مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰

اثر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت سلولی سیاه‌دانه (*Nigella sativa*)

سحر ابراهیم‌زاده .M.Sc، فروغ سنجریان .Ph.D*

- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فراورده های گیاهی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: fsanjarian@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۱

چکیده

هدف: هدف این مطالعه القای کالوس و تولید سوسپانسیون سلولی از گیاه دارویی شناخته شده سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) و به‌دنبال آن تاثیر الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات برروی مقدار و توان آنتی اکسیدانت‌های آن بود.

مواد و روش‌ها: از برگ‌های لپه‌ای گیاه، کالوس تهیه شد. سپس استقرار کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از کالوس مناسب، انجام شد. سلول‌ها تحت تیمار با الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات قرار گرفتند و محتوی فنل کل و کارتنوئیدها در آن‌ها سنجش شد. توان آنتی‌اکسیدانتی باروش FRAP اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که تیمارها تاثیر معنی‌داری بر وزن‌تر کالوس ندارند اما وزن خشک کالوس تیمارشده با سالیسیلیک‌اسید به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بیش‌ترین مقدار محتوی فنل کل در کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی در تیمار با سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد. تیمار سوسپانسیون سلولی با هر دو الیسیتور باعث افزایش معنی‌دار مقدار فلاونوئیدها شد. توان آنتی‌اکسیدانتی سوسپانسیون سلولی نیز در تیمارها افزایش معنی‌داری یافت که این افزایش در تیمار متیل‌جاسمونات کم‌تر بود.

نتیجه‌گیری: باتوجه به‌نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد الیسیتور سالیسیلیک‌اسید در سوسپانسیون سلولی سیاه‌دانه باعث القای بیش‌تر پاسخ نسبت به الیسیتور متیل‌جاسمونات شده و در نتیجه باعث القای بیش‌تر خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌شود.

واژگان کلیدی: سیاه‌دانه، کشت سلول، الیسیتور، آنتی‌اکسیدانت

مقدمه

بشر از سالیان دور از گیاهان در ساخت داورهای سنتی استفاده کرده است. امروزه نیز گیاهان منبع اصلی برخی داروهای پیشرفته هستند. براساس اعلام سازمان جهانی بهداشت بیش از سه چهارم جوامع در کشورهای توسعه نیافته به‌دلیل عدم دسترسی یا عدم تامین هزینه داروهای الوپاتیک جهت درمان ومراقبت‌های اولیه بهداشتی به گیاهان دارویی تکیه می‌کنند (۱). در دهه‌های اخیر تقاضا برای استفاده از گیاهان دارویی در اروپا، آمریکای شمالی و آسیا نیز سالیانه ۸ تا ۱۵درصد افزایش یافته (۲) که معمولا به‌دلیل بی‌اعتمادی به داروهای شیمیایی و بازگشت به منابع طبیعی است. افزایش تقاضا برای گیاهان دارویی باعث رونق بازار این محصولات شده است اما از طرف دیگر چالش‌هایی را برای دولت و صنایع در جهت اطمینان از تامین مداوم مواد اولیه گیاهی استاندارد ایجاد کرده است (۳). علاوه‌براین، کشت گیاهان دارویی نیز با محدودیت‌هایی چون تنوع ژنتیکی، تاثیر شرایط محیطی، آلودگی با عوامل بیماری‌زا و دسترسی به زمین‌های قابل‌کشت مواجه است (۴). روش‌های جایگزین ازجمله انواع کشت سلول و بافت برای غلبه براین کاستی‌ها می‌توانند راه‌گشا باشند. کشت سلول و تولید کالوس روشی است که به‌طور مستقیم یا به‌عنوان روشی واسطه در تولید و افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بسیار استفاده شده است (۵). ازآن‌جاکه مقدار متابولیت تولیدی توسط کالوس اندک است، به‌طور معمول از الیستورها جهت افزایش تولید این مواد استفاده می‌شود (۶).

گیاه سیاه‌دانه، از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی، با نام علمی *Nigella sativa* L. از خانواده آلالگان (*Ranunculaceae*) است و ترکیبات فعال زیادی ازجمله آلکالوییدها، مواد معدنی، پروتیین‌ها و غیره از بذرهای این گیاه جداسازی و شناسایی شده‌اند. مهم‌ترین این مواد تایموکوییینون است که ازدسته کوییینون‌هاست (۷). این گیاه بومی نواحی غرب آسیا مدیترانه و خاورمیانه و هم‌چنین جنوب اروپا است. در فرهنگ بومی این نواحی بذر سیاه‌دانه از دیرباز به‌عنوان چاشنی برروی نان و شیرینی، ترشیجات، انواع سالاد و سس استفاده می‌شود (۸). روغن آن نیز در طب سنتی این نواحی بسیار شناخته شده‌است (۹). تحقیقات اخیر برروی این گیاه خواص ضدالتهاب (۱۰، ۱۱)، ضددیابت (۱۲)، ضداسپاسم (۱۳) و ضدسرطانی (۱۴-۱۶) آن را به‌اثبات رسانده است.

در این تحقیق، کالوس‌های القا شده از برگ‌های لپه‌ای گیاه سیاه‌دانه، برای استقرار سوسپانسیون سلولی استفاده شدند و در ادامه تاثیر الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر ترکیبات فنلی کل و خواص آنتی‌اکسیدانتی کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید کالوس: بذر *N. sativa* (IBRC P1006713) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای استریل کردن بذرها از محلول پنج درصد هیپوکلریت سدیم و یک‌دهم درصد تریتون استفاده شد. بذرهای استریل در محیط جامد Murashige and Skoog (MS) با غلظت یک‌دوم کشت شدند و ظروف در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، قرار گرفتند. به‌منظور تولید کالوس، ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای در محیط جامد MS حاوی (۱ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D و (۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) kinetin کشت شدند. کشت‌های القا و رشد کالوس در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند.

کالوس‌های القا شده جهت رشد به‌محیط MS دارای (۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D و (۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) kinetin منتقل شدند (۱۱). کالوس‌ها هر سه هفته یک‌بار واکشت شدند.

استقرار سوسپانسیون سلولی: جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از کالوس‌هایی با سن شش هفته استفاده شد. حدود دوونیم گرم از کالوس به‌ارلن (۲۵۰ میلی‌لیتر) دارای ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مشابه محیط رشد کالوس (محیط MS دارای (۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D و (۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) kinetin) اضافه شده و نمونه‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برروی شیکر با دور 100 rpm نگه‌داری شدند. پس از سه هفته سلول‌ها از صافی استریل عبور داده شده و در محیط مشابه محیط قبلی واکشت داده شدند.

اعمال تیمار: جهت اعمال تیمار مقادیر مساوی از وزن از کالوس به محیط مشابه محیط رشد (محیط MS دارای (۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D و (۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) kinetin) دارای سالیسیلیک‌اسید (با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و متیل‌جاسمونات (با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) واکشت شده و بعد از ده روز برداشت شدند. اعمال تیمار در سوسپانسیون سلولی بااضافه کردن سالیسیلیک‌اسید ۱۰۰ میکرومولار و متیل‌جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار به‌محیط کشت در هفته دوم از سومین واکشت انجام شد. سلول‌ها در شرایط محیطی قبلی به‌مدت یک هفته نگه‌داری شده و سپس برداشت شدند.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس: وزن‌تر کالوس بلافاصله پس از برداشت با ترازوی دیجیتال حساس اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از آن وزن خشک اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: نمونه از سوسپانسیون سلولی با رسوب‌دادن توسط سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در دور rpm ۴۵۰۰ به‌مدت پنج دقیقه جمع‌آوری شد. اندازه‌گیری H_2O_2 بااستفاده از روش Velikova و همکاران انجام شد (۱۷). به ۵۰۰ میکروگرم از رسوب حاصل، ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) سرد افزوده شد و در هاون چینی برروی یخ ساییده شد. سپس مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. برای اندازه‌گیری مقدار H_2O_2 در بافت به‌نیم میلی‌لیتر از محلول شناور حاصل، نیم میلی‌لیتر بافر پتاسیم‌فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH=7 و یک میلی‌لیتر یدیدپتاسیم (KI) ۱ مولار اضافه شد. درنهایت جذب نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومولار خوانده شد و با استفاده از منحنی استانداردی که با استفاده از H_2O_2 رسم شده بود مقدار آب اکسیژنه در بافت گیاهی محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانتی، نمونه‌های کالوس از پلیت جمع‌آوری شدند. نمونه‌های سوسپانسیون سلولی با سانتریفیوژ کردن سلول‌ها در rpm ۴۵۰۰ به‌مدت پنج دقیقه به‌دست آمد. نمونه‌ها در دمای اتاق خشک شدند. برای تهیه عصاره الکلی، ۴۵۰ میلی‌گرم از عصاره خشک پودر شده توسط هاون با پنج میلی‌لیتر متانول به‌خوبی مخلوط شده و به‌مدت یک شب برروی شیکر قرار گرفت، سپس با کاغذ صافی واتمن صاف شد (۱۸).

بررسی محتوای فنلی: میزان کل ترکیبات فنولی در عصاره الکلی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد و نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره بیان شد (۱۹). به‌طور خلاصه، در این روش ۶۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۴۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو و ۱۶۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط شد و پس بعد از پنج دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول بی‌کربنات‌سدیم بیست درصد به لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش ۹۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند. سپس جذب نوری آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL9500، ساخت انگلیس) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئیدها: از عصاره الکلی برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد (۱۸). برای این منظور به ۵۰۰ میکرولیتر عصاره الکلی به یک‌ونیم میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینویم‌کلرید ۱۰ درصد در اتانول و ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم استات اضافه شد و حجم با آب مقطر به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگاه‌داری

شد و سپس جذب نوری آن در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه و گزارش شد.

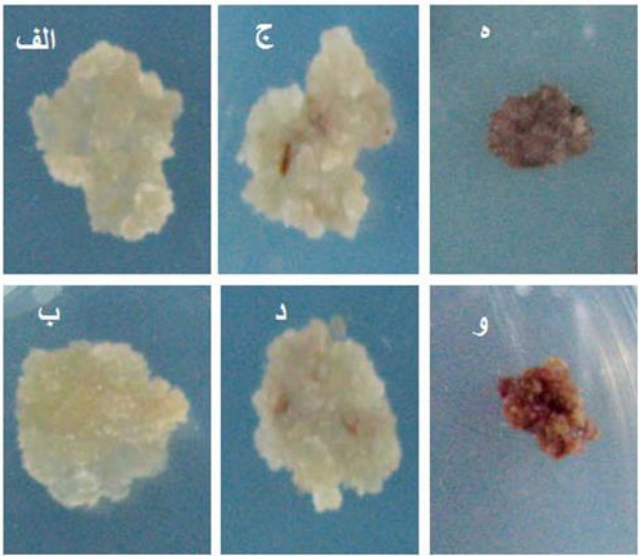
سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی به‌روش FRAP: برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی از معرف FRAP و روش Tomasina و همکاران (۲۰) استفاده شد. معرف FRAP با مخلوط کردن TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) حل شده در ۴۰میلی‌مولار HCl، بافر استات و $FeCl_3.6H_2O$ تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دو میلی‌لیتر معرف اضافه شده و ده دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومولار خوانده شد.

آنالیز آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با حداقل سه تکرار از سه نمونه مستقل انجام شد. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS ver16 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج

از برگ‌های لپه‌ای جهت القای کالوس استفاده شد و ۶ تا ۷ روز بعد ازکشت کالوس‌ها در محیط قابل تشخیص بودند. کالوس‌ها سه‌بار جهت تکثیر در محیط رشد واکشت شدند و در واکشت چهارم تیمار انجام شد. تیمار با سالیسیلیک‌اسید ۱۰۰ میکرومولار و متیل‌جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار باعث سیاه شدن و ازبین رفتن کالوس‌ها شد (شکل ۱).

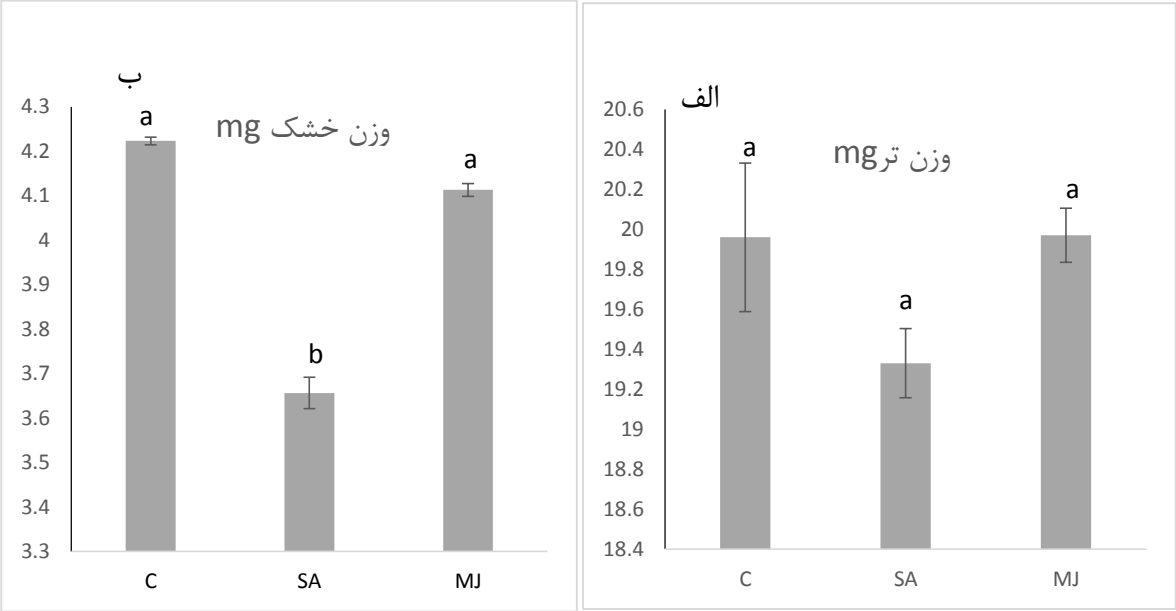


شکل ۱: کالوس‌های *N. sativa* رشد کرده در الف و ب) محیط شاهد ج) محیط سالیسیلیک‌اسید 50 µM د) متیل‌جاسمونات 50 µM ه) محیط سالیسیلیک‌اسید 100 µM و) متیل‌جاسمونات 100 µM

بنابراین، جهت اندازه‌گیری‌های بعدی کالوس از تیمار ۵۰ میکرومولار این مواد استفاده شد. در بررسی وزن‌تر و خشک کالوس‌ها بعد از تیمار نتایج نشان داد که وزن‌تر نمونه‌ها بر اثر تیمار تغییر معنی‌داری نداشت، اما وزن خشک، براثر تیمار سالیسیلیک‌اسید کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و تیمار متیل‌جاسمونات نشان داد (نمودار ۱).

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن در سوسپانسیون سلولی تحت تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات مشخص کرد که مقدار این ماده براثر تیمار افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. مقدار این ماده در سول‌های شاهد ۲/۹۳ µM/gFW به‌دست

آمد در حالی‌که در تیمار با سالیسیلیک‌اسید این مقدار µM/gFW ۱۷/۸۳ بود و تیمار با متیل‌جاسمونات مقدار آن µM/gFW ۶/۵۹ که تفاوت بین تیمارها و هم‌چنین تفاوت تیمارها با شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱).



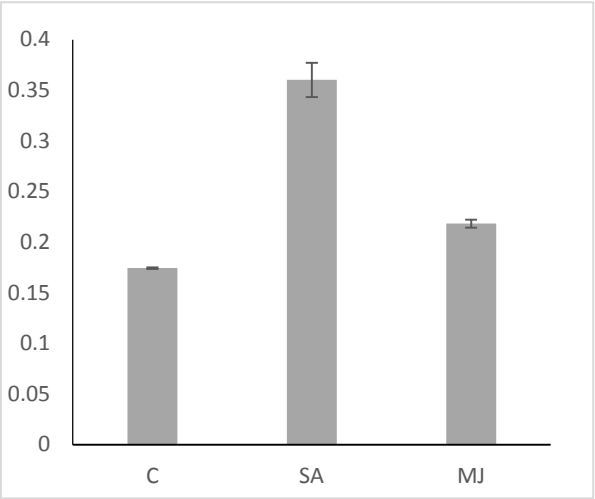
شکل ۲: تاثیر تیمارهای سالیسیلیک‌اسید (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ) بر تغییرات وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) عصاره کالوس *N. sativa*. حروف مختلف نشان‌گر معنی‌داری ($p\leq0.05$) تفاوت‌هاست.

جدول ۱: تاثیر تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر مقدار پراکسیدهیدروژن، محتوی فنل کل، مقدار فلاونوئیدها و توان آنتی‌اکسیدانتی عصاره سوسپانسون سلولی *N. Sativa*

	H_2O_2 µM/gFW	فنل کل µg/g	فلاونوئید کلµg/g	FRAP
تیمار				
شاهد	2.93± 0.22[a]	0.10717+0.005 [a]	4.41+0.11 [b]	2.017+0 .027 [a]
سالیسیلیک‌اسید	17.83± 0.84[c]	0.1493 +0.006 [b]	3.55+0.23 [a]	2.77 +0.039 [c]
متیل‌جاسمونات	6.59± 0.19[b]	0.1365 +0.009 [ab]	4.58+0.29 [b]	2.545 +0.047 [b]

هر داده نشان‌دهنده میانگین سه تکرار با خطای استاندارد (SE) است.
حروف مختلف نشان‌گر معنی‌داری ($p\leq0.05$) تفاوت‌هاست.

فنل‌ها و فلاونوئیدها ازجمله متابولیت‌های ثانویه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. محتوی فنل کل در کالوس با تیمار توسط الیسیتورها نسبت به‌گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. بیش‌ترین مقدار محتوی فنل کل (۰/۳۶۰ میکروگرم در گرم) در کالوس تیمار شده با سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از مقدار محتوی فنل کل در تیمار با متیل‌جاسمونات (۰/۲۱۸ میکروگرم در گرم) بیش‌تر بود. کم‌ترین مقدار محتوی فنل کل در کالوس‌های شاهد (۰/۱۷۴ میکروگرم در گرم) به‌دست آمد که همان‌طور که گفته شد با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد (نمودار ۲).



نمودار ۲: تغییرات مقدار محتوی فنل کل در عصاره کالوس *N. sativa* بر اثر الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ). حروف مختلف نشان‌گر معنی‌داری ($p\leq0.05$) تفاوت‌هاست.

در سنجش محتوی فنل کل در سوسپانسیون سلولی نیز بیش‌ترین مقدار (۰/۱۴۰ میکروگرم در گرم) متعلق به‌سلول‌های تیمار شده با سالیسیلیک‌اسید بود. این مقدار با محتوی فنل کل سوسپانسیون شاهد (۰/۱۰۷ میکروگرم در گرم) تفاوت معنی‌داری را نشان داد اما با مقدار محتوی فنل کل سنجش شده در تیمار متیل‌جاسمونات (۰/۱۳۶ میکروگرم در گرم) تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌داد (جدول ۱). بیش‌ترین مقدار فلاونوئید سنجش شده در سوسپانسیون سلولی در تیمار با متیل‌جاسمونات (۴/۵۸ میگروگرم در گرم) بود که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد (۴/۴۱ میگروگرم در گرم) نشان نمی‌داد. مقدار فلاونوئید به‌دست آمده در تیمار با سالیسیلیک‌اسید (۳/۵۵ میکروگرم در گرم) به‌طور معنی‌داری از دو گروه دیگر کم‌تر بود (جدول ۱). جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانتی از توانایی احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} مواد آنتی‌اکسیدانت استفاده شد. تفاوت توان آنتی‌اکسیدانتی در عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری با هم متفاوت بود. توان آنتی‌اکسیدانتی عصاره سوسپانسیون سلولی تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیش از سایر عصاره‌ها بود و عصاره تیمار شده با متیل‌جاسمونات نیز توان آنتی‌اکسیدانتی بیش‌تری نسبت به نمونه شاهد نشان داد (جدول۱).

بحث

تیمار کالوس با الیستورها، باعث سیاه شدن و ازبین رفتن آن‌ها شد. با افزایش غلظت الیسیتورها القای تنش اکسیداتیو در کالوس شدت بیش‌تری پیدا کرده و ترکیبات فنلی بیش‌تری جهت مقابله با آن تولید می‌شوند که باعث سیاه شدن کالوس می‌شود (۲۱، ۲۲). حساسیت به غلظت بالای متیل‌جاسمونات در کالوس‌های گل‌راعی *Hypericum perforatum* نیز گزارش شده است (۲۱). نتایج تیمارهای اعمال شده برروی کالوس نشان داد که مقدار عددی وزن تر تیمار سالیسیلیک‌اسید نسبت به کالوس‌های شاهد و تیمار متیل‌جاسمونات کاهش یافته است اگرچه این کاهش معنی‌دار نیست. کاهش وزن خشک این تیمار نسبت به دو گروه دیگر معنی‌دار بود و می‌توان نتیجه گرفت که تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش رشد سلول‌ها شده‌است. ازطرفی مقدار ترکیبات فنلی در گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد و بیش‌ترین مقدار این ترکیبات به‌ترتیب در تیمار با سالیسیلیک‌اسید و بعد از آن تیمار متیل‌جاسمونات بود و گروه شاهد کم‌ترین محتوای ترکیبات فنلی را داشت. سالیسیلیک‌اسید از تنظیم‌کننده‌های مهم رشد در گیاه است و تعداد زیادی از فرایندهای فیزیولوژیکی تحت تاثیر آن

قرار می‌گیرند. افزودن سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان الیسیتور در محیط کشت منجر به‌زیاد شدن بیش‌ازحد تولید ترکیبات فنلی شده و وضعیت اکسایشی سلول گیاه را بیش‌ازحد توان تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به‌کاهش رشد و مرگ سلول گیاه می‌شود (۲۳). گزارشاتی در تایید نتایج به‌دست آمده وجود دارند ازجمله در مطالعه‌ای که تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید برروی کالوس*Coriandrum sativum* مورد بررسی قرار گرفت مشخص شد که تمامی غلظت‌های مورد مطالعه سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش وزن تر و خشک کالوس می‌شوند (۲۴). تیمار کالوس گیاه *Stevia rebaudiana* (کنگر فرنگی) با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات باعث کاهش وزن تر کالوس شد (۲۵). در کشت سلول گیاه *Scrophularia striata* نیز تیمار با متیل‌جاسمونات در ابتدا باعث افزایش وزن و پس از ۴۸ ساعت کاهش وزن را به‌دنبال داشت (۲۶). البته مطالعات متناقض نیز در این زمینه وجود دارد. درکشت کالوس گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات باعث افزایش وزن تر و خشک کالوس شد (۲۷). به‌نظر می‌رسد تاثیر الیسیتورهای سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات بر وزن تر و خشک گیاهان مختلف، متفاوت باشد و به‌مقدار الیسیتور و زمان در معرض قرارگیری بستگی داشته باشد (۲۸).

پراکسید هیدروژن مولکول پیام‌رسان مهمی است که در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و محیطی در گیاهان نقش دارد (۲۹، ۳۰) هم‌چنین مشخص شده که سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید تولید پراکسید هیدروژن در گیاه را افزایش می‌دهند (۳۱). تولید پراکسید هیدروژن منجر به‌افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن زنجیری اکسایشی را در غشای سلول و یا بخش‌های حاوی لیپید در سلول را فعال می‌کنند و در نهایت منجر به‌مرگ سلول می‌شوند (۳۲). مکانیسم‌های موجود مقابله با آنتی‌اکسیدانت‌ها در سلول قبل از راه‌اندازی این واکنش‌ها، رادیکال‌ها پاکسازی می‌کنند. سنجش توان آنتی‌اکسیدانتی سلول نشان‌دهنده قدرت آن در مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. در این مطالعه مقدار پراکسید هیدروژن براثر تیمار سالیسیلیک‌اسید افزایش چشم‌گیری داشت که نشان‌گر پاسخ بالای سلول‌ها به‌تیمار است. مقدار پراکسید هیدروژن در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات نیز آفزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان می‌داد. توان آنتی‌اکسیدانتی اندازه‌گیری شده توسط قدرت احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} نیز در تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و بیش‌ترین مقدار در تیمار سالیسیلیک‌اسید و کم‌ترین در گروه شاهد ثبت شد. مطالعات مختلفی این یافته‌ها را تایید می‌کند. با تیمارهای سالیسیلیک-اسید و متیل‌جاسمونات (در غلظت‌های ۱۰۰ میکرولیتر و ۲۰۰ میکرولیتر) توان آنتی‌اکسیدانتی کالوس کنگر فرنگی افزایش یافت (۳۳). استفاده از متیل‌جاسمونات در کشت کالوس گیاه *Nardostachys jatamansi* در غلظت ۶ میکرومولار باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی عصاره سنجش شده توسط FRAP شد اما در غلظت‌های بالاتر الیسیتور کاهش معنی‌دار را به‌دنبال داشت (۳۴). در کشت ساقه گیاه *Ajuga integrifolia* با استفاده از سالیسیلیک‌اسید مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانتی توسط FRAP در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (۳۵). استفاده از ترکیبی از الیسیتورها شامل متیل‌جاسمونات (۱۵۰ میکرومولار)، سالیسیلیک‌اسید (۵۰ میکرومولار) و اشعه UV دو ساعت در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Lonicera japonica* منجر به افزایش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانتی عصاره شد (۳۶).

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو از دو راه‌کار آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده می‌کنند. در راه‌کار غیرآنزیمی سلول ترکیبات آنتی‌اکسیدانت ازجمله پلی‌فنل‌ها را تولید می‌کند (۳۷). این ترکیبات یک گروه واکنش‌گر هیدروکسیل روی حلقه آروماتیک به‌نام فنل هستند و بخش مهمی از سیستم دفاعی گیاه علیه شرایط تنش زیستی و غیرزیستی را تشکیل می‌دهند (۳۸). فلاونوئیدها از ترکیبات پلی‌فنولی و ازجمله آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی هستند که در سرکوب رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) نقش دارند. چنان‌چه به‌گیاه تنشی وارد شود ROSهای درون‌زاد افزایش می‌یابند. دراین‌حالت فلاونوئیدهایی تجمع یافته در واکوئل‌ها به‌رویش آن‌ها می‌پردازند (۳۹). درمطالعه حاضر توان آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های تیمار شده با

سالیسیلیک‌اسید نسبت به متیل‌جاسمونات و شاهد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود، مقدار ترکیبات فنلی نیز افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر داشت. اما مقدار فلاونوئیدها در این گروه نسبت به شاهد و متیل‌جاسمونات کاهش معنی‌دار را نشان می‌داد. در سلول‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات توان آنتی‌اکسیدانتی به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود. مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها اگرچه ازلحاظ عددی بیش‌تر از گروه شاهد بودند ولی اختلاف معنی‌داری نداشتند. تیمار کالوس گیاه استویا با سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات موجب افزایش معنی‌دار مقدار محتوی فنل کل در کالوس نسبت به شاهد شد (۴۰). در همین مطالعه تیمارها مقدار فلاونوئیدها را به‌طور معنی‌داری نسبت شاهد افزایش دادند اما افزایش در تیمار سالیسیلیک‌اسید به‌طور معنی‌داری از تیمار متیل جاسمونات بیش‌تر بود (۴۰). مقدار محتوی فنل کل ۲۴ ساعت بعد از تیمار سالیسیلیک‌اسید در سوسپانسیون سلولی گیاه *Thevetia peruviana* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما این افزایش پایدار نبود و در ساعات بعد به‌مقدار محتوی فنل کل سوسپانسیون سلولی شاهد کاهش یافت. درهمین مطالعه تیمار سلول‌های *Thevetia peruviana* با متیل‌جاسمونات باعث افزایش معنی‌دار مقدار محتوی فنل کل شد که تا ۹۶ ساعت بعد این افزایش ادامه داشت (۲۹). بررسی محتوی فنلی کل و فلاونوئیدها در تیمار با سالیسیلیک‌اسید برروی کالوس *Coriandrum sativum* نشان داد که این تیمار باعث افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها می‌شود (۲۴). در کشت کالوس نوروزک با افزایش غلظت در تیمار متیل سالسیلات، مقدار فنل کل و فلاونوئیدها افزایش معنی‌داری را نشان دادند اما این افزایش مقدار در تیمار متیل‌جاسمونات به‌غلظت بستگی داشت و تا غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌دار مشاهده شد اما در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش می‌یافت (۲۷).

نتیجه‌گیری

استراتژی‌های متفاوتی برای افزایش نرخ رشد و هم‌چنین تولید مواد موثره در کشت‌های سلولی ارائه شده‌اند که ازجمله آن‌ها استفاده از الیسیتورهاست (۴۰، ۴۱). از الیستورهای مهم و موثر در این زمینه هورمون‌های گیاهی هستند. سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات دو هورمونی هستند که در بسیاری از موارد به‌کار گرفته شده‌اند (۴۲). این تحقیق تاثیر این دو الیسیتور برروی سوسپانسیون سلولی گیاه سیاه‌دانه را مورد بررسی قرار داد و نتایج امیدوار کننده‌ای نیز جهت ادامه تحقیقات به‌دست آمد. این نتایج می‌تواند به‌عنوان گامی موثر در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه در بیوراکتورها مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (حمایت مالی در قالب طرح ۵۸۰) سپاس‌گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Adil M, Ren X, Kang DI, Jeong BR. Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino. Molecular biology reports. 2018; 45(6): 1919-27.

2. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. Journal of herbmed pharmacology. 2018; 7(1): 1-7

3. Ghosh D. Quality issues of herbal medicines: internal and external factors. Int J Complement Alt Med. 2018; 11(1): 67-9.

4. Pan SY ,Zhou SF, Gao SH, Yu ZL, et al. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013: 1-25.

5. Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, et al. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. Genes. 2018; 9(6): 34–46.

6. Singh A, Dwivedi P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. J Pharmacogn Phytochem. 2018; 7(1): 750-7.

7. Ijaz H, Tulain UR, Qureshi J, Danish Z, et al. *Nigella sativ*a (Prophetic Medicine): A Review. Pak. J. Pharm. Sci. 2017; 30(1): 229-234

8. Srinivasan K. Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (Nigella sativa) seeds: traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. Food quality and safety. 2018; 2(1): 1-16.

9. Nautiyal OH. Black Seed (*Nigella sativa*) Oil. Fruit Oils: Chemistry and Functionality: Springer; 2019. p. 839-57.

10. Bordoni L, Fedeli D, Nasuti C, Maggi F, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Nigella sativa* oil in human pre-adipocytes. Antioxidants. 2019; 8(2): 51.1-12.

11. Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, et al. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. Aaps Pharmscitech. 2013; 14(1): 160-7.

12. Mohebbati R, Abbasnezhad A. Effects of *Nigella sativa* on endothelial dysfunction in diabetes mellitus: A review. Journal of Ethnopharmacology. 2020; 252(1): 112585.

13. Jalali A, Raesi Vanani A, Shirani M. Ethnobotanical Approaches of Traditional Medicinal Plants Used in the Management of Asthma in Iran. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 15(1): e62269.

14. Rashid M, Sanjarin F, Sabouni F. Thymoquinone effects on cell viability, apoptosis and VEGF-A gene expression level in AGS (CRL 1739) cell line. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2019; 19(6): 820-6.

15. Almatroodi SA, Almatroudi A, Alsahli MA, Khan AA, et al. Thymoquinone, an Active Compound of *Nigella Sativa*: Role in Prevention and Treatment of Cancer. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2020; 21(11): 1028-1041.

16. Korak T, Ergül E, Sazci A. *Nigella sativa* and Cancer: A Review Focusing on Breast Cancer, Inhibition of Metastasis and Enhancement of Natural Killer Cell Cytotoxicity. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2020; 21(12): 1176-1185

17. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant science. 2000; 151(1): 59-66.

18. Mazandarani M, Majidi Z, Zarghami Moghaddam P, Abrodi M, et al. Essential oil composition, total phenol, flavonoid, anthocyanin and antioxidant activities in different parts of *Artemisia annua* L. in two localities (North of Iran). Journal of Medicinal Plants and By-products. 2012;1(1): 21-13.

19. Jahantigh O, Najafi F, Badi HN, Khavari-Nejad RA, et al. Changes in antioxidant enzymes activities and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus officinalis* L. plants under salt stress. Acta Biologica Hungarica. 2016; 67(2): 195-204.

20. Tomasina F, Carabio C, Celano L, Thomson L. Analysis of two methods to evaluate antioxidants. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2012; 40(4): 266-70.

21. Abdollahpoor M, Kalantari S, Azizi M, Saadat YA. Effects of Methyl Jasmonate and Chitosanon Shoot and Callus Growth of Iranian *Hypericum perforatum* L. in vitro Cultures. Journal of Medicinal plants and By-product. 2017; 6(2): 165-72.

22. Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Journal of experimental botany. 2011; 62(10): 3321-38.

23. Kováčik J, Grúz J, Bačkor M, Strnad M, et al. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant cell reports. 2009; 28(1): 135-43.

24. Kdhim SJ, Jassim EH, Salih HH. Effect of salicylic acid on increasing of some phenolic acid and flavonoids in *Coriandrum sativum* callus. Plant Archives. 2020; 20(1): 3007-14.

25. Tanoori A, Ghasemnezhad A, Alizadeh M. Study the effect of methyl jasmonate and salicylic acid on morphological characters internal pigments of artichoke callus. Journal of Crops Improvement. 2015; 16(4): 857-869.

26. Khanpour- Ardestani N, Sharifi M, Behmanesh M. Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. Journal of plant research. 2015; 27(5): 840-853

27. Ghasimi Hagh Z, Jokar S, Bodaghi H, Modarres M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus cultureof *Salvia lerrifolia* Benth. Journal of Plant Biology. 2018; 10(1): 67-80

28. Mendoza D, Cuaspud O, Arias JP, Ruiz O, et al. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Biotechnology reports. 2018;19: e00273.

29. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygengene network of plants. Trends Plant Sci. 2004; 9 (10): 490–98.

30. Xia XJ, Zhou YH, Shi K, Zhou J, et al. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. J Exp Bot. 2015; 66(10): 2839–56.
31. Wang W, Wang X, Huang M, Cai J, et al. Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. Frontiers in plant science. 2018; 9: 1137.
32. Lee EJ, Park SY, Paek KY. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2015; 120(1): 1-10.
33. Samadi S, Ghasemnezhad A, Alizade M. Fresh weigh, Total phenol, Total flavonoids, Antioxidant and PAL enzyme activity of Stevia callus variation affected by salicylic acid and methyl jasmonate. Journal of Plant Process and Function. 2019; 8(32): 325-37.
34. Rawat V, Ghildiyal A, Singh L, Jugran AK, et al. Methyl jasmonate induced polyphenols and antioxidant production in callus suspension culture of *Nardostachys jatamansi*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 2019: 154(6): 851-859.
35. Abbasi BH, Ullah MA, Nadeem M, Tungmunnithum D, et al. Exogenous application of salicylic acid and gibberellic acid on biomass accumulation, antioxidant and anti-inflammatory secondary metabolites production in multiple shoot culture of *Ajuga integrifolia* Buch. Ham ex D Don. Industrial Crops and Products. 2020; 145: 112098.
36. Du L, Li D, Zhang J, Du J, et al. Elicitation of Lonicera japonica Thunb suspension cell for enhancement of secondary metabolites and antioxidant activity. Industrial Crops and Products. 2020; 156: 112877.
37. Irato P, Santovito G. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants*. 2021; 10(4): 579-583
38. Grace SC. Phenolics as antioxidants. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. 2005;141-68.
39. Baskar V, Venkatesh R, Ramalingam S. Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants: Springer; 2018. p. 253-68.
40. Eibl R, Meier P, Stutz I, Schildberger D, et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. Applied microbiology and biotechnology. 2018; 102(20): 8661-75.
41. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Engineering in Life Sciences. 2019; 19(12): 880-95.

42. Thakur M, Bhattacharya S, Khosla PK, Puri S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2019; 12: 1-12.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2021; 12(2) *Original Article*

Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on antioxidant activity, phenolic and flavonoid compounds in *Nigella sativa* cell culture

Ebrahimzade S M.Sc., Sanjarian F* Ph.D.

-Plant Bio-Product Group, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* Email corresponding author: fsanjarian@nigeb.ac.ir

Received: 3 Dec. 2021 Accepted: 22 Agu. 2021

Abstract

Aim: The purpose of this investigation was to induce callus and produce cell suspension from the well-known medicinal plant *Nigella sativa* (Black seed). Subsequently, the effects of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors were investigated on their antioxidant content and potency.

Material and Methods: Callus was prepared from the cotyledonary leaves of the plant. Then, cell suspension culture was established using appropriate callus. The cells were treated with salicylic acid and methyl jasmonate elicitors and the content of total phenol and carotenoids was measured. Antioxidant potency was measured by the FRAP method.

Results: The results showed that the treatments had no significant effect on the fresh weight of callus but the dry weight of callus was significantly reduced by treatment with salicylic acid. The highest amount of total phenol was observed in callus culture and salicylic acid-treated cell suspension. Treatment of cell suspension with both elicitors significantly increased the amount of flavonoids. The treatments resulted in a significant increase in the antioxidant capacity of the cell suspension, which was less in the methyl jasmonate treatment.

Conclusion: According to the obtained results, it seems that in the cell suspension of *N. sativa* salicylic acid induces a greater response than methyl jasmonate, which leads to extra induction of antioxidant properties.

Keywords: *N. sativa*, cell culture, elicitor, antioxidant