@uma.ac.ir

۳- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۴- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

چکیده

سابقه و هدف

گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* L.) عضوی از خانواده چتریان (*Apiaceae*) است. گیاه رازیانه به عنوان گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی ایران و کشورهای دیگر مطرح می‌باشد که برای درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی، گوارشی و غیره مورد توجه بوده است. ازجمله ترکیبات با ارزش دارویی بالای موجود در این گیاه، می‌توان به خانواده بزرگ فلاونوئیدها اشاره کرد. با توجه به خواص منحصر به فرد گیاه رازیانه و اهمیت آن در صنایع دارویی و غذایی و اهمیت روش‌های نوین کشت بافت گیاهی برای تولید و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی، این تحقیق در راستای افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه با ارزش همانند روتین، کوئرستین و کمپفرول از بافت کالوس حاصل از این گیاه، با استفاده از متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک و فنیل‌آلانین به‌عنوان عوامل محرک در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ارزیابی میزان تأثیر محرک‌های رشد گیاهی ازجمله متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (صفر به عنوان تیمار شاهد)، شامل ۱۰ تیمار در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تأثیر محرک‌های رشد گیاهی بر سطح ترکیبات بیوشیمیایی ازجمله میزان پروتئین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، میزان تجمع اسیدآمینه پرولین، آنتوسیانین و فلاونوئید کل و میزان روتین، کوئرستین و کامپفرول پرداخته شد. برای این منظور، نمونه کالوس‌های حاصل از محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin برای مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت توسط محرک‌های رشد ذکرشده تحت تیمار قرار گرفت.

نتایج

طبق نتایج به‌دست آمده میزان پروتئین، تجمع اسیدآمینه پرولین، آنتوسیانین و فلاونوئید کل و میزان روتین، کوئرستین و کامپفرول به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر اثر متقابل دو جانبه نوع محرک استفاده شده و مدت زمان استفاده از محرک قرار گرفت. استفاده از غلظت‌های بالاتر متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید موجب افزایش معنی‌دار میزان تولید پرولین، فلاونوئید و آنتوسیانین در نمونه کالوس‌های جمع‌آوری شده از محیط کشت شد. به‌طوری‌که بیشترین مقدار تجمع پرولین (۰/۹۳ میکروگرم در میلی‌گرم پروتئین) مربوط به بافت کالوس جمع‌آوری شده از محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۹۶ ساعت بود. همچنین بیشترین مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین به ترتیب ۰/۲۵ و ۵/۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن کالوس مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات به مدت زمان ۹۶ ساعت بود. همچنین بیشترین میزان

فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز مربوط به محیط کشت حاوی متیل‌جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و مدت زمان ۹۶ ساعت بود. از سوی دیگر، طبق نتایج به‌دست آمده با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان تولید روتین در نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه افزایش یافت. بیشترین میزان کوئرستین (۵/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن کالوس) مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت بود.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش تیمار کالوس با غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک و فنیل-آلانین، امکان افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی (روتین، کوئرستین و کمپفرول) را در این گیاه فراهم می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک‌اسید، متیل‌جاسمونات، کوئرستین، روتین، کشت بافت گیاهی و ***Foeniculum vulgare***

مقدمه

گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* L.) عضوی از خانواده چتریان *Apiaceae* است. این گیاه جزء گیاهان دارویی و با ارزش محسوب می‌شود که از دیرباز در طب سنتی ایران و جهان برای درمان بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های مربوط به زنان، بیماری‌های تنفسی، آب مروارید، برونشیت، استفراغ، دفع سنگ کلیه، اسهال و سرفه‌های مزمن و جلوگیری از اختلالات سوء هاضمه در نوزادان شیرخوار استفاده می‌شده است (Jadid *et al*., 2023). در حالت اهلی این گیاه جزء گیاهان دوساله محسوب می‌شود اما در حالت وحشی جزء گیاهان چند ساله طبقه‌بندی می‌گردد. موطن اصلی گیاه رازیانه به عنوان یک گیاه دیپلوئید (2n=2x=22) و علفی، مدیترانه و اروپای مرکزی است. سطح کشت این گیاه ارزشمند دارویی در کشورهایی مانند یونان، جنوب‌شرق آسیا، برخی از کشورهای خاورمیانه و خاور دور بسیار قابل توجه می‌باشد (Mehra *et al*., 2021).

اندام‌های مختلف شامل دانه یا بذر، ساقه و ریشه این گیاه ارزش دارویی و ادویه‌ای بسیار شناخته شده و ارزشمندی دارد که با توجه به نیاز و هدف درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ahmed *et al*., 2019). ازجمله ترکیبات معدنی و ویتامین‌های موجود گیاه رازیانه می‌توان به کلسیم، پتاسیم، سدیم، آهن، فسفر، تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و ویتامین C اشاره کرد (Di Napoli *et al*., 2022). همچنین اندام هوایی و بذرهای این گیاه دارای ترکیبات مهم دارویی ازجمله ساپونین‌ها، تانن‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنلی و آلکالوئیدها هستند که برای پیشگیری و درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند و فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی دارند (Kurtulbaş *et al*., 2022). ازجمله مهمترین ترکیبات استخراج شده از اندام‌های مختلف این گیاه می‌توان به انواع کوئرستین‌ها، روتین، کامپفرول، اسید گالیک، اسید رزمارنیک، آنتول، آپیژنین، روتین، کمپفرول، فلاونوئید فینکولارین، آرابینوزید، نلومبوزید کومارین‌ها و آپیول کامفن، مواد پروتئینی- قندی و روغنی و اسیدهای چرب همانند اسید پالمتیک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید پتروسلینیک اشاره کرد (Belabdelli *et al*., 2020). ایزوفلاونوئیدهایی مانند ژنیستئین، روتین و کوئرستین از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (Cayetano-Salazar *et al*., 2021). کوئرستین موجود در نمونه‌های برگ و بذر گیاه رازیانه به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجب کلاته شدن فلزات و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. اثرهای متعدد کوئرستین بر عملکرد سلول‌های سرطانی پستان، ازجمله القای پروتئین p21 (مهارکننده CDK) و توقف چرخه سلولی در مراحل G_1 یا G_2/M گزارش شده است (Tang *et al*., 2020).

گیاهان دارویی غنی از ترکیبات شیمیایی و آلی هستند که از دیرباز در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف به عنوان منابع اصلی ترکیبات دارویی مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند.

سیستم‌های دفاعی گیاهی تحت تأثیر قرار دهد (Lefevere *et al*., 2020). جاسمونیک اسید نیز در مسیر القای ژن‌های دفاعی در گیاهان به‌ویژه در زمان حمله پاتوژن‌ها و حشرات مؤثر است (Ruan *et al*., 2019). فنیل‌آلانین یک آمینواسید و پیش‌ماده مسیر فنیل‌پروپانوئید است و به همین دلیل به‌طور وسیعی به عنوان سوبسترا برای تولید اسیدهای فنلیک، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و سایر ترکیبات فنلی استفاده می‌شود. از فنیل‌آلانین با موفقیت برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Rodrigues *et al*., 2021).

گیاه رازیانه، گیاهی مقاوم در برابر شرایط کم آبی است که باعث اصلاح ساختار خاک شده و در تناوب با غلات (گندم و جو) به عنوان گیاه دارویی و صنعتی استفاده می‌شود. سطح زیر کشت گیاه رازیانه در ایران در حدود ۱۰۶۶ هکتار است و استان‌های عمده تولیدکننده این محصول، همدان، خراسان، کهگیلویه و بویراحمد، لرستان، تهران، کرمان و گلستان هستند (Sabzi-Nojadeh *et al*., 2023). به دلیل پراکنش محدود گیاه رازیانه در ایران که بیشتر محدود به استان‌های دارای دامنه‌های وسیع می‌باشد، مطالعات انجام شده در مورد این گیاه به‌ویژه بررسی‌های به‌نژادی، خواص درمانی، تنوع ژنتیکی و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در ایران بسیار اندک بوده و بیشتر در زمینه گیاه‌شناسی گزارش‌هایی انجام شده است. استفاده از روش کشت بافت گیاهی و استفاده از عوامل محرک در این گونه گیاهی بسیار کم بوده و علاوه‌براین هیچ‌گونه گزارشی از کاربرد این روش‌ها در ایران ارائه نشده است. القای سلول‌های کالوس در گیاه رازیانه تا حد زیادی تحت تأثیر دما، مواد مغذی، pH و افزودن اسید اسکوربیک و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون محیط کشت قرار دارد (Jadid *et al*., 2023). محیط کشت پایه MS به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک میلی‌گرم بر لیتر Kin باعث تولید ۱۰۰ درصدی کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) می‌شود (Afify *et al*., 2011). در پژوهشی که Yang و همکاران (۲۰۱۵) بر فراورده‌های گیاهی به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه گیاهی جزء با ارزش‌ترین و گران‌بهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی محسوب می‌شوند (Vaou *et al*., 2021). متابولیت‌های ثانویه گیاهی در فرایندهای اکولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نقش بسیار مهمی دارند. این ترکیبات در حفاظت گیاهان در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی، جاذب گرده‌افشان‌ها، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش دارند (Ku-Vera *et al*., 2020). روش‌های مختلفی برای تولید، افزایش و استخراج ترکیبات با ارزش گیاهی (متابولیت‌های ثانویه) وجود دارد که ازجمله مهمترین و نوین‌ترین آنها می‌توان به استفاده از محرک‌های رشد گیاهی (الیسیتورها) در فرایند کشت بافت و اندام گیاهی اشاره کرد (Noruzpour *et al*., 2019). کشت بافت گیاهی یک روش مؤثر برای ریزازدیادی، تولید گیاهان یکنواخت، حفظ ژرم‌پلاسم گیاهی و افزایش تولید متابولیت‌های با ارزش گیاهی می‌باشد که مورد توجه محققان مختلف بوده است (Bhaskar *et al*., 2022). محرک‌های مختلفی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه توسط سلول و بافت گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای توسط محققان مختلف ارزیابی شده‌اند (Patel *et al*., 2020). ازجمله الیسیتورهای زیستی، غیرزیستی، فیزیکی یا شیمیایی پرکاربرد در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای می‌توان به سالیسیلیک اسید، متیل‌جاسمونات، عصاره مخمر، امواج فراصوت، فنیل‌آلانین، کیتوسان، آمینوبنزوئیک اسید و غیره اشاره کرد (Abdulhafiz, 2022). سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در تنظیم بیان ژن و فرایند پیام‌رسانی ثانویه درون سلول‌های گیاهی مؤثرند (Shafighi *et al*., 2022). سالیسیلیک اسید موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود (Zhang & Li, 2019). سالیسیلیک اسید علاوه‌بر مؤثر بودن در مسیر بروز مقاومت سلول‌های گیاهی در برابر بیماری‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی در رشد و نمو سلول‌های گیاهی، میزان تنفس سلولی، جذب و انتقال یون‌ها و بروز تغییرات فنوتیپی در برگ و ساختار کلروفیل نقش دارد. این هورمون گیاهی ازجمله محرک‌های زیستی بی‌خطری است که می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای را از طریق تحریک

گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد (Afify *et al*., 2011). برای بررسی تأثیر انواع عوامل محرک بر تولید و افزایش ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه گیاهی از این ترکیب محیط کشت استفاده شد. همچنین برای حصول یکنواختی بیشتر در نمونه‌های کالوس، بافت‌های کالوس حاصل سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۵ تا ۲۰ روز درون محیط کشت ذکرشده واکشت شدند.

اعمال الیسیتور

از الیسیتورهای (جدول ۱) درون محیط کشت ایستا برای افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی و برخی از متابولیت‌های گیاه رازیانه در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت استفاده شد (Zare-Hassani *et al*., 2019). پس از انتقال بافت کالوس (از واکشت نهایی) به محیط کشت‌های جامد و دارای انواع مختلفی از الیسیتورها، برای بررسی ترکیبات بیوشیمیایی و برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی نمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد فاقد روشنایی و با دمای ۲۵°C منتقل شدند. نمونه‌های کالوس مورد نظر برای ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی و تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در مدت زمان‌های ذکرشده جمع‌آوری و بلافاصله پس از انجماد در ازت مایع، در دمای ۸۰°C- نگه‌داری شدند.

روی کشت بافت گیاه رازیانه و تولید متابولیت‌های ثانویه انجام دادند، به کمک محرک‌های رشد گیاهی بیان کردند که نمونه کالوس‌های تیمار شده درون محیط کشت MS حاوی NAA و Kin به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان محرک‌های رشد گیاهی بیشترین میزان تولید آنتول را داشته‌اند.

با توجه به خواص منحصر به فرد گیاه رازیانه و اهمیت آن در صنایع دارویی و غذایی و اهمیت روش‌های نوین کشت بافت گیاهی برای تولید و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی، این تحقیق در راستای افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه با ارزش همانند روتین، کوئرستین و کمپفرول از بافت کالوس حاصل از این گیاه، با استفاده از متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک و فنیل‌آلانین به‌عنوان عوامل محرک در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها

تولید بافت کالوس

نمونه‌های بافت کالوس گیاه رازیانه از ریزنمونه‌های برگ و ساقه کشت شده درون محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی-

جدول ۱- انواع محرک‌های رشد گیاهی مورد استفاده درون محیط کشت ایستای دارای بافت کالوس گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

Table 1. Types of elicitors used in the solid culture medium callus tissue of (*F. vulgare*)

Basic culture medium	Methyl jasmonate (mg/l)	Salicylic acid (mg/l)	Phenylalanine (mg/l)
MS	-	-	-
MS	50	-	-
MS	100	-	-
MS	200	-	-
MS	-	50	-
MS	-	100	-
MS	-	200	-
MS	-	-	50
MS	-	-	100
MS	-	-	200

اندازه‌گیری خصوصیات بیوشیمیایی

ابتدا ۰/۱ گرم از هر نمونه کالوس درون هاون چینی و ازت مایع ساییده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴°C و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس قسمت رویی به عنوان عصاره پروتئینی برای اندازه-گیری میزان پروتئین و فعالیت‌های آنزیمی جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل نمونه‌ها از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. برای این منظور، از ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی و ۵۰ میکرولیتر معرف برادفورد و ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات به عنوان محلول واکنش استفاده شد. میزان جذب نوری عصاره پروتئینی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec™ plus، آمریکا) استفاده شد. کمی‌سازی غلظت پروتئین با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های مختلف انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) با کمی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی-مولار (pH= ۷)، ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۹۰ میکرولیتر گلایکول (۱۰ میلی‌مولار) و ۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۵ میلی‌مولار) بود. تغییرات جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۲۵ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه و در دمای ۲۵°C با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز برحسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان و میزان فعالیت آن با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{Peroxidase activity} = \Delta A425 \times (V/Vt)/(0/1 \times t)/Cp$$

که در این فرمول، $\Delta A_{۴۲۵}$: تغییرات جذب نوری؛ V: حجم کل؛ Vt: حجم عصاره مورد استفاده در واکنش؛ T: زمان واکنش (دقیقه)؛ Cp: غلظت پروتئین است.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Chanesو Mahely (۱۹۹۶) با کمی تغییر استفاده گردید. بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار با pH= ۷ و ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۵ میلی‌مولار به عنوان پذیرنده الکترون مورد استفاده قرار گرفت و بعد ۶۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی در حمام یخ به آن اضافه و تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. برای نمونه بلانک به جای عصاره پروتئینی از بافر فسفات (pH= ۷/۰) استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز براساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین در دقیقه با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Catalase activity} = \Delta A240 \times (V/Vt)/(0/1 \times t)/Cp$$

در این فرمول، $\Delta A_{۲۴۰}$: تغییرات جذب نوری؛ V: حجم کل؛ Vt: حجم عصاره مورد استفاده در واکنش؛ T: زمان واکنش (برحسب دقیقه) و Cp: غلظت پروتئین بود.

اندازه‌گیری اسیدآمینه پرولین

پرولین آزاد نمونه‌های مورد نظر طبق روش Bates (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۱ گرم نمونه کالوس در سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد و در یک

هاون چینی کوچک به مدت ۳ دقیقه سائیده شد. همگن حاصل در دمای ۴°C و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی به یک میکروتیوب جداگانه منتقل گردید. سپس یک میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر استیک‌اسید خالص به آن اضافه شد. سپس، مخلوط حاصل به حمام آب با دمای ۹۰°C منتقل شده و به‌مدت یک ساعت در این شرایط نگه‌داری شد. پس از سرد شدن نمونه دو میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و بعد به مدت دو دقیقه ورتکس گردید. سپس، جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پرولین آزاد نمونه با استفاده از یک منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین گردید.

استخراج متابولیت‌های ثانویه

به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه نمونه‌های کالوس، از روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۱ گرم کالوس درون هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک به نسبت حجمی ۹۹:۱) کاملاً سائیده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی حاصل برای اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد (جرمی-حجمی)، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات یک مولار به یک میلی‌لیتر عصاره حاصل اضافه و مقادیر جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۸ نانومتراندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متانول) تهیه و برای کمی‌سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها استفاده شد. سپس با استفاده از فرمول $T = (C \times V)/M$ مقدار فلاونوئید برحسب میلی‌گرم در یک گرم بافت کالوس محاسبه گردید. در این فرمول T، میزان فلاونوئید برحسب میلی-گرم در گرم بافت کالوس؛ C، غلظت فلاونوئید برحسب میلی‌گرم کوئرستین در میلی‌لیتر؛ V، حجم نهایی عصاره و M، وزن نمونه (بافت کالوس برحسب گرم) است.

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نمونه‌های کالوس از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A = \varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $33000\ M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه به روش HPLC

به منظور اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه (روتین، کوئرستین و کمپفرول) با استفاده از دستگاه HPLC، از روش Hurst و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۱ گرم از نمونه کالوس درون هاون-چینی به‌همراه ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد کاملاً سائیده شده و به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس دو بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Bandelin electronic®, Germany) و در دمای ۳۵ °C نگه‌داری شد و پس از ۳ ساعت دوباره تیمار ورتکس و اولتراسوند تکرار شد. نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس عصاره رویی به‌دست آمده برای اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی ذکرشده با استفاده از دستگاه HPLC (KENUVER ،GermanyAZURA) ستون فاز معکوس C18 استفاده گردید. قسمت متحرک شامل متانول گرید HPLC و آب مقطر بود. تشخیص و کمی‌سازی مقدار روتین، کوئرستین و کمپفرول به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷ nm،

۳۶۸ nm و ۳۶۸ nm انجام شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نمونه خالص روتین (NAWAH-HIKA2001-Egypt)، کوئرستین (Sigma-Aldrich) و کمپفرول (Sigma-Aldrich) استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

ترکیبات بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان پروتئین و میزان تجمع اسیدآمینه پرولین، فلاونوئید کل و آنتوسیانین نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه *F. vulgare* در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع الیسیتور مورد استفاده، مدت زمان استفاده و اثر متقابل دو جانبه بین نوع الیسیتور × مدت زمان استفاده از آن قرار گرفت. این در حالی است که میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر نوع الیسیتور مورد استفاده و مدت زمان استفاده از الیسیتور قرار گرفتند. اما اثر متقابل بین نوع الیسیتور× مدت زمان استفاده از آن تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های رشد گیاهی بر خصوصیات بیوشیمیایی و متابولیت-های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

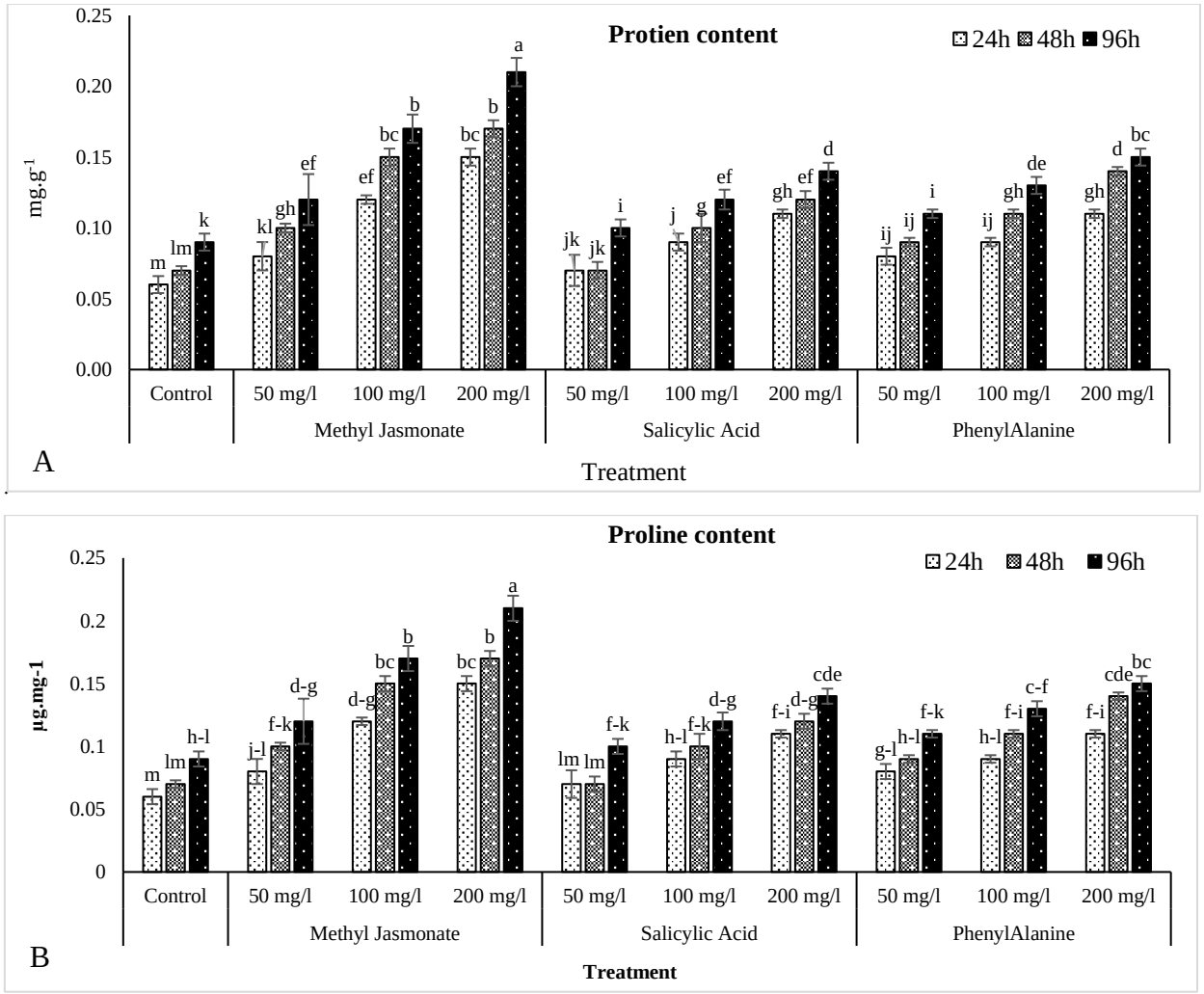
Table 2: Mean squares of type, concentration, and duration of plant growth stimulants effects on biochemical characteristics and secondary metabolites of *F. vulgare in vitro* culture.

Source of variation	df	MS					
		Protein	Peroxidase	Catalase	Proline	flavonoid	Anthocyanin
Elicitor (A)	9	0.02 **	1009.06 **	11246.23 **	0.12 **	0.02 **	4.75 **
Time (B)	2	0.007 **	696.89 **	8009.91 **	0.049 **	0.02 **	3.88 **
A× B	18	0.001 **	157.12	2693.58	0.003 **	0.001 **	0.23 **
Erorr	60	0.001	113.76	2234.30	0.002	0.001	0.10
CV(%)	-	15.12	10.51	19.98	12.09	18.99	13.94

**: significant at 1% level of probability. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱

طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۱-A)، بیشترین مقدار پروتئین (۰/۲۱ میلی‌گرم در گرم نمونه کالوس) مربوط به نمونه بافت کالوس جمع‌آوری شده از محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات (تیمار ۹۶ ساعت) بود. این در حالی است که تیمار نمونه بافت‌های کالوس به مدت ۹۶ و ۴۸ ساعت با الیسیتورهای متیل-جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین (در تمامی غلظت-ها) و تیمار شاهد (فاقد الیسیتور) به‌طور معنی‌داری بیشتر از مدت زمان ۲۴ ساعت بود. به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان استفاده از الیسیتورها از ۲۴ ساعت به ۴۸ و ۹۶ ساعت میزان تولید پروتئین توسط نمونه بافت‌های کالوس گیاه افزایش می-یابد. همچنین افزایش غلظت الیسیتورها درون محیط کشت از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (در تمامی مدت زمان‌های مورد استفاده)، موجب افزایش معنی‌دار تولید پروتئین توسط نمونه بافت کالوس‌های جمع‌آوری شده شد. همچنین از نظر میزان تجمع اسیدآمینه پرولین درون سلول‌های بافت کالوس تیمار شده بین تیمار شاهد و برخی از تیمارها اختلاف معنی-داری از نظر آماری مشاهده شد (شکل ۱-B). بیشترین مقدار

تجمع پرولین (۰/۹۳ میکروگرم در میلی‌گرم) در نمونه کالوس-های تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۹۶ ساعت مشاهده شد. از نظر مدت زمان استفاده از محرک‌ها در تمامی محیط کشت‌های حاوی متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید و یا فنیل‌آلانین میزان تجمع پرولین در کالوس‌های جمع‌آوری شده تحت تیمار زمانی ۹۶ ساعت به طور معنی‌داری بیشتر از مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. این در حالی است که در بیشتر تیمارها بین مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و تنها در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات و یا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین، بین محیط کشت دارای الیسیتورهای ذکر شده در مدت زمان ۴۸ و ۲۴ ساعت میزان تجمع اسیدآمینه پرولین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱-B).



شکل ۱- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های مختلف بر میزان (A): پروتئین و (B): تجمع اسید آمینه پرولین نمونه کالوس‌های گیاه *F. vulgare* در شرایط درون‌شیشه‌ای. میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با هم ندارند.

Figure 1- The effect of the type, concentration and duration of using different elicitors on the (A): Protein and (B): Proline content of the callus samples callus of *F. vulgare* under *in vitro* conditions. The means followed by a common letter does not have a significant difference at the 5% probability level.

از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) تیمار شده با الیسیتورهای مختلف در غلظت‌های (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، بین بیشتر تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز (به ترتیب ۱۲۶/۳۰ و ۷۴۵/۹۸ μmol H_2O_2 mg^{-1} protein) مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات بود. طبق نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت الیستورها درون محیط کشت از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز تغییر معنی‌داری نداشت.

جدول۳- تأثیر نوع و غلظت محرک‌های رشد گیاهی بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 3.The effect of the type and concentration of plant growth stimulants on Catalase and Peroxidase activities of fennel (*F. vulgare*) in *in vitro* culture.

Type and Concentration of Elicitor	Peroxidase (μmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}Protein)	Catalase (μmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}Protein)
MS+ 2 NAA+ 1 Kin (Control)	114.66 ^{ab}	737.08 ^{ab}
50 (mg) Methyl jasmonate	115.95 ^{ab}	716.13 ^{ab}
100 (mg) Methyl jasmonate	125.60 ^{a}	714.04 ^{ab}
200 (mg) Methyl jasmonate	126.30 ^{a}	745.98 ^{a}
50 (mg) Salicylic acid	100.47 ^{c}	650.04 ^{c}
100 (mg) Salicylic acid	112.62 ^{bc}	699.00 ^{abc}
200 (mg) Salicylic acid	106.52 ^{bc}	736.22 ^{ab}
50 (mg) Phenylalanine	101.11 ^{c}	690.01 ^{bc}
100 (mg) Phenylalanine	111.71 ^{bc}	690.28 ^{b}
200 (mg) Phenylalanine	109.77 ^{bc}	737.61 ^{ab}

میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

The means followed by a common letter do not have a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴- تأثیر مدت زمان استفاده از محرک‌های رشد گیاهی بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون-شیشه‌ای

Table 4. Effect of duration of using plant growth stimulants on Catalase and Peroxidase activities of fennel plant (*F. vulgare*) in *in vitro* culture.

Time (hour)	Peroxidase (μmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}Protein)	Catalase (μmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}Protein)
24	109.34 ^{b}	690.24 ^{b}
48	108.62 ^{b}	716.74 ^{ab}
96	119.45 ^{a}	727.94 ^{a}

میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

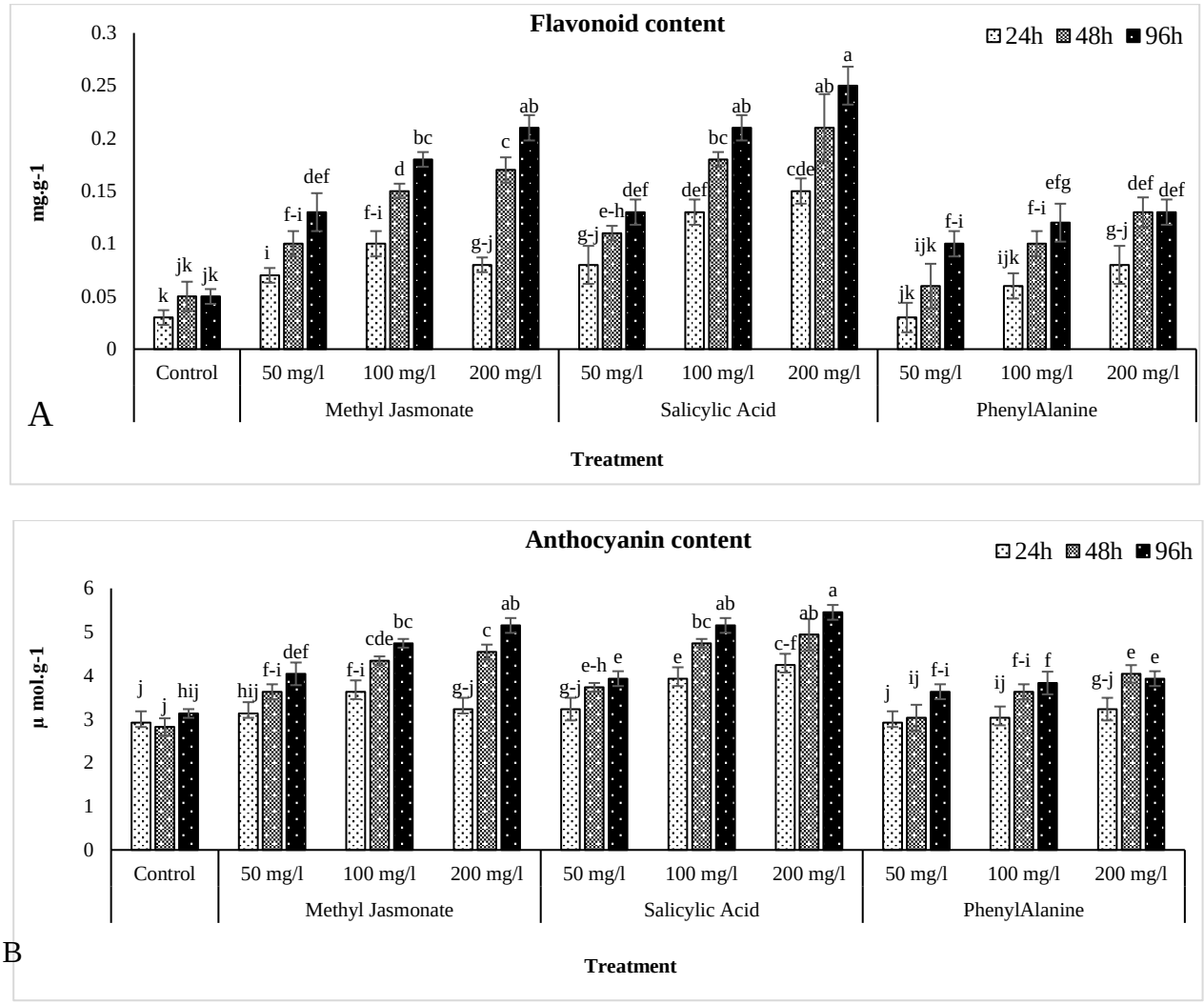
The means followed by common letter do not have a significant difference at the 5% probability level

طبق نتایج به‌دست آمده (جدول ۴)، با افزایش مدت زمان استفاده از محرک‌های رشد گیاهی از ۲۴ به ۹۶ ساعت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این در حالی است که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز از نظر مدت زمان استفاده از محرک‌های رشد گیاهی بین مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی-

داری از نظر آماری مشاهده نشد (جدول۴). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز (به ترتیب ۱۱۹/۴۵ و ۷۲۷/۹۴ $\mu mol\ H_2O_2\ mg^{-1}\ protein$) مربوط به استفاده از محرک‌های رشد گیاهی مختلف برای مدت زمان ۹۶ ساعت بود.

به‌طورکلی طبق نتایج به‌دست آمده از جدول ۳ و ۴، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز مربوط به محیط کشت حاوی متیل‌جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میلی-گرم در لیتر و مدت زمان ۹۶ ساعت بود.

از نظر میزان فلاونوئید استخراج شده از بافت‌های کالوس بین بیشتر محیط کشت‌های حاوی محرک‌ها و تیمار شاهد (فاقد محرک) اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) مشاهده شد (شکل ۲-A). همچنین بیشترین مقدار فلاونوئید (۰/۲۵ میلی‌گرم بر گرم کالوس) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به مدت زمان ۹۶ ساعت مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، میزان فلاونوئید کل کالوس‌های گیاه رازیانه با افزایش غلظت محرک‌های استفاده شده (متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید) با افزایش غلظت از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم (در مدت زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت) در لیتر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. اما این در حالی است که از نظر میزان فلاونوئید کل نمونه کالوس‌های تیمار شده توسط محرک‌های رشد گیاهی، افزایش غلظت محرک‌های ذکر شده از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین با افزایش غلظت فنیل‌آلانین از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای مدت زمان ۴۸ ساعت میزان فلاونوئید کل نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه به‌طور معنی داری افزایش یافت. اما این اختلاف معنی‌دار در مدت زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت و در بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد (شکل ۲-A). همچنین از نظر تأثیر غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر روی فلاونوئید کل نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه نیز همانطوری‌که در شکل ۲-A مشاهده می-شود، در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید با افزایش مدت زمان استفاده از محرک‌های مذکور از ۲۴ به ۴۸ ساعت میزان تولید فلاونوئید کل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. اما افزایش مدت زمان استفاده از متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری از نظر تولید فلاونوئید کل در نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه مشاهده نشد. این نتیجه در مورد استفاده از فنیل‌آلانین تنها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. از نظر میزان آنتوسیانین، بین بیشتر تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی-داری از نظر آماری مشاهده نشد (شکل ۲-B). بیشترین مقدار آنتوسیانین (۵/۴۵ میکرومول بر گرم وزن کالوس) مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به مدت زمان ۹۶ ساعت بود. از نظر مدت زمان تیمار محرک-ها، با افزایش مدت زمان مورد استفاده از محرک‌ها میزان تولید آنتوسیانین افزایش یافت اما این افزایش در بیشتر موارد معنی‌دار نبود. طبق نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات درون محیط کشت از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت موجب افزایش معنی‌دار میزان تولید آنتوسیانین توسط کالوس‌های تیمار شده شد. این در حالی بود که از نظر استفاده از سالیسیلیک اسید درون محیط کشت با افزایش غلظت محرک رشد گیاهی از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت موجب افزایش معنی‌دار میزان تولید آنتوسیانین توسط کالوس‌ها شد. بااین حال، در مورد فنیل‌آلانین بین بیشتر تیمارها و مدت زمان-های مورد استفاده اختلاف معنی‌داری از نظر تولید آنتوسیانین مشاهده نشد (شکل ۲-B).



شکل ۲- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های مختلف بر میزان فلاونوئید (A) و آنتوسیانین (B) کالوس گیاه رازیانه F. vulgare در شرایط درون‌شیشه‌ای. میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Figure 2- The effect of the type, concentration and duration of using different elicitors on the flavonoid (A) and Anthocyanin (B) contents in the callus of *F. vulgare* under *in vitro* conditions. The means followed by common letters do not have a significant difference at the 5% probability level.

متابولیت‌های ثانویه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان تولید روتین، کوئرستین و کمپفرول بافت کالوس گیاه رازیانه *F. vulgare* به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر نوع الیسیتور، مدت زمان استفاده از الیسیتور و اثر متقابل الیسیتور × مدت زمان استفاده از آن قرار داشت (جدول ۳).

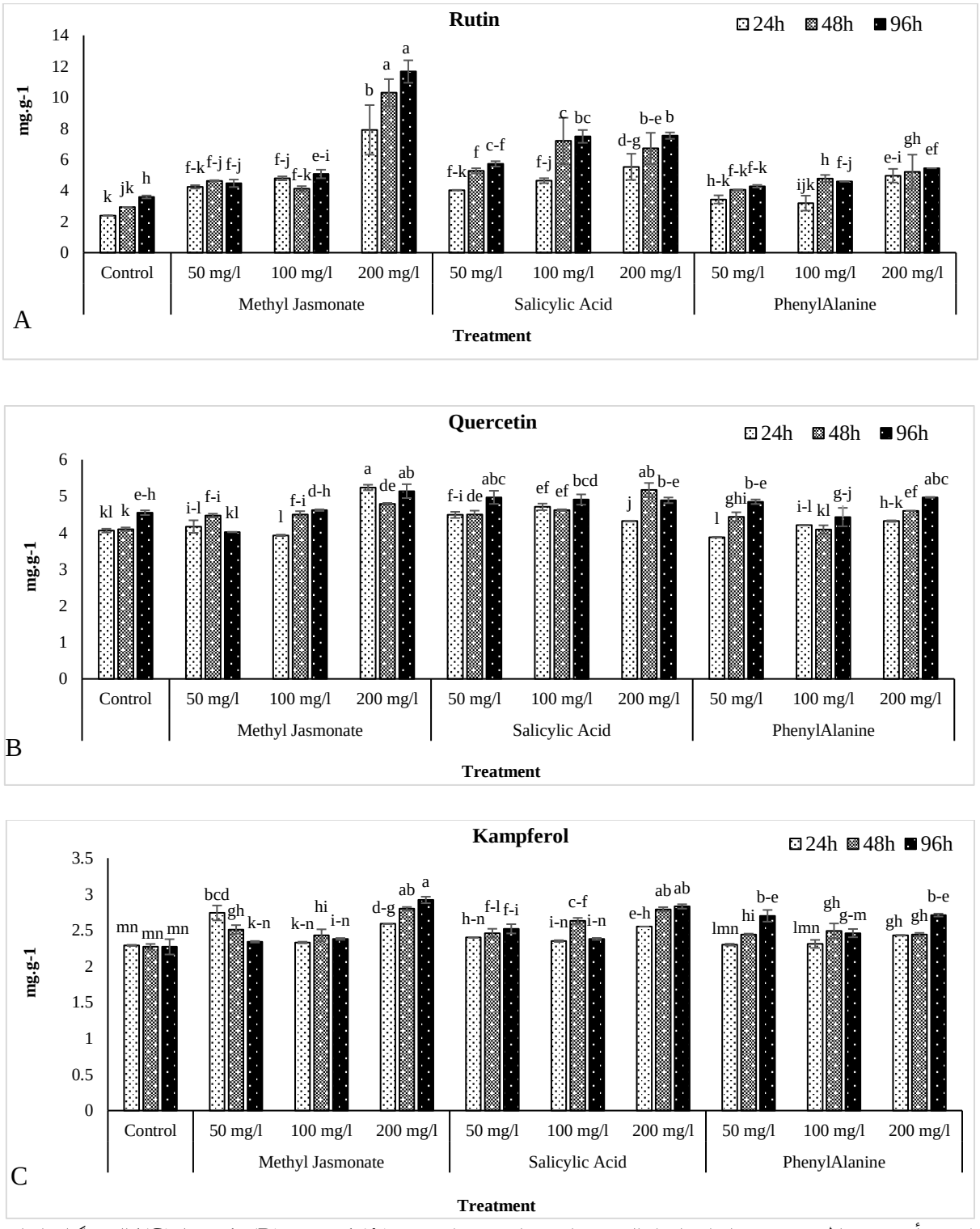
جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرهای الیسیتور و مدت زمان استفاده از آن بر تولید متابولیت‌های ثانویه نمونه‌های کالوس گیاه رازیانه
Table 3. The mean squares of the effects of the elicitor type, and duration on the secondary metabolites production in the callus samples of *F. vulgare* under *in vitro* conditions.

Source of variation	df	MS		
		Rutin	Quercetin	Kaempferol
Elicitor (A)	9	56.93 **	1.61 **	0.63 **
Time (B)	2	16.63 **	0.53 **	0.07 **
A× B	18	5.78 **	0.24 **	0.05 **
Erorr	60	1.02	0.03	0.007
CV(%)	-	11.09	3.27	2.57

**: significant at 1% level of probability. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

از نظر میزان تولید روتین توسط نمونه بافت کالوس-های تیمار شده با الیسیتورها بین تیمار شاهد و بیشتر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳-A). بیشترین میزان روتین (۱۱/۶۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر کالوس) مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۹۶ ساعت بود. طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش افزایش مدت زمان تیمار نمونه کالوس‌های درون محیط کشت شاهد، محیط کشت حاوی ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل جاسمونات، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک - اسید و محیط کشت دارای ۵۰ یا ۱۰۰ و یا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین از ۲۴ ساعت به ۴۸ و ۹۶ ساعت تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید روتین در بافت‌های کالوس نداشت. همچنین افزایش معنی‌دار تولید میزان روتین توسط بافت کالوس با افزایش مدت زمان تیمار در محیط کشت‌های دارای ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید مشاهده شد (شکل ۳-A). طبق نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت متیل-جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین در مدت زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت، تولید روتین در نمونه بافت کالوس گیاه رازیانه (*F. vulgare*) نیز افزایش یافت. از نظر میزان تولید کوئرستین توسط نمونه کالوس‌های تیمار شده نیز بین بیشتر تیمارهای حاوی الیسیتور و تیمار شاهد در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) اختلاف معنی داری مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست آمده افزایش مدت زمان استفاده از فنیل‌آلانین (در غلظت‌های مختلف)، سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان الیسیتور درون محیط کشت میزان تولید کوئرستین در بافت کالوس گیاه رازیانه *F. vulgare* را افزایش می‌دهد (شکل ۳-B). از نظر میزان تولید کمپفرول در کالوس گیاه رازیانه *F. vulgare* بین بیشتر تیمارهای دارای محرک و تیمار شاهد در مدت زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

طبق نتایج به‌دست آمده بین بیشتر صفات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه اندازه‌گیری شده از نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) تیمار شده با محرک‌ها در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف در شرایط درون‌شیشه‌ای همبستگی در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۴). طبق نتایج به‌دست آمده از جدول ۴، بین تولید کوئرستین و تولید پراکسیداز و کاتالاز همبستگی وجود نداشت.



شکل ۳- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از الیسیتورهای مختلف بر میزان روتین (A)، کوئرستین (B) و کمپفرول (C) کالوس گیاه رازیانه *F.vulgare* در شرایط درون‌شیشه‌ای میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Figure 3- The effect of the type, concentration and duration of different elicitors on the Rutin (A), Quercetin (B), and Kampferol (C) in the callus of *F. vulgare* under *in vitro* conditions. The means followed by a common letter do not have a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴- میزان همبستگی بین صفات محاسبه شده نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) تیمار شده با محرک‌ها در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف در شرایط درون‌شیشه‌ای

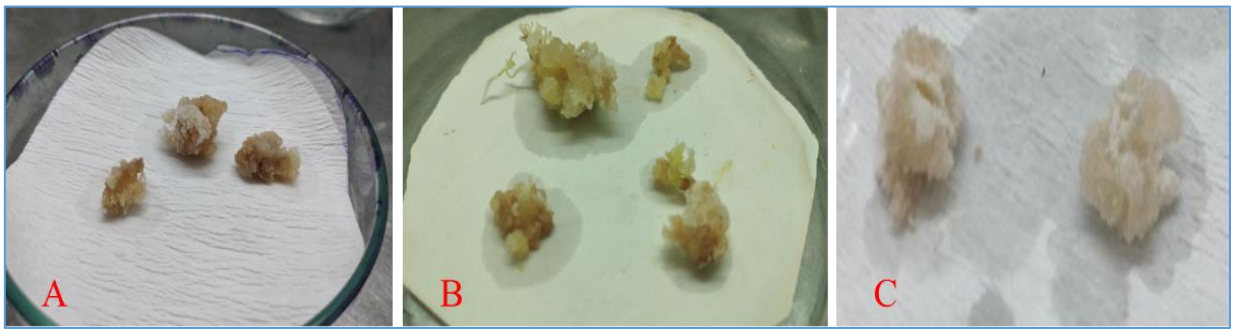
Table 4. The degree of correlation between the calculated traits of callus samples of *F. vulgare* treated with stimulants in different concentrations and durations in *in vitro* conditions

Treatment	Rutine	Quercetin	Kaempferol	Protein	Peroxidase	Catalase	Flavonoid	Anthocyanin
Rutine	1							
Quercetin	0.55**	1						
Kaempferol	0.55**	0.54**	1					
Protein	0.65**	0.49**	0.43**	1				
Peroxidase	0.42**	0.15	0.40**	0.34**	1			
Catalase	0.24*	0.19	0.23*	0.21*	0.49**	1		
Flavonoid	0.66**	0.46**	0.54**	0.85**	0.53	0.41**	1	
Anthocyanin	0.65**	0.52**	0.40**	0.58**	0.27**	0.24*	0.64**	1

**, * significantly at 1 and 5% of probability level, respectively

** و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵٪

طبق مشاهدات آزمایشگاهی استفاده از محرک‌ها در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف تغییری در نوع، رنگ و رشد بافت‌های کالوس نداشت (شکل ۴).



شکل ۴- نمونه کالوس‌های جمع‌آوری شده از محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به (A): همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل-جاسمونات به مدت ۹۶ ساعت، (B): ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک به مدت ۹۶ ساعت و (C): نمونه شاهد فاقد محرک

Figure 4. Callus samples collected from MS medium containing 2 mg L^{-1} NAA and 1 mg L^{-1} BAP along with 200 mg L^{-1} methyl Jasmonate for 96 h (A), 100 mg L^{-1} of salicylic acid for 96 h (B), and control without elicitor (C).

بحث

تولید متابولیت‌های ثانویه به کمک روش کشت بافت گیاهی به عنوان یک روش ساده، مطمئن و سودآور می‌باشد که در طی سالیان اخیر مورد توجه بسیاری از محققان و شرکت‌های تولیدکننده ترکیبات دارویی قرار گرفته است (Gorlenko *et al.*, 2020). استفاده از روش کشت بافت گیاهی به دلیل تولید فراورده‌های گیاهی یکنواخت در واحد سطح کوچک‌تر، مستقل از شرایط محیطی، شرایط رشدی قابل کنترل و غیره از اهمیت فراوانی برخوردار است. یکی از مزیت‌های عمده روش کشت بافت و اندام گیاهی تولید متابولیت‌های ثانویه نادر و افزایش تولید متابولیت‌های رایج گیاهی می‌باشد (Pan *et al.*, 2019). بافت کالوس گیاهی به عنوان بافت گیاهی تمایز نیافته در گیاهان عمدتاً دولپه‌ای در پاسخ به زخم یا خراش مکانیکی و شیمیایی برای سد

دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی حاصل می‌شود. یکی از مزایای این بافت مخصوص، خاصیت توتی‌پوتنسی (Totipotency) آنها می‌باشد که تمامی ویژگی‌های یک گیاه کامل را دارد. تولید و کشت بافت کالوس در شرایط درون-شیشه‌ای و استفاده از الیسیتورها یکی از روش‌های عمده در جهت تولید متابولیت‌های ارزشمند دارویی محسوب می-شود (Liu *et al*., 2022). در این پژوهش نیز از محرک‌های رشد گیاهی (الیسیتورهایی) مانند متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین در غلظت‌های (صفر (به عنوان شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند خانواده بزرگ فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها، کوئرستین، روتین و کمپفرول و ترکیبات بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و تجمع اسید آمینه پرولین در نمونه بافت‌های کالوس گیاه رازیانه (*F. vulgare*) استفاده شد.

محرک‌های رشد گیاهی (الیسیتورها) به دو دسته زیستی (زنده) و غیرزیستی (غیرزنده) تقسیم می‌شوند که به عنوان عوامل بروز استرس و تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در بافت کالوس و اندام گیاهی در گیاهان دارویی و در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Burdziej *et al*., 2021). ازجمله الیسیتورهای پرکاربرد در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌توان به سالیسیلیک اسید، متیل‌جاسمونات، عصاره مخمر، امواج فراصوت، فنیل‌آلانین، کیتوسان، آمینوبنزوئیک اسید و غیره اشاره کرد (Alexiou *et al*., 2022). سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در تنظیم بیان ژن و فرایند پیام‌رسانی ثانویه درون سلول‌های گیاهی مؤثرند (Shafighi *et al*., 2022). سالیسیلیک اسید موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود (Zhang & Li, 2019). امروزه کاربرد سالیسیلیک‌اسید به عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌ها به اثبات رسیده است (Saleem *et al*., 2022).

رادیکال‌های آزاد مولکول‌های درون سلولی هستند که به دلیل داشتن الکترون‌های جفت نشده بسیار فعال و واکنش-پذیر می‌باشند (Di-Meo & Venditti, 2020). فعالیت بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد برای عملکرد طبیعی سلول مضر است (Huang *et al*., 2019؛ Wan *et al*., 2020). گیاهان با استفاده از سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌توانند غلظت گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) را کاهش داده و از این طریق از اثرهای مخرب آن بکاهند. دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنلی می‌باشد (Zou *et al*., 2020). فعالیت بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی همانند پراکسیداز و کاتالاز برای ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی بسیار مهم است. به‌طورکلی تغییر در محتوای آنتی‌اکسیدانی، یکی از پاسخ‌های گیاه برای تنظیم شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش‌ها می‌باشد. اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات از طریق افزایش فعالیت مسیر سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گیاه را از صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Galasso *et al*., 2021). طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش استفاده از متیل‌جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای ۹۶ ساعت در مقایسه با تیمارهای شاهد موجب افزایش معنی‌دار میزان آنزیم پراکسیداز در نمونه بافت‌های کالوس گیاه رازیانه **(***F. vulgare***)** در شرایط درون‌شیشه‌ای شد (جدول ۳ و ۴). این در حالی است که سایر تیمارهای دیگر تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به تیمار شاهد نداشتند. مطابق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Shabani و همکاران (۲۰۰۹)، با بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) نشان دادند که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز و افزایش غلظت متیل جاسمونات موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود. استفاده از الیسیتورهای مختلف در غلظت‌ها و مدت زمان-های مختلف تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در

نمونه کالوس‌های تیمار شده نداشت (جدول ۳ و ۴). برخلاف نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Nafie و همکاران (۲۰۱۱)، بیان کردند که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خربزه (*Cucumis melo*) می‌شود.

پرولین یکی از مهمترین اسیدهای آمینه است که در بیشتر گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید و تجمع آن در سلول‌ها افزایش یافته و نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی را در حفاظت سلول‌ها در برابر تنش و بهبود رشد و نمو سلول‌ها ایفا می‌کند. ازجمله نقش‌های مهم پرولین می‌توان به نقش آن به عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت و پایدارکننده ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشاء اشاره کرد. تجمع اسمولیت‌ها در سیتوزول امکان تعدیل فشار اسمزی را در سلول فراهم می‌کند. همچنین این اسیدآمینه از ساختارهای سلولی پروتئین‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش محیطی و زیستی محافظت می‌کند (Alvarez *et al*., 2022). در این پژوهش مشخص شد که استفاده از غلظت‌های بالاتر و مدت زمان‌های بیشتر متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک اسید در مقایسه با تیمار شاهد و استفاده از غلظت‌های پایین‌تر موجب افزایش معنی‌دار میزان تجمع اسید آمینه پرولین در بافت‌های کالوس گیاه رازیانه *F. vulgare* در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود (شکل۱-B). Madani و همکاران (۲۰۲۱)، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر موجب افزایش تجمع پرولین در ریشه‌های مویین گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

متابولیت‌های ثانویه گروه متنوعی از مولکول‌هایی هستند که بخشی از سیستم دفاعی گیاه را شامل می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه همیشه و در همه بخش‌های گیاه تولید نمی‌شوند، بلکه به سرعت در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. ازجمله این ترکیبات فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها هستند که علاوه‌بر نقش‌های حفاظتی و ساختاری در بافت‌ها، به عنوان ترکیبات رنگدانه‌ای گیاهی در جذب حشرات گرده‌افشان، ایجاد تنوع رنگی برای گل‌ها و گیاهان زینتی، تولید داروها، حشره‌کش‌ها، چاشنی‌های غذایی، رنگ‌های طبیعی، خوشبوکننده‌ها و به عنوان علامت‌های مولکولی در برهم‌کنش گیاهان با محیط و به عنوان نشانگرهای زیستی در مطالعات کموتاکسی (سیستماتیک بر پایه عوامل شیمیایی) مطرح می‌باشند (Pang *et al*., 2021). فلاونوئیدها را می‌توان در بیشتر گونه‌های گیاهی و در اندام‌های مختلف یافت. فلاونوئیدها در کنار طیف گسترده‌ای از عملکردهای مختلف به عنوان مولکول‌های سیگنال در تولیدمثل جنسی نقش دارند و از گیاه در برابر اثرهای مخرب اشعه ماوراءبنفش محافظت می‌کنند. همچنین در تعاملات گیاهان و میکروب‌ها و پاسخ‌های دفاعی گیاه شرکت می‌کنند (Dias *et al*., 2021). آنتوسیانین‌ها مهمترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل‌ها هستند که غیرسمی و محلول در آب بوده و در سطح وسیعی در مایع سلول‌های گیاهی وجود دارند. این رنگدانه‌ها مسئول رنگ‌های قرمز، آبی و بنفش در بسیاری از میوه‌ها، سبزی‌ها و گل‌ها هستند. طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش از نظر میزان فلاونوئید و آنتوسیانین بین تیمار شاهد و بیشتر تیمارها اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (شکل ۲-A و B). به‌طوری‌که استفاده از متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین به‌ویژه در غلظت‌ها و مدت زمان‌های بالاتر به‌طور معنی‌داری میزان تولید فلاونوئید را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۲-A). از نظر میزان آنتوسیانین نمونه کالوس‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک - اسید و فنیل‌آلانین نیز مشخص شد که با افزایش غلظت و مدت زمان استفاده از متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید میزان آنتوسیانین نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. مطابق نتایج به‌دست آمده در

این پژوهش، Zhang و Xing (۲۰۰۸) با بررسی تأثیر الیسیتورهای مختلف بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه بافت کالوس گیاه توت‌سیاه (*Morus Nigra*) در شرایط درون‌شیشه‌ای بیان کردند که متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر تولید فلاونوئید و آنتوسیانین را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

طبق گزارش‌های ارائه شده کوئرستین، کامفرول، لوتئولین، روتین و آپیژنین به عنوان فلاونول‌های اصلی در برگ‌های گیاهان، آنها را در برابر اشعه مضر نور خورشید محافظت می‌کنند (Laoué *et al*., 2022). کوئرستین موجب مهار اکسیداسیون و سمیت سلولی لیپوپروتئین‌ها می‌شود (Hosseini *et al*., 2021). کامپفرول از نظر ساختاری از دی‌فنیل‌پروپان تشکیل شده است که از طریق تراکم با کمک آنزیم‌های مختلف تهیه می‌شود. کمپفرول معمولاً به صورت خوراکی به عنوان گلیکوزیدهای با قطبیت بالا مصرف می‌شود. این ترکیب ماهیتی چربی‌دوست دارد و مانند سایر فلاونوئیدها، از طریق انتشار غیرفعال، انتشار تسهیل شده و با انتقال فعال توسط روده کوچک جذب می‌شود (Modarresi *et al*., 2020). طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، استفاده از متیل‌جاسمونات یا سالیسیلیک اسید در غلظت‌ها و مدت زمان‌های بالاتر در مقایسه با تیمار شاهد و محیط کشت‌های دارای فنیل‌آلانین به‌طور معنی‌داری میزان تولید روتین در نمونه بافت کالوس را افزایش داد (شکل ۳-A). استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت و استفاده از سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت میزان تولید روتین را در نمونه کالوس‌های منتخب به‌طور معنی‌داری افزایش داد. بااین‌حال، میزان تولید روتین در مورد استفاده از متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید یک پاسخ وابسته به غلظت بود. هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Ishikawa و همکاران (۲۰۰۷)، بیان کردند که افزودن متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر به محیط کشت موجب افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه ازجمله روتین در بافت کالوس گیاه *Glehnia littoralis*می‌شود. در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی *Papaver bracteatum* نیز از نظر میزان متابولیت تبائین یک پاسخ وابسته به دز به اسید آمینه ال-تیروزین گزارش شده است. به‌طوری‌که بیشترین میزان تبائین (۴۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) در غلظت یک میلی‌مولار ال-تیروزین بدست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از مقدار آن در تیمار دو میلی‌مولار ال-تیروزین بود (Farjaminejad *et al*., 2015). طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، افزودن متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک اسید (در غلظت بالا و مدت زمان بیشتر) به محیط کشت موجب افزایش تولید میزان کوئرستین در نمونه بافت‌های کالوس گیاه رازیانه نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۳-B). Zare و همکاران (۲۰۲۱)، با بررسی تأثیر فنیل‌آلانین، مخمر و سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.) محیط کشت بیان کردند که افزایش در غلظت سالیسیلیک اسید و فنیل‌آلانین امکان تولید روتین را در اندام برگ‌های حاصل افزایش می‌دهد اما تأثیری بر میزان کوئرستین و کمپفرول ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی امکان احیای روش‌های نوین کشت بافت گیاهی و تولید ترکیبات با ارزش در سطح تجاری را فراهم کرده است. استفاده از روش‌های زیست فناوری گیاهی و به‌ویژه تولید ترکیبات گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای امکان تولید محصولات با ارزش دارویی مستقل از شرایط فصلی و آب و هوایی را در کل طول سال فراهم می‌نماید. امروزه پژوهش‌های فراوانی در مورد ارزش دارویی و غذایی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) انجام شده و در حال انجام است. به

دلیل ارزش بالای این گیاه از نظر دارویی و درمان بیماری-هایی مانند سرطان در طب سنتی ملل مختلف روش‌های مناسب و جایگزین برای تولید ترکیبات مؤثره آن بسیار اهمیت دارد. استفاده از کشت بافت گیاهی و عوامل محرک روش مؤثری در جهت تولید ترکیبات با ارزش این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای محسوب می‌شود. از نظر تجمع پرولین، میزان فلاونوئید و آنتوسیانین کل نیز استفاده از غلظت‌های بالاتر در کنار مدت زمان‌های بیشتر متیل-جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک اسید موجب افزایش معنی‌دار تجمع اسیدآمینه پرولین فلاونوئید و آنتوسیانین کل در بافت کالوس مورینگا می‌شود. همچنین طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش تیمار کالوس با غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک و فنیل‌آلانین، امکان افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی (روتین، کوئرستین و کمپفرول) را در این گیاه فراهم می‌نماید.

References

– Abdulhafiz, F., 2022. Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. Arabian Journal of Chemistry, 104161. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104161

– Afify, A.E.M., El-Beltagi, H.S., Hammama, A.A.E.A., Sidky, M.M. and Mostafa, O.F.A. 2011. Distribution of transanethole and estragole in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) of callus induced from different seedling parts and fruits. Notulae Scientia Biologicae, 3(1): 79-86.

– Ahmed, A.F., Shi, M., Liu, C., and Kang, W., 2019. Comparative analysis of antioxidant activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Egypt and China. Food Science and Human Wellness, 8(1): 67-72.

– Alexiou, A., Höfer, V., Dölle-Bierke, S., Grünhagen, J., Zuberbier, T., and Worm, M., 2022. Elicitors and phenotypes of adult patients with proven IgE-mediated food allergy and non-immune-mediated food hypersensitivity to food additives. Clinical & Experimental Allergy, 52(11): 1302-1310.

– Alvarez, M.E., Savouré, A. and Szabados, L., 2022. Proline metabolism as regulatory hub. Trends in Plant Science, 27(1): 39-55.

– Asgari-Targhi, G., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O. and Tooski, A.H., 2021. Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) Nano-composite and its biological assessment in pepper (*Capsicum annuum*) as an elicitor for *in vitro* tissue culture applications. International Journal of Biological Macromolecules, 189: 170-182.

– Bates, L.S., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

– Belabdelli, F., Piras, A., Bekhti, N., Falconieri, D., Belmokhtar, Z. and Merad, Y., 2020. Chemical composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. Chemistry Africa, 3: 323-328.

– Bhaskar, R., Xavier, L.S.E., Udayakumaran, G., Kumar, D.S., Venkatesh, R., and Nagella, P., 2022. Biotic elicitors: A boon for the *in-vitro* production of plant secondary metabolites. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 149(1-2): 7-24.

– Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.

– Burdziej, A., Bellée, A., Bodin, E., Valls Fonayet, J., Magnin, N., Szakiel, A. and Corio-Costet, M.F., 2021. Three types of elicitors induce grapevine resistance against downy mildew via common and specific immune responses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(6):1781-1795.

– Cayetano-Salazar, L., Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M.D., Weinstein-Oppenheimer, C., Fernández-Tilapa, G., Mendoza-Catalán, M.A., and Navarro-Tito, N., 2021. Natural isoflavonoids in invasive cancer therapy: From bench to bedside. Phytotherapy Research 35(8): 4092-4110.

– Chanes, B. and Mahely, A.C., 1996. Assay of catalase and peroxidase. In: Methods in enzymology (Eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N. D.) 2:764-791. Academic Press, New York.

– Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis, 10: 178-182.

– Di Napoli, M., Castagliuolo, G., Badalamenti, N., Maresca, V., Basile, A., Bruno, M. and Zanfardino, A., 2022. Antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant properties of essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. leaves. Plants, 11(24): 35-73.

– Dias, M.C., Pinto, D.C., and Silva, A.M., 2021. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. Molecules 26(17): 5377.

in animal husbandry. Arabian Journal of Chemistry, 21(3): 123-136.
– Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M. and Yu, D.J., 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expressionof *PMT* and *H_6H* in adventitious root cultures of Scopolia parviflora. Plant Science, 166: 745-751.
– Kurtulbaş, E., Albarri, R., Torun, M., and Şahin, S., 2022. Encapsulation of *Moringa oleifera* leaf extract in chitosan-coated alginate microbeads produced by ionic gelation. Food Bioscience 50: 102-128.
– Ku-Vera, J.C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Montoya-Flores, M.D., Molina-Botero, I.C., Arango, J., and Solorio-Sánchez, F.J., 2020. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. Frontiers in Veterinary Science, 7: 584.
– Laoué, J., Fernandez, C., and Ormeño, E., 2022. Plant flavonoids in mediterranean species: A focus on flavonols as protective metabolites under climate stress. Plants, 11(2): 172.
– Lebaschy, M.H., Sharifi Ashoorabadi, E. and Bakhtiary, M. 2010. The effects of plant densities on yields of Foeniculum vulgare Mill. under dry farming. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 26(1):121-132.
– Lefevere, H., Bauters, L. and Gheysen, G., 2020. Salicylic acid biosynthesis in plants. Frontiers in Plant Science, 11: 338- 347.
– Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R. and Wu, H., 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry, 148: 80-89.
– Liu, D., Mu, Q., Li, X., Xu, S., Li, Y. and Gu, T., 2022. The callus formation capacity of strawberry leaf explants is modulated by DNA methylation. Horticulture Research, 9: 23-51
– Mac-Adam, J.W., Nelson, C.J. and Sharp, R.E., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tallfescue. Plant Physiology, 99: 872-878.
– Marchi, D., Lanati, D., Mazza, G. and Cascio, P., 2019. Composizione in antociani e flavonoli di vini prodotti nel territorio svizzero. In BIO Web of Conferences (15): 15-24.
– Mehra, N., Tamta, G. and Nand, V., 2021. A review on nutritional value, phytochemical and pharmacological attributes of *Foeniculum vulgare* Mill. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 10(2): 1255-1263.
– Di-Meo, S. and Venditti, P., 2020. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Pp:1-32.
– Farjaminejad, R., Zare, N., Asghari Zakaria, R and Farjaminejad, M., 2016.The effect of l-tyrosine on thebain production in cell suspension culture (*Papaver bracteatum*). Journal of Medicinal Plants, 2(58): 110-119 (In Persian).
– Galasso, M., Gambino, S., Romanelli, M.G., Donadelli, M., and Scupoli, M.T., 2021. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. Free Radical Biology and Medicine 172: 264-272.
– Gorlenko, C.L., Kiselev, H.Y., Budanova, E.V., Zamyatnin, A.A. and Ikryannikova, L.N., 2020. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics. Antibiotics, 9(4): 154-170.
– Ho, T.T., Murthy, H.N. and Park, S.Y., 2020. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. International Journal of Molecular Sciences, 21(3): 698-716.
– Hosseini, A., Razavi, B. M., Banach, M., and Hosseinzadeh, H., 2021. Quercetin and metabolic syndrome: A review. Phytotherapy Research, 35(10), 5352-5364.
– Huang, D., Luo, H., Zhang, C., Zeng, G., Lai, C., Cheng, M. and Li, T., 2019. Nonnegligible role of biomass types and its compositions on the formation of persistent free radicals in biochar: Insight into the influences on Fenton-like process. Chemical Engineering Journal, 361: 353-363.
– Hurst, W.J., Maryin, R.A. and Zoumas, B.L., 1983. Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods. Journal of Food Science, 44:892-904.
– Isah, T., 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological research 52. http://dx.doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3
– Ishikawa, A., Kitamura, Y., Ozeki, Y. and Watanabe, M., 2007. Different responses of shoot and root cultures of *Glehnia littoralis* to yeast extract. Journal of Natural Medicines, 61: 30-37.
– Jadid, N., Widodo, A. F., Ermavitalini, D., Sa'adah, N.N., Gunawan, S. and Nisa, C., 2023. The medicinal Umbelliferae plant Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): cultivation, traditional uses, phytopharmacological properties, and application

– Modarresi, M., Chahardoli, A., Karimi, N. and Chahardoli, S., 2020. Variations of glaucine, quercetin and kaempferol contents in *Nigella arvensis* against Al2O3, NiO, and TiO2 nanoparticles. Heliyon, 6(6): 121-134.

– Nafie, E., Hathout, T., Mokadem, A. and Shyma, A. 2011. Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. Brazilian Journal of Plant Physiology, 23: 161-174.

– Sabzi-Nojadeh, M., Aharizad, S., Mohammadi, S. A. and Amani, M. 2023. Screening of several important compounds production in fennel (Foeniculum vulgare Mill.) populations. *Journal of Medicinal Plants*, *22*(85), 98-112. (In Persian)

– Noruzpour, M., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Sheikhzade-Mosadegh, P., 2019. Effect of culture media and plant growth regulators on *in vitro* growth and production of secondary metabolites in *Vaccinium arctostaphylos* L. Iranian Journal of Horticultural Science, 50(2): 451-464. (In Persian)

– Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H. and Wang, H., 2019. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. Frontiers in Microbiology, 10: 294-312.

– Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L. and Cheng, Y., 2021. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. Frontiers in Plant Science 12: 62-78.

– Patel, Z.M., Mahapatra, R. and Jampala, S.S.M., 2020. Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture. 143-158.

– Rodrigues, C., Pinto, A., Faria, A., Teixeira, D., van Wegberg, A. M., Ahring, K. and Rocha, J.C., 2021. Is the phenylalanine-restricted diet a risk factor for overweight or obesity in patients with phenylketonuria (PKU). A systematic review and meta-analysis. Nutrients, 13(10): 34-43.

– Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W. and Zhang, K., 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. International Journal of Molecular Sciences, 20(10): 24-79.

– Saleem, M., Fariduddin, Q. and Castroverde, C.D.M., 2021. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. Plant Physiology and Biochemistry, 168: 381-397.

– Shabani, L., Ehsanpour, A.A., Asgari, G. and Emami, J. 2009. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology, 56: 621 -626.

– Shafighi, S., Moieni, A. and Monfared, S.R., 2022. Effects of methyl jasmonate, salicylic acid and phenylalanine on aloe emodin and aloin in diploid and tetraploid *Aloe barbadensis*. International Journal of Horticultural Science 28. https://doi.org/10.31421/ijhs/28/2022/9304

– Tang, S.M., Deng, X.T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X.X. and Miao, L., 2020. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. Biomedicine & Pharmacotherapy, 121:109604.

– Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C. and Bezirtzoglou, E., 2021. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. Microorganisms, 9(10): 2041.

– Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutralsugars, free amino acids and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.

– Wan, Q., Zhang, R., Zhuang, Z., Li, Y., Huang, Y., Wang, Z. and Tang, B. Z., 2020. Molecular engineering to boost AIE-active free radical photogenerators and enable high-performance photodynamic therapy under hypoxia. Advanced Functional Materials, 30(39): 200-205.

– Yang, I. J., Lee, D.U., and Shin, H.M., 2015. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 37(3): 308-317.

– Zare, N., Noruzpour, M. and Sheikhzadeh, P., 2021. Effects of yeast extract on growth, biochemical properties and production of secondary metabolites in in vitro cultures of *Vaccinium arctostaphylos* L. Iranian Journal of Plant Biology, 13(1): 37-54. (In Persian)

– Zare-Hassani, E., Motafakkerazad, R., Razeghi, J. and Kosari-Nasab, M., 2019. The effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of secondary metabolites in organ culture of *Ziziphora persica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 138: 437-444.

– Zhang, L. and Xing, D. 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. Plant Cell Physiology, 49(7): 1092 -1111.

– Zhang, Y. and Li, X. 2019. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant

immunity. Current opinion in plant biology, 50: 29-36.
– Zou, Q., Wang, N., Gao, Z., Xu, H., Yang, G., Zhang, T. and Chen, X. 2020. Antioxidant and hepatoprotective effects against acute CCl4-induced liver damage in mice from red-fleshed apple flesh flavonoid extract. Journal of Food Science, 85(10): 3618-3627.