Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 3, Page 467-484 (2024)

DOI:10.22092/IJMAPR.2024.131920

Effect of elicitor on some biochemical traits of *Withania coagulans* (Stocks) Dun. in cell suspension culture conditions

Marie Dorrazehi[1], Maryam Allahdou[2*], Barat Ali Fakheri[1] and Leila Mehravaran[1]

1- MSc. Graduated, Department of Plant breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
E-mail: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

Received: September 2023 Revised: December 2023 Accepted: February 2024

Abstract

Background and objectives: Medicinal plants produce bioactive compounds with high antioxidant value. Due to the importance of *Withania coagulans* in the pharmaceutical industry and also due to the cutting of this shrub species and its use in the pharmaceutical industry using traditional methods, the risk of extinction of this valuable species will increase, so we should look for the method - to be alternatives to increase the production of secondary metabolites of this plant. Using elicitors as a technique in vitro increases plant production of effective compounds (secondary metabolites). It has been reported that fungal stimulants are also used to induce the production or increase of secondary metabolites in medicinal plants. Therefore, in this study, the effect of cellulase elicitor on the growth index and biochemical and physiological traits of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal) was investigated in cell suspension culture.

Methodology: Seeds of *Withania coagulans* were collected from the Mehrestan region of Saravan city, and after disinfection, they were cultivated in ½ MS medium to produce explant. Production explants were cultured in an MS culture medium containing auxin and cytokinin hormones (2mg/l 2, 4, D, and 0.5 mg/l Kinetin) to produce callus. Three sub-cultures of production called into MS culture medium containing transfer previous regulating hormones were done. Investigated treatments include six elicitor treatments: 1: Control 2: Elicitor with a concentration of 200 µg/ml and 24 hours of exposure to the Elicitor, 3: Elicitor with a concentration of 200 µg/ml and 48 hours of exposure to the Elicitor, 4: Elicitor with a concentration of 200 µg/ml and 72 hours of exposure Elicitor, 5: Elicitor with a concentration of 7.5 µg/ml and 14 days of exposure to the Elicitor and 6: Elicitor with a concentration of 10 µg/ml and 14 days of exposure to the cellulase elicitor in a completely randomized design with three replications in the central laboratory of the university of Zabol was applied. Investigated traits were: callus growth index, antioxidant activity, proline content, soluble carbohydrates, malondialdehyde, total alkaloid, and activity of antioxidant enzymes (catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, superoxide dismutase, and polyphenol oxidase).

Results: The effect of different cellulase treatments on all traits was significant except polyphenol oxidase enzyme activity. In general, different elicitor treatments improved all the measured traits except the content of total carbohydrates. However, the increase in the trait depended on the concentration and period of exposure to the Elicitor. So, in most of the measured traits, the elicitor treatment with a concentration of 10 micrograms/ml and a period of 14 days caused an increase in all treatments. All cellulase elicitor treatments increased the

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

antioxidant activity of *Withania coagulans* cells in cell suspension culture. The highest antioxidant activity was observed in the sixth and fifth treatments and the lowest in the second and first treatments (control). The addition of Elicitor in the early stage of cell growth in cell suspension culture (eighth day) despite the lower concentrations of Elicitor (7.5 and 10 µg/ml) leads to a further increase in callus growth, antioxidant activity, Proline, and total alkaloid increased then the addition of Elicitor in exponential phase, despite the high concentration of Elicitor (200 µg/ml). A higher concentration of elicitors causes a hypersensitive response, which leads to cell death; hence, an optimal Elicitor level is required to induce growth.
Conclusion: Cellulase elicitor improved the growth index and antioxidant potential of *Withania coagulans* through physiological and biochemical traits. According to the obtained results, the use of cellulase elicitor can be considered an important strategy to increase the growth, effective compounds, and antioxidant properties of *Withania coagulans* for commercial production.

Keywords: Antioxidant, cellulase elicitor, growth index, secondary metabolites.

اثر الیسیتور سلولاز بر روی برخی صفات بیوشیمیایی گیاه پنیر باد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.) در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی

ماریه درازهی[۱]، مریم الهدو[۲*]، براتعلی فاخری[۳] و لیلا مهرآوران[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

پست الکترونیک: **Maryam.allahdou@uoz.ac.ir**

۳- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۴- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان دارویی ترکیبات زیست فعالی تولید می‌کنند که ارزش آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. با توجه به اهمیت گیاه پنیر باد در صنایع داروسازی، خطر انقراض این گونه ارزشمند افزایش یافته است. ازاین‌رو باید به دنبال روش‌های جایگزین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه بود. استفاده از محرک‌ها به عنوان یک تکنیک در کشت بافت، تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان را افزایش می‌دهد. گزارش شده است که محرک‌های قارچی نیز در القای تولید یا افزایش این متابولیت‌ها در گیاهان دارویی کاربرد دارند. ازاین‌رو در این مطالعه تأثیر محرک سلولاز بر روی شاخص رشد و صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه پنیر باد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.) در کشت سوسپانسیون سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بذرهای گیاه پنیر باد از منطقه مهرستان شهرستان سراوان جمع‌آوری و بعد از ضد عفونی در محیط کشت MS ½ به منظور تولید ریز نمونه کشت گردید. ریزنمونه‌های تولیدی در محیط کشت MS محتوای هورمون‌های اکسین و سیتوکنین (۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و نیم میلی‌گرم در لیتر کینتین) به منظور تولید کالوس کشت شده و بعد از سه واکشت متوالی کالوس‌های تولیدی به محیط کشت MS مایع محتوای هورمون‌های تنظیم‌کننده انتقال و تیمارهای مورد بررسی که ۶ تیمار محرک شامل: ۱: کنترل، ۲: محرک با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض تحریک‌کننده، ۳: محرک با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت قرارگیری در معرض تحریک‌کننده، ۴: محرک با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۲ ساعت قرارگیری در معرض تحریک‌کننده، ۵: محرک با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۴ روز قرارگیری در معرض تحریک‌کننده و ۶: محرک با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۴ روز قرارگیری در معرض محرک قارچی سلولاز بوده و به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه زابل اعمال گردید. صفات مورد بررسی شامل: شاخص رشد کالوس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، مالون دی آلدهید، آلکالوئید کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و پلی فنل اکسیداز) بود.

نتایج: اثر تیمارهای مختلف سلولاز بر روی کلیه صفات به غیر از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز معنی‌دار بود. به‌طورکلی تیمارهای مختلف محرک منجر به بهبود کلیه صفات اندازه‌گیری شده به غیر از محتوای کربوهیدرات‌های کل شد. اما میزان افزایش صفات بستگی به غلظت و دوره زمانی قرارگیری در معرض محرک داشت. به‌طوری‌که در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده، تیمار تحریک‌کننده با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دوره ۱۴ روزه در معرض محرک بودن سبب افزایش بیشتر شد. همه تیمارهای محرک سلولاز منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های پنیر باد در کشت سوسپانسیون سلولی شد. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای ششم و پنجم و کمترین آن در تیمارهای دوم و اول (کنترل) مشاهده شد. افزودن محرک در مرحله اول رشد سلول‌ها در

کشت سوسپانسیون سلولی (روز هشتم) با وجود غلظت‌های پایین‌تر محرک (۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منجر به افزایش بیشتر رشد کالوس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان پرولین و آلکالوئید کل نسبت به اضافه کردن محرک در مرحله فاز نمایی رشد، با وجود غلظت بالای محرک (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شد. غلظت بالاتر تحریک‌کننده‌ها باعث ایجاد پاسخ حساسیت بیش از حد شده که منجر به مرگ سلولی می‌گردد و ازاین‌رو سطح بهینه‌ای از محرک برای القای رشد مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری: محرک سلولاز از طریق بهبود صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی منجر به افزایش شاخص رشد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه پنیر باد شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، استفاده از محرک سلولاز می‌تواند به عنوان یک راهبرد مهم برای افزایش رشد، ترکیبات مؤثره و خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه پنیر باد در راستای تولید تجاری آن در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، سلولاز، شاخص رشد، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

گیاهان دارویی قادرند انواع ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی پایین به نام متابولیت‌های ثانویه سنتز کنند که هم برای خود گیاه (از لحاظ فعل و انفعالات گیاهی و محیطی) و هم برای انسان‌ها (از نظر فعالیت‌های بیولوژیکی که می‌توانند ارزش درمانی داشته باشند) اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند. این ترکیب‌ها به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع، قرن‌ها در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و امروزه در ترکیب‌های ارزشمندی مانند داروها، لوازم آرایشی و مواد شیمیایی استفاده می‌شوند (Bourgaud *et al*., 2001).

گیاه پنیر باد با نام علمی *Withania coagulans* (Stocks) Dun. متعلق به تیره سولاناسه یا سیب‌زمینی بوده و به‌صورت گیاهی بوته‌ای یا تقریباً درختچه‌ای به ارتفاع ۱۲۰-۳۰ سانتی‌متر با برگ‌های سبز کدر و با جام گلی به رنگ زرد دیده می‌شود. این گونه به‌صورت دو پایه و دگرگشن بوده و در آن گل‌های ماده با پرچم‌های رشد نکرده ظاهر می‌گردد (Jain *et al*., 2012). به این گیاه مایه پنیر، مایه پنیر هندی، کاکنج هندی و *Cheese-maker* نیز گفته می‌شود (Ghorbani Ghoochani, 2014). گونه *W. coagulans* در پاکستان، افغانستان، شمال‌غربی هند و مناطق محدودی از ایران پراکنش دارد (Valizadeh & Valizadeh, 2011). جمعیت‌های طبیعی پنیر باد به‌وسیله بذر پراکنده و تکثیر می‌شوند و به‌دلیل دوره رشد طولانی آنها، برای برداشت بخش‌های دارویی و استخراج مواد مؤثره یک دوره زمانی طولانی نیاز است. همچنین میزان ویتانولیدها (withanoloids) در گیاهان طبیعی به مقدار بسیار کم وجود داشته و به‌دلیل دگرگرده‌افشان بودن این گیاه و تغییر شرایط محیطی امکان تغییر در نوع ترکیب شیمیایی آنها در مناطق مختلف و از یک گیاه به گیاه دیگر وجود دارد (Mirjalili *et al*., 2009). ازاین‌رو روش‌های جایگزین و بهینه شده برای تولید کارآمد این گونه ویتانولیدها که از نظر دارویی بسیار امیدوارکننده هستند، مهم است. در عصر کنونی فناوری و رویکردهای بیوتکنولوژی، به‌طور خاص در کشت بافت گیاهی، نقش حیاتی در تولید ترکیب‌های دارویی مطلوب از گیاهان به جای روش‌های سنتی دارد (Rao & Ravishankar, 2002). محصول‌های ثانویه تولید شده با کشت سلول گیاهی را می‌توان به‌طور مداوم در طول سال تولید کرد، در نتیجه هیچ‌گونه محدودیت فصلی وجود نداشته و تولید قابل اطمینان، قابل پیش‌بینی و مستقل از محیط است (Verma *et al*., 2017).

مطالعات متعددی در زمینه بهبود تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان در نتیجه کاربرد الیسیتورهای مختلف انجام شده است. استفاده از الیسیتورهای آلومینیوم کلراید و کیتوزان در گیاه پنیر باد (Sivanandhan *et al*., 2012)، کاربرد الیسیتورهای قارچی در گیاه *W. somnifera* (Ahlawat *et al*., 2017)، تیمار با الیسیتور جاسمونیک اسید در گیاه خربزه (Nafie *et al*., 2011) و استفاده از الیسیتورهای سالیسیلیک اسید، کلریدسدیم و نیترات نقره در گیاه مریم‌گلی قرمز (Yu *et al*., 2019)، افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را در نتیجه استفاده از این محرک‌ها

نشان داده‌اند. همچنین مطالعه تأثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر روی متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین گیاه پنیر باد (*Withania somnifera*) نشان داد که هر دو الیسیتور منجر به افزایش ویتانولید A (Withanoloid A)، ویتانون (Withanon) و ویتافرین A (withaferin A) در همه زمان‌ها شد (Sivanandha *et al*., 2012). بنابراین از این مولکول‌ها می‌توان برای تولید بیشتر این ترکیب‌ها برای کاربرد تجاری استفاده کرد. گزارش شده است که فعالیت القاء شده آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (Super Oxid Dismutase) و گایاکول پراکسیداز (guaiacol peroxidase) نشان‌دهنده این است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در حفظ سلول‌ها از تحریک متیل جاسمونات در کشت ریشه‌های گیاه *Panax ginseng* و *P. quinquefolium* دارد (Ali *et al*., 2005). کاربرد محرک جاسمونیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خربزه (*Cucumis melo* L.) فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو (آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز) و مقادیر آسکوربیک اسید و متابولیت‌های کومارین و پی–کوماریک را افزایش داده بود (Nafie *et al*., 2011).

با توجه به اهمیت گیاه پنیر باد در صنایع داروسازی و خطر انقراض این گونه ارزشمند به دلیل برداشت بی‌رویه و استفاده از آن در صنایع داروسازی باید دنبال روش‌های جایگزین برای افزایش متابولیت‌های ثانویه این گیاه بود. یکی از این روش‌ها، استفاده از فناوری کشت بافت می‌باشد. استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی منجر به تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. استفاده از قارچ‌ها برای بهبود تولید آلکالوئیدها در بسیاری از گیاهان از اوایل دهه ۱۹۹۰ گزارش شده است (Christen *et al*., 1991؛ Strobel *et al*., 1992). قارچ‌های اندوفیتیک میکرو قارچ‌هایی هستند که به‌طور متقابل حداقل در بخشی از چرخه زندگی خود با گیاهان ارتباط داشته و هیچ‌گونه آسیب قابل توجهی به آنها وارد نمی‌کنند (Abdel-Azeem *et al*., 2019). آنها تقریباً در همه گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و از طریق برهم‌کنش‌های میکروب و میزبان در توسعه گیاه میزبان مهم تشخیص داده می‌شوند (Kaul *et al*., 2014). آنها همچنین به دلیل نقش احتمالی در سنتز مواد فعال یا تبدیل متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان محرک استفاده می‌شوند (Boller *et al*., 1995). در بین محرک‌های زیستی، تحریک‌کننده‌های قارچی منجر به افزایش قابل توجهی در تولید تعدادی از مواد شیمیایی در کشت بافت گیاهی شده است (Marero *et al*., 1997؛ Namdeo *et al*., 2002). تأثیر سلولاز بر روی میزان گلیسیریزین در کشت ریشه موئین گیاه شیرین‌بیان بررسی و نشان داده شد که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان گلیسیریزین ۲/۵، ۴/۷ و ۸/۶ برابر به‌ترتیب در روزهای سوم، پنجم و هفتم در معرض قرارگیری سلولاز افزایش یافته بود (Srivastava *et al*., 2019). ازاین‌رو در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف سلولاز گرفته شده از قارچ *Aspergillus nigari* بر روی برخی صفات بیوشیمیایی در زمان‌های مختلف در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی بررسی شد. هدف از این تحقیق، یافتن غلظت‌های مؤثر محرک قارچی سلولاز در تولید بیوماس، بررسی سازوکارهای دفاعی با تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز تغییر در صفات بیوشیمیایی در نتیجه در معرض قرار گرفتن کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاه پنیر باد در زمان‌های مختلف این محرک می‌باشد. زیرا تغییر در هر یک از این صفات، در نتیجه تغییر در متابولیت‌های ثانویه این گیاه در شرایط تنش است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه

بذرهای گیاه از منطقه مهرستان شهرستان سراوان جمع‌آوری شد. بذرها ابتدا در آب استریل محتوی یک قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شده و بعد به مدت دو دقیقه در اسید سولفوریک ۱۰٪ قرار گرفتند. بعد از آن بذرها در زیر لامینار در وایتکس ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و سه مرتبه به مدت یک دقیقه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند.

بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت یک دوم موراشیگ و اسکوگ (½ MS) (Murashige & Skoog, 1962) به منظور تولید گیاهچه کشت گردیدند. کشت بذرها در زیر لامینار و در شرایط کاملاً استریل انجام شد. کلیه ظروف و وسایل قبل از استفاده در اتوکلاو استریل شدند. بذرهای کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تغییرات نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تهیه کالوس

بعد از سه هفته از گیاهچه‌های تولید شده برای تهیه ریزنمونه برگ و ساقه به منظور القای کالوس استفاده شد. بدین صورت که ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش‌های اتوکلاو شده محتوی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (Sivanandhan *et al.*, 2013a) منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی برای تولید کالوس نگهداری شدند. چهار هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، کالوس‌های تولید شده به محیط کشت جدید حاوی هورمون‌های قبلی منتقل شدند. سه واکشت متوالی در این محیط کشت با همان هورمون‌ها برای تولید کالوس بیشتر انجام شد.

سوسپانسیون سلولی و تیمار با الیسیتور

بعد از سه واکشت متوالی، کالوس‌های تولید شده به منظور کشت سوسپانسیون سلولی به محیط کشت MS مایع محتوی هورمون‌های قبلی و ساکارز ۳٪ منتقل شدند. مقادیر ۱/۵ تا ۳ گرم کالوس ابتدا داخل بشرهای کوچک محتوی محیط کشت مایع به‌خوبی خرد شده و بعد به ارلن‌های ۲۰۰CC محتوی ۵۰CC محیط کشت مایع منتقل گردیدند. کشت‌های سوسپانسیون در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند.

برای تهیه استوک آنزیم سلولاز، ۲۰ میلی‌گرم از آنزیم را وزن و در ۲۰CC بافر سدیم سیترات حل کرده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرون در زیر لامینار استریل شد. سپس محرک در دو مرحله به کشت‌های سوسپانسیون سلولی اضافه شد. مرحله اول در روز هشتم زمانی که سلول‌ها شروع به رشد کردند، در غلظت‌های ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سه تکرار اضافه شده و به تیمار کنترل نیز آب مقطر استریل اضافه گردید. ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی تا روز بیست و یکم قرار گرفتند و در روز بیست و دوم سلول‌ها به‌طور جداگانه برای هر ارلن از یک صافی عبور داده شده و نمونه‌های برداشت شده تا زمان اندازه‌گیری صفات مورد نظر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مرحله دوم به منظور بررسی تأثیر آنزیم سلولاز در غلظت بالا و دوره زمانی کوتاه، در مرحله فاز نمایی رشد یعنی زمانی که رشد سلول‌ها متوقف و افزایشی در رشد مشاهده نمی‌شد (روز نوزدهم) سلولاز با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ارلن‌ها اضافه شده و ارلن‌ها دوباره بر روی شیکر با همان شرایط قرار گرفته و در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برداشت سلول‌ها انجام شد.

صفات مورد بررسی

شاخص رشد کالوس

با استفاده از فرمول زیر شاخص رشد کالوس محاسبه گردید (Zahedzadeh *et al.*, 2013).

$$G_i = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100$$

Gi: شاخص رشد کالوس، W1: وزن اولیه کالوس، W2: وزن ثانویه کالوس

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها به ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۱ میلی‌مولار اضافه گردید. مخلوط به‌شدت تکان داده شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. یک نمونه حاوی ۰/۱

میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ و ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH به‌عنوان نمونه کنترل تهیه گردید. جذب نمونه‌ها و نمونه کنترل با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. متانول ۸۰٪ به‌عنوان بلانک (شاهد) استفاده گردید. درصد بازدارندگی (inhibition%) نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ang *et al*., 2015).

$$\text{inhibition\%} = \frac{\text{Ac}-\text{As}}{\text{Ac}} \times 100$$

As و Ac: به‌ترتیب عدد جذب مربوط به نمونه‌های آزمایشی و نمونه کنترل

آلکالوئید کل

حدود ۲ گرم کالوس با اتانول ۹۰٪ استخراج شد. عصاره الکلی در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تغلیظ شد. سپس با HCl (۳٪) اسیدی شده و فیلتر گردید. فیلتر بدست آمده با کلروفرم استخراج شد تا قسمت آلکالوئید اسیدی حذف شود. لایه آبی اسیدی با آمونیاک به محیط قلیایی تنظیم و قسمت پایه آلکالوئید آزاد شده (رسوب) با کلروفرم استخراج شد. عصاره کلروفرمی بر روی سولفات سدیم بی آب فیلتر شده و تحت فشار کاهش یافته تا زمان خشک شدن تبخیر شد، سپس برای محاسبه درصد وزنی وزن گردید (Woo *et al*., 1977).

محتوای کربوهیدرات

برای اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات کل، ۰/۲ گرم کالوس به‌همراه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله‌های آزمایش دربسته قرار داده شده و در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از اینکه نمونه‌ها سرد شدند، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۸ نانومتر نمونه‌ها خوانده شدند. مقدار محتوای کربوهیدرات استخراجی براساس میکروگرم گلوکز در گرم وزن تر از جدول استاندارد استخراج شد (Sheligl, 1986).

محتوای پرولین

مقدار ۱/۲۵ گرم از نین‌هیدرین، داخل ارلن ریخته شده و بعد به آن ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار اضافه گردید. سپس، در هاون چینی مقدار ۰/۱ گرم کالوس با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به‌خوبی ساییده شده و از کاغذ صافی عبور داده شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده به لوله درب‌دار منتقل گردیده و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک، افزوده شد. سپس در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. بعد از این مدت، در زیر هود به هر نمونه ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردیده و تکان داده شد تا به‌طور کامل مخلوط گردند. در نهایت بخش رویی که به رنگ قرمز شده بود، جدا شد. استانداردهایی از پرولین نیز از غلظت صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی‌لیتر آماده گردید و مقدار جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Bates *et al*., 1973).

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

ابتدا ۰/۲ گرم کالوس با ۲ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱٪ (TCA) سائیده شد. عصاره تهیه شده، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر TCA ۲۰٪ شامل ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید (TBA) به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی بدست آمده از سانتریفوژ، اضافه شد. محلول حاصل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه گرما داده شد و پس از آن بلافاصله در یخ قرار گرفته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. جذب این محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای

تعیین مقدار محتوای مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی ۱۵۵ mM-1cm-1 استفاده گردید و مقادیر آن برحسب نانومول بر گرم وزن تر بیان شد (Heath & Paker, 1969).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

ابتدا استخراج عصاره آنزیمی انجام شد. برای استخراج آن، ۲۰۰ میلی‌گرم کالوس با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=7 در هاون چینی ساییده و از کاغذ صافی عبور داده شد. پس از آن با سرعت ۱۶ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ انجام گردید. برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی بخش رویی عصاره استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط شده و به‌مدت ۲ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری سرعت حذف پراکسید هیدروژن انجام شد. نمونه شاهد بافر فسفات پتاسیم حاوی پراکسید هیدروژن بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی mM-1cm-1 ۳۹/۴ و از تقسیم فعالیت حجمی کاتالاز بر میزان پروتئین عصاره بدست آمد (Beers & Sizer, 1952).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیم با ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر براساس اکسیداسیون گایاکول (Guaiacol) به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. نمونه شاهد (بلانک) محلول واکنش بدون عصاره آنزیمی بود. یک واحد از فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان‌دهنده میزان آنزیمی است که برای اکسید کردن یک میکرومول گایاکول در یک دقیقه نیاز می‌باشد (Fielding & Hall, 1978).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم با استفاده از اسپکتروفتومتر براساس کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آسکوربات ۵ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط گردید. محلول واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان نمونه شاهد (بلانک) بود. یک واحد از فعالیت آن نشان‌دهنده میزان آنزیمی است که برای اکسید کردن یک میکرومول آسکوربات در یک دقیقه نیاز می‌باشد (Yoshimura *et al*., 2000).

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

تعدادی لوله آزمایش در حمام آب گرم با ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به هر یک ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۲۰ میکرولیتر پیروگالل (Pyrogallol) ۰/۰۲ مولار اضافه شد تا دمای لوله‌ها به ۴۰ درجه سانتی‌گراد برسد. پس از آن به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید. با استفاده از اسپکتروفتومتر تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۴ دقیقه خوانده شد. مقدار فعالیت آنزیم با استفاده از تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین ثبت شد (Janovitz-Klapp *et al*., 1990).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

۳ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار و ریبوفلاوین ۴ میکرومولار بود. یک نمونه حاوی همه مواد به‌غیر از عصاره آنزیمی نیز به‌عنوان نمونه کنترل تهیه گردید. محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی و

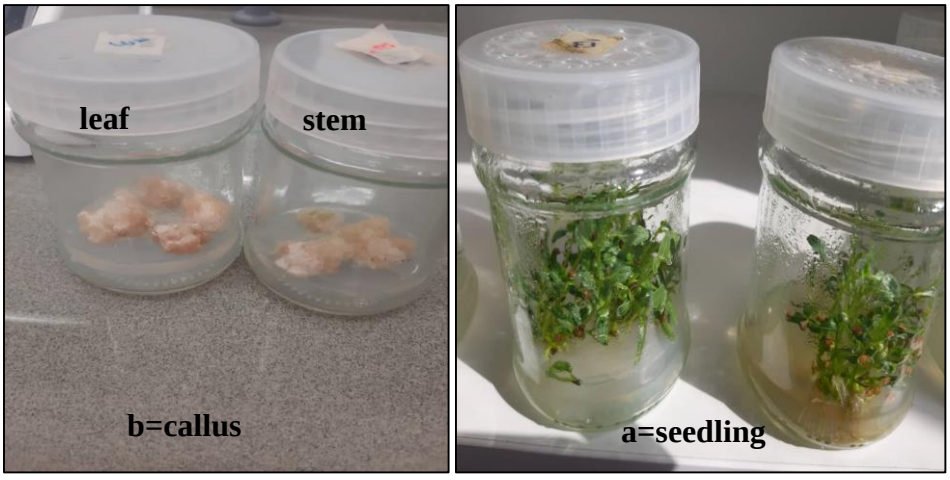
نمونه کنترل زیر لامپ فلورسنت به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از آن جذب محلول‌های واکنش با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یکی از محلول‌ها تحت تابش نور قرار داده نشده و به‌عنوان شاهد بود. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، میزان آنزیمی است که می‌تواند تا ۵۰٪ از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (Nitro-Blue-Tetrazolium Chloride) جلوگیری کند. میزان اختلاف جذب نمونه و کنترل در ۵۶۰ نانومتر، بیانگر مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در نمونه می‌باشد. براساس این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها اندازه‌گیری شده و فعالیت ویژه آنزیم برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) محاسبه شد (Giannopolities & Ries, 1977).

تجزیه‌وتحلیل آماری

آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل تیمار ۱: شاهد (فاقد الیسیتور سلولاز)؛ تیمار ۲، ۳ و ۴ شامل: اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز نوزدهم؛ غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه به‌ترتیب ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اضافه کردن الیسیتور؛ تیمار ۵ و ۶ شامل: اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز هشتم و غلظت‌های به‌ترتیب ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نیز زمان برداشت نمونه‌ها روز بیست و دوم بود. ابتدا داده‌ها و بعد خطاها از نظر نرمال بودن با نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۸ بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. رسم نمودارها با اکسل نسخه ۲۰۱۳ انجام گردید.

نتایج

ریزنمونه‌های برگ و ساقه بعد از سه هفته به‌منظور تولید کالوس مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱– a). میزان کالوس تولید شده در هر دو نوع ریزنمونه از نظر ظاهری و نیز میزان بیوماس یکسان بود (شکل ۱– b). کالوس‌های تولیدی برای کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شدند.



شکل ۱– a: گیاهچه‌های تولید شده بعد از ۳ هفته کشت بذور گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) در محیط ½MS و b: کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های برگ و ساقه گیاه پنیرباد در محیط MS محتوی اکسین و سیتوکنین

Figure 1. a: Seedlings produced after three weeks of *Withania coagulans* seeds cultivation in ½MS, and b: calli produced from *W. coagulans* leaf and stem explants in MS contained auxin and cytokinin

تجزیه واریانس شاخص رشد کالوس، آلکالوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اثر تیمار الیسیتور بر روی کلیه صفات معنی‌دار بود (جدول ۱) که نشان‌دهنده این است که این صفات واکنش‌های متفاوتی به تیمارهای مختلف الیسیتور داده‌اند.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر الیسیتور سلولاز بر شاخص رشد و برخی صفات فیتوشیمیایی کالوس گیاه پنیرباد (***Withania coagulans***)

Table 1. ANOVA of cellulase elicitor effects on growth index and some phytochemical characteristics of *Withania coagulans* callus

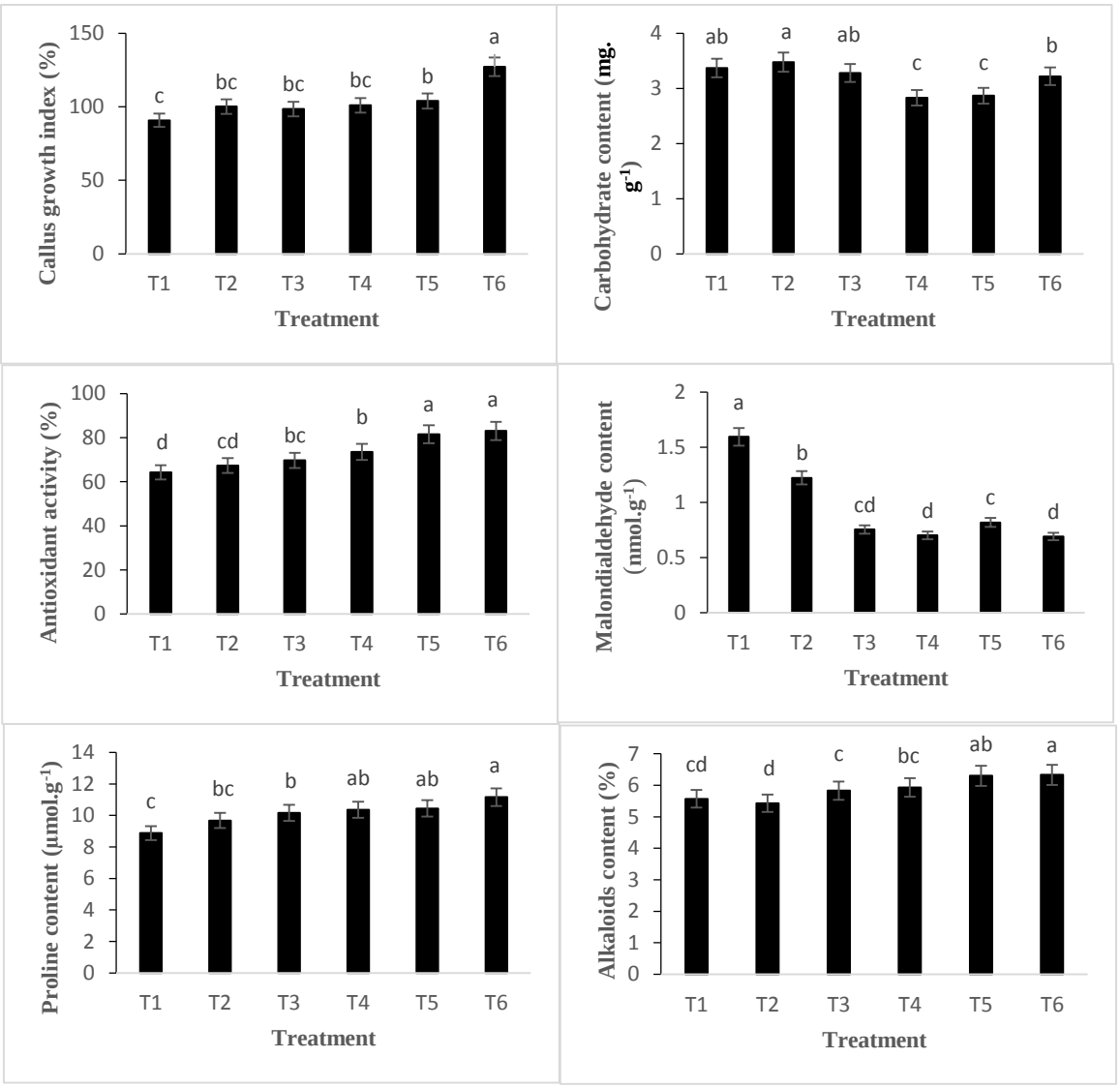
S.O.V.	d.f.	M.S.					
		Callus growth index	Total Alkaloids	Antioxidant activity	Proline content	Carbohydrate content	Malondialdehyde content
Cellulase elicitor	5	461.6**	0.374**	175.2**	1.78**	0.216**	0.405**
Experimental error	12	39.5	0.048	7.09	0.307	0.014	0.004
C.V. (%)	-	6.06	3.69	3.64	5.48	3.72	6.45

**: Sinificant at 1% probability level.

بیشترین شاخص رشد کالوس در تیماری که غلظت الیسیتور سلولاز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و سلول‌ها در دوره زمانی طولانی‌تری (۱۴ روز) در معرض الیسیتور بودند (تیمار ششم)، بدست آمد. در این تیمار میزان شاخص رشد کالوس نسبت به کنترل ۲۸/۷٪ افزایش داشت که تأثیر مثبت الیسیتور را بر روی رشد کالوس نشان داد. کمترین شاخص رشد کالوس در نمونه شاهد (تیمار اول) مشاهده شد (شکل ۲- A). بیشترین محتوای کربوهیدرات در تیمارهای دوم، اول (شاهد) و سوم (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر الیسیتور سلولاز و مدت ۴۸ ساعت قرارگیری در معرض الیسیتور) به‌ترتیب با مقادیر ۳/۴۸، ۳/۳۷ و ۳/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. میزان کاهش محتوای کربوهیدرات تحت تیمارهای چهارم، پنجم، ششم و سوم به‌ترتیب ۱۶/۰۲، ۱۴/۸۴، ۴/۱۵ و ۲/۶۷ درصد نسبت به شاهد بود (شکل ۲- B). همه تیمارهای الیسیتور سلولاز منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های پنیر باد در کشت سوسپانسیون سلولی شد. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای ششم (با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۴ روز در معرض الیسیتور بودن) و پنجم الیسیتور (با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۴ روز در معرض الیسیتور بودن) و کمترین آن در تیمارهای دوم (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ روز در معرض الیسیتور بودن) و اول (کنترل) مشاهده شد. تیمارهای سوم (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲ روز در معرض الیسیتور بودن) و چهارم (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳ روز در معرض الیسیتور بودن) در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۲- C). میزان افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای ششم، پنجم، چهارم، سوم و دوم به‌ترتیب ۲۲/۶۱، ۲۱/۱۰، ۱۲/۵۲، ۷/۷۴ و ۴/۵۶ درصد در مقایسه با نمونه شاهد بود. برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء از مقدار محتوای مالون دی آلدهید (MDA) استفاده شد. در این مطالعه کمترین محتوای مالون دی آلدهید در تیمارهای الیسیتور با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دوره ۱۴ روزه قرار گرفتن در معرض الیسیتور (تیمار ششم)، با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دوره ۳ روزه قرار گرفتن در معرض الیسیتور (تیمار چهارم) و با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دوره ۲ روزه قرار گرفتن در معرض الیسیتور (تیمار سوم) مشاهده شد (شکل ۲- D). به‌طور کلی در همه تیمارهای الیسیتور افزایش محتوای پرولین مشاهده گردید. بیشترین مقادیر آن در تیمارهای ششم (با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر الیسیتور سلولاز و مدت ۱۴ روز قرارگیری در معرض الیسیتور)، پنجم (با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر الیسیتور سلولاز و

مدت ۱۴ روز قرارگیری در معرض الیسیتور) و چهارم (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر الیسیتور سلولاز و مدت ۳ روز قرارگیری در معرض الیسیتور) بود. کمترین مقدار آن در نمونه شاهد بدست آمد. تیمارهای ششم، پنجم، چهارم، سوم و دوم به‌ترتیب منجر به افزایش محتوای پرولین به میزان ۲۰/۴، ۱۵/۱، ۱۴/۱، ۱۲/۷ و ۸/۳ درصد نسبت به شاهد شد (شکل ۲– E).

بیشترین مقادیر محتوای آلکالوئید کل در این تحقیق در تیمارهای ششم و پنجم به‌ترتیب با مقدار ۶/۳۳٪ و ۶/۳۰٪ بدست آمد. کمترین آن در تیمارهای دوم و اول به‌ترتیب با مقادیر ۵/۴۳٪ و ۵/۶۷٪ مشاهده شد (شکل ۲– F). مقدار افزایش آلکالوئید کل تحت تیمارهای ششم، پنجم، چهارم و سوم به‌ترتیب ۱۰/۴۳، ۱۰/۰۰، ۴/۳۸ و ۲/۷۴ درصد در مقایسه با نمونه شاهد بود.



شکل ۲– مقایسه میانگین تأثیر الیسیتور سلولاز بر شاخص رشد و برخی صفات فیتوشیمیایی کالوس گیاه پنیرباد (***Withania coagulans***)

Figure 2. Means comparison of cellulase elicitor effects on growth index and some phytochemical characteristics of *Withania coagulans* callus

T1: control (without elicitor), T2: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 24 h, T3: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 48 h, T4: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 72 h, T5: 7.5 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 14 days, and T6: 10 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 14 days.

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

تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

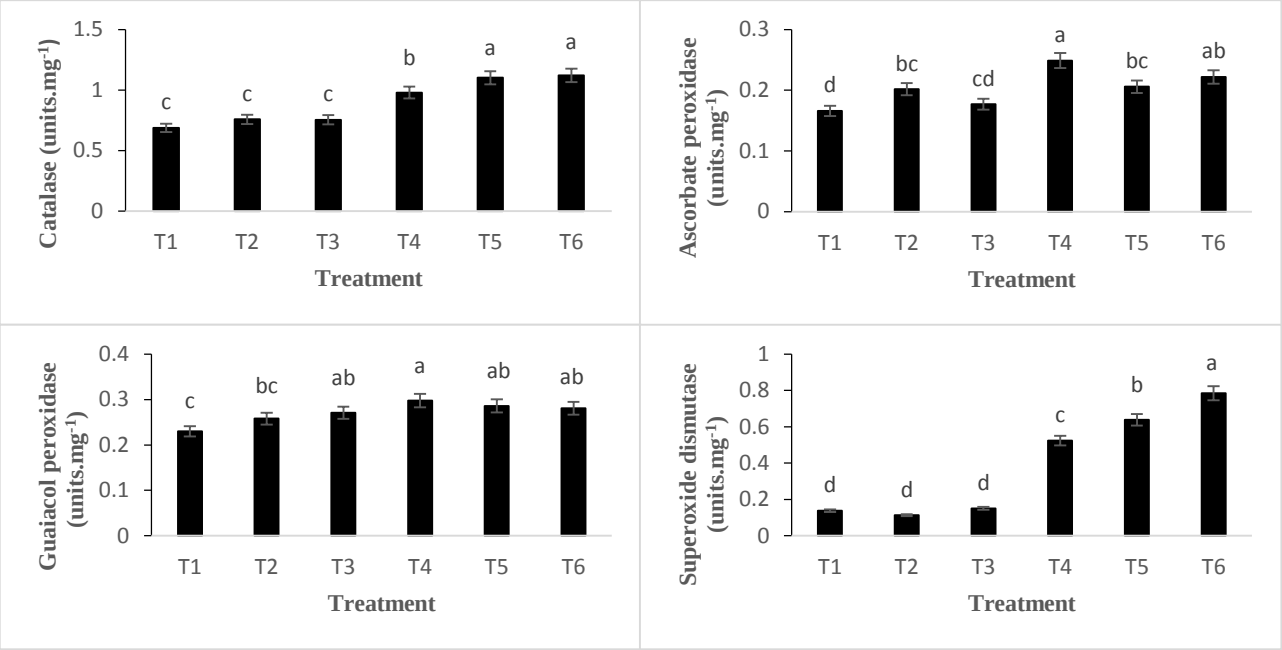
تیمار الیسیتور اثر معنی‌داری بر روی کلیه فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده به‌غیر از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز داشت (جدول ۲). به‌طور کلی استفاده از الیسیتور سلولاز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کشت‌های سوسپانسیون سلولی شد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای ششم و پنجم و کمترین فعالیت آن در تیمارهای اول، دوم و سوم مشاهده شد. تیمار چهارم در گروه دوم قرار گرفت. میزان افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای ششم، پنجم و چهارم به‌ترتیب ۳۸/۷، ۳۷/۶ و ۲۹/۸ درصد نسبت به نمونه شاهد بود (شکل ۳- A). بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای چهارم و ششم و کمترین فعالیت آن در تیمارهای اول و سوم مشاهده شد. تیمارهای پنجم و دوم از نظر فعالیت این آنزیم در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۲- B). نتایج نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در تیمار با دوره زمانی کمتر در معرض الیسیتور با افزایش غلظت الیسیتور جبران شد. بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمارهای چهارم، پنجم، ششم و سوم و کمترین آن در تیمارهای دوم و یکم بدست آمد (شکل ۳- C). بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار ششم الیسیتور (اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز هشتم، غلظت آن ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه روز بیست و دوم) و کمترین فعالیت آن در تیمار اول (شاهد)، تیمار دوم (اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز نوزدهم، غلظت آن ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن الیسیتور) و تیمار سوم (اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز نوزدهم، غلظت آن ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن الیسیتور) بدست آمد. تیمار پنجم (اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز هشتم، غلظت آن ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه روز بیست و دوم) و تیمار چهارم (اضافه کردن الیسیتور سلولاز به سوسپانسیون سلولی روز نوزدهم، غلظت آن ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان برداشت نمونه ۷۲ ساعت بعد از اضافه کردن الیسیتور) به‌ترتیب در گروه‌های دوم و سوم قرار گرفتند (شکل ۳- D). نتایج این تحقیق نشان داد که هر چه دوره قرارگیری سلول‌ها در معرض الیسیتور بیشتر باشد، فعالیت این آنزیم بیشتر افزایش می‌یابد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر الیسیتور سلولاز بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*)

Table 2. ANOVA of cellulase elicitor effects on antioxidant enzymes of *Withania coagulans* calli

		M.S.				
S.O.V.	**d.f.**	**CAT**	**A.P.O**	**G.P.O**	**S.O.D**	**P.P.O**
Cellulase elicitor	5	0.109**	0.003**	0.002**	0.260**	0.0002n.s.
Experimental error	12	0.002	0.0003	0.0003	0.0009	0.0001
C.V. (%)	-	4.34	8.78	6.74	7.50	8.51

n.s. and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively; CAT: Catalase, A.P.O: Ascorbate peroxidase, G.P.O: guaiacol peroxidase, S.O.D: Superoxide dismutase, P.P.O: polyphenol oxidase



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر الیسیتور سلولاز بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه پنیرباد (***Withania coagulans***)

Figure 3. Means comparison of cellulase elicitor effects on antioxidant enzymes of *Withania coagulans* calli
T1: control (without elicitor), T2: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 24 h, T3: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 48 h, T4: 200 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 72 h, T5: 7.5 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 14 days, and T6: 10 µg.mL^{-1} cellulase elicitor for 14 days.
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

بحث

توسعه و استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژیکی اخیر برای حفاظت و بهبود گونه‌های مهم گیاهان دارویی، به‌ویژه زمانی که منابع ژنتیکی به سرعت در حال از بین رفتن در محیط طبیعی هستند، ضروریست. گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که کشت گیاهان دارویی با ارزش، بعد جدیدی در زمینه بیوتکنولوژی گیاهی ایجاد کرده است (Supe *et al.*, 2011). اخیراً، تکنیک‌های مختلف کشت درون شیشه (in vitro) باعث حفاظت و تکثیر، افزایش تولید پایدار و سودآوری شده است و به‌طور مؤثر برای تکثیر سریع گیاهان دارویی با خصوصیات اصلاح شده از نظر خاصیت دارویی برای سلامتی انسان و افزایش تعداد ژرم‌پلاسم‌های مطلوب برای به‌نژادگرهای گیاهی بهره‌برداری شده‌اند. برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های بافت گیاهی، راهبردهای تحریک و فرایندهای متنوعی اعمال شده است. تیمار سلول‌های گیاهی با تحریک‌کننده‌های زنده و غیرزنده، یکی از مؤثرترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت‌های ریشه مویی و کشت‌های سوسپانسیون سلولی بوده است (Wang & Wu, 2013).

در مطالعه‌ای که غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و دوره‌های زمانی مختلف (۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت) در معرض تحریک‌کننده، در گیاه پنیر باد انجام شده بود، افزایش تولید بیوماس در غلظت ۱۵۰ میکرومولار و ۴ ساعت در معرض قرارگیری مشاهده شده بود که با نتایج این تحقیق مبنی بر تولید بیوماس مطابقت دارد (Sivanandhan *et al.*, 2013b). در مطالعه Maurya و همکاران (۲۰۱۹) با غلظت‌های مختلف الیسیتور سالیسیلیک اسید (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در گیاه پنیر باد، افزایش بیوماس کل (از ۱۲/۵٪ تا ۵۰٪) را تحت همه تیمارها گزارش کردند. آنان همچنین بیان کردند که سالیسیلیک اسید عملکردهای فیزیولوژی گیاه را برای بهبود رشد تنظیم می‌کند. در کشت سوسپانسیون سلولی نخل خرما تیمار شده با تحریک‌کننده‌های مختلف مانند عصاره مخمر، پکتین،

سالیسیلیک اسید، کلرید کادمیوم و نیترات نقره با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای هر تحریک‌کننده، با افزایش غلظت، کاهش وزن تر و خشک، بجز برای کشت سلولی تیمار شده با عصاره مخمر مشاهده شد. در میان تیمارهای مختلف، تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به‌عنوان تیمار امیدوارکننده‌ای برای القای افزایش وزن تر و خشک بود (Al-Khayri & Naik, 2020).

همچنین محققان در مطالعه‌ای دیگر دریافتند که غلظت تحریک‌کننده، مدت زمان در معرض قرار گرفتن با آن، شرایط کشت و مرحله رشدی سلول‌های کشت شده در فرایند استفاده از تحریک‌کننده مهم هستند (Vasconsuelo & Boland, 2007). در این مطالعه افزودن تحریک‌کننده در اوایل مرحله رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی (روز هشتم) با وجود غلظت‌های پایین‌تر تحریک‌کننده (۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منجر به افزایش بیشتر رشد کالوس نسبت به اضافه کردن تحریک‌کننده در مرحله فاز نمایی رشد (روز نوزدهم: زمانی که رشد سلول‌ها به مرحله بیشینه می‌رسد و بعد از آن افزایش رشد و متابولیت ثانویه کاهش می‌یابد) با وجود غلظت بالای الیسیتور (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شد. گزارش شده است که غلظت‌های مختلف تحریک‌کننده نقش مهمی در رشد سلول ایفاء می‌کند، اما غلظت بالاتر باعث ایجاد پاسخ حساسیت بیش از حد می‌شود که منجر به مرگ سلولی می‌گردد و ازاین‌رو سطح بهینه‌ای از تحریک‌کننده برای القای رشد مورد نیاز است (Naik & Al-Khayri, 2016). در این مطالعه نیز ممکن است غلظت بالای تحریک‌کننده (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، به دلیل پاسخ حساسیت بیش از حد، منجر به کاهش رشد نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن (۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شده باشد.

Lahuta و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که حضور الیسیتور متیل جاسمونات سبب کاهش کربوهیدرات‌های محلول در گیاه تریتیکاله شده که با نتایج این تحقیق مبنی بر تأثیر تحریک‌کننده سلولاز بر روی میزان کربوهیدرات مطابقت دارد. آنان علت کاهش کربوهیدرات را وجود تحریک‌کننده ذکر کردند که باعث کاهش فعالیت آلفا-آمیلاز شده که از تخریب نشاسته جلوگیری می‌کند. همچنین Yu و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده کردند که الیسیتور سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری متابولیسم گلوکز را در سلول‌های سوسپانسیون *Salvia miltiorrhiza* القاء کرد و میانگین محتوای گلوکز، فروکتوز و مانوز در سلول‌های القاء شده به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. آنان بیان کردند که این کاهش ممکن است ناشی از سه فاکتور باشد. اول اینکه، متابولیسم کربوهیدرات به‌عنوان یکی از متابولیسم‌های اساسی در گیاهان، در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مهم مانند فتوسنتز و تنفس نقش دارد. دوم، افزایش محتوای کربوهیدرات در گیاهان بر تنظیم اسمزی سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. به‌طوری که بسیاری از کربوهیدرات‌ها مواد سیگنالی برای سازگاری گیاهان با محیط هستند. در نهایت، در طی کشت سلولی سوسپانسیون، ساکارز تنها منبع انرژی و کربن برای رشد سلول است، یعنی انرژی و کربن مورد نیاز برای فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها مانند میتوز و رشد طبیعی آنها عمدتاً از طریق گلیکولیز فراهم می‌شود. در این تحقیق نیز کاهش محتوای کربوهیدرات‌ها در کشت‌های حاوی تحریک‌کننده ممکن است به دلیل افزایش رشد سلول‌ها در این شرایط باشد که منجر به مصرف آنها به‌عنوان انرژی و کربن می‌شود و مقدار آنها نسبت به کنترل کاهش می‌یابد.

تجمع اسمولیت پرولین یک واکنش سازگاری است که بقای گیاهان را در شرایط مختلف تنظیم می‌کند. پرولین همچنین به‌طور بالقوه در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROSs)، محافظت از غشاءهای بیولوژیکی با حفظ ظرفیت یونی و اسمزی و تثبیت پروتئین‌ها یا آنزیم‌ها نقش دارد (Maurya *et al.*, 2019). مشابه با نتایج این تحقیق Nazar و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که تجمع پرولین به‌طور قابل توجهی با استفاده از تحریک‌کننده سالیسیلیک اسید در گیاه خردل افزایش یافت. آنان همچنین بیان کردند که تجمع پرولین یک شاخص تحمل به تنش است که با تثبیت ساختار پروتئین‌هایی مانند روبیسکو از ساختارهای غشایی آنزیم‌ها

محافظت می‌کند. در مطالعه دیگری افزایش محتوای پرولین تحت تیمار تحریک‌کننده سالیسیلیک اسید در گیاه پنیر باد گزارش شد (Maurya *et al*., 2019). البته افزایش پرولین با تیمار محرک کیتوزان در گیاه *Thymus daenensis* (Emami Bistgani *et al*., 2017)، گیاه *Salvia abrotanoides* (Kar.) (Attaran Dowom *et al*., 2022) نیز مشاهده شده است. Attaran Dowom و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که مقدار پرولین بالاتر ناشی از استفاده از کیتوزان‌ها ممکن است به دلیل کاهش اکسیداسیون پرولین به گلوتامات، افزایش گردش پروتئین یا کاهش مصرف پروتئین باشد. علاوه بر این، کیتوزان‌ها ژن‌های بیوسنتز پرولین را فعال می‌کنند که باعث تولید پرولین از گلوتامات می‌شوند.

با بررسی تأثیر تحریک‌کننده‌های مختلف بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه *Nasturtium officinale* (علف چشمه) مشاهده گردید که محرک‌ها منجر به افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها شد و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بعد از ۲۴ ساعت تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار حاصل شد (Klimek-Szczykutowicz *et al*., 2022) که با نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نتیجه کاربرد محرک قارچی سلولاز مطابقت دارد. در این تحقیق تیمارهایی که حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر و نیز پرولین و آلکالوئید بیشتری بودند، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشتند که نشان می‌دهد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه پنیر باد مربوط به محتوای متابولیت‌های این گیاه مانند پرولین و آلکالوئید کل نیز می‌باشد.

در مطالعه دیگری با بررسی غلظت‌های مختلف الیسیتور سالیسیلیک اسید (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در کشت بافت گیاهچه‌های پنیر باد (*Withania coagulans*) مشخص شد که کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید منجر به افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه شامل فنول، پرولین و آنتوسیانین شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که الیسیتورهای خارجی سالیسیلیک اسید، سطح mRNA ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی متابولیت ثانویه را تنظیم می‌کند و باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه، کارایی فتوسنتزی، بهبود رشد گیاه و افزایش بیوماس گیاهی در کشت بافت گیاهچه‌های پنیر باد می‌شود (Maurya *et al*., 2019). در این تحقیق نیز تیمارهایی که بیشترین محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند، شاخص رشد بهتری نیز در آنها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که الیسیتور سلولاز ممکن است از طریق تحریک سازوکارهای دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه منجر به بهبود پاسخ سلول‌ها به تنش اکسیداتیو ایجاد شده از محرک قارچی سلولاز شود و رشد سلول‌ها را بهبود ببخشد.

با مطالعه تأثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم با غلظت‌های ۲۰۰-۵۰ میکرومولار در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Sccrophularia kakudensis* Franch مشاهده شده بود که کشت‌های سلولی تیمار شده با الیسیتورها شامل مقادیر بیشتری از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با کشت‌های شاهد بوده و محرک متیل جاسمونات به‌ویژه در غلظت ۲۰۰ میکرومولار، فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را به میزان زیادی در مقایسه با سایر تحریک‌کننده‌ها افزایش داده بود (Manivannan *et al*., 2016). Simic و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه تحریک‌کننده‌های پلی‌ساکارید مانند پکتین و کیتین در کشت‌های برگ و شاخه گیاه گل‌راعی (*Hypericum perforatum*) گزارش کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز در کشت‌های برگ و شاخه تحت تیمار پکتین در طول کل دوره پس از افزودن الیسیتور به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که کشت‌های تیمار شده با محرک کیتین افزایش فعالیت پراکسیداز را در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از اضافه کردن الیسیتور نسبت به نمونه شاهد نشان دادند. همچنین آنان بیان کردند که استفاده از هر دو عامل محرک پکتین و کیتین بیشترین افزایش فعالیت پراکسیداز را در روز ۱۴ در حدود ۲ برابر نسبت به نمونه شاهد داشتند. به‌طور کلی افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز در گیاه مرزه

(*Satureja khuzistanica* Jamzad) تحت الیسیتور سالیسیلیک اسید (Sadeghian *et al*., 2013) و در گیاه مریم‌گلی (*Salvia abrotanoides* (Kar.) تحت الیسیتور کیتوزان (Attaran Dowom *et al*., 2022) مشابه با نتایج این تحقیق مشاهده شده است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که نتایج بررسی گیاه پنیر باد تحت شش تیمار محرک قارچی سلولاز (۱: کنترل، ۲: الیسیتور با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر و ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض الیسیتور، ۳: الیسیتور با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر و ۴۸ ساعت قرارگیری در معرض الیسیتور، ۴: الیسیتور با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر و ۷۲ ساعت قرارگیری در معرض الیسیتور، ۵: الیسیتور با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر لیتر و ۱۴ روز قرارگیری در معرض الیسیتور و ۶: الیسیتور با غلظت ۱۰ میکروگرم بر لیتر و ۱۴روز قرارگیری در معرض الیسیتور) در کشت سوسپانسیون سلولی نشان داد که همه صفات فیزیولوژی (محتوای پرولین و کربوهیدرات، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء) تحت تأثیر این محرک قارچی قرار گرفتند. صفات مختلف واکنش‌های متفاوتی به تیمارهای مختلف محرک نشان دادند، اما به‌طور کلی تیمار محرک قارچی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و اضافه کردن محرک در روز هشتم به کشت سوسپانسیون سلولی (۱۴ روز قرارگیری در معرض الیسیتور) اثر بهتری بر روی صفات فیزیولوژی و بیوشیمیایی و افزایش شاخص رشد کالوس داشت. بنابراین از محرک قارچی سلولاز به‌عنوان یک تحریک‌کننده افزایش رشد و خاصیت دارویی گیاه پنیر باد برای تولید تجاری آن می‌توان استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشگاه زابل به‌دلیل تهیه منابع مالی این مقاله (از گرنت به شماره UOZ-1882) تشکر و قدردانی لازم را دارند.

References

- Abdel-Azeem, A.M., Abdel-Azeem, M.A. and Khalil, W.F., 2019. Endophytic fungi as a new source of antirheumatoid metabolites: 355-384. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Diseases, 2nd ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA 628p.
- Ahlawat, S., Saxena, P., Ali, A., Khan, Sh. and Abdin, M.Z., 2017. Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. Plant Physiology and Biochemistry, 114: 19-28.
- Al-Khayri, J.M. and Naik, P.M., 2020. Elicitor-induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of data palm (*phoenix dactylifera* L.). Molecules, 25: 4669.
- Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2005. Differential responses of anti-oxidant enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* C.A. Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. Plant Science, 169: 83-192.
- Ang, L.Z.P., Hashim, R., Sulaiman, S.F., Coulibaly, A.Y., Sulaiman, O., Kawamura, F. and Salleh, K.M., 2015. In vitro antioxidant and antidiabetic activities of *Gluta torquata*. Industrial Crops and Products, 76: 755-760.
- Attaran Dowom, S., Karimian, Z., Mostafaei Dehnavi, M. and Samiei, L., 2022. Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress. Plant Biology, 22: 364.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Tear, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.
- Beers, G.R. and Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Biological Chemistry, 195(1): 133-140.
- Boller, T., 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annual Review in Plant Biology, 46: 189-214.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.
- Christen, A., Gibson, D. and Bland, T., 1991.

Production of Taxol or Taxol-Like Compounds in cell Culture. US Patent 5019504A, 28 May.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Gasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. The crop Journal, 5: 407-415
- Fielding, J.L. and Hall. J., 1978. A biochemical and cytochemical Study of peroxidase activity in root pea. Journal of Experimental Botany, 29: 98-989.
- Ghorbani Ghoochani, H., 2014. An Introduction to Medicinal, Aromatic, and Spice Plants. Shahroud University of Technology Press, 512p.
- Giannopolities, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59: 309-314.
- Heath, R.L. and Paker, L., 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biophysics, 125: 189-198.
- Jain, R., Sumita, K. and Kothari, L., 2012. Phytochemistry, pharmacology, and biotechnology of *Withania somnifera* (L.) Dunnal. Grown in Sri Lanka. Pakistan Journal of Biological Science, 16: 141-144.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. and Nicolas, J.J., 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxadase. Journal of Agricultural Food Chemistry, 38: 926-931.
- Kaul, S., Ahmed, M., Sharma, T. and Dhar, M.K., 2014. Unlocking the myriad benefits of endophytes: An overview. 41-57, In: Kharwar, R.N., Upadhyay, R., Dubey, N. and Raghuwanshi, R. (Eds.), Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security; Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 610p.
- Klimek-Szczykutowicz, M., Dziurka, M., Blažević, I., Đulović, A., Apola, A., Ekiert, H and Szopa, A., 2022. Impacts of elicitors on metabolite production and on antioxidant potential and tyrosinase inhibition in watercress microshoot cultures. Applied Microbiology Biotechnology, 106(2): 619-633.
- Lahuta, L.B., Zalewski, K., Glowacka, K., Nikiewicz, B. and Amarowicz, R., 2017. Effect of methyl jasmonate on carbohydrate composition, α-amylase activity and growth of triticale (*Triticosecale witmmack*) seedlings. Journal of Agricultural Science and technology, 19: 1127-1137.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y.G. and Jeong, B.R., 2016. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. International Journal of Molecular Science, 17(399): 1-13.
- Marero, L.M., Jin, J.H., Shin, J.H., Lee, H.J., Chung, I.S. and Lee, H.J., 1997. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. Enzym Microbiology Technolology, 21: 97-101.
- Maurya, B., Rai, K.K., Pandey, N., Sharma, L., Goswami, N.K. and Rai, S.P., 2019. Influence of salicylic acid elicitation on secondary metabolites and biomass production in-vitro cultured *Withania coagulans* (L.) Dunal. Plant Archives, 19(1): 1308-1316.
- Mirjalili, M.H., Fakhr-Tabatabaei, S.M., Bonfill, M., Alizadeh, H., Cusido, R.M., ghassempour, A.R. and Palazon, J., 2009. Morphology and withanolide production of *Withnia coagulans* hairy root cultures. England Life Science, 9(3): 197-204.
- Nafie, E., Hathout, T. and Al Mokadem, A.Sh., 2011. Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. Brazilian Society of Plant Physiology, 23(2): 161-174.
- Namdeo, A., Patil, S. and Fulzele, D.P., 2002. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology Progress, 18: 159-162.
- Naik, P.M. and Al-Khayri, J.M., 2016. Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. 247-277. In: Schenker, A.K. and Shankar, C. (Eds.), Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent advances and future perspectives, IntechOpen, Rijeka, Croatia, 768p.
- Nazar, R., Umar, S., Khan, N.A. and Sareer, O., 2015. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes accumulation and ethylene formation under drought stress. Sought African Journal of botany, 98: 84-94.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101-153.
- Sadeghian, F., Hadian, J., Hadavi, M., Mohamadi, A., Ghorbanpour, M. and Ghafarzadegan, R., 2013. Effect of exogenous salisylic acid application on growth, metabolic activities and essential oil composition of *Satureja khuzistanica* Jamzad. Journal of Medicinal Plants, 12: 70-82.
- Sheligl, H.Q., 1986. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta Journal, 47-51.

- Simic, S.G., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C. and Hagege, D., 2014. Effects of polysaccharide elisitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. The Sientific World Journal, ID 609649: 1-10.
- Srivastava, M., Singh, G., Sharma, S., Shukla, S. and Misra, P., 2019. Elicitation enhanced the yield of glycyrrhizin and antioxidant activities in hairy Root cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. Journal of Plant Growth Regulation, 38: 373-384.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T.S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, 2012. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withnia somnifera* (L.) Dunal. Industrial Crops and Products, 37: 124-129.
- Sivanandhan, G., Kapil Dev, G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Muthuselvam, M., Selvaraj, N., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A., 2013a. A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Protoplasma, 250(4): 885-898.
- Sivanandhan, G., Dev, G.K., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M. Manickavasagam, M. Selvaraj, N. and Canapathi, A., 2013b. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withnia somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 114: 121-129.
- Strobel, G.A., Stierle, A. and van Kuijk, F.J.G.M., 1992. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia*. Plant Science, 84(1): 65-74.
- Supe, U., Dhote, F. and Royman, M.G., 2011. A review on micro propagation of *Withania somnifera* a medicinal plant. Journal of Agricultural Technology, 7: 1475-1483.
- Valizadeh, J. and Valizadeh, M., 2011. Development of efficient micropropagation protocol for *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. African Journal of Biotechnology, 10(39): 7611-7616.
- Vasconsuelo, A. and Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172: 861-875.
- Verma, A., Ahlawat, S., Kumar Jha, A. and Abdin, M.Z., 2017. Optimization of physiochemical parameters for the production of withaferin A employing cell suspension culture of *Withania somnifera*: A review. Journal of Pharmacy Research, 11(4): 267-271.
- Wang, J.W. and Wu, J.Y., 2013. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. Advances in Biochnology Engineering/Biotechnology, 134: 55-89.
- Woo, W.S., Chi, H.J., Yun, S. and Hye, S., 1977. Alkaloid screening of some Saudi Arabian plants. Saengya Khakhoe Chi (Hanguk Saengya Khakhoe), 8: 109-113.
- Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S., 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 123: 223-233.
- Yu, Y., Wang, T., Wu, Y., Zhou, Y., Jiang, Y. and Zhang, L., 2019. Effect of elicitors on the metabolites in the suspension cell culture of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Physiology and Molecular Biology of Plants, 25: 229-242.
- Zahedzadeh, F., Mahna, N., kakavand, F., Zare Nahandi, F and panahandeh, G., 2013. Effect of carbohydrate concentration and source on in vitro production of anthocyanin in apple. Journal of Agriculture of Biotechnology, 5(4): 37-48.