

تأثیر متیل جاسمونات و هیدروژن پراکسید بر میزان تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی فندق

مریم جمالی^۱، علیرضا قنبری^۲، اصغر استاجی^۳، اسماعیل چمنی^۴ و امیرمحمد ناجی^۵

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۴/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۵)

چکیده

کشت سوسپانسیون سلولی فندق به‌عنوان روشی مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش بهره‌وری در تحقیقات بیوشیمیایی و زیست‌فناوری به کار می‌رود. این فناوری امکان کنترل دقیق شرایط رشد، کاهش هزینه‌ها و تولید انبوه ترکیبات دارویی مانند تاکسول را فراهم می‌کند. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثرات متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بر میزان متابولیت‌های ثانویه فندق طی کشت سوسپانسیون سلولی فندق انجام شد. تیمارها شامل متیل جاسمونات در چهار غلظت ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی گرم در لیتر و آب اکسیژنه در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی لیتر در لیتر همراه با تیمار شاهد بود. بعد از اتمام آزمایش صفاتی مانند وزن تر، وزن خشک، محتوای فنل و فلاونوئید کل و تاکسول انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از متیل جاسمونات و H_2O_2 بر میزان متابولیت‌های مورد بررسی در سوسپانسیون سلولی فندق تأثیر چشمگیری داشت. استفاده از غلظت ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر متیل جاسمونات نسبت به غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن تأثیر بهتری بر میزان محتوای فنل و فلاونوئید کل داشت. میزان محتوای فنل (۱۴/۸۸ میلی گرم در گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۲/۶۵ میلی گرم در گرم وزن خشک) در نمونه‌های سوسپانسیون سلولی تیمار شده با متیل جاسمونات در غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان تاکسول (۳۰۸/۷۹ میلی گرم در لیتر) در نمونه‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن در غلظت ۰/۵ میلی لیتر مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *Corylus avellana*، تاکسول، تنظیم‌کننده رشد گیاهی، سوسپانسیون سلولی

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۴- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۵- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

* پست الکترونیک: ghanbari66@uma.ac.ir

مقدمه

فندق (*Corylus avellana* L) به دلیل ارزش غذایی بالا از دیرباز در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. میوه فندق حاوی ۱۹ درصد پروتئین، ۶۰ درصد روغن و درصد بالایی از ویتامین‌های B و E و عناصر معدنی مانند فسفر می‌باشد. امروزه با شناخت بیشتر این گیاه با شناسایی و جداسازی سموم از برگ‌ها و پوسته‌های اطراف دانه فندق از یک طرف و ارزش دارویی و اقتصادی بالای متابولیت‌ها از یک دیگر، برای کاربردهای صنعتی و پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از ترکیبات این گیاه در درمان سرطان‌ها افق جدیدی را در تولید اقتصادی این ماده ارزشمند گشوده است. علاوه بر این از این گیاه برای تهیه بیودیزل و بیوپلاستیک نیز استفاده می‌شود (رضوی^۱ و همکاران، ۲۰۲۱). یکی از روش‌های تکثیر گیاهان تکنیک کشت بافت و روش کشت کالوس و یا کشت سوسپانسیون سلولی می‌باشد. عوامل مختلفی مانند: ژنوتیپ، نوع محیط کشت، نوع کربوهیدرات، دوره زمانی کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و شرایط محیطی نقش موثری در تولید گیاه در شرایط کشت بافت دارند (سبحانی زاده^۲ و همکاران، ۲۰۲۵). به غیر این موارد استفاده خارجی از تنظیم‌کننده‌ها و هر عاملی که بر شرایط رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار باشد نیز مفید است. ترکیبات مختلفی در ابتدا یا وسط مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان وجود دارند که با افزودن آنها به محیط کشت می‌توان تولید محصول نهایی را افزایش داد (ریدل^۳ و همکاران، ۲۰۱۲). محرک‌هایی که غالباً در مطالعات مورد استفاده می‌شوند، شامل کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و کیتوزان هستند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، بخشی از پاسخ‌های دفاعی در برابر حملات پاتوژنی است که توسط محرک‌ها القا و فعال می‌شوند، استفاده از الیستورها در کشت سلولی مناسب‌ترین روش برای افزایش بهره‌وری است (ژانگ^۴، ۲۰۰۱). در میان آنها متیل جاسمونات و مشتقات آن مشخص شده‌اند که ضمن القای واکنش‌های

دفاعی به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه منجر می‌گردد (جیاسری^۵ و همکاران، ۲۰۲۳).

تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی به دلیل ارزش اقتصادی بالای این ترکیبات به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (وانگ^۶ و همکاران، ۲۰۲۲). یکی از متابولیت‌های مهم گیاه فندق تاکسول می‌باشد که یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است که متعلق به گروهی از ترپنوئیدها به نام تاکسان‌ها بوده و از پیش‌ماده ژرانیل-ژرانیل دی‌فسفات منشأ می‌گیرد و توسط آنزیم تاکسیدین سنتتاز (TS) به گونه ۴، ۵ تاکسا تبدیل می‌شود (ره‌پیما^۷ و همکاران، ۲۰۱۵). برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی گیاهی می‌توان از استراتژی‌های مختلفی استفاده نمود (فری‌تر^۸ و همکاران، ۲۰۲۲؛ گیگلو^۹ و همکاران، ۲۰۲۲). نخستین گزارش از تولید پاکلیتاکسل در کشت سوسپانسیون سلولی فندق توسط بستوسو^{۱۰} و همکاران (۲۰۰۶) ارائه شد که موفق به تولید این ترکیب با غلظت ۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر شدند. در پژوهشی برای افزایش تولید تاکسان‌ها از الیستورهای شیمیایی مانند متیل جاسمونات به همراه کیتوزان استفاده شد که منجر به دو برابر شدن تولید تاکسول نسبت به نمونه شاهد گردید. در پژوهش‌های دیگر نیز از فنیل آلانین (بمانی^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۳)، امواج فراصوت (ره‌پیما و همکاران، ۲۰۱۵)، محرک‌های قارچی (صالحی^{۱۲} و همکاران، ۲۰۲۰) جهت افزایش تولید پاکلیتاکسل و دناستیل‌باکاتین نیز استفاده شده است.

با توجه به اینکه گیاه فندق و کشت سلولی آن به عنوان منبع جدید تاکسول معرفی شده و از برخی جهات از قبیل فراوانی و سهولت دسترسی، کشت و کار وسیع و القا و نگهداری راحت‌تر کالوس مزیت‌هایی دارد و از طرفی نشان داده شده است که غالباً یک رابطه هم‌افزایی بین محرک‌های مختلف در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه یا کشت‌های سلولی وجود

7. Rahpeyma
8. Fritz
9. Giglou
10. Bestoso
11. Bemani
12. Salehi

1. Razavi
2. Sobhannizadeh
3. Riedel
4. Zhong
5. Jeyasri
6. Wang

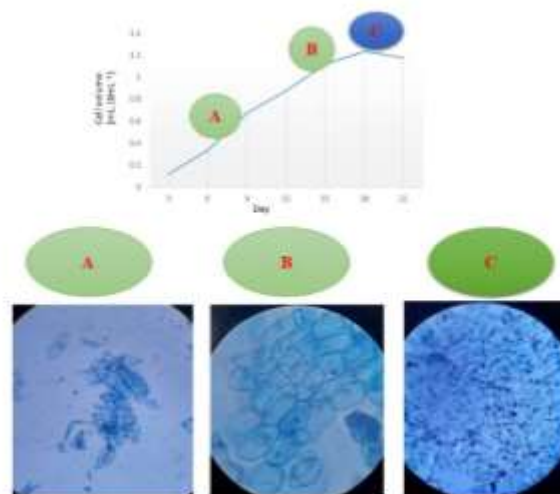
برای القای کالوس، برش‌هایی از بذر در محیط کشت MS کامل همراه با تنظیم‌کننده‌های رشدی 2-4-D (در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر)، BA (در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر) و NAA (در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر) قرار داده شد. مدت زمان القای کالوس ۳ هفته بود.

برای کشت سوسپانسیون سلولی از کالوس ترد و شکننده در محیط کشت MS مایع با دو برابر غلظت ساکارز همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد شامل NAA، BA و 2-4-D (در غلظت های استفاده شده در مرحله القای کالوس) مورد استفاده قرار گرفت. پس از رشد مناسب کالوس و بررسی میزان توده سلولی تولید شده در این محیط و شمارش سلول‌های زنده در آخرین مرحله و پس از رسیدن کشت‌های سوسپانسیون سلولی به سطح مطلوب OD، تیماردهی انجام شد. میزان رشد سوسپانسیون سلولی در شکل ۱ آورده شده است. پس از تعیین زمان مناسب برای برداشت سوسپانسیون سلولی فندق، سلول‌های فندق در محیط کشت مایع MS حاوی

دارد (سبی^۱ و همکاران، ۲۰۲۴)، بنابراین در این پژوهش سعی شده است تا با استفاده از محرک‌های شیمیایی در محیط سوسپانسیون سلولی، ضمن اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف فیزیولوژیک، عملکرد سلول‌های فندق در محیط کشت تعلیقی از نظر تولید تاکسول مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بذرهای فندق مورد استفاده در این پژوهش از ایستگاه تحقیقات فندق اشکورات رودسر، که جزء ارقام محلی منطقه بوده تهیه شد. کالوس‌های به‌دست آمده از برش‌های دانه به عنوان ماده گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور بذرهای به مدت ۴۵ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. پس از ضدعفونی سطح، بذرهای به مدت دو دقیقه با آب مقطر شسته شدند. در مرحله بعد، بذرهای به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تیمار شدند و سپس به مدت ۲ دقیقه (سه بار با فاصله یک دقیقه) با آب مقطر شسته شدند.



شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های فندق در محیط کشت سوسپانسیون سلولی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. پس از رسیدن به OD ۰/۸ پس از سه هفته، سوسپانسیون سلولی فندق برای بررسی تأثیر تیمارهای متیل جاسمونات و آب اکسیژنه بر میزان متابولیت‌های ثانویه آزاد شده توسط سلول‌های فندق آنالیز شد. برای به‌دست آوردن میزان وزن

2-4-D (در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر)، BA (در غلظت دو میلی گرم در لیتر) و NAA (در غلظت یک میلی گرم در لیتر) همراه با تیمار متیل جاسمونات در ۴ غلظت ۲۵۰، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۳۵۰ میلی گرم در لیتر و آب اکسیژنه در غلظت ۰/۵ و یک میلی گرم در لیتر همراه با تیمار شاهد تحت بررسی قرار گرفت.

تقریباً ۳:۱، ۱:۱/۵، ۱:۰/۷۵) عصاره با دو میلی لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد رادیکال‌های آزاد (%I) در هر عصاره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%I = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

استخراج تاکسول

طبق روش دوسی^۵ و همکاران (۲۰۲۲)، سلول‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک و پودر شدند. ۵۰ میلی گرم از هر نمونه با ۵ میلی لیتر محلول متانول (گرید HPLC) حاوی ۶۰ درصد متانول و ۴۰ درصد ddH₂O مخلوط شد. سپس مخلوط سه بار به مدت ۱۵ دقیقه اولتراسونیک قرار گرفته شد. مخلوط به دست آمده در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و بخش‌های رویی جمع‌آوری شد. سپس مواد رویی در شرایط خلأ در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شدند تا عصاره‌های خشک به دست آید. به عصاره خشک، ۴۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. عصاره‌ها فیلتر شده تا زمان تجزیه و تحلیل بعدی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جاکابوا^۶ و همکاران، ۲۰۱۲). از روش HPLC برای تعیین کمیت تاکسول در نمونه‌ها استفاده شد. برای اندازه‌گیری تاکسول از HPLC با ستون ۱۸ به طول ۵۰ میلی متر و فاز متحرک متانول و آب به نسبت ۴۵ به ۵۰ و با دبی ۱ میلی متر در دقیقه با طول موج UV ۲۷۰ نانومتر استفاده شد. پس از کالیبراسیون ستون‌ها، مقدار تاکسول در هر نمونه با تزریق محلول استاندارد و به دست آوردن منحنی کالیبراسیون و با مقایسه زمان مهار پیک تاکسول خالص تزریق شده با غلظت‌های مختلف و پیک‌های به دست آمده از عصاره‌های تزریقی انجام شد. برای تعیین میزان تاکسول در هر یک از عصاره‌ها، سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر اندازه‌گیری شد و با قراردادن این سطح در معادله به دست آمده از منحنی کالیبراسیون، مقدار تاکسول بر حسب ppm برای هر نمونه برآورد شد.

تر بعد از اتمام آزمایش سلول‌های فندق از محیط کشت مایع در شرایط سترون جداسازی و به صورت جداگانه برای هر تیمار و تکرار با ترازوی دیجیتالی توزین شد و تا زمان شروع آنالیزهای بعدی در ۸۰- نگهداری شد.

تهیه ماده خشک و عصاره‌گیری برای اندازه‌گیری محتوای فنل (TPC)، فلاونوئید کل (TFC) و فعالیت آنتی اکسیدانی

سوسپانسیون سلولی فندق در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۹۶ ساعت خشک شد و سپس مواد خشک شده آسیاب شد. پس از این، ۰/۱ گرم از هر نمونه در ۵۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خیسانده شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره‌ها از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۴ فیلتر شدند. سپس حلال در دمای کمتر از ۵۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. بقیه آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد (پورمراد^۱ و همکاران، ۲۰۰۶).

محتوای فنل کل (TPC)

مقدار محتوای فنل کل (TPC) با استفاده از روش مدا^۲ و همکاران (۲۰۰۵) تعیین شد. اسیدگالیک به عنوان یک استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. محتوای فنل کل عصاره‌ها در هر میلی گرم (معادل اسید گالیک در هر گرم وزن خشک گیاه) گزارش شد.

محتوای فلاونوئید کل (TFC)

برای اندازه‌گیری TFC، ۱/۵ میلی لیتر متانول (۰/۸۰)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول (10%) AlCl₃، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات سدیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره اضافه شد. جذب پس از ۴۰ دقیقه در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. کوئرتستین به عنوان یک استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها بر حسب میلی گرم معادل کوئرتستین در هر گرم ماده خشک گزارش شد (میتا^۳ و همکاران، ۱۹۹۷).

فعالیت آنتی اکسیدانی

بر اساس روش میلیاسکاس^۴ و همکاران (۲۰۰۴) DPPH، غلظت‌های مختلف (نسبت جرمی نهایی عصاره‌ها با DPPH

4. Miliuskas
5. Devci
6. Jakabová

1. Pourmorad
2. Meda
3. Mita

تجزیه آماری داده‌ها

برای انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات مورد بررسی از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ استفاده شد. مقایسه میانگین‌های تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. همچنین برای رسم شکل از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ و برای بررسی همبستگی بین صفات از نرم‌افزار Heatmap استفاده گردید.

نتایج و بحث

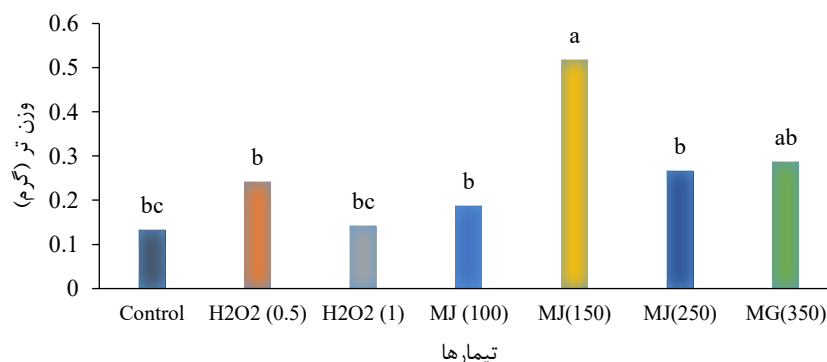
وزن تر و خشک

بررسی میزان وزن تر و خشک سوسپانسیون سلولی فندق نشان داد که کاربرد پراکسید هیدروژن و متیل جاسمونات میزان این صفات را افزایش داد که میزان این افزایش در غلظت‌های پایین بیشتر بود و با افزایش غلظت تیمارهای فوق این صفات نیز کاهش یافت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن تر (شکل ۲) و خشک (شکل ۳) در نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ۱۵۰ ppm مشاهده شد. که این میزان به ترتیب ۷۴/۴۶ (شکل ۲) و ۷۵/۰۱ درصد (شکل ۳) بیشتر از میزان وزن تر به دست آمده در نمونه‌های شاهد بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن و متیل جاسمونات وزن تر و خشک نمونه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. اما در برخی غلظت‌ها متیل جاسمونات به ویژه در ۲۵۰ ppm، افزایش در وزن تر و خشک نسبت به نمونه‌های شاهد، مشاهده شد.

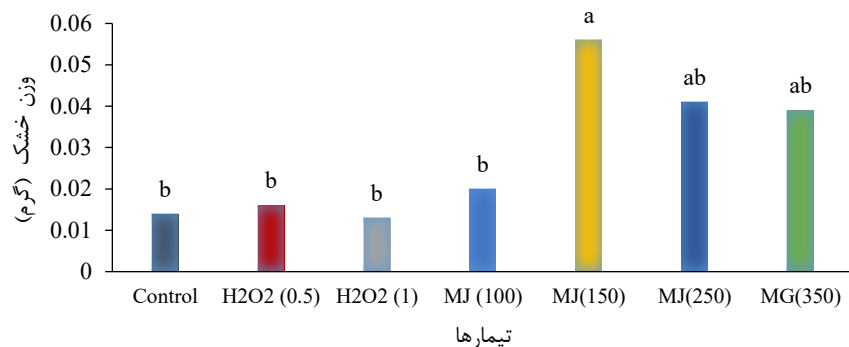
این یافته ممکن است به دلیل نقش سیگنال‌دهی این ترکیبات در فعال‌سازی مسیرهای رشد و بیوسنتز در شرایط خاص باشد، همان‌گونه که در مطالعات پیشین نشان داده شده است (جیاسری و همکاران، ۲۰۲۳؛ خان^۱ و همکاران، ۲۰۲۵). پراکسید هیدروژن به عنوان یک عامل تنش اکسیداتیوی در گیاهان نقش دوگانه‌ای ایفا می‌کند: از یک طرف، در غلظت‌های پایین، به عنوان یک پیام‌رسان سیگنال‌دهنده برای فعال‌سازی مسیرهای مقاومت و بیوسنتز متابولیت‌های دفاعی عمل می‌کند و از طرف دیگر در غلظت‌های بالاتر، می‌تواند موجب آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش میزان رشد و تولید متابولیت‌ها شود (هو^۲ و همکاران، ۲۰۱۶).

محتوای فنل و فلاونوئید کل

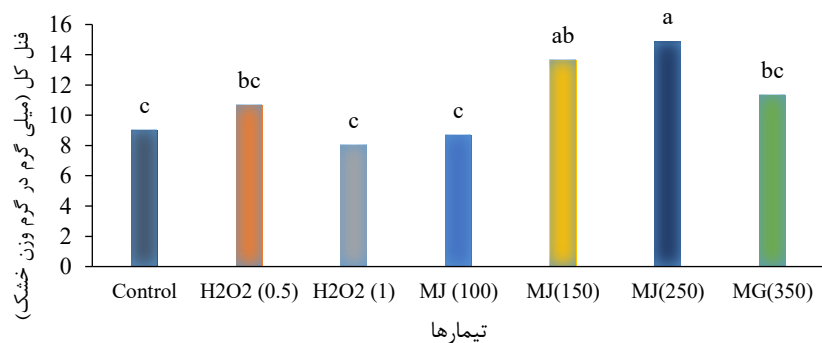
در بررسی اثرات تیمارهای مورد استفاده بر میزان محتوای فنل و فلاونوئید کل در سوسپانسیون سلولی فندق مشاهده شد که افزایش متیل جاسمونات تا غلظت ۲۵۰ ppm میزان این شاخص را افزایش داد این در حالی بود که غلظت ۳۵۰ ppm متیل جاسمونات میزان محتوای فنلی را کاهش داد. از این رو بیشترین میزان محتوای فنل و فلاونوئید کل در نمونه‌های سوسپانسیون سلولی تیمار شده با متیل جاسمونات در غلظت ۲۵۰ ppm مشاهده شد که این میزان ۳۹/۷۵ درصد بیشتر از میزان محتوای فنل به دست آمده از نمونه‌های شاهد بود (شکل ۴). همچنین بیشترین میزان محتوای فلاونوئید کل ۷۱/۶۹ درصد بیشتر از میزان این شاخص در نمونه شاهد بود (شکل



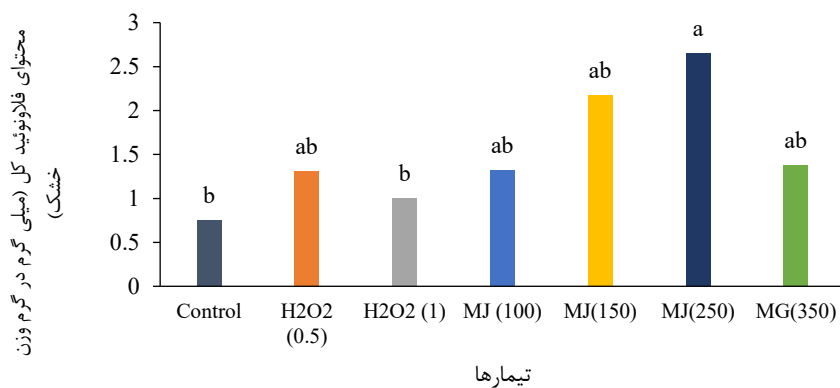
شکل ۲- تغییرات میزان وزن تر در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل ۳- تغییرات میزان وزن خشک در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل ۴- تغییرات میزان محتوای فنل کل در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل ۵- تغییرات میزان محتوای فلاونوئید کل در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

فنی داشته باشد. در مسیر بیوسنتزی، پراکسید هیدروژن می‌تواند فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند فنیل آلانین آمونیالاز

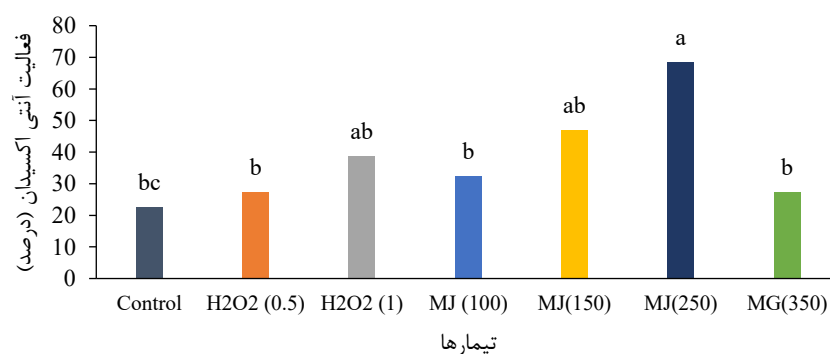
(۵). این نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر متیل جاسمونات ممکن است اثرات منفی بر روی تولید ترکیبات

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها عمل کند و از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری نماید (سینگ^۳ و همکاران، ۲۰۱۸). متیل جاسمونات به‌عنوان یک واسطه اساسی و کنترلی در مسیر بیوسنتزی فنل‌ها و فلاونوئیدها عمل می‌کند. این ترکیب با فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با پاسخ‌های استرسی و تنظیم مسیرهای بیوسنتزی، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند فنیل‌آلانین آمونیالایز، چالکون‌سنتاز (CHS) و استیلین‌سنتاز (STS) را تحریک کند. این آنزیم‌ها، نقش اصلی را در تولید ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک دارند و فعال‌سازی آن‌ها در نتیجه افزودن متیل جاسمونات منجر به افزایش چشمگیر در بیوسنتز این متابولیت‌ها می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که متیل جاسمونات، با فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی، نقش مهمی در تنظیم و تقویت فعالیت‌های ژنی مربوط به تولید متابولیت‌های دارویی و گیاهی ایفا می‌کند (قناتی^۴ و همکاران، ۲۰۱۱؛ وانگ و همکاران ۲۰۲۲؛ گوکتپ-آتیلگان^۵ و همکاران، ۲۰۲۳). همچنین، این ترکیب در قالب یک میانجی سیگنال، می‌تواند مسیرهای مقاومت و سازگاری گیاهی را به استرس‌های محیطی فعال سازد که نتیجه آن، افزایش تولید ترکیبات دفاعی و دارویی است (یو^۶ و همکاران، ۲۰۱۹؛ پیمائی^۷ و همکاران، ۲۰۲۴).

(PAL) که نقش مهمی در مسیر فنولیک و تولید فلاونوئیدها دارند را تنظیم کند. بر اساس تحقیقات، پراکسید هیدروژن به‌عنوان یک پیام‌رسان داخل سلولی، با فعال‌سازی ژن‌های مرتبط و افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر فنولیک، موجب افزایش تولید فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌شود (بربا-اسپین^۱ و همکاران، ۲۰۲۱). این اثر به‌ویژه در حضور غلظت‌های کنترل‌شده، نشان می‌دهد که پراکسید هیدروژن می‌تواند نقش مثبت و تقویت‌کننده در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ایفا کند، در حالی که غلظت‌های بیش از حد آن، اثر عکس دارد و ممکن است به کاهش فعالیت‌های بیوسنتزی منجر شود (فان^۲ و همکاران، ۲۰۲۴).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن قرار گرفت. به‌طوری که همسو با افزایش غلظت متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ۲۵۰ ppm مشاهده شد (شکل ۶). این یافته‌ها نشان‌دهنده این است که متیل جاسمونات می‌تواند به‌عنوان یک محرک طبیعی برای افزایش



شکل ۶- تغییرات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

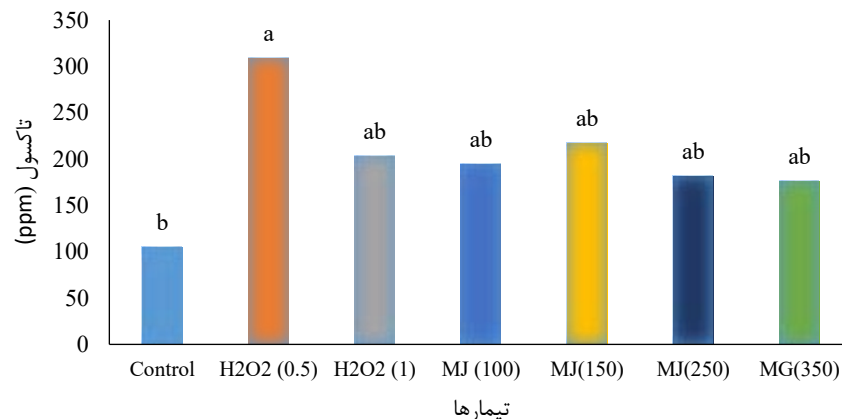
5. Goktepe-Atilgan
6. Yu
7. Peymaei

1. Barba-Espín
2. Fan
3. Singh
4. Ghanati

میزان تاکسول

نشان‌دهنده این است که ترکیبات اکسیداتیو می‌توانند به‌عنوان محرک‌های طبیعی برای تولید تاکسول در سوسپانسیون‌های سلولی عمل کنند. می‌توان گفت که هر دو عامل متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن نقش‌های مهم و تعاملی در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی گیاهی دارند (کیم^۱ و همکاران، ۲۰۱۷؛ یان^۲ و همکاران، ۲۰۲۰؛ لئو^۳ و همکاران، ۲۰۲۴). استراتژی‌های بهینه‌سازی غلظت‌های این عوامل، می‌تواند منجر به افزایش بهره‌وری در تولید داروهای گیاهی و ترکیبات بیوسنتزی ارزشمند گردد. همچنین، توسعه فناوری‌های جدید جهت تنظیم دقیق میزان این ترکیبات در سیستم‌های کشت، می‌تواند بهره‌وری و سازگاری گیاه در محیط‌های صنعتی و آزمایشگاهی را افزایش دهد (نبی^۴ و همکاران، ۲۰۲۱).

برای بررسی و اندازه‌گیری اثرات کاربرد متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن بر میزان تاکسول در سوسپانسیون سلولی فندق از HPLC استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که همسو با افزایش غلظت متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن میزان تاکسول نیز در نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد روندی افزایشی داشت. به‌طوری که بیشترین میزان تاکسول در نمونه‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن در غلظت ۱ میلی مولار ثبت شد. که این میزان به‌ترتیب ۶۵/۹۵ و ۲۹/۵۴ درصد بیشتر از میزان تاکسول به‌دست آمده در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات در غلظت ۱۵۰ ppm بود (شکل ۷). در خصوص تولید تاکسول، نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن به‌طور معنی‌داری میزان تاکسول را افزایش دادند. این یافته‌ها



شکل ۷- تغییرات میزان تاکسول در سوسپانسیون سلولی فندق تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂). ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

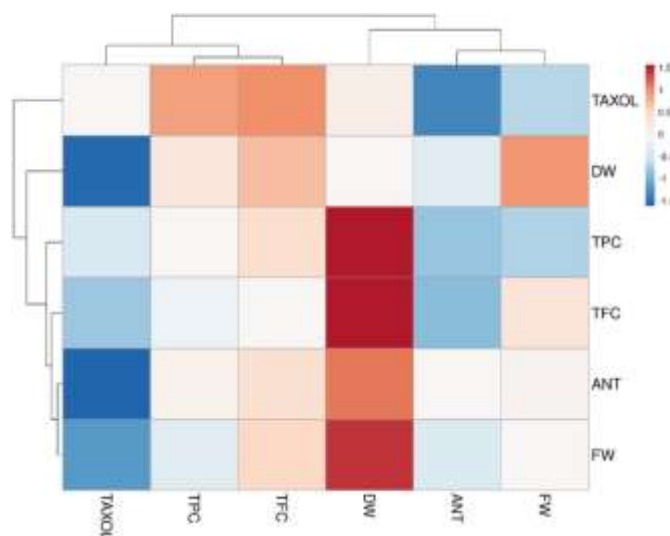
همبستگی مثبت بالایی داشته است. این درحالی بود که همبستگی بین محتوای فنل کل و تاکسول مثبت ارزیابی شد (شکل ۸). همچنین تاکسول با وزن‌تر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای همبستگی منفی است. این موضوع می‌تواند بیانگر نوعی رقابت متابولیکی میان مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات اولیه (مانند توده سلولی) و ترکیبات ثانویه (نظیر تاکسول) باشد،

همبستگی بین صفات

نتایج حاصل نشان داد که میزان تاکسول با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و وزن‌تر رابطه همبستگی منفی داشته و افزایش میزان وزن‌تر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش میزان تاکسول در سوسپانسیون سلولی فندق شده است. همچنین نتایج نشان داد که فلاونوئید کل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی

است. فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهم شناخته می‌شوند و افزایش آن‌ها اغلب همراه با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول است. همچنین رابطه مثبت بین فنل کل و تاکسول می‌تواند نشان‌دهنده نقش ترکیبات فنلی به‌عنوان پیش‌ماده‌های مسیر بیوسنتز تاکسول یا تنظیم‌کننده‌های این مسیر باشد (پانچه^۳ و همکاران، ۲۰۱۶). این یافته‌ها اهمیت تنظیم دقیق شرایط کشت و تیمارهای محرک را برای هدایت مسیرهای متابولیکی به‌سوی تولید هدفمند تاکسول برجسته می‌سازند.

به‌طوری‌که افزایش رشد زیستی سلول‌ها ممکن است به کاهش اختصاص پیش‌ماده‌ها برای تولید تاکسول منجر شود (راماچندرا و راویشانکرا^۱، ۲۰۰۲). همچنین، فعالیت بالای سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از طریق مهار استرس اکسیداتیو، محرک‌های لازم برای فعال شدن مسیر سنتز تاکسول را کاهش دهد (ژائو^۲ و همکاران، ۲۰۰۵). از سوی دیگر، همبستگی مثبت مشاهده شده میان فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان کل بیانگر همپوشانی عملکردی این دو گروه از متابولیت‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی یا الیسیتور خارجی



شکل ۸- نقشه حرارتی (Heatmap) همبستگی بین صفات اندازه‌گیری‌شده شامل وزن تر (FW)، وزن خشک (DW)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ANT)، محتوای فنل کل (TPC)، محتوای فلاونوئید کل (TFC) و میزان تاکسول (TAXOL)

شدند و سطح آنتی‌اکسیان نیز در این غلظت‌ها بیشترین مقدار را داشت. همچنین، میزان تاکسول در نمونه‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن در غلظت ۱ میلی‌مولار، نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت و نشانگر اثربخشی این عوامل در تحریک مسیرهای بیوسنتزی است. همبستگی‌های منفی بین میزان تاکسول و شاخص‌های آنتی‌اکسیان و وزن تر و همبستگی مثبت بین فلاونوئید و فنل‌ها با آنتی‌اکسیان، نشان می‌دهد که تنظیم دقیق غلظت این تیمارها می‌تواند در بهبود تولید متابولیت‌های دارویی مفید باشد، اما نیازمند کنترل و پایش دقیق است تا اثرات منفی بر رشد سلولی کاهش یابد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت‌های متیل جاسمونات و پراکسید هیدروژن در کشت سلولی فندق به‌طور معنی‌داری باعث کاهش وزن تر و خشک سلول‌ها شد، اما در عین حال، سطح فنل‌ها، فلاونوئیدها، آنتی‌اکسیان و تولید تاکسول در نمونه‌های تیمار شده به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمار با غلظت ۲۵۰ ppm متیل جاسمونات و ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن مشاهده شد. این تیمارها موجب افزایش محتوای فنلی و فلاونوئیدی تا بیش از ۷۵ درصد نسبت به نمونه شاهد

منابع

- Barba-Espín, G., Martínez-Jiménez, C., Izquierdo-Martínez, A., Acosta-Motos, J.R., Hernández, J.A. and Díaz-Vivancos, P. 2021. H₂O₂-elicitation of black carrot hairy roots induces a controlled oxidative burst leading to increased anthocyanin production. *Plants*, 10(12): 2753.
- Bemani, E., Ghanati, F., Rezaei, A. and Jamshidi, M. 2013. Effect of phenylalanine on Taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells. *Journal of Natural Medicines*, 67(3): 446–451.
- Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. and Miele, M. 2006. In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnology*, 6: 45.
- Çebi, A., Tepe, Y., Alioglu, İ. and Ari, F. 2024. Inducing effect of *corylus avellana* on cytotoxic activity in lung and breast cancer cells via apoptosis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79(3): 648-655.
- Deveci, H., Demirci, T. and Baydar, N.G. 2022. Effect of culture time on secondary metabolite production from MeJA-stimulated in vitro roots of *Hyoscyamus niger* L. *International Journal of Secondary Metabolite*, 9(2): 178-193.
- Fan, J., Hu, H., Lu, Y., Tao, L., Shen, X., Sun, C. and Shen, Y. 2024. Mechanism by which exogenous H₂O₂ improves main secondary metabolites contents in post-harvest fresh Ginkgo leaves through induced physiological responses mimicking stress. *Industrial Crops and Products*, 218: 118908.
- Fritz, V., Tereucán, G., Santander, C., Contreras, B., Cornejo, P., Ferreira, P.A.A. and Ruiz, A. 2022. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and fungicide application on the secondary metabolism of *Solanum tuberosum* leaves. *Plants*, 11(3): 278.
- Ghanati, F., Rezaei, A. and Behmanesh, M. 2011. Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Journal of Plant Biological Sciences*, 3(7): 55-72.
- Giglou, M.T., Giglou, R.H., Esmaeilpour, B., Azarmi, R., Padash, A., Falakian, M., Śliwka, J., Gohari, G. and Lajayer, H.M. 2022. A new method in mitigation of drought stress by chitosan-coated iron oxide nanoparticles and growth stimulant in peppermint. *Industrial Crops and Products*, 187: 115286.
- Goktepe-Atilgan, I., Dogan, A. and Ari, S. 2023. Enhancement of taxane production in cell suspension culture of *Corylus avellana* L. Kalınkara by elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 37(1): 2255703.
- Hu, T., Chen, K., Hu, L., Amombo, E. and Fu, J. 2016. H₂O₂ and Ca²⁺-based signaling and associated ion accumulation, antioxidant systems and secondary metabolism orchestrate the response to NaCl stress in perennial ryegrass. *Scientific reports*, 6(1): 36396.
- Jakabová, S., Vincze, L., Farkas, Á., Kílár, F., Boros, B. and Felinger, A. 2012. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A*, 1232: 295-301.
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S.H. and Ramesh, M. 2023. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 153(3): 447-458.
- Khan, V., Princi, Mubashshir, M., Umar, S. and Iqbal, N. 2025. Methyl jasmonate and *Pseudomonas fluorescens* synergistically boost antioxidative defense, secondary metabolites, and osmolyte production to enhance drought resilience in mustard. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44(1): 198-216.
- Kim, M.J., Chiu, Y.C., Kim, N.K., Park, H.M., Lee, C.H., Juvik, J.A. and Ku, K.M. 2017. Cultivar-specific changes in primary and secondary metabolites in pak choi (*Brassica rapa*, Chinensis group) by methyl jasmonate. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5): 1004.

- Luo, C., Chen, C., Xian, X., Cai, W.F., Yu, X. and Ye, C. 2024. The secondary outbreak risk and mechanisms of *Microcystis aeruginosa* after H₂O₂ treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 470: 134196.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3): 571-577.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2): 231-237.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4): 841-851.
- Nabi, N., Singh, S. and Saffeullah, P. 2021. Responses of in vitro cell cultures to elicitation: regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57(3): 341-355.
- Panche, A.N., Diwan, A.D. and Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5: e47.
- Peymaei, M., Sarabi, V. and Hashempour, H. 2024. Improvement of the yield and essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) using external proline, uniconazole and methyl jasmonate under drought stress conditions. *Scientia Horticulturae*, 323: 112488.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 5(11): 42-45.
- Rahpeyma, S.A., Moieni, A. and Jalali Javaran, M. 2015. Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor. *Engineering in Life Sciences*, 15(2): 234-242.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2): 101-153.
- Razavi, R., Maghsoudlou, Y., Aalami, M. and Ghorbani, M. 2021. Impact of carboxymethyl cellulose coating enriched with *Thymus vulgaris* L. extract on physicochemical, microbial, and sensorial properties of fresh hazelnut (*Corylus avellana* L.) during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(4): e15313.
- Riedel, H., Akumo, D.N., Saw, N.M.M.T., Kütük, O., Neubauer, P. and Smetanska, I. 2012. Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *African Journal of Biotechnology*, 11(12): 3000-3008.
- Salehi, M., Moieni, A., Safaie, N. and Farhadi, S. 2020. Whole fungal elicitors boost paclitaxel biosynthesis induction in *Corylus avellana* cell culture. *PLoS One*, 15(7): e0236191.
- Singh, A. and Dwivedi, P. 2018. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1): 750-757.
- Sobhannizadeh, A., Giglou, M.T., Behnamian, M., Estaji, A., Majdi, M. and Szumny, A. 2025. The effect of plant growth regulators, FeO₃-CTs nanoparticles and LEDs light on the growth and biochemical compounds of black seed (*Nigella sativa* L.) callus in vitro. *BMC Plant Biology*, 25(1): 539.
- Wang, C., Zhang, J., Lv, J., Li, J., Gao, Y., Patience, B.E., Niu, T., Yu, J. and Xie, J. 2022. Effect of methyl jasmonate treatment on primary and secondary metabolites and antioxidant capacity of the substrate and hydroponically grown Chinese chives. *Frontiers in Nutrition*, 9: 859035.
- Yan, K., He, L. and Yang, K. 2020. Effects of SA and H₂O₂ mediated endophytic fungal elicitors on essential oil in suspension cells of *Cinnamomum longepaniculatum*. *Open Access Library Journal*, 7(1): 1-12.

- Yu, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, X., Lang, D. and Zhang, X. 2019. The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Functional Plant Biology*, 46(3): 197-212.
- 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.
- Zhong, J.J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Plant Cells*, 72: 1-26.