

## اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و NaCl بر ترکیب‌های بیوشیمیایی کالوس استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) در محیط کشت‌های جامد و مایع

مارال سلملیان<sup>۱</sup>، عظیم قاسم‌نژاد<sup>۲\*</sup> و کامبیز مشایخی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته گیاهان دارویی ادویه‌ای و نوشابه‌ای، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: aghasemnajad@hotmail.com

۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷

### چکیده

استفاده از محرک‌ها روشی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی در شرایط برون و درون شیشه‌ای به‌شمار می‌رود. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر شوری صفر و ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات با غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومولار در دو محیط کشت جامد و مایع بر صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) کالوس گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. این تحقیق با آرایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گردید. محرک‌های مورد استفاده، محیط کشت و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر صفات اندازه‌گیری شده داشتند. بیشترین میزان تولید فنل و فلاونوئید، در تیمار اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ و تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت جامد دیده شد. تیمارهای شوری ۵۰ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ و متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط کشت جامد سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به سایر تیمارها شدند. بین آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز، فنل و فلاونوئید همبستگی مثبت دیده شد. تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار همچنین سبب افزایش اسید آمینه پرولین شد. بنابراین برای بهبود تولید ترکیب‌های ثانویه‌ای مانند فنل، فلاونوئید و همچنین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز در استویا، استفاده از تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید (۱۰۰ میکرومولار) و شوری (۵۰ میکرومولار) در شرایط کشت جامد توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز، پرولین، کشت بافت، فنل کل، فلاونوئید کل، محیط کشت مایع.

### مقدمه

دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والدینی یافت می‌شود، تولید نماید (Rao & Ravishankar, 2002). کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان

سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی توانمندی بارزی دارند. بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را داراست، از این رو این توانایی را دارد تا

دارویی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام (Tripathi & Tripathi, 2003). قوه نامیه بذره‌های استویا بسیار پایین بوده و درصد بسیار اندکی از آنها سبز می‌شوند، به همین دلیل روش‌های تکثیر غیرجنسی، نسبت به ازدیاد از طریق بذر کارایی بیشتری دارند و در کشور ما نیز روش کشت بافت موفق‌تر از سایر روش‌های تکثیر بوده است (Azarpour *et al.*, 2014). استفاده از محرک‌ها یکی از مهمترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی بوده و اثر آن تحت تأثیر نوع محرک و گیاه متفاوت است (Zhao *et al.*, 2005). میزان اثر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت معمولاً به غلظت اضافه شده و مرحله رشدی نمونه گیاهی وابسته است (Wang & Wu, 2010). از شوری، هورمون اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌توان به‌عنوان الیسیتورهای (Elicitors) غیرزیستی برای افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه بهره برد. در شرایط درون شیشه‌ای رشد سلول‌ها را می‌توان به‌صورت خودکار کنترل کرد و فرایندهای متابولیکی را تنظیم نمود، فرآورده‌های مفید را می‌توان تحت شرایط کنترل‌شده تولید کرد و محصولات خالص‌تر و مطمئن‌تر به بازار عرضه نمود. به‌علاوه از کشت سلولی می‌توان برای مطالعه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد (Rao & Bourgaud *et al.*, 2002). تنش‌های غیرزیستی از قبیل شوری، فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی را که تعداد زیادی از آنها در سطح سلولی بررسی شده است، تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعه تأثیر تنش شوری بر متابولیت‌ها در بافت کالوس، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Niknam *et al.*, 2004). اثر تنش شوری بر گیاهان در بافت چهار گونه شنبلیله (*Trigonella*) (Niknam *et al.*, 2006)، پروانش (Neelam *et al.*, 2014)، ریحان سبز (Delavari Parizi, 2010)، شنبلیله (Esam & Esam, 2011) و کنگر فرنگی (Rezazadeh *et al.*, 2012) مورد

بررسی قرار گرفت. یکی از روش‌های متابولیسمی بارز در تجمع پرولین واکنش به تنش اسمزی است که سازوکار احتمالی افزایش تولید آن توسط پژوهشگران مشخص شده است (Arshi *et al.*, 2002). از سازوکارهای بیوشیمیایی بسیار مهم گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که دارای دو قسمت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (Phenylalanine ammonia lyase)، کاتالاز (Catalase)، پراکسیداز (Peroxidase)) و غیر آنزیمی (مانند ترکیب‌های فنیل‌پروپانوییدی (phenylpropanoid compounds)، گلوپتاتینون (Glutathione)، کاروتنوئید (Carotenoid)) می‌باشد (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). به‌طور کلی، تنش‌های وارده سبب تغییر در بیان و فعالیت آنزیم‌های دفاعی و کلیدی مانند فنیل‌آلانین آمونیلایز می‌شوند که این آنزیم در بیوسنتز ترکیب‌های فنیل‌پروپانوییدی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین و سایر ترکیب‌ها نقش اساسی دارد. استفاده از الیسیتورها روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌باشد و نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کند (Ali *et al.*, 2007). مطالعات فراوانی بر روی اثر محرک‌های رشد اسید سالیسیلیک (Salicylic acid) و متیل‌جاسمونات (methyl jasmonate) بر گیاهانی مانند گل راعی (Sonja *et al.*, 2007)، گونه‌ای گل‌گندمی (*Chlorophytum borivilianum*) (Babel *et al.*, 2014)، کنگر فرنگی (Samadi, 2013) و سویا (Simaei *et al.*, 2012) انجام شده که گویای تأثیر بسیار محرک‌های رشد بر صفات بیوشیمیایی گیاهان می‌باشد. آنزیم PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل‌پروپانوییدها است و عمل اصلی آن آمین‌زدایی از اسیدآمینه ال-فنیل‌آلانین (L-Phenylalanine) و تبدیل آن به ترانس سینامیک اسید (Cinnamic Acid trans) می‌باشد، این ترکیب به‌عنوان اولین و مهمترین حد واسط در مسیر تولید ترکیب‌های فنولی شناخته شده است (Achnine *et al.*, 2012).

متیل جاسمونات هریک در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار، تیمارهای ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و متیل جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ در دو محیط کشت مایع و جامد در شرایط استریل کشت شدند. پس از گذشت چهار هفته از اعمال تیمار، میزان ترکیب‌های بیوشیمیایی فنل (Dos Santos *et al.*, 2009)، فلاونوئید (Toor & Savage., 2005)، پرولین (Bates *et al.*, 1973) و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لایز (PAL) کالوس‌ها (Saunders & McClure., 1974) اندازه‌گیری شدند. این تحقیق به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. تیمارها شامل محیط کشت (در دو سطح محیط مایع و محیط جامد) و محرک متابولیت (در دو سطح، شامل شوری در دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات هریک در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار، تیمارهای ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و متیل جاسمونات ۱۰۰+ شوری ۵۰ بودند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 انجام شد. همچنین از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر محرک‌ها، محیط کشت و اثر متقابل آنها بر تمامی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. محرک‌ها بر محتوای ترکیب‌های فنلی کالوس استویا اثر معنی‌داری داشتند، به طوری که وجود اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در محیط کشت سبب کاهش معنی‌دار محتوای فنل کالوس‌ها شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت تغییرات فنل کل را به شکل معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. به نحوی که بیشترین میزان ترکیب فنلی در تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰+ شوری ۵۰ و محیط کشت جامد مشاهده شد که با تیمار شوری ۵۰ در محیط جامد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین تیمار شوری

(2004). با افزایش سطح شوری مقدار تنظیم‌کننده‌های اسمزی از قبیل پرولین افزایش می‌یابد که گیاه می‌تواند تنش‌های محیطی را تحمل نماید. افزایش در تولید پرولین، نوعی راهبرد تنظیم اسمزی است که می‌تواند منجر به کاهش رشد گیاه شود (Mirza Masoumzadeh *et al.*, 2012). استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گونه‌ای چند ساله، بوته‌ای و کوتاه قد از خانواده Asteraceae و بومی نواحی شمالی آمریکای جنوبی می‌باشد. از برگ‌های استویا به عنوان افزودنی و شیرین‌کننده در صنایع غذایی استفاده می‌شود که در کنار غلظت بالای استویوزید (stevioside)، این گیاه منبع خوبی از پروتئین، فیبر رژیمی، مواد معدنی و اسید آمینه‌های ضروری می‌باشد (Abou-Arab *et al.*, 2010). بذر گیاه استویا درصد جوانه‌زنی پائینی دارد و ازدیاد رویشی از طریق قلمه توسط تعداد کمی از افراد انجام می‌شود (Jain *et al.*, 2009). از این رو کشت بافت به عنوان سریع‌ترین روش برای افزایش انبوه استویا مورد توجه است. در این تحقیق سعی بر این است تا مناسب‌ترین محرک و محیط کشت در افزایش تولید خصوصیات بیوشیمیایی کالوس استویا مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

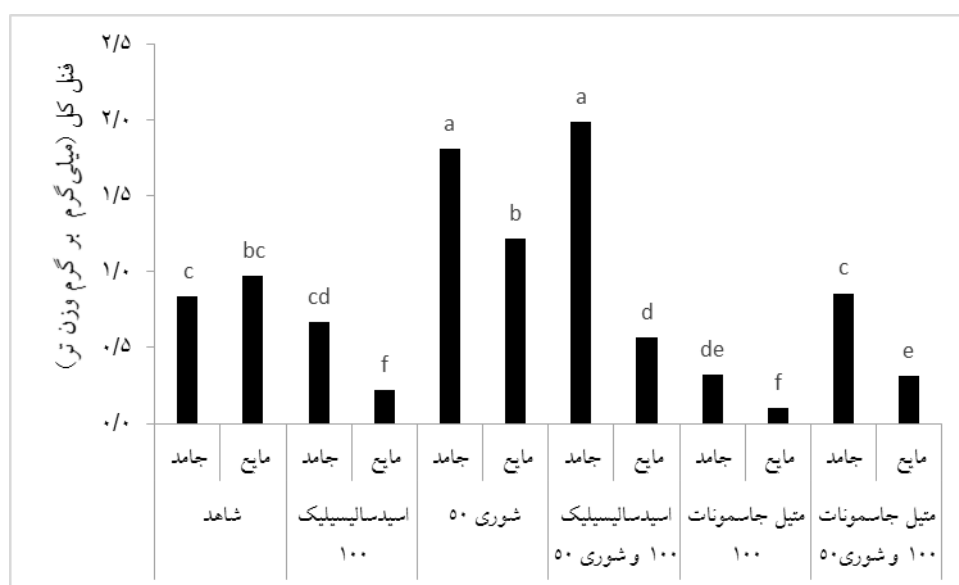
این تحقیق در طول سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ریزنمونه برگ گیاه استویا به اندازه یک سانتی‌متر جداسازی شده و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS: Murashig & Skoog) حاوی محرک رشد BA (Benzyladenine) به مقدار ۰/۵٪ و NAA (Naphthalene acetic acid) به مقدار یک میلی‌گرم بر لیتر کشت شد و پس از تهیه کالوس به اندازه مورد نیاز، کالوس در اندازه‌های تقریبی یکسان (یک نخود) در محیط حاوی تیمارهای آزمایشی کشت شد. تیمارها شامل شوری در دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک اسید و

۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت مایع نیز میزان فنل بالایی داشت. به طوری که میزان فنل کل تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در محیط‌های کشت مایع کمترین مقدار را داشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس آنزیم فنیل‌آلانین، فنل، فلاونوئید و پرولین کالوس استویا تحت تأثیر محرک‌ها و محیط کشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز	فنل	فلاونوئید	پرولین
محرک‌ها	۵	۲۷/۰۳**	۲/۰۱۳**	۰/۱۵۶**	۷۹/۲۷**
محیط کشت	۱	۲۴۵/۳۲**	۳/۱۸۱**	۰/۷۷۳**	۸۰۳/۵۰**
محرک × محیط	۵	۱۵/۴۱**	۰/۵۳۷**	۰/۰۱۳**	۱۹/۷۶**
خطا	۳۶	۱/۱۲	۰/۰۳۰	۰/۰۰۰۴	۱/۱۶۷
ضریب تغییرات		۴/۵۷	۱۴/۲۱	۷/۱۷	۱۹/۲۳

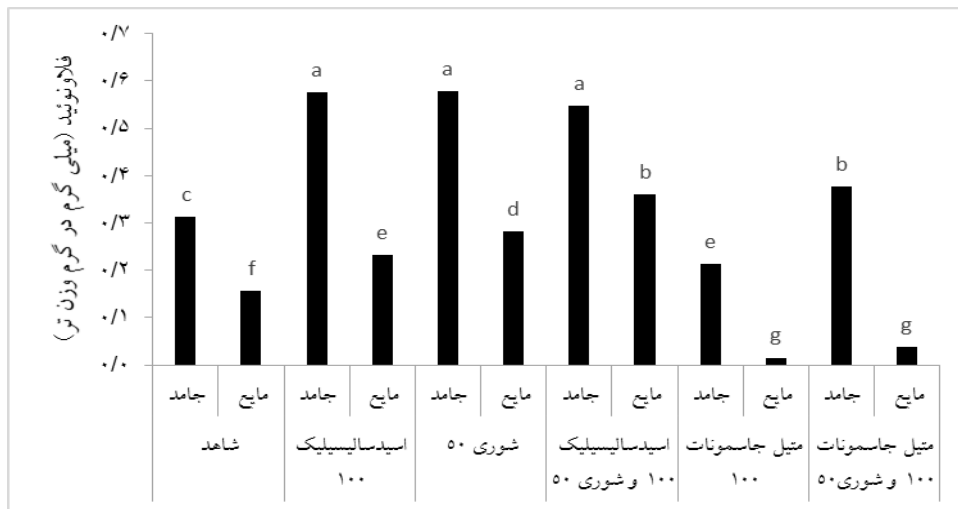
\*\*\*، \*\* و n.s: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪، ۵٪ و عدم معنی‌دار



شکل ۱- اثر متقابل نوع محرک و محیط کشت بر تجمع فنل کل

اسید سالیسیلیک ۱۰۰، شوری ۵۰ و تیمار توأم اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط کشت جامد به ثبت رسید. تحت این تیمارها میزان فلاونوئید عصاره کالوس حدود ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. به طوری که کمترین مقدار این ترکیب در کشت‌های مایع متیل جاسمونات و تیمار ترکیبی متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ مشاهده شد (شکل ۲).

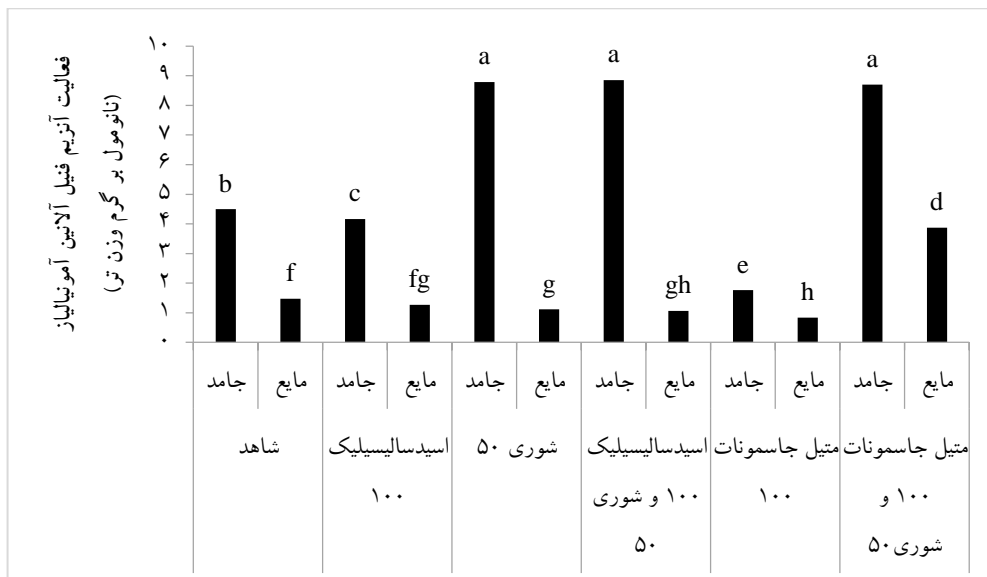
در این آزمایش طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها در شرایط تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ بیشترین میزان فلاونوئید مشاهده شد که بیانگر اثر مثبت شوری بر اسید سالیسیلیک در تولید ترکیب‌های فلاونوئیدی می‌باشد. نمونه‌های رشد کرده در محیط حاوی متیل جاسمونات کمترین تجمع فلاونوئید را نشان دادند. بیشترین میزان این ترکیب‌ها در تیمارهای



شکل ۲- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر فلاونوئید کل

۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط کشت جامد بدون اختلاف معنی داری با تیمار شوری ۵۰ میلی مولار در محیط جامد و تیمار ترکیبی متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ در محیط جامد مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت PAL در تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ محیط مایع مشاهده شد. البته با تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک ۱۰۰ و شوری ۵۰ در محیط مایع اختلاف معنی داری نداشت.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در تیمار ترکیب متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ انجام شد. این در حالیست که کمترین میزان فعالیت PAL در محیط حاوی ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد. محیط کشت جامد تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم PAL داشت. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک



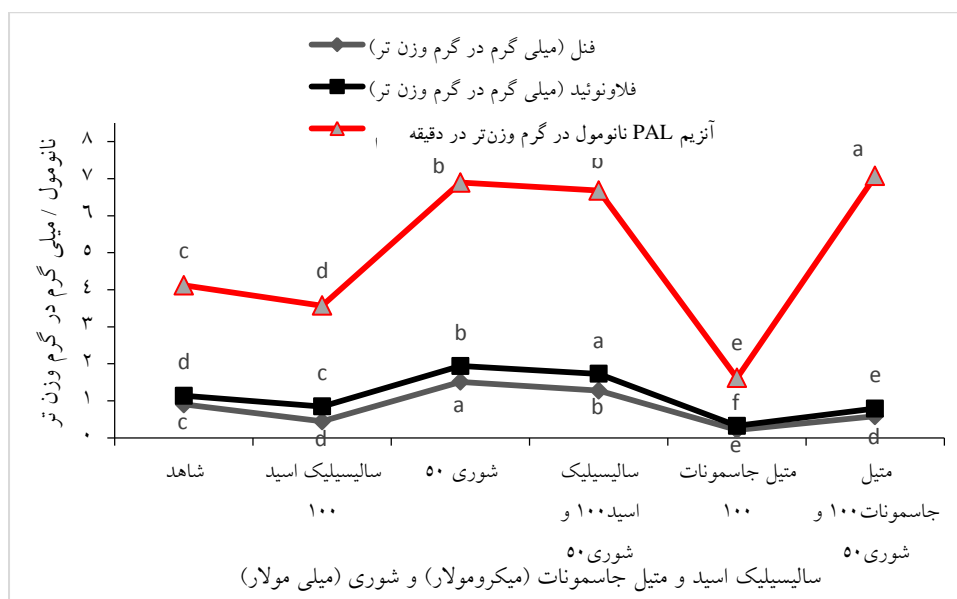
شکل ۳- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

تغییر ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت را نشان داد. به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در ترکیب متیل جاسمونات ۱۰۰ + شوری ۵۰ دیده شد. بیشترین تجمع ترکیب‌های فنلی و فلاونوییدی به ترتیب در تیمارهای شوری ۵۰ و ترکیب اسید سالیسیلیک ۱۰۰ + شوری ۵۰ حاصل شد (شکل ۴).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی تحت تیمار محرک‌ها و محیط کشت همبستگی مثبتی را در سطح ۱٪ نشان دادند. محرک‌ها اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی (فنلی و فلاونوییدی) کالوس استویا داشتند (جدول ۲). همچنین روند

جدول ۲- همبستگی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز با میزان تجمع فنل کل و فلاونوئید کل

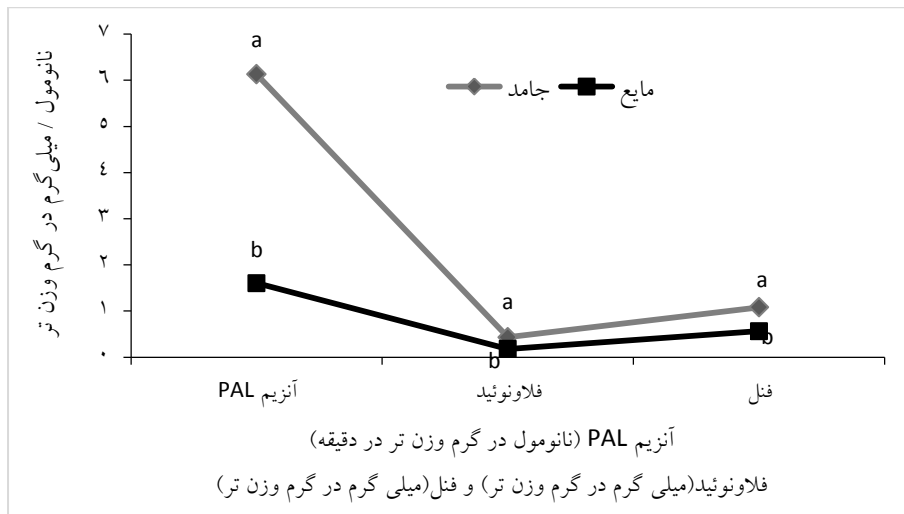
فلاونوئید	فنل کل	آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز	آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز
		۱	آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز
	۱	۰/۶۷۰***	فنل کل
۱	۰/۶۹۸***	۰/۶۵۶***	فلاونوئید



شکل ۴- اثر محرک‌ها بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز

پروپانوییدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت نشان داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم و تجمع ترکیب‌های فنلی و فلاونوییدی در محیط کشت جامد حاصل شد (شکل ۵).

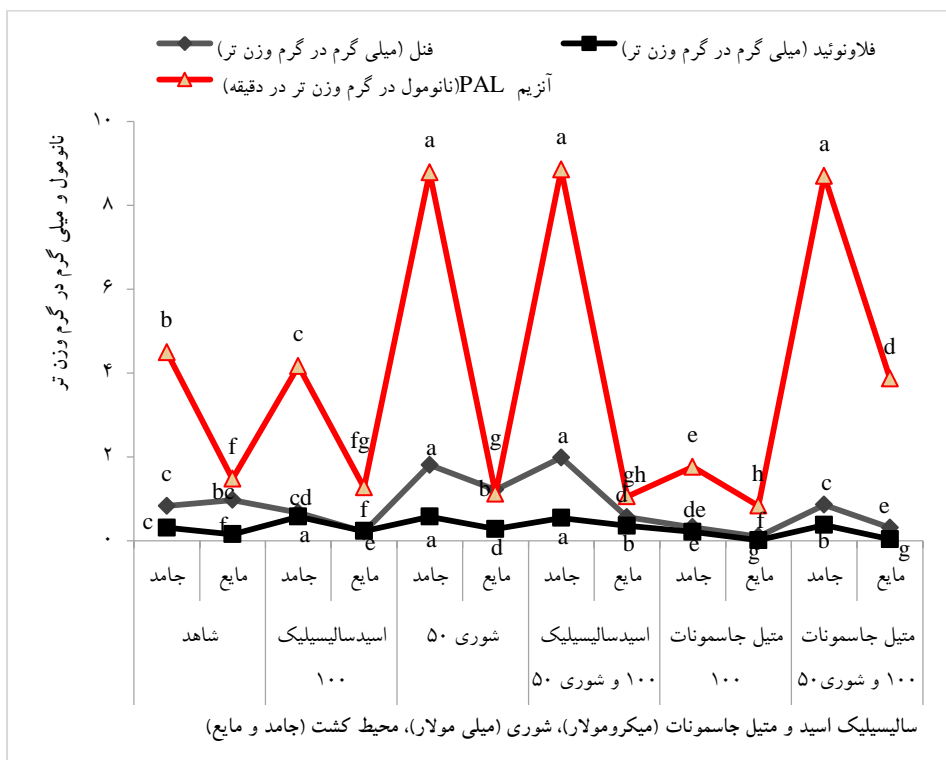
محیط کشت اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی (فنلی و فلاونوییدی) کالوس استویا داشت. روند تغییرات فنیل



شکل ۵- اثر محیط کشت بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

تیمارهای ۵۰ میلی مولار شوری + محیط کشت جامد و تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۵۰ میلی مولار شوری + محیط کشت مایع نداشت (شکل ۶).

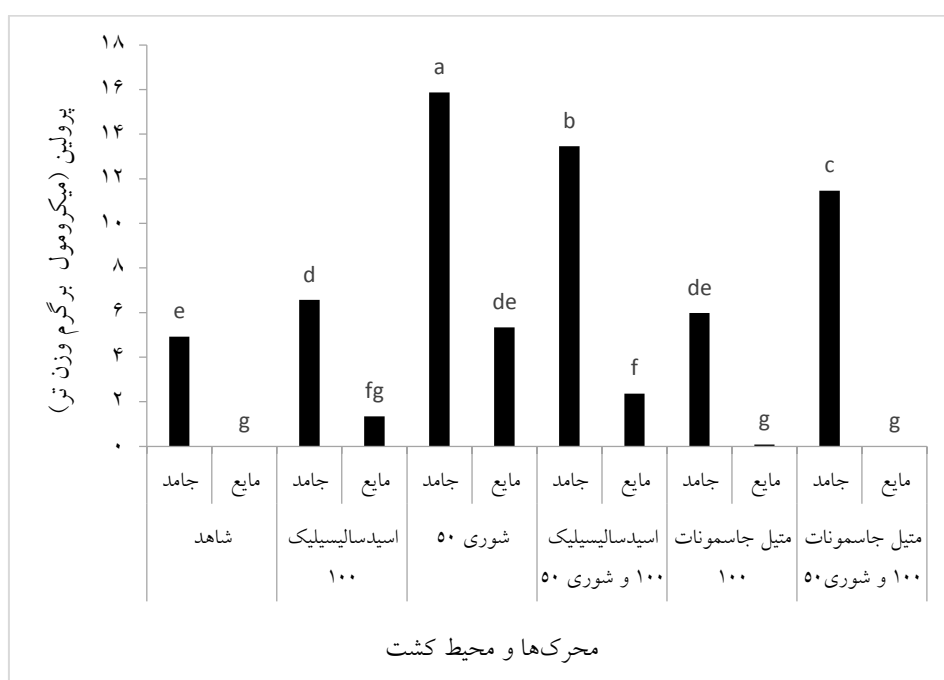
بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۵۰ میلی مولار شوری + محیط کشت جامد مشاهده شد که اختلاف معنی داری با



شکل ۶- اثر محیط کشت بر فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

بیشترین میزان پرولین در تیمار ۵۰ میلی مولار شوری و در محیط کشت جامد مشاهده شد که افزایش ۴ برابری را نسبت به شاهد داشته است. میزان پرولین در محیط کشت مایع کمتر شد و کمترین میزان پرولین نیز در تیمارهای شاهد و متیل جاسمونات ۱۰۰ و ترکیب شوری ۵۰ + متیل جاسمونات ۱۰۰ در محیط کشت مایع دیده شد.

شوری بر میزان پرولین کالوس استویا اثر معنی داری داشت. به طوری که بیشترین میزان پرولین در تیمار شوری مشاهده شد. میزان پرولین در محیط کشت جامد بیشتر از مایع دیده شد. علت این امر احتمالاً جذب بیشتر آب در محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد و افزایش وزن کالوس در اثر این افزایش آب درون سلول‌ها می باشد. با توجه به شکل ۷،



شکل ۷- اثر متقابل محرک‌ها و محیط کشت بر میزان پرولین کالوس

## بحث

ترکیب‌های فنلی در گیاه *Hypericum perforatum* L. نشان داده شد که افزایش غلظت محرک سبب کاهش میزان تولید این ترکیب‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار شده است (Sonja et al., 2007). تأثیر متیل جاسمونات بر سنتز ترکیب‌های فنلی به غلظت آن وابسته است (Horbowicz et al., 2011). Babel و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که مقادیر پایین اسید سالیسیلیک (۵ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر) در گیاه *Chlorophytum borivilianum* سبب افزایش فنل کل شد. در مقابل افزایش بیشتر این اسید در محیط کشت روند کاهشی بر تجمع فنل کل داشت. بررسی اثر متیل جاسمونات بر محتوای فنلی کالوس

شوری چه در شرایط طبیعی و چه در شرایط درون شیشه‌ای بدون در نظر گرفتن نوع گیاه سبب اختلال در رشد گیاه و تغییر فعالیت‌های متابولیکی آن می شود. اگرچه این تغییرات ممکن است تحت تأثیر نوع گونه گیاهی متفاوت باشد. بررسی‌ها نشان داد که اثر تنش شوری (NaCl) بر بافت کالوس چهار گونه شنبليله ایرانی (*T. tehranica*، *T. foenum-graecum* و *T. aphanoneura*، *T. eliptica*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای سبب افزایش فنل کل شد (Niknam et al., 2006). همچنین در بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان تولید



این ترکیب‌ها در سیتوپلاسم سلولی، واکنش‌های ضد اکسیداسیونی سلول شروع شده که نمونه بارز آن تجمع فلاونوئید است. Rezazadeh و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که شوری سبب افزایش معنی‌داری در ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی گیاه دارویی کنگرفرنگی شده است. Dash Agha و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که میزان فلاونوئیدهای تحت تنش شوری و تیمار اسید سالیسیلیک افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد که شوری سبب بهبود عملکرد اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات شده و اثر کاهشی آنها را از بین می‌برد. شوری حاصل از نمک NaCl سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد. از این رو برای مقابله با تنش بوجود آمده سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه فعال می‌شود که در ادامه افزایش بیان و فعالیت آنزیم PAL را سبب می‌گردد. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشاء سبب تولید اکسیرن‌های فعال، NO، پروتئین‌کینازها، اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات می‌شود (Raman & Ravi, 2011; Andi et al., 2001). تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌شوند. این ترکیب‌ها خود به‌طور مستقیم به‌عنوان عامل دفاعی عمل نمی‌کنند، بلکه با فعال‌سازی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه سبب حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. افزایش اسیدسالیسیلیک تا حدی فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهد و با توجه به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیکی سلول افزایش بیش از حد آستانه تحمل این ترکیب سبب کاهش این ترکیب‌ها نیز می‌شود. این مورد علاوه بر اسید سالیسیلیک، در مورد سایر محرک‌هایی مانند متیل‌جاسمونات و شوری نیز صدق می‌کند. Mizukami و همکاران (۱۹۹۳) بیان کردند که فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در *Lithospermum erythrorhizon* تا ۷۲ ساعت اولیه افزایش و در غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر کاهش یافت. همانطور که پیش‌تر اشاره شد

کنگرفرنگی نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکرومولار میزان تجمع ترکیب‌های فنلی افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار کاهش یافت که می‌تواند به دلیل محدود بودن توانمندی سلول‌ها در پاسخ به عامل تنش‌زا و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها مرتبط باشد (Samadi et al., 2013). Amini و Ehsanpour (۲۰۰۱) بیان کردند که استفاده از محیط کشت مایع ترکیب‌های فنلی و تولیدات سمی را رقیق‌تر می‌کند. اسید سالیسیلیک با سازوکار کنترل شوری حاصل از نمک در جهت دفاع از گیاه اثر خود را بر افزایش فنل در کالوس استویا گذاشته است، این نتیجه در گیاهانی مانند پروانش (Neelam et al., 2014) و ریحان سبز (Delavari Parizi, 2010) نیز گزارش شده است. فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه ترکیب‌های فنلی هستند که نقش دفاعی مهمی در مقابل تنش‌ها ایفاء می‌کنند (Myung-Min et al., 2009). در آزمایشی روی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تنش شوری مقدار فلاونوئید افزایش یافت (Esam & Esam, 2011). در تنش شوری، تیمار با اسید سالیسیلیک می‌تواند فلاونوئیدها را افزایش دهد و سبب مقاومت به شوری در دانه‌ها سویا شود (Simaei et al., 2012). در بررسی اثر محرک متیل‌جاسمونات در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، نتایج نشان داد که استفاده از متیل‌جاسمونات باعث کاهش تولید ایزولیکویریتجین (*Isoliquiritigenin*) شد که این ترکیب پیش‌ماده تولید ترکیب‌های فلاونوئیدی است (Shirazi et al., 2012). فلاونوئیدها یکی از متنوع‌ترین ترکیب‌های طبیعی هستند که توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. مشاهدات ثابت می‌کند که غلظت ۲۰  $\mu\text{M}$  اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئیدها در گیاه *Panax ginseng* افزایش قابل توجهی را به همراه داشت (Yu et al., 2006; Ali et al., 2007). همچنین نشان داده شد که با افزایش تنش‌های محیطی و به‌علت نقص در متابولیسم گیاه، بر غلظت یون‌ها، مولکول‌ها و ترکیب‌های شیمیایی ناپایدار که تحت عنوان رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند، افزوده می‌شود. به طوری که با افزایش

کاربرد نمک NaCl سبب القای تنش شوری به گیاه گردید که به دنبال آن، به منظور خنثی‌سازی اثرهای زیان‌بار تنش‌هایی مانند تنش اکسیداتیو حاصل از تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، سازوکارهای دفاعی در گیاه فعال می‌گردد. از جمله پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش‌ها می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز اشاره کرد. متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک مسیر سیگنالینگ اختصاصی داشته، اما هر یک از آنها قابلیت بازدارندگی و یا تحریک‌کنندگی بر همدیگر را نیز دارند. برخی از مطالعات عامل اصلی این ارتباط را هورمون اتیلن می‌دانند. در واقع متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز سبب فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیب‌های فنلی می‌شوند (Wang & Wu, 2010). بیان و فعالیت آنزیم PAL رابطه مستقیم با میزان فنیل پروپانوئید دارد، به طوری که افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوئیدی می‌گردد (Bagal et al., 2012). در مطالعه‌ای تیمارهای اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در کشت سوسپانسیون ریشه پاناکس و شیرین‌بیان باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز شد (Ali et al., 2007). در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری، ترکیب‌هایی مانند اسید سالیسیلیک با فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیب‌های دفاعی سبب افزایش مقاومت گیاهان می‌شوند که این اثر اسید سالیسیلیک به سازوکار اثر محرک آن بر تغییر بیان ژن‌های سازنده آنزیم‌های درگیر در فرایندهای دفاعی در گیاهان بازمی‌گردد (He & Zhu, 2008). استفاده از ترکیب‌هایی مانند نمک NaCl به عنوان الیستور، سبب القای تنش شوری در گیاهان شده و به دنبال آن سازوکارهای تدافعی گیاه برای بقاء فعال می‌شود که در نهایت منجر به افزایش بیان آنزیم PAL و نیز بیوسنتز مواد مؤثره وابسته می‌گردد. ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی در اندام‌های مختلف گیاهان وجود دارند که آنزیم‌های مختلفی نقش سنتز این ترکیب‌های مهم را بر عهده دارند. Chen و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که دامینه شدن

فنیل‌آلانین و تولید سینامیک اسید مهمترین مرحله در تولید و بیوسنتز فنل‌ها می‌باشد. افزایش فعالیت PAL منجر به افزایش ترکیب‌های فنلی می‌شود که این واکنش از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش می‌باشد (Huang et al., 2010). داده‌های زیادی همبستگی بین تجمع ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم PAL را نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین منجر به افزایش تجمع ترکیب‌های فنیل پروپانوئیدی می‌شود (Gallao et al., 2010). بررسی‌های Jacobo-Velázquez (۲۰۱۱) نشان داد که آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش یافته و با بیشتر شدن فعالیت ویژه آنزیم فنیل‌آلانین، متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابند. Koushesh و همکاران (۲۰۱۲) همبستگی مثبت بین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و ترکیب‌های فنلی را به اثبات رسانده‌اند. یکی از روش‌های متابولیسمی بارز در واکنش به تنش اسمزی، تجمع پرولین است که سازوکار احتمالی افزایش تولید آن توسط پژوهشگران مشخص شده است (Arshi et al., 2002). تنش شوری سبب بروز تنش اسمزی (تنش آبی) می‌گردد، در چنین شرایطی گیاهان برای مقابله با تنش بوجود آمده از سازوکارهای متنوعی استفاده می‌نمایند تا اثرهای ناشی از تنش را تخفیف دهند. افزایش سنتز و تجمع اسمولیت‌ها از روش‌های مهم تداوم جذب آب و کنترل تنش اسمزی است که اهمیت تجمع پرولین در حفظ وضعیت آبی گیاه بسیار زیاد بوده و به عنوان وسیع‌ترین اسمولیت انباشته شده در تنش عمل می‌کند (Rhodes et al., 2002). میزان پرولین در محیط کشت جامد بیشتر از مایع بود. علت این امر احتمالاً جذب بیشتر آب در محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد و افزایش وزن کالوس در اثر این افزایش آب درون سلول‌ها می‌باشد. همچنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرایند طبیعی سلولی ممانعت بعمل می‌آورد. استفاده از ترکیب‌هایی مانند اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات، مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند و موجب بهبود فعالیت‌های متابولیسمی گیاه

- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. and Dixon, R.A., 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 16: 3098-3109.
- Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2007. Methyl jasmonat and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolic in *Panax ginseng* Bioreactor root suspension culture. *Journal of Molecules*, 12: 607-621.
- Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y., 2001. Effect of methyl jasmonate on harpin induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured by-2 cells. *Plant Cell Physiology*, 42(4): 446-449.
- Arshi, A., Abdin, M.Z. and Iqbal, M., 2002. Growth and metabolism of senna as affected by salt stress. *Biologia Plantarum*, 45(2): 295-298.
- Azarpour, E., Motamed, M.K. and Bozorgi, H.R., 2014. *Stevia* cultivation and promotion. Lahijan of Islamic Azad University Press, Lahijan.
- Babel, P., Devpura, V. and Purohit, S.D., 2014. Salicylic acid induced changes in growth and some biochemical characteristics in vitro cultures shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. Et Fernand. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(4): 774-779.
- Bagal, U.R., Leebens Mack, J.H., Walter Lorenz, W. and Dean, J.F.D., 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. *BMC Genoms*, 13(3): 1471-2164.
- Bates, L., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Bourgaud, F., Grivot, A. and Goniter, E., 2002. Production of plant secondary metabolites. *Plant Science* 161: 839-851.
- Chen, J.Y.W., Kong, P.F., Pan, W.F., Wan, Q.H. and Huang, W.D., 2006. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology*, 163(2): 115-127.
- Dash Agha, Z., Mazaheri Tirani, M. and Ghasemi Khorasgani, M., 2014. The effect of acid-salicylic on some growth and biochemical parameters of wheat and maize under salt stress in laboratory conditions. *Journal of Crop Production and Processing*, 4(11): 207-216.
- Delavari Parizi, M., 2010. The effects of Salicylic acid and salinity stress on the some physiological and biochemical changes in *Ocimum basilicum* L.

می شوند. پرولین باعث محافظت غشای سلولی در برابر تنش های زیستی و غیرزیستی می شود. آزمایش های Sairam و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که افزایش پرولین و قند احیاء باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر شوری می شود. در محیط درون شیشه ای پرولین نقش یک جاروکننده ROS را بر عهده دارد و باعث افزایش سنتز سلولی در طول تنش در گیاهان می شود. البته افزایش میزان پرولین در این آزمایش می تواند به دلیل افزایش سنتز پرولین یا کاهش تجزیه آن به منظور مقابله با تنش شوری باشد.

به عنوان نتیجه گیری نهایی میتوان گفت که به دلیل اهمیت بسیار ترکیب های ثانوی گیاهان دارویی و کاربرد این ترکیب ها در صنایع مختلف، دستیابی به روش های مفید برای تولید اقتصادی این ترکیب ها بسیار حائز اهمیت است. کاربرد ایلیسیتورها و ایجاد تنش به منظور تحریک بیوسنتز و تولید متابولیت های ثانویه، یکی از مهمترین روش های افزایش متابولیت های ثانویه است. در این آزمایش اثر شوری و اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به عنوان ایلیسیتور در دو محیط کشت جامد و مایع استفاده شد و نتایج نشان داد که فعالیت های بیوشیمیایی کالوس تحت تأثیر ایلیسیتورها و همچنین محیط کشت قرار دارد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که در کشت استوبا در صورت تمایل به تولید متابولیت به ویژه توجه به مقوله کشت متابولیتی در شرایط درون شیشه ای بهتر است که از سیستم کشت مایع استفاده گردد.

### منابع مورد استفاده

- Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. and Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3): 427-436.
- Abou-Arab, E.A., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, F.M., 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant. *African Journal of Food Science*, 4(5): 269-281.

- Mirza Masoumzadeh, B., Imani, A.A. and Khayamaim, S., 2012. Salinity stress effect on proline and chlorophyll rate in four beet cultivars. *Annals of Biological Research*, 3(12): 5453-5456.
- Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B.E., 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12(12): 706-709.
- Myung-Min, H., Trick, H.N. and Rajasheka, E.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166: 180-191.
- Neelam, M., Rahul, M., Ajiboye, M., Kafayat, Y. and Lateefat, Y., 2014. Salicylic acid alters antioxidant and phenolic metabolism in *Catharanthus roseus* grown under salinity stress. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5): 118-125.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H. and Sokhansanj, A., 2004. Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Biologia Plantarum*, 48: 613-615.
- Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifzadeh, B., 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. *Biologia Plantarum*, 50(4): 591-596.
- Raman, V. and Ravi, S., 2011. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3): 1043-1049.
- Rao, R.S. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant tissue cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2): 101-153.
- Rezaadeh, A., Ghasemnezhad, A. and Barani, M., 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plant*, 63: 242-252.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. and Rich, P.J., 2002. Salinity, osmolytes compatible solutes: 181-204. In: Lauchli, A. and Lutge, U., (Eds.). *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Kluwer Academic Publ., Boston, 552p.
- Sairam, R.K., Tyagi, A. and Chinnusamy, V., 2006. Salinity tolerance: cellular mechanisms and gene regulation: 121-176. In: Huang, B., (Ed.). *Plant-Environment Interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL, 416p.
- Master thesis, Department of Biology, Payame Noor University.
- Dos Santos, V.L., de Souza Monteiro, A., Braga, D.T. and Santoro, M.M., 2009. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Material*, 161: 1413-1420.
- Ehsanpour, A. and Amini, F., 2001. *Plant Cell and Tissue Culture*. JDM Press, 181p.
- Esam, A.H. and Esam M.A., 2011. Effect of mannitol and sodium chloride on some total secondary metabolites of fenugreek calli cultured in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 21(1): 35-43.
- Gallao, M.I., Cortelazzo, A.L., Salema Fevereiro, M.P. and Brito, E.S., 2010. Biochemical and morphological responses to abiotic elicitor chitin in suspension-cultured sugarcane cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(2): 8-18.
- He, Y. and Zhu, Z.J., 2008. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum*, 52(4): 792-795.
- Horbowicz, M., Chrzanowski, G., Koczkodaj, D. and Mitrus, J., 2011. The effect of methyl jasmonate vapors on concentration of phenolic compounds in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 80(1): 5-9.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. and Chen, Z., 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4): 1526-1538.
- Jacobo-Velázquez, D.A., Martínez-Hernández, G.B., Del C Rodríguez, S., Cao, C.M. and Cisneros-Zevallos, L., 2011. Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12): 6583-6593.
- Jain, P., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L., 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* Bertoni by using high copper levels in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 119(3): 315-319.
- Koushesh, M., Arzani, K. and Barzegar, M., 2012. Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 8947-8953.

- elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 89: 1-13.
- Toor, R.K. and Savage, G.P., 2005. Antioxidant activities in different fractions of tomato. *Food Research International*, 38: 487-494.
  - Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 243-253.
  - Wang, J.W. and Wu, J.Y., 2010. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Application Microbiology Biotechnology*, 88: 437-449.
  - Yu, Z.Z., Fu, C.X., Han, Y.S., Li, Y.X. and Zhao, D.X., 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnology Letter*, 28: 1027-1031.
  - Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.
  - Samadi, S., 2013. Effect of elicitors (salicylic acid, methyl jasmonate) on biochemical conditions of *Cynara scolymus*. M.Sc. thesis. Department of Agricultural Science and Natural Resources, The Gorgan University.
  - Saunders, J.A. and McClure, J.W., 1974. The suitability of a quantitative spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity in barely, buckwheat and pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 54: 412-413.
  - Shirazi, Z., Piri, Kh., Mirzaie Asl, A. and Hasanloo, T., 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrriz glabra*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 31: 4640-4646.
  - Simaei, M., Khavari-Nejad, R.A. and Bernard, F., 2012. Exogenous application of salicylic acid and nitric oxide on the ionic contents and enzymatic activities in nacl-stressed soybean plants. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 1495-1503.
  - Sonja, G., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C. and Hagege, D., 2007. Jasmonic acid

## The effect of salicylic acid, methyl jasmonate and NaCl stimulants on biochemical compounds of stevia's callus in solid and liquid media

M. Salmalian<sup>1</sup>, A. Ghasemnejad<sup>2\*</sup> and K. Mashayekhi<sup>3</sup>

1- M.Sc. student in Medicinal and Aromatic Plants, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2\*- Corresponding author, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

E-mail: aghasemnajad@hotmail.com

3- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: October 2018

Revised: July 2019

Accepted: July 2019

### Abstract

Using stimulants is an efficient way to increase the production of secondary metabolites of medicinal plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. The present study aimed to investigate the effect of NaCl (0 and 50 mM), salicylic acid, and methyl jasmonate (each in 0 and 100  $\mu$ M) in solid and liquid culture media on the biochemical properties and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity of stevia callus under *in vitro* conditions. This study was conducted in a completely randomized design with a two-factor factorial arrangement in four replications. The stimuli used, culture medium and their interactions had a significant effect on the measured traits. The highest amount of phenol and flavonoid production was observed in salicylic acid 100 + salinity 50 and salinity 50 treatments in solid culture medium. Treatments including salinity 50, salicylic acid 100 + salinity 50 and methyl jasmonate 100 + salinity 50 in the solid medium increased PAL enzyme activity compared to other treatments. PAL enzyme, phenol and flavonoid were positively correlated each other. The 50 mM salinity treatment also increased proline amino acid content. Therefore, in order to improve the production of secondary compounds such as phenol, flavonoids and also PAL enzyme activity in stevia, a combination of salicylic acid (100  $\mu$ M) and salinity (50 mM) is recommended under solid culture medium conditions.

**Keywords:** Phenylalanine ammonia-lyase, proline, tissue culture, phenol, flavonoid, liquid media.