https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 14, Issue, No. 3, Autumn 2022
Document Type: Research Paper
Received: 05/07/2023 Accepted: 03/09/2023

The Effect of the Type and Concentration of Some Elicitors on the Biochemical Characteristics and Production of the Secondary Metabolites in the Callus Culture of *Moringa oleifera* L.

Mehran Noruzpuor[1*], Rasool Asghari Zakaria[1], Nasser Zare[1], Hossein Ali Ebrahimi[2], Hamed Parsa[3], Shima Bourang[1]

[1.] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2.] Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[3.] Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

Abstract

The Moringa (*Moringa oleifera* L.) is a medicinal plant with medicinal properties and many valuable metabolites including flavonoids. Due to the medicinal and therapeutic importance of this plant, this research was conducted with the aim of studying the effect of elicitors such as methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine on biochemical properties and the production of valuable secondary metabolites from its callus tissue *in vitro*. According to the results obtained, it was found that higher concentrations of salicylic acid and methyl jasmonate led to a significant increase in peroxidase enzyme activity in the treated calluses. The callus samples treated with methyl jasmonate and phenylalanine showed significantly higher catalase enzyme activity compared to the control treatment at most concentrations and treatment durations. The highest level of flavonoids (0.628 mg g^{-1}) was related to the culture medium containing 200 mg L^{-1} methyl jasmonate for 96 h. Regarding the duration of treatment with plant growth stimulants, for most treatments, the amount of anthocyanin production increased with the growing duration of elicitors treatment. Based on the results, increasing the salicylic acid concentration from 50 to 100 and 200 mg L^{-1}, particularly over a 48-h period, resulted in a rise in rutin production in the Moringa callus. On the other hand, the highest amount of quercetin (5.38 mg g^{-1}) in the culture medium with 200 mg L^{-1} methyl jasmonate for 96 hours and the highest amount of kaempferol (3.45 mg g^{-1}) in the culture medium containing 100 mg L^{-1} salicylic acid was observed for 96 h.

* Corresponding Author: m.noruzpuor@gmail.com

2322- 2204/ © University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2023.138311.1325

Introduction

Moringa, *Moringa oleifera* L, is a member of the Moringaceae family (Mashamaite et al., 2022). Due to the high medicinal and food value of this plant, it is known as the tree of the century. All constituent parts of *Moringa*, encompassing its roots, stems, leaves, and seeds, bear both medicinal and dietary utility, serving as a pivotal reservoir of vitamins and minerals (Mohlala et al., 2023). The leaves, in particular, exhibit pivotal medicinal attributes, owing to the presence of notable bioactive compounds such as saponins, tannins, steroids, flavonoids, coumarins, quinones, phenolic compounds, and alkaloids, which are proficiently employed in cancer prevention and treatment endeavors (Kurtulbaş et al., 2022). Prominently, a comprehensive range of quercetins, rutin, kaempferol, gallic acid, moringin, and the extensive Niazimicin assemblage represents the principal assortment of compounds derived from the diverse organs of this botanical specimen (Syeda & Riazunnisa, 2020). By virtue of its potent antioxidant property, quercetin, abundantly discovered within the leaf and seed samples of *M. oleifera*, orchestrates metal chelation and free radical inhibition (Bhaskar et al., 2022). There are various methods to increase the production of secondary metabolites as valuable compounds in medicinal plants, which include the use of agents in cell and plant tissue culture *in vitro*. The induction of callus cells in *M. oleifera* plant is largely influenced by temperature, nutrients, pH, and the addition of ascorbic acid and plant growth regulators in the culture medium. Stress induction increases the production of plant secondary metabolites. Stimulants are divided into biological and non-biological categories (Arya et al., 2021). Among the widely used stimulating factors used in most tissue culture programs are fungal carbohydrates, yeast extract, methyl jasmonate, salicylic acid, and amino acids such as phenylalanine and Polyamines such as chitosan (Raj & Saudagar, 2019). Common plant hormones such as salicylic acid and jasmonic acid are key markers for the expression of genes involved in plant defense systems (Patel et al., 2020; Shafighi et al., 2022). Considering the unique properties of the *M. oleifera* plant and its importance in the pharmaceutical and food industries, as well as the importance of new methods of plant tissue culture to produce and increase the amount of plant secondary metabolites, the present research aimed at increasing the production of biochemical compounds and valuable secondary metabolites such as rutin, quercetin and kaempferol from the callus tissue obtained from the leaf explants of this plant, using methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine as stimulating agents in different concentrations and time durations.

Materials and Methods

Callus tissue samples of *M. oleifera* plant were obtained from leaf explants grown in an MS base medium containing 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP (Riyathong et al., 2010). Plant growth stimulants (methyl-jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine) in concentrations of zero (control), 50, 100, and 200 mg/l during time periods in an MS base culture medium containing 2 ml 2,4-D and 0.5 mg/liter of BAP were utilized. Biochemical compounds such as peroxidase (MacAdam et al., 1992), catalase (Chanes & Mahely, 1996), proline (Bates, 1973), flavonoid (Chang et al., 2002) and anthocyanin (Wagner, 1979) along with metabolites secondary substances such as rutin, quercetin, and kaempferol (Hurst et al., 1983) were measured in callus tissue samples collected after 24, 48, and 96 hours after applying the stimuli. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Data variance analysis and average data comparison using SPSS ver. 26 were done.

Results and Discussion

The results of variance analysis of the data demonstrated that the activity level of peroxidase and catalase enzymes, the amount of amino acid accumulation of proline, total flavonoid, anthocyanin, the amount of rutin, quercetin, and kaempferol in the callus samples of *M. oleifera* plant *in vitro* was significantly ($p < 0.01$) affected by the type of stimulus used, the duration of use, and the interaction between the type of stimulus and the duration of its use. The highest amount of peroxidase enzyme activity was related to the culture medium containing 100 or 200 mg/l of methyl jasmonate and 200 mg/l of phenylalanine for a period of 96 hours. According to the obtained results, by raising the concentration of plant growth stimulants (methyl jasmonate and salicylic acid) from 50 to 100 and 200 mg/liter in different periods of time, the peroxidase enzyme activity did not change significantly. On the other hand, the highest amount of peroxidase enzyme activity (455.886 protein-µmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}) was related to the culture medium containing 200 mg/liter of phenylalanine for a period of 96 hours. The obtained results are consistent with the results reported by Shabani et al., (2009). The highest amount of proline amino acid accumulation (2.19 µg/mg) was observed in the treatment of callus samples with 200 mg/L of methyl-jasmonate for a period of 96 hours. In regards to the temporal extent of utilizing stimulants in any and all culture mediums that encompass methyl jasmonate, phenylalanine, or salicylic acid, the quantity of proline accumulation detected in callus obtained subsequent to a treatment period of 96 hours is notably greater. This phenomenon becomes apparent within the time frames of 24 and 48 hours. The highest amount of flavonoid (0.628 mg/g of callus) was observed in the treatment of 200 mg/l of methyl jasmonate for 96 hours. Zhang et al. (2009) stated that the flavonoid content of blackberry callus tissue increases remarkably in the treatment with methyl jasmonate and salicylic acid, which is consistent with the results obtained in this study. Also, the highest amount of anthocyanin (12.42 µmol/g of callus weight) was related to the treatment of 200 mg/l phenylalanine for 96 hours. According to the results obtained in this research, utilizing methyl jasmonate, phenylalanine, and salicylic acid as stimulants (especially in higher concentrations and time durations) significantly increased the amount of rutin production in callus tissue samples, which is consistent with the results obtained by Ishikawa et al. (2007). The highest amounts of rutin, quercetin, and kaempferol were respectively (12.86, 5.38 and 3.45 mg per gram of callus fresh weight) related to the culture medium containing 50 mg/liter salicylic acid for 48 hours, the culture medium containing 200 mg/liter methyl-jasmonate for 96 hours, and the culture medium containing 100 mg/liter salicylic acid for 96 hours.

Conclusion

Recent advances in various fields of biotechnology have made it possible to revive new methods of plant tissue culture and produce valuable compounds at a commercial level. The employment of plant biotechnological techniques, particularly the generation of plant compounds in a controlled environment, presents the potential to manufacture items possessing therapeutic properties, irrespective of the variability in climate and seasons, thereby ensuring year-round availability. Today, many studies have been conducted and are being conducted on the medicinal and nutritional value of the *Moringa* plant (*M. oleifera*). Due to the high value of this plant in terms of medicine and treatment of diseases such as cancer in the traditional medicine of different nations, suitable and alternative methods for producing its effective compounds are very

important. The use of plant tissue culture and esters is an effective method to produce valuable compounds of this plant *in vitro*. According to the results obtained in this study, treating callus with higher concentrations (100 and 200 mg/L) of methyl jasmonate, salicylic acid, and phenylalanine increases the possibility of increasing the production of plant secondary metabolites (rutin, quercetin, and kaempferol) in this plant.

Keywords: Salicylic Acid, Phenylalanine, *In Vitro* Culture, Methyl Jasmonate, *Moringa oleifera*

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال چهاردهم، شمارهٔ پنجاه و سوم، پاییز ۱۴۰۱، صفحهٔ ۱۱۲-۹۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲
مقاله پژوهشی

تأثیر نوع و غلظت عوامل محرک بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و تولید متابولیت‌های ثانویهٔ بافت کالوس گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.)

مهران نوروزپور*[۱]، رسول اصغری‌زکریا[۱]، ناصر زارع[۱]، حسینعلی ابراهیمی[۲]، حامد پارسا[۳]، شیما بورنگ[۱]
[۱] گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲] گروه فارماسیوتیکس و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[۳] گروه فارماکوگنوزی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.)، گیاهی دارویی است که بسیاری از ترکیبات دارویی و متابولیت‌های ارزشمند ازجمله فلاونوئیدها را دارد. باتوجه‌به اهمیت دارویی و درمانی این گیاه، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر محرک‌هایی مانند متیل جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و تولید متابولیت‌های ثانویهٔ بافت کالوس آن در شرایط درون‌شیشه انجام شد. نتایج نشان دادند غلظت‌های بیشتر سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات سبب افزایش معنادار میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس‌های تیمارشده می‌شود؛ همچنین کالوس‌های تیمارشده با متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین در بیشتر غلظت‌ها و مدت زمان‌ها در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنادار فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری نشان دادند. بیشترین مقدار فلاونوئید (۰/۶۲۸ میلی‌گرم‌برگرم وزن کالوس) به محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات برای زمان ۹۶ ساعت تعلق داشت. از نظر مدت زمان تیمار، در بیشتر تیمارها میزان تولید آنتوسیانین با افزایش مدت زمان استفاده از محرک‌ها افزایش یافت. بر اساس نتایج، افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر به‌ویژه برای مدت زمان ۴۸ ساعت سبب افزایش میزان تولید روتین در کالوس‌های گیاه مورینگا شد. بیشترین میزان کوئرستین (۵/۳۸ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر کالوس) در محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات به‌مدت ۹۶ ساعت و بیشترین میزان کمپفرول (۳/۴۵ میلی‌گرم‌درگرم وزن تر کالوس) در محیط‌کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید به‌مدت ۹۶ ساعت مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک‌اسید، فنیل‌آلانین، کشت درون‌شیشه، متیل‌جاسمونات، مورینگا

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: m.noruzpuor@gmail.com

2322- 2204/ © University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2023.138311.1325

مقدمه

گیاه مورینگا با نام علمی *Moringa oleifera* L. عضوی از خانوادهٔ Moringaceae است که خاستگاه اصلی آن جنوب تبت و شمال هندوستان است (Mashamaite et al., 2022). ارزش دارویی و غذایی زیاد گیاه مورینگا سبب شده است از آن با عنوان درخت قرن یاد شود. تمام اندام‌های این درخت ازجمله ریشه، ساقه، برگ و دانهٔ آن مصرف دارویی و غذایی دارند (Mohlala et al., 2023). در بسیاری از کشورهای اروپایی، آسیایی و آفریقایی، برگ‌های این گیاه به‌عنوان چاشنی غذا یا دم‌نوش و پودر ساقه و ریشهٔ آن به‌عنوان چاشنی استفاده می‌شود (Al-Ghanayem et al., 2022). این گیاه منبع مهمی از ویتامین‌ها و مواد معدنی است و برگ‌ها و غلاف‌های جوان آن حاوی مقادیر درخور توجهی از مواد معدنی و ویتامین‌ها مانند ویتامین‌های A، B و C هستند. برگ‌های این گیاه، ویتامین A بیشتر از هویج، کلسیم بیشتر از شیر، آهن بیشتر از اسفناج، ویتامین C بیشتر از پرتقال و پتاسیم بیشتر از موز دارند و کیفیت پروتئین آن بیشتر از شیر و تخم‌مرغ است (Ramzan et al., 2022)؛ همچنین برگ‌های این گیاه ترکیبات دارویی مهمی ازجمله ساپونین‌ها، تانن‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنلی و آلکالوئیدها را دارند که برای پیشگیری و درمان سرطان استفاده می‌شوند و فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی دارند (Kurtulbaş et al., 2022). انواع کوئرستین‌ها، روتین، کامپفرول، گالیک‌اسید، مورینگین و خانوادهٔ بزرگ نیازیمیسین (Niazimicin) از مهم‌ترین ترکیبات استخراج‌شده از اندام‌های مختلف این گیاه به شمار می‌آیند (Syeda & Riazunnisa, 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 *M. oleifera* به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی سبب کلاته‌شدن فلزات و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. آثار متعدد کوئرستین بر عملکرد سلول‌های سرطانی پستان ازجمله القای پروتئین p21 (مهارکنندهٔ CDK) و توقف چرخهٔ سلولی در مراحل G_1 یا G_2/M گزارش شده است (Tang et al., 2020).

روش‌های مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان ترکیبات باارزش در گیاهان دارویی وجود دارند که ازجملهٔ آنها می‌توان به کاربرد عوامل در کشت سلول و بافت گیاهی در شرایط درون‌شیشه اشاره کرد (Bhaskar et al., 2022). عوامل محرک به دو دستهٔ زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند (Arya et al., 2021) و با تأثیر بر ترکیبات و همچنین دیوارهٔ سلولی سبب فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه می‌شوند که درنتیجه، تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد (Lertphadungkit et al., 2020)؛ کربوهیدرات‌های قارچی، عصارهٔ مخمر، متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید، آمینواسیدهایی مانند فنیل‌آلانین و پلی‌آمین‌هایی مانند کیتوزان ازجمله عوامل محرک پرکاربردی هستند که در بیشتر برنامه‌های کشت بافت استفاده می‌شوند (Raj & Saudagar, 2019). جاسمونیک‌اسید (JA) و مشتقات آن مانند متیل‌جاسمونات تنظیم‌کننده‌های

رشد گیاهی هستند که در پاسخ‌های دفاعی گیاه ازجمله تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دخالت دارند (Ho et al., 2020). سالیسیلیک‌اسید (SA) نوعی اسید فنولی و یکی از هورمون‌های رشد گیاهی است که نقش بسیار مهمی در بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول‌های گیاهی ازجمله رشدونمو، فتوسنتز و تنظیم و فعال‌سازی پاسخ سلول در برابر عوامل زیستی و غیرزیستی دارد (Ali, 2021). هورمون‌های متداول گیاهی مانند سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید علامت‌رسان‌های کلیدی برای بیان ژن‌های درگیر در سیستم‌های دفاعی گیاهان به شمار می‌روند. عوامل محرک با تأثیر بر تنظیم بیان ژن و فرایند پیام‌رسانی ثانویه درسلول‌های گیاهی سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول و بافت گیاهی می‌شوند (Patel et al., 2020; Shafighi et al., 2022).

گیاه *M. oleifera* پراکنش بسیار محدودی در ایران و بیشتر در استان‌های جنوبی کشور دارد؛ ازاین‌رو، مطالعه‌های انجام‌شده در زمینهٔ این گیاه به‌ویژه بررسی‌های به‌نژادی، ویژگی‌های درمانی، تنوع ژنتیکی و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن در ایران بسیار اندک است و بیشتر گزارش‌هایی در زمینهٔ گیاه‌شناسی آن وجود دارد. استفاده از روش کشت بافت گیاهی و استفاده از عوامل محرک در این گونهٔ گیاهی بسیار کم بوده و هیچ‌گونه گزارشی از کاربرد این روش‌ها در ایران ارائه نشده است. القای سلول‌های کالوس در گیاه *M. oleifera* تا حد زیادی تحت‌تأثیر دما، مواد مغذی، اسیدیته و افزودن آسکوربیک‌اسید و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط‌کشت قرار دارد (Bennet et al., 2003). محیط‌کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D سبب تولید ۱۰۰ درصدی کالوس از ریزنمونه‌های برگی *M. oleifera* می‌شود (Riyathong et al., 2010).

باتوجه‌به ویژگی‌های منحصربه‌فرد گیاه *M. oleifera* و اهمیت آن در صنایع دارویی و غذایی و اهمیت روش‌های نوین کشت بافت گیاهی برای تولید و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی، پژوهش حاضر در راستای افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویهٔ باارزش همانند روتین، کوئرستین و کمپفرول از بافت کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ این گیاه با استفاده از متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین به‌عنوان عوامل محرک در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها

تولید بافت کالوس

نمونه‌های بافت کالوس گیاه *M. oleifera* از ریزنمونه‌های برگ کشت‌شده در محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP به دست آمدند (Riyathong et al., 2010). به‌منظور بررسی تأثیر انواع عوامل محرک بر تولید و افزایش ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی از ترکیب محیط‌کشت یادشده استفاده شد؛ همچنین برای دستیابی به یکنواختی بیشتر در نمونه‌های کالوس، بافت‌های کالوس حاصل سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ روز در محیط‌کشت یادشده واکشت شدند.

آماده‌سازی عوامل محرک

در پژوهش حاضر از محرک‌های رشد گیاهی مانند متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین استفاده شد. به‌منظور تهیهٔ محلول متیل‌جاسمونات از N- هگزان به‌طور حجمی-حجمی استفاده شد. به‌منظور تهیهٔ محلول سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین به‌طور جرمی-حجمی (به دلیل حلالیت زیاد این دو ترکیب در آب)، مقدار معینی از این ترکیبات (۱ گرم) در آب (۵۰ میلی‌لیتر) حل شد. باتوجه‌به حساسیت زیاد هر سه ترکیب یادشده به دمای زیاد اتوکلاو، محلول‌های یادشده با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون ضدعفونی و زیر هود لامینار به محیط‌کشت استریل با دمای ۳۵ تا ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد افزوده شدند.

اعمال محرک‌ها

محرک‌های رشد گیاهی (متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین) در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت درون محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP استفاده و سپس تمام کشت‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه‌های کالوس مدنظر برای ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی و تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در مدت زمان‌های یادشده جمع‌آوری و پس از انجماد در ازت مایع، در دمای منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی

ابتدا ۰/۱ گرم از هر نمونه کالوس درون هاون چینی حاوی ازت مایع ساییده و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم (pH=۷) حاوی ۱ درصد پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) و ۱ میلی‌مولار EDTA به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند؛ سپس فاز رویی به‌عنوان عصارهٔ پروتئینی برای اندازه‌گیری میزان پروتئین و فعالیت‌های آنزیمی جمع‌آوری شد. روش Bradford (1976) برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل نمونه‌ها استفاده شد؛ به این منظور، ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ پروتئینی، ۵۰ میکرولیتر معرف برادفورد و ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات به‌عنوان محلول واکنش استفاده شد. میزان جذب نوری عصارهٔ پروتئینی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec^{TM} plus، آمریکا) تعیین شد. کمی‌سازی غلظت پروتئین با آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های مختلف انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Mac-Adam et al. (1992) با کمی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰ میکرولیتر عصارهٔ پروتئینی، ۹۰ میکرولیتر گلایکول (۱۰ میلی‌مولار)، ۹۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه (۵ میلی‌مولار) بود. تغییرات جذب مخلوط واکنش به‌مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۴۲۵ نانومتر و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز برحسب تغییرات جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد و میزان فعالیت آن از رابطهٔ $(\Delta A_{425}\times(V/Vt)/(0.1\times T)/Cp)$ محاسبه شد. در این رابطه، ΔA_{425}: تغییرات جذب نوری، V: حجم

کل، Vt: حجم عصارهٔ استفاده‌شده در واکنش، T: زمان واکنش (دقیقه) و Cp: غلظت پروتئین است.

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Chanes & Mahely (1996) با کمی تغییر استفاده شد. بافر فسفات‌سدیم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۲۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) ۵ میلی‌مولار به‌عنوان پذیرندهٔ الکترون استفاده و سپس ۶۰ میکرولیتر عصارهٔ پروتئینی در حمام یخ به آن اضافه و تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. برای نمونهٔ بلانک از بافر فسفات (pH=۷/۰) به‌جای عصارهٔ پروتئینی استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین در دقیقه از فرمول ($\Delta A_{۲۴۰}\times(V/Vt)/(0.1\times T)/Cp)\times(V/Vt)/(0/1\times T)$) محاسبه شد. در این رابطه، $\Delta A_{۲۴۰}$: تغییرات جذب نوری، V: حجم کل، Vt: حجم عصارهٔ استفاده‌شده در واکنش، T: زمان واکنش (برحسب دقیقه) و Cp: غلظت پروتئین است.

اندازه‌گیری آمینواسید پرولین

پرولین آزاد نمونه‌های مدنظر طبق روش Bates (1973) اندازه‌گیری شد؛ به این منظور، ۰/۱ گرم نمونه کالوس به‌مدت ۳ دقیقه در سولفوسالیسیلیک‌اسید ۳/۳ درصد درون هاون چینی کوچک ساییده شد. همگنای حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی به میکروتیوب جداگانه منتقل شد؛ سپس ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید خالص به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به حمام آب با دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل و به مدت یک ساعت در شرایط یادشده نگهداری شد. پس‌از سردشدن نمونه، ۲ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و به‌مدت ۲ دقیقه هم زده شد. جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پرولین آزاد نمونه با استفاده از منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین شد.

استخراج متابولیت‌های ثانویه

به‌منظور استخراج متابولیت‌های ثانویهٔ نمونه‌های کالوس از روش Chang et al. (2002) استفاده شد؛ به این منظور، ابتدا ۰/۱ گرم نمونه کالوس تازه با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک‌اسید به نسبت حجمی ۹۹:۱) درون هاون چینی کاملاً ساییده شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شد؛ سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده شد.

به‌منظور اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش Chang et al. (2002) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد (جرمی-حجمی) و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات ۱ مولار به ۱ میلی‌لیتر عصارهٔ حاصل اضافه و مقادیر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۸ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متانول) تهیه و برای کمی‌سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها استفاده شد. مقدار فلاونوئید از رابطهٔ $T=(C\times V)/M$ برحسب میلی‌گرم‌درگرم بافت

کالوس محاسبه شد. در این رابطه، T: میزان فلاونوئید برحسب میلی‌گرم‌درگرم بافت کالوس، C: غلظت فلاونوئید برحسب میلی‌گرم کوئرستین در میلی‌لیتر، V: حجم نهایی عصاره و M: وزن نمونه (بافت کالوس برحسب گرم) است.

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نمونه‌های کالوس از روش Wagner (1979) استفاده شد؛ به این منظور، جذب نوری عصارهٔ حاصل در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان آنتوسیانین از رابطهٔ $A=\varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ محاسبه شد. در این رابطه، A: مقدار عدد جذبی، b:عرض کووت (Cuvette)، ε: ضریب خاموشی و c: غلظت آنتوسیانین است.

اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه به روش HPLC

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه (روتین، کوئرستین و کمپفرول) با دستگاه HPLC، از روش Hurst et al. (1983) استفاده شد؛ به این منظور، ابتدا ۱ گرم نمونه کالوس به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد درون هاون چینی کاملاً ساییده و به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه ورتکس شد؛ سپس دو بار و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Bandelin electronic®, Germany) و دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۳ ساعت، دوباره تیمار ورتکس و اولتراسوند تکرار شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند. عصارهٔ رویی به‌دست‌آمده برای اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی یادشده با استفاده از دستگاه HPLC (Germany AZURA, KENUVER) ستون فاز معکوس C18 استفاده شد. فاز متحرک شامل متانول گرید HPLC و آب مقطر بود. تشخیص و کمی‌سازی مقدار روتین، کوئرستین و کمپفرول به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷، ۳۶۸ و ۳۶۸ نانومتر انجام شد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر نمونهٔ خالص روتین (NAWAH-HIKA2001-Egypt)، کوئرستین (Sigma-Aldrich) و کمپفرول (Sigma-Aldrich) استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیهٔ آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. نرمال‌بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ver. 26 انجام شد. نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

ترکیبات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، میزان تجمع آمینواسید پرولین، فلاونوئید کل و آنتوسیانین نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه به‌طور معناداری ($p<0.01$) تحت‌تأثیر نوع محرک استفاده‌شده، مدت زمان استفاده و اثر متقابل نوع محرک و مدت زمان استفاده از آن قرار می‌گیرد. مدت زمان استفاده از محرک تأثیر معناداری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت، اما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز مؤثر بود (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین مربعات تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های رشد گیاهی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویهٔ کالوس‌های *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه

Table 1- Mean squares of type, concentration and duration of plant growth stimulants effects on biochemical characteristics and secondary metabolites of *M. oleifera in vitro* calli.

Source of variation	df	MS				
		Peroxidase	Catalase	Proline	flavonoid	Anthocyanin
Elicitor (A)	9	424.22 **	2418.72 ns	1.27 **	0.09 **	43.76 **
Time (B)	2	813.05 **	51536.74 **	0.63 **	0.19 **	24.97 **
A× B	18	202.11 **	6633.65 **	0.11 **	0.01 **	5.54 **
Erorr	60	73.90	3028.31	0.01	0.005	0.55
CV (%)	-	9.51	22.00	14.08	22.11	15.94

ns and **: Non-significant and significant at 1% level of probability, respectively.

از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* تیمارشده با محرک‌های مختلف در مدت زمان‌های مختلف، بیشتر تیمارها نسبت به شاهد اختلاف معنادار نشان دادند (شکل ۱a). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به محیط‌کشت حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین برای مدت زمان ۹۶ ساعت تعلق داشت. با افزایش غلظت محرک‌های رشد گیاهی (متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید) از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر در مدت زمان‌های مختلف، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تغییر معناداری نشان نداد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بین نمونه کالوس‌های تیمارشده با فنیل‌آلانین ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر برای مدت زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت اختلاف معناداری نداشت، اما هر دو تیمار یادشده به‌طور معناداری فعالیت آنزیم پراکسیدازی بیشتری نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین در مدت زمان برابر (۲۴ یا ۹۶ ساعت) داشتند (شکل ۱a). در مدت زمان ۴۸ ساعت استفاده از محرک‌ها، بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معناداری مشاهده نشد، اما افزایش غلظت فنیل‌آلانین در محیط‌کشت به ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سبب افزایش معنادار میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه‌های کالوس تیمارشده شد. از نظر تأثیر مدت زمان استفاده از محرک‌ها بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار شاهد نیز بین نمونه‌های کالوس تیمارشده در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد. بر اساس نتایج، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* تیمارشده با ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات یا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین یا ۲۰۰ میلی‌گرم‌در لیتراسیدسالیسیلیک برای مدت زمان ۲۴ ساعت به‌طور معناداری بیشتر از مدت زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت با همان نوع و غلظت محرک‌ها بود.

از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، اختلاف معناداری بین بیشتر تیمارها و شاهد مشاهده نشد (شکل ۱b). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۴۵۵/۸۸۶ proteinμmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1}) به محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین برای مدت زمان ۹۶ ساعت تعلق داشت. طبق نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها (شکل ۱b)، اختلاف

معناداری از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز بین محیط‌کشت حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات یا ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید برای مدت زمان ۲۴ ساعت درون محیط‌کشت پایه و شاهد (۲۴ ساعت) مشاهده نشد؛ همچنین اختلاف معناداری از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز بین محیط‌کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات یا ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید برای مدت زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت درون محیط‌کشت پایه و شاهد (۴۸ و ۹۶ ساعت) مشاهده نشد. همان‌طور که در شکل ۱b مشاهده می‌شود، بین غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۲۴ ساعت اختلاف معناداری دیده نمی‌شود. از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز، غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) در تیمار محرک برای مدت زمان ۴۸ ساعت اختلاف معنادار نشان دادند؛ به‌طوری‌که در استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۴۸ ساعت، فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معناداری بیشتر از زمانی بود که از ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر استفاده شد. بر اساس نتایج، استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین برای مدت زمان ۹۶ ساعت در مقایسه با مدت زمان مشابه برای غلظت‌های ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را به طور معناداری افزایش می‌دهد (شکل ۱b)؛ علاوه‌براین، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس‌های تیمارشده با ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید در مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت نسبت به مدت زمان مشابه برای ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید به‌طور معناداری افزایش یافت.

بیشترین مقدار تجمع آمینواسید پرولین (۲/۱۹ میکروگرم‌درمیلی‌گرم) در تیمار نمونه کالوس‌ها با ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۹۶ ساعت مشاهده شد. از نظر مدت زمان استفاده از محرک‌ها در تمام محیط‌کشت‌های حاوی متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین یا سالیسیلیک‌اسید، میزان تجمع پرولین در کالوس‌های جمع‌آوری‌شده در تیمار زمانی ۹۶ ساعت به‌طور معناداری بیشتر از مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بود، ولی در بیشتر تیمارها اختلاف معناداری بین مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده نشد و تنها در محیط‌کشت‌های حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات یا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین، مدت زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با ۲۴ ساعت میزان تجمع آمینواسید پرولین را به‌طور معناداری افزایش داد (شکل ۱C).

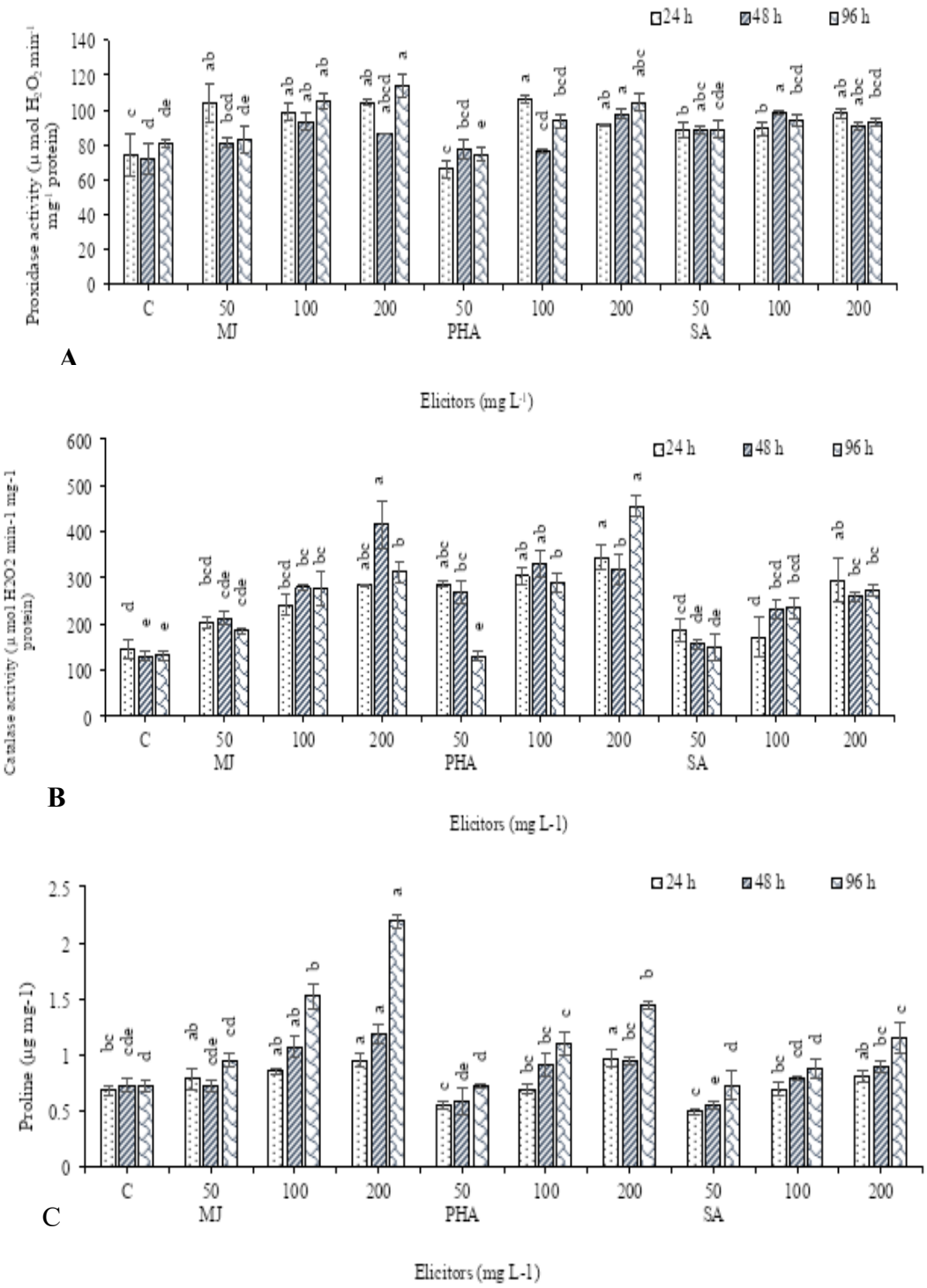
از نظر میزان فلاونوئید استخراج‌شده از بافت‌های کالوس، اختلاف معناداری ($p<۰/۰۱$) بین محیط‌کشت‌های حاوی محرک‌ها و شاهد مشاهده شد (شکل ۲a). بیشترین مقدار فلاونوئید (۰/۶۲۸ میلی‌گرم‌برگرم کالوس) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۹۶ ساعت مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند میزان فلاونوئید کل کالوس‌های تیمارشده با ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات تحت‌تأثیر مدت زمان‌های مختلف قرار نمی‌گیرد؛ به‌طوری‌که استفاده از ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات در

مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت تفاوت معناداری از نظر آماری ایجاد نکرد، ولی تیمار کالوس‌های مدنظر برای مدت زمان‌های مختلف با متیل‌جاسمونات در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر اختلاف معناداری را نشان داد؛ به‌طوری‌که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات برای مدت زمان ۴۸ ساعت، مقدار بیشتر و معناداری نسبت به مدت زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت داشت. در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات، تیمار کالوس‌ها برای مدت زمان ۹۶ ساعت به‌طور معناداری بیشتر از ۲۴ ساعت بود، اما اختلاف معناداری با تیمار زمانی ۴۸ ساعت نداشت. استفاده از ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین برای مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت سبب افزایش معنادار میزان تولید فلاونوئید کالوس‌های مدنظر شد، اما میزان فلاونوئید کالوس‌های تیمارشده برای مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت در غلظت‌های یادشده تفاوت معناداری نداشت. اختلاف معناداری بین مدت زمان‌های استفاده‌شده برای غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین مشاهده شد؛ به‌طوری‌که افزایش مدت زمان تیمار کالوس‌ها با ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین از ۲۴ به ۴۸ و ۹۶ ساعت سبب افزایش معنادار میزان فلاونوئید کل شد (شکل ۲b). میزان تولید فلاونوئید در محیط‌کشت حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید تحت‌تأثیر مدت زمان استفاده از آن قرار نگرفت.

اختلاف معناداری از نظر میزان تولید آنتوسیانین بین بیشتر تیمارها و شاهد مشاهده نشد (شکل ۲b). بیشترین مقدار آنتوسیانین (۱۲/۴۲ میکرومول‌برگرم وزن کالوس) به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین برای مدت زمان ۹۶ ساعت تعلق داشت. میزان تولید آنتوسیانین در بیشتر تیمارها با افزایش مدت زمان استفاده از محرک‌ها افزایش یافت؛ این تفاوت در تیمار شاهد، تیمار ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید معنادار نبود. بر اساس نتایج، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات در محیط‌کشت از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر در هریک از مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت، تأثیر معناداری بر میزان تولید آنتوسیانین کالوس‌های تیمارشده نداشت؛ باوجوداین، افزایش مدت زمان استفاده از ۲۴ به ۴۸ و ۹۶ ساعت سبب افزایش معنادار تولید آنتوسیانین در کالوس‌های تیمارشده شد. در تیمار فنیل‌آلانین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر و سالیسیلیک‌اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر، افزایش زمان تیمار سبب افزایش معنادار میزان تولید آنتوسیانین شد (شکل ۲b).

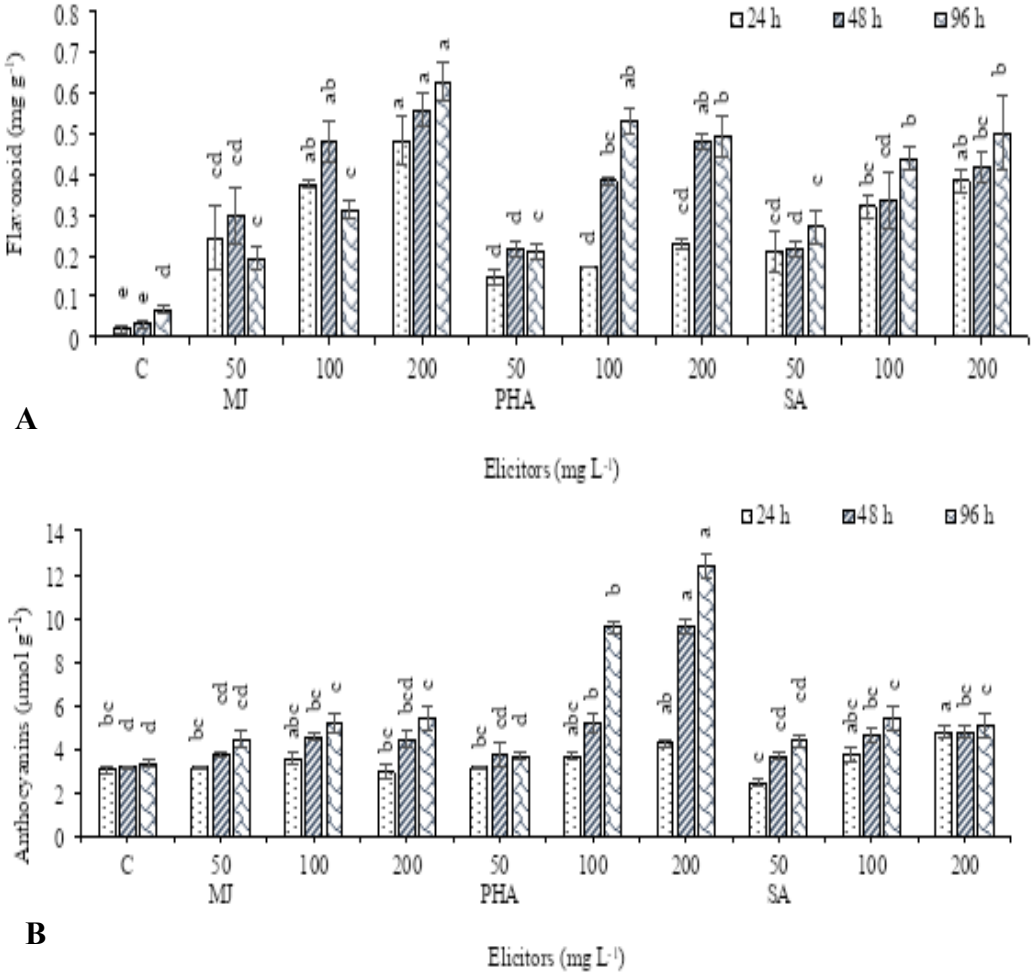
متابولیت‌های ثانویه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند میزان تولید روتین، کوئرستین و کمپفرول بافت کالوس گیاه *M. oleifera* به‌طور معنادار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر نوع محرک‌ها، مدت زمان استفاده از محرک‌ها و اثر متقابل آنها قرار می‌گیرد (جدول ۲).



شکل ۱- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های مختلف بر میزان A) پراکسیداز، B) کاتالاز و C) پرولین کالوس‌های گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه. C: شاهد، MJ: متیل‌جاسمونات، PHA: فنیل‌آلانین و SA: سالیسیلیک‌اسید. حروف متفاوت نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار (در سطح احتمال ۵ درصد) بین تیمارهای محرک در هریک از زمان‌های اعمال تیمار است.

Figure 1- The effect of the type, concentration and duration of using different elicitors on the Peroxidase (a) and Catalase (b) activity and Proline content of the callus samples of *M. oleifera* under *in vitro* conditions. C: Control, MJ: Methyl Jasmonate, PHA: Phenylalanine and SA: Salicylic Acid. Different letters indicate a significant difference (at the 5% probability level) between various elicitors in each treatment duration.



شکل ۲- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های مختلف بر میزان a) فلاونوئید وb) آنتوسیانین کالوس *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه. C: شاهد، MJ: متیل‌جاسمونات، PHA: فنیل‌آلانین و SA: سالیسیلیک‌اسید. حروف متفاوت نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار (در سطح احتمال ۵ درصد) بین تیمارهای محرک در هریک از زمان‌های اعمال تیمار است.

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 *M. oleifera* under *in vitro* conditions. C: Control, MJ: Methyl Jasmonate, PHA: Phenylalanine and SA: Salicylic Acid. Different letters indicate a significant difference (at the 5% probability level) between various elicitors in each treatment duration

جدول ۲- میانگین مربعات آثار محرک‌های رشد گیاهی و مدت زمان استفاده از آنها بر تولید متابولیت‌های ثانویه نمونه‌های کالوس *M. oleifera*

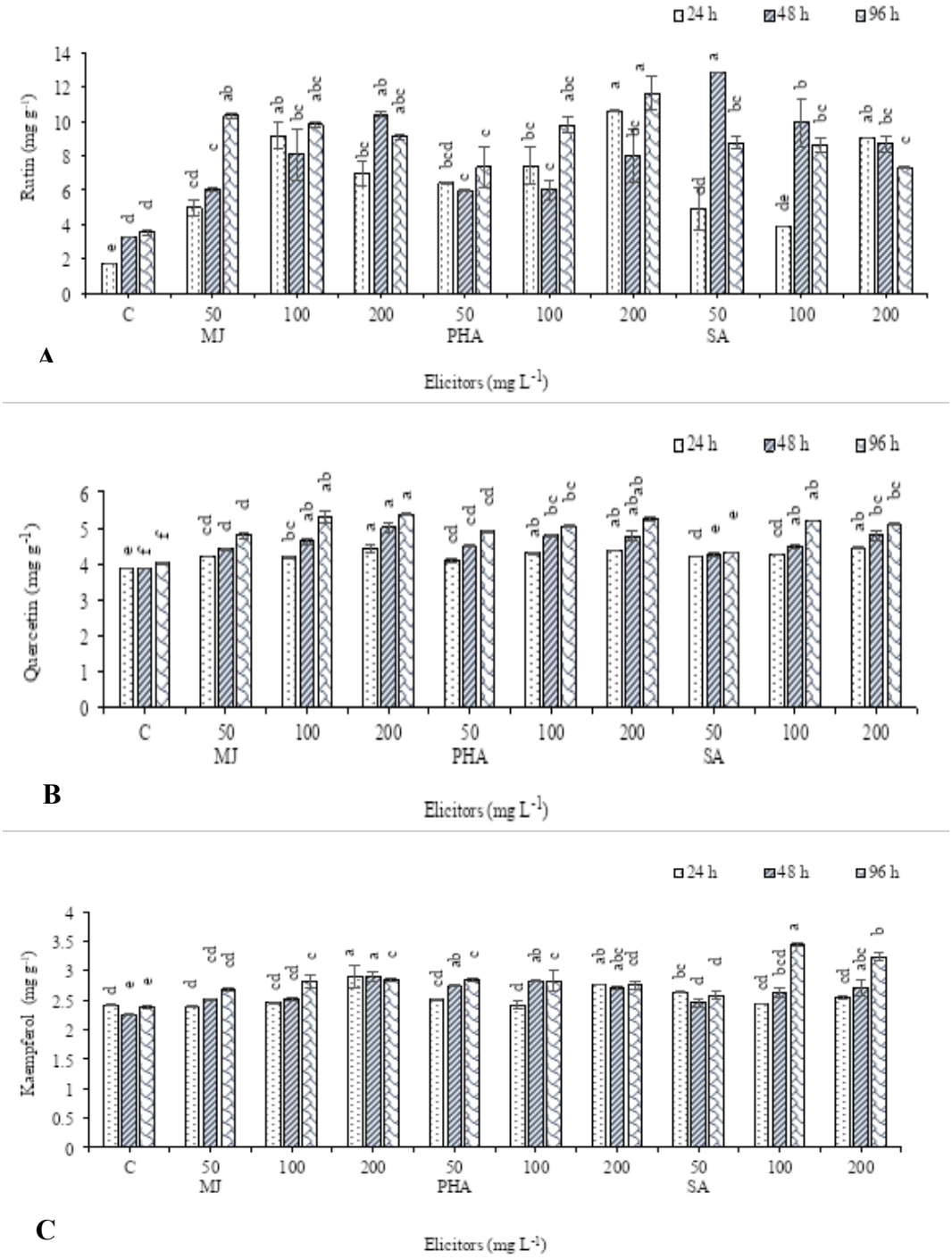
Table 2- The mean squares of the effects of the elicitor type, and duration on the secondary metabolites production in the callus samples of *M. oleifera* under *in vitro* conditions

Source of variation	df	MS		
		Rutin	Quercetin	Kaempferol
Elicitor (A)	9	34.70 **	3.65 **	0.69 **
Time (B)	2	35.83 **	0.81 **	0.24 **
A× B	18	11.89 **	0.09 **	0.11 **
Erorr	60	2.38	0.02	0.01
Cv(%)	-	20.09	3.27	4.39

**: significant at 1% level of probability

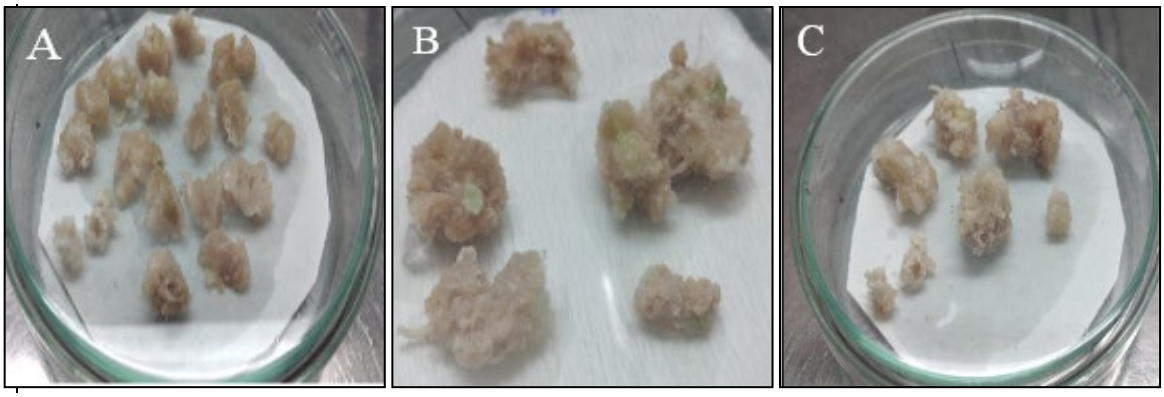
از نظر میزان تولید روتین توسط کالوس‌های تیمارشده با محرک‌ها، اختلاف معناداری بین شاهد و بیشتر تیمارها مشاهده شد (شکل ۳a). بیشترین میزان روتین (۱۲/۸۶ میلی‌گرم‌درگرم وزن تر کالوس) به محیط‌کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید برای مدت زمان ۴۸ ساعت تعلق داشت. افزایش سن کالوس در محیط‌کشت شاهد از ۲۴ ساعت به ۴۸ و ۹۶ ساعت سبب افزایش معنادار میزان تولید روتین در بافت‌های کالوس شد؛ همچنین افزایش معنادار تولید روتین با افزایش مدت زمان تیمار در محیط‌کشت‌های حاوی ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات و ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین مشاهده شد. استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل جاسمونات، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید برای مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به مدت زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت، تولید روتین در بافت‌های کالوس گیاه *M. oleifera* را به‌طور معناداری افزایش داد (شکل ۳a). نتایج نشان دادند تولید روتین با افزایش غلظت فنیل‌آلانین و سالیسیلیک‌اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت افزایش می‌یابد.

از نظر میزان تولید کوئرستین کالوس‌های تیمارشده، اختلاف معناداری بین تمام تیمارهای حاوی محرک‌ها و شاهد در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) مشاهده شد. نتایج نشان دادند با افزایش مدت زمان استفاده از متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان محرک (در غلظت‌های مختلف)، میزان تولید کوئرستین در بافت کالوس گیاه *M. oleifera* افزایش می‌یابد (شکل ۳b). از نظر میزان تولید کمپفرول در کالوس گیاه *M. oleifera*، اختلاف معناداری بین بیشتر تیمارهای دارای محرک و تیمار شاهد در مدت زمان ۲۴ ساعت مشاهده نشد. بیشترین میزان کوئرستین (۵/۳۸ میلی‌گرم‌درگرم وزن تر کالوس) به محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات و مدت زمان ۹۶ ساعت تعلق داشت که اختلاف معناداری با تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات، ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر فنیل‌آلانین در همان مدت زمان تیمار نداشت (شکل ۳b). استفاده از محرک‌های رشد گیاهی در مدت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت، میزان تولید کمپفرول را به‌طور معناداری نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۳b). در محیط‌کشت‌های حاوی متیل‌جاسمونات (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر)، فنیل‌آلانین (۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر) و سالیسیلیک‌اسید (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر)، اختلاف معناداری بین مدت زمان استفاده از محرک‌ها مشاهده شد و استفاده از مدت زمان‌های بیشتر برای این غلظت‌ها سبب افزایش معنادار تولید کمپفرول در بافت‌های کالوس شد. بیشترین میزان کمپفرول (۳/۴۵ میلی‌گرم‌درگرم وزن تر کالوس) به محیط‌کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید برای مدت زمان ۹۶ ساعت و در رتبهٔ بعدی به ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر آن در همان مدت زمان تیمار تعلق داشت (شکل ۳c). استفاده از محرک‌ها در غلظت‌ها و مدت زمان های مختلف تغییری در نوع، رنگ و رشد بافت های کالوس نداشت (شکل ۴).



شکل ۳- تأثیر نوع، غلظت و مدت زمان استفاده از محرک‌های مختلف بر میزان a) روتین، b) کوئرستین و c) کمپفرول کالوس گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه. C: شاهد، MJ: متیل‌جاسمونات، PHA: فنیل‌آلانین و SA: سالیسیلیک‌اسید. حروف متفاوت نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار (در سطح احتمال ۵ درصد) بین تیمارهای محرک در هریک از زمان‌های اعمال تیمار است.

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 *M. oleifera* under *in vitro* conditions. C: Control, MJ: Methyl Jasmonate, PHA: Phenylalanine. Different letters indicate a significant difference (at the 5% probability level) between various elicitors in each treatment duration



شکل ۴- نمونه کالوس‌های جمع‌آوری‌شده از محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر BAP به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر متیل‌جاسمونات به‌مدت ۹۶ ساعت (A)، ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر سالیسیلیک‌اسید به‌مدت ۹۶ ساعت (B) و نمونهٔ شاهد بدون محرک (C).

Figure 4- Callus samples collected from MS medium containing 2 mg L^{-1} 2,4-D and 0.5 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 و نتیجه‌گیری

عوامل مختلفی برای تولید متابولیت‌های ثانویه به کمک عوامل محرک درون محیط‌کشت در شرایط درون‌شیشه وجود دارند که ازجملهٔ آنها می‌توان به غلظت محرک، سن محیط‌کشت، زمان افزودن محرک به محیط‌کشت و مدت زمانی که ریزنمونه در معرض آن قرار می‌گیرد، اشاره کرد (Cardoso et al., 2019). امروزه، کاربرد سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌ها اثبات شده است (Saleem et al., 2022). رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های درون‌سلولی هستند که به دلیل داشتن الکترون‌های جفت‌نشده، بسیار فعال و واکنش‌پذیرند (Di-Meo & Venditti, 2021). رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های فیزیولوژیک برای عملکرد طبیعی سلول ضروری هستند و افزایش کم تا متوسط آنها نقش تنظیم‌کننده‌ای در مسیرهای پیام‌رسان سلولی دارد (Huang et al., 2019; Wan et al., 2020). گیاهان با استفاده از سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌توانند غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهند و از آثار مخرب آنها بکاهند. دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌هایی نظیر پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنلی است (Zou et al., 2020). فعالیت بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند پراکسیداز و کاتالاز برای ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی بسیار مهم است و به‌طورکلی تغییر در محتوای آنتی‌اکسیدانی، یکی از پاسخ‌های گیاه به تنش‌ها برای تنظیم شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است (Galasso et al., 2021). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند استفاده از سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات (در بیشتر غلظت‌ها و مدت زمان‌ها) در مقایسه با شاهد سبب افزایش معنادار میزان آنزیم پراکسیداز در نمونه کالوس گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه می‌شود (شکل ۱a)؛ به‌طوری‌که افزایش غلظت و

مدت زمان استفاده از متیل‌جاسمونات در محیط‌کشت سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه کالوس‌های تیمارشده شد. در بررسی تأثیر فنیل‌آلانین بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (شکل ۱a) در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت، افزایش غلظت فنیل‌آلانین به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر درون محیط‌کشت، افزایش معنادار فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس‌های تیمارشده را در پی داشت. بر اساس نتایج، تغییر غلظت و مدت زمان استفاده از سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان محرک در محیط‌کشت، تأثیر معناداری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نداشت؛ این در حالیست که نمونه کالوس‌های تیمارشده با متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین (در بیشتر غلظت‌ها و مدت زمان‌ها) در مقایسه با تیمارهای شاهد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری داشتند، ولی استفاده از سالیسیلیک‌اسید (در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) تأثیر معناداری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار شاهد نداشت (شکل ۱b). مطابق نتایج پژوهش حاضر، Pandolfini et al., (1992) بیان کردند سالیسیلیک‌اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس *Triticum aestivum* می‌شود؛ همچنین گزارش شده است افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه شیرین‌بیان می‌شود (Shabania et al., 2009). سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌ها و کشت‌های سوسپانسیون مریم‌گلی را ممانعت می‌کند (Kang et al., 2004). سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات از طریق افزایش فعالیت مسیر سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گیاه را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. پرولین یکی از مهم‌ترین آمینواسیدهایی است که بیشتر گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌کنند، تجمع آن در سلول‌ها افزایش می‌یابد و نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی را در حفاظت سلول‌ها در برابر تنش و بهبود رشدونمو سلول‌ها ایفا می‌کند؛ ازجمله نقش‌های مهم پرولین می‌توان به نقش آن به‌عنوان مادهٔ تنظیم‌کنندهٔ اسمزی و عامل حفاظت و پایدارکنندهٔ ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا اشاره کرد. تجمع اسمولیت‌ها در سیتوزول امکان تعدیل فشار اسمزی در سلول را فراهم می‌کند؛ همچنین این آمینواسید از ساختارهای سلولی پروتئین‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش محیطی و زیستی محافظت می‌کند (Alvarez *et al*., 2022). در پژوهش حاضر مشخص شد استفاده از غلظت‌های بیشتر و مدت زمان‌های بیشتر متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک‌اسید در مقایسه با شاهد و استفاده از غلظت‌های کمتر سبب افزایش معنادار میزان تجمع آمینواسید پرولین در بافت کالوس گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه می‌شود (شکل ۱c).

متابولیت‌های ثانویه گروه متنوعی از مولکول‌هایی هستند که بخشی از سیستم دفاعی گیاه را شامل می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه همیشه و در همهٔ بخش‌های گیاه تولید نمی‌شوند، بلکه در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌سرعت تولید می‌شوند؛ فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها ازجملهٔ این ترکیبات هستند که علاوه‌بر نقش‌های حفاظتی و ساختاری در بافت‌ها، به‌عنوان ترکیبات

رنگدانه‌ای گیاه در جذب حشرات گرده‌افشان، ایجاد تنوع رنگی برای گل‌ها و گیاهان زینتی، تولید داروها، حشره‌کش‌ها، چاشنی‌های غذایی، رنگ‌های طبیعی، خوشبوکننده‌ها و همچنین به‌عنوان علامت‌های مولکولی در برهم‌کنش گیاهان با محیط و به‌عنوان نشانگرهای زیستی در مطالعه‌های کموتاکسی (سیستماتیک بر پایهٔ عوامل شیمیایی) مطرح هستند (Pang et al., 2021). فلاونوئیدها را می‌توان در بیشتر گونه‌های گیاهی و در اندام‌های مختلف گیاه یافت. فلاونوئیدها در کنار طیف گسترده‌ای از عملکردهای مختلفی که دارند، به‌عنوان مولکول‌های سیگنال در تولیدمثل جنسی نقش دارند و از گیاه در برابر آثار مخرب اشعهٔ ماورابنفش محافظت می‌کنند؛ همچنین در تعامل‌های گیاهان و میکروب‌ها و پاسخ‌های دفاعی گیاه شرکت دارند (Dias et al., 2021). پس از کلروفیل‌ها، آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی به شمار می‌آیند که غیرسمی و محلول در آب هستند 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. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، اختلاف معناداری از نظر میزان فلاونوئید بین شاهد و بیشتر تیمارها وجود دارد (شکل ۲a)؛ به‌طوری‌که استفاده از متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین به‌ویژه در غلظت‌ها و مدت زمان‌های بیشتر، میزان تولید فلاونوئید را به‌طور معناداری نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۲a). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند استفاده از متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان محرک (به‌ویژه در غلظت‌ها و مدت زمان‌های بیشتر) به‌طور معناداری میزان تولید روتین در نمونهٔ بافت کالوس را افزایش می‌دهد (شکل ۳a). در مدت زمان ۴۸ ساعت، استفاده از غلظت‌های بیشتر متیل‌جاسمونات و فنیل‌آلانین سبب افزایش تولید روتین نمونه کالوس‌های تیمارشده درون محیط‌کشت شد؛ این در حالیست که برای سالیسیلیک‌اسید در مدت زمان یادشده، استفاده از غلظت‌های بیشتر سبب کاهش عملکرد روتین در کالوس‌های تیمارشده شد. مطابق نتایج پژوهش حاضر، مشخص شده است افزودن متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و عصارهٔ مخمر به محیط‌کشت سبب افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویهٔ بافت کالوس گیاه *Glehnia littoralis* می‌شود (Ishikawa *et al*., 2007)؛ علاوه‌براین با افزایش غلظت آمینواسید فنیل‌آلانین به‌عنوان یکی از پیش‌ماده‌های مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، میزان تولید روتین در بافت‌های کالوس گیاه مورینگا نسبت به غلظت‌های کم این ماده به‌طور معناداری افزایش یافت؛ باوجوداین، میزان تولید روتین در بیشتر موارد، پاسخی وابسته به غلظت نبود. به نظر می‌رسد استفاده از فنیل‌آلانین به‌ویژه در غلظت‌ها و مدت زمان‌های بیشتر سبب هدایت جریان تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها به‌سمت بیوسنتز روتین و استفادهٔ حداکثری از ظرفیت آنزیمی سلول‌ها در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌ها می‌شود. در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی نیز از نظر میزان متابولیت تبائین، پاسخ وابسته به میزان آمینواسید ال- تیروزین گزارش شده است؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان تبائین (۴۲/۳

میلی‌گرم‌درلیتر) در غلظت ۱ میلی‌مولار ال-تیروزین به دست آمده که به طور معناداری بیشتر از مقدار آن در تیمار ۲ میلی‌مولار ال- تیروزین بوده است. نتایج (شکل ۳a) نشان دادند با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر به‌ویژه برای مدت زمان ۴۸ ساعت، میزان تولید روتین در نمونه کالوس‌های گیاه مورینگا افزایش می‌یابد. کوئرستین به‌عنوان فلاونول اصلی در برگ‌های گیاهان مختلف شناسایی شده است و تابش نور خورشید سبب افزایش محتوای کوئرستین و کمپفرول در برگ‌های گیاهان می‌شود؛ این امر نشان می‌دهد این ترکیبات در محافظت از گیاهان در برابر اشعهٔ مضر نور خورشید نقش دارند (Hosseini et al., 2021). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند افزودن متیل‌جاسمونات، فنیل‌آلانین و سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان محرک‌های رشد گیاهی به محیط‌کشت سبب افزایش تولید میزان کوئرستین در نمونه بافت‌های کالوس گیاه *M. oleifera* نسبت به تیمار شاهد می‌شود (شکل ۳b). استفاده از غلظت‌ها و مدت زمان‌های بیشتر از محرک‌های رشد گیاهی، میزان تولید کوئرستین در نمونه بافت‌های کالوس گیاه *M. oleifera* را افزایش داد. Zanella et al. (2019) با بررسی تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویهٔ گیاه *M. oleifera* بیان کردند افزودن سالیسیلیک‌اسید به محیط‌کشت بافت، تأثیر معناداری بر تولید روتین، کوئرستین و کمپفرول نمونه کالوس‌های کشت‌شدهٔ این گیاه ندارد. Zare et al. (2021) با بررسی تأثیر محرک‌های رشد گیاهی فنیل‌آلانین، مخمر و سالیسیلیک‌اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویهٔ گیاه قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.) در محیط‌کشت بیان کردند افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین، تولید روتین در برگ‌های حاصل را افزایش می‌دهد، اما تأثیری بر میزان کوئرستین و کمپفرول آنها ندارد.

پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌های مختلف زیست‌فناوری، امکان احیای روش‌های نوین کشت بافت گیاهی و تولید ترکیبات باارزش در سطح تجاری را فراهم کرده است. استفاده از روش‌های زیست‌فناوری گیاهی و به‌ویژه تولید ترکیبات گیاهی در شرایط درون‌شیشه امکان تولید محصولات دارویی باارزش را مستقل از شرایط فصلی و آب‌وهوایی در طول سال فراهم می‌کند. امروزه پژوهش‌های بسیاری در زمینهٔ ارزش دارویی و غذایی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) انجام شده و در حال انجام است. باتوجه‌به ارزش زیاد این گیاه از نظر دارویی و درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان در طب سنتی ملل مختلف، روش‌های مناسب و جایگزین برای تولید ترکیبات مؤثرهٔ آن اهمیت بسیاری دارد. استفاده از کشت بافت گیاهی و همچنین عوامل محرک، روش مؤثری برای تولید ترکیبات باارزش این گیاه در شرایط درون‌شیشه محسوب می‌شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تیمار کالوس با غلظت‌های بیشتر (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و فنیل‌آلانین، امکان افزایش تولید متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی (روتین، کوئرستین و کمپفرول) در این گیاه را فراهم می‌کند.

References

Arya, S. S., Lenka, S. K., Cahill, D. M., & Rookes, J. E. (2021). Designer nanoparticles for plant cell culture systems: Mechanisms of elicitation and harnessing of specialized metabolites. *BioEssays*, *43*(11), 2100081. https://doi.org/10.1002/bies.202100081

Bates, L. S., Waldren, R. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, *39*, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Bhaskar, R., Xavier, L. S. E., Udayakumaran, G., Kumar, D. S., Venkatesh, R., & Nagella, P. (2022). Biotic elicitors: A boon for the *in vitro* production of plant secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *149*(1-2), 7-24. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1

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. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chanes, B., & Mahely, A. C. (1996). Assay of catalase and peroxidase. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. D. (Eds.) *Methods in enzymology*. New York: Academic Press. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3). https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Huang, D., Luo, H., Zhang, C., Zeng, G., Lai, C., Cheng, M., & 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. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.098

Hurst, W. J., Martin Jr, R. A., & Zoumas, B. L. (1979). Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods. *Journal of Food Science*, *44*(3), 892-895. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08529

Ishikawa, A., Kitamura, Y., Ozeki, Y., & Watanabe, M. (2007). Different responses of shoot and root cultures of *Glehnia littoralis* to yeast extract. *Journal of Natural Medicines*, *61*, 30-37. https://doi.org/10.1007/s11418-006-0006

Kurtulbaş, E., Albarri, R., Torun, M., & Şahin, S. (2022). Encapsulation of *Moringa oleifera* leaf extract in chitosan-coated alginate microbeads produced by ionic gelation. *Food Bioscience*, *50*, 102158. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102158

MacAdam, J. W., Nelson, C. J., & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*, *99*(3), 872-878. https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872

Mashamaite, C. V., Ngcobo, B. L., Manyevere, A., Bertling, I., & Fawole, O. A. (2022). Assessing the usefulness of *Moringa oleifera* leaf extract as a biostimulant to supplement synthetic fertilizers: A Review. *Plants*, *11*(17), 2214. https://doi.org/10.3390/plants11172214

Mohlala, K., Offor, U., Monageng, E., Takalani, N. B., & Opuwari, C. S. (2023). Overview of the Effects of

Moringa oleifera Leaf Extract on Oxidative Stress and Male Infertility: A Review. *Applied Sciences*, *13*(7), 4387. https://doi.org/10.3390/app13074387

Patel, Z. M., Mahapatra, R., & Jampala, S. S. M. (2020). Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 143-158). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00012-2

Raj, S., & Saudagar, P. (2019). Plant cell culture as alternatives to produce secondary metabolites. *Natural Bio-active Compounds: Volume 3: Biotechnology, Bioengineering, and Molecular Approaches*, 265-286. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7438-8_11

Riyathong, T., Dheeranupattana, S., Palee, J., & Shank, L. (2010). Shoot multiplication and plant regeneration from in vitro cultures of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). In *The 8th international symposium on biocontrol and biotechnology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University, Nongkhai Campus, Thailand* (pp. 99-104). https://doi.org/10.3390/app45071121

Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asghari, G., & 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. https://doi.org/10.1134/S1021443709050069

Shafighi, S., Moieni, A., & 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

Syeda, A. M., & Riazunnisa, K. (2020). Data on GC-MS analysis, in vitro anti-oxidant and anti-microbial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. *Data in Brief*, *29*, 105258. https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105258

Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109604. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604

Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, *64*(1), 88-93. https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88