

## اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید هایپریرسین در کشت کالوس گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) رقم Topas

محمد زمانی<sup>۱</sup>، حسین مرادی<sup>۲\*</sup>، ویدا چالوی<sup>۲</sup> و سید کمال کاظمی تبار<sup>۳</sup>  
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
۲ و ۳. استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۱)

### چکیده

در این تحقیق اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید هایپریرسین در کشت کالوس گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) رقم Topas بررسی گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل سالیسیلیک اسید در چهار سطح (۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ میکرومولار) و متیل جاسمونات در سه سطح (۰، ۷۵، ۱۵۰ میکرومولار) با سه تکرار در آزمایشگاه گروه پژوهشی علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. فاکتورهای اندازه گیری شده شامل هایپریرسین، فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) بود. در مقایسه میانگین اثرات ساده تیمارها، اثر متیل جاسمونات بر فلاونوئید کل معنی دار شد. اثر متقابل تیمارها برای هایپریرسین، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها معنی دار شد. در مجموع، در میان نتایج به دست آمده از این پژوهش، بیشترین میزان هایپریرسین تولید شده از اثر ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و همین طور اثر متقابل ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید (SA) در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات (MJ) در مدت زمان ۲۱ روز (سه هفته) به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: علف چای، محرک، متابولیت ثانویه، نفتودی آترون.

## Effect of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Elicitors on Hypericin production in StJohn's wort (*Hypericum perforatum* L.) cv. Topas Callus culture

Mohammad Zamani<sup>1</sup>, Hossein Moradi<sup>2\*</sup>, Vida Chalavi<sup>2</sup> and Seyyed Kamal Kazemitabar<sup>3</sup>

1. M.Sc. Student of Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science, Sari Agricultural sciences and Natural Resources University, Iran

2, 3. Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agricultural Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Iran

(Received: Feb. 11, 2017 - Accepted: Nov. 12, 2017)

### ABSTRACT

Effects of salicylic acid and methyl Jasmonate on Hypericin production in callus culture of *Hypericum perforatum* L. cv Topas were investigated. This factorial experiment was carried out in a completely randomized design with two factors including the four levels of salicylic acid (225, 150, 75, 0  $\mu\text{M}$ ) and methyl Jasmonate in three levels (150, 75, 0  $\mu\text{M}$ ) with three replications at the research lab Group of Sari University of Agricultural Sciences and natural resources, department of Horticultural Science. Analysis of variance showed significant differences among treatments. Effect of treatments on total flavonoid Methyl Jasmonate effect was significant. Interaction effect was significant for Hypericin, flavonoids and anthocyanins. According to the results of this study in cell cultures of *H. perforatum*, low concentration (100 micromolar and lower) of both salicylic acid and methyl Jasmonate elicitors were effective for production of Hypericin. The results of this experiment showed that the highest amount of Hypericin produced from 150  $\mu\text{M}$  salicylic acid (SA) and 225  $\mu\text{M}$  salicylic acid in combination with 75  $\mu\text{M}$  methyl Jasmonate (MJ) after 21 days.

**Keywords:** Elicitor, Naphtodianthrones, Secondary metabolites, StJohn's Wort.

\* Corresponding author E-mail: moradiho@yahoo.com

### مقدمه

در حال حاضر پژوهش‌های زیادی در گیاهان دارویی انجام گرفته است؛ به طوری که حدود یک سوم داروهای موجود در جهان را داروهایی با منشأ گیاهی تشکیل می‌دهند (Omidbeigi, 2009). گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. چندساله با ساقه‌های منشعب و بدون کرک که طول آن از ۱۰ تا ۱۱۰ سانتی‌متر متفاوت می‌باشد. گل راعی در مناطق مختلفی از جهان مانند شرق اروپا، خاورمیانه و آمریکای شمالی رویش می‌کند. در ایران به نام‌های گل راعی، علف چای، هوفاریقون، گل شهناز و گل هزاران چشم شناخته می‌شود و نام رایج جهانی آن *st John s wort* می‌باشد (Mozafarian, 2012). این گیاه به دلیل ویژگی‌های دارویی مهمی مانند خواص ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد میگرن و ضد افسردگی، آرام‌بخش بودن و درمان زخم‌ها مورد توجه می‌باشد (Barns et al., 2007). برای به دست آوردن محصولات این گیاه، روش‌های مختلفی شامل جمع‌آوری از طبیعت، کشت مزرعه‌ای و کشت گلخانه‌ای وجود دارد. کشت سلول / بافت / اندام به علت قیمت بالای نیروی کار، مواد شیمیایی و تجهیزات گران‌ترین روش است، اما در عوض مزیت‌هایی مانند ایجاد تغییر ژنتیکی و ریز ازدیادی در سطح وسیع می‌باشد که در هیچ مزرعه‌ای ممکن نیست. کشت بافت و سلول به دلیل توانایی تولید محصول در سراسر سال و عدم وابستگی به شرایط آب و هوایی همچنین حفظ محیط زیست از طریق بی‌نیازی به جمع‌آوری گیاهان از طبیعت، بر خلاف هزینه بالا نسبت به دیگر روش‌های ذکر شده برتری دارد. اما مهم‌ترین مشکل پیش رو در کشت درون شیشه‌ای، مقدار تولید پایین مواد مؤثره در واحد سطح است. به همین دلیل استفاده از محرک‌ها (Elicitor) در کشت درون‌شیشه‌ای به وجود آمده است. محرک‌ها به عواملی گفته می‌شود که می‌تواند سلول‌های کشت‌شده را به تولید مواد ثانوی تحریک کنند. محرک‌ها به دو دسته زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند. محرک‌های زیستی شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها و یا عصاره دیواره قارچی می‌باشند؛ محرک‌های غیرزیستی نیز شامل هورمون‌ها

(سالیسیلیک‌اسید، جاسمونات‌ها) و عوامل فیزیکی مثل پرتو فرا بنفش و غیره اشند. مهم‌ترین متابولیت‌های ثانوی در گل راعی، رنگیزه‌های دی‌آنترون یعنی هایپرپیرسین و سودوهایپرپیرسین هستند (Naik et al., 2016). هایپرپیرسین‌ها ترکیباتی با فعالیت‌های ضد ویروسی هستند. به نظر می‌رسد که در فعالیت ضد ویروسی، هایپرپیرسین از سودوهایپرپیرسین بسیار مؤثرتر باشند. هایپرپیرسین و سودوهایپرپیرسین اثر زیادی بر درمان هپاتیت C دارند. اگر چه، دیگر مواد شیمیایی هم نقش‌های مهمی در فعالیت ضد افسردگی دارند. به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت درون‌شیشه‌ای گل راعی و استفاده از محرک‌های مختلف مطالعات زیادی انجام گرفته است.

در مورد مقایسه میزان هایپرپیرسین در گونه‌های مختلف جنس *Hypericum* (Jaimand et al., 2007) میزان ترکیب هایپرپیرسین در برگ و گل ۸ گونه *Hypericum* را اندازه گرفتند که بالاترین میزان هایپرپیرسین در گونه *Perforatum* با ۱۹۰۰ ppm و گونه *Triquetrifolium* با ۱۴۶۰ ppm وجود داشت. در مورد استفاده از محرک‌های زیستی، اثر پلی‌ساکاریدهای کیتین، پکتین و دکستران را بر تولید متابولیت‌های ثانوی گل راعی مطالعه گردید و نشان داده شد که پکتین و دکستران تجمع نفتودی‌آنترون‌ها به ویژه هایپرپیرسین را در ۲۱ روز پس از کاربرد افزایش دادند و افزایش این ترکیبات رابطه مستقیمی با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز در شاخه‌های تیمار شده داشت و کیتین و پکتین فعالیت پراکسیداز را افزایش دادند (Gadzovska et al., 2014). در پژوهشی تأثیر مانان و پکتین بر تولید هایپرپیرسین در کشت درون‌شیشه‌ای دانهال *Hypericum adenotricum* مورد آزمایش قرار گرفت (Yamaner et al., 2013). مانان تولید هایپرپیرسین را ۱/۷ و سودو هایپرپیرسین را ۲/۷ برابر افزایش داد. پکتین تولید هایپرپیرسین را ۴/۸ برابر افزایش داد (Gadzovska et al., 2013). تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر کشت شاخه، کالوس و سوسپانسیون سلولی در تولید نفتودی‌آنترون‌ها و فنیل‌پروپانویدهای گل راعی مطالعه نمودند. بیشترین هایپرپیرسین و سودو

شده و در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۱ میلی گرم بر لیتر بنزین آدنین کشت شده و به مدت ۷ هفته در دمای عادی و شرایط تاریکی جهت القای کالوس نگهداری شدند. سپس کالوس‌ها به محیط حاوی محرک‌ها منتقل گردیدند. تیمارهای محرک در این آزمایش فاکتوریل شامل دو فاکتور سالیسیلیک اسید در چهار سطح (۲۲۵، ۱۵۰، ۷۵، ۰ میکرومولار) و متیل جاسمونات در سه سطح (۱۵۰، ۷۵، ۰ میکرومولار) با سه تکرار بود که در آزمایشگاه گروه پژوهشی علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت.

کالوس‌های برداشت شده با استفاده از ایزوتامپ پودر شده و درون ورقه آلومینیومی در فریزر نگهداری شد. برای تهیه عصاره متانولی از روش Namli *et al.* (2014) با کمی تغییر استفاده شد. ۲۰۰ میلی گرم از پودر گیاهی (کالوس پودر شده) وزن شده و درون لوله آزمایش ریخته شد. ۲ میلی لیتر کلروفرم به آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در هوای آزاد قرار گرفت تا کلروفرم تبخیر شود. پس از تبخیر کلروفرم ۳ میلی لیتر متانول به لوله‌های آزمایش اضافه شده و ۵ دقیقه تحت اموج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ۲۴ ساعت در هوای آزاد برای تبخیر متانول قرار گرفت. این عمل یک بار تکرار شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و ۱ میلی لیتر محلول رویی نمونه‌ها برداشته و در میکروتیوب با یک میلی لیتر متانول خالص ترکیب شده و به عنوان عصاره متانولی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای تعیین مقدار هایپریسین عصاره متانولی، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۹ نانومتر برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک استفاده شد (Namli *et al.*, 2014). فنل کل به روش فولین سیوکالتو (Morshedloo *et al.*, 2011) اندازه گیری شد و قرائت مقدار فنل کل در نمونه‌ها (میلی گرم در اکی‌والانت گالیک اسید بر گرم وزن خشک) به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر انجام شد. برای اندازه گیری مقدار فلاونوئید کل از روش آلومینیوم کلرید برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک

هایپریسین در کشت سلولی وجود داشت (دو برابر کنترل) ولی در کشت شاخه و کالوس این افزایش دیده نشد. تأثیر سالیسیلیک اسید بر مقدار هایپریسین به نوع ریز نمونه، غلظت سالیسیلیک اسید و مدت زمان پس از تیمار بستگی دارد (Wang *et al.*, 2015). اثر متیل جاسمونات را بر افزایش تولید فلاونوئید در کشت سوسپانسیون سلولی *Hypericum perforatum* آزمایش نمودند. در این آزمایش ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به مدت ۵ روز mg/1280 فلاونوئید تولید کرد که ۲/۷ برابر کنترل بود (Coste *et al.*, 2011). اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و سالیسیلیک اسید را بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت شاخه *Hypericum maculatum* و *Hypericum hirsutum* آزمایش کردند. در حضور ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در گونه ماکولاتوم هایپریسین به ۷/۹۸ برابر و مقدار سودوهایپریسین به ۱۳/۵۸ برابر نسبت به کنترل رسید. بنابراین در این پژوهش جهت تولید ماده مؤثره از طریق کشت درون شیشه‌ای، تعیین مناسب‌ترین محرک تولید هایپریسین در گیاه گل راعی و تعیین بهترین غلظت محرک تولید هایپریسین در گیاه گل راعی، اثر سطوح مختلف سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار هایپریسین، در کشت کالوس گل راعی رقم توپاز مطالعه شد.

## مواد و روش‌ها

بذرهای گل راعی رقم توپاز از شرکت pharmasaat تهیه گردید. برای ضدعفونی بذرها ابتدا آنها با یک تا یک و نیم میلی لیتر اتانول ۸۰٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. سپس یک تا یک و نیم میلی لیتر سدیم هیپوکلرید ۵٪ به نمونه‌ها افزوده گردید. پس از ده دقیقه سدیم هیپوکلرید از درون تیوب‌ها حذف شده و بذور سه دفعه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. آبکشی مرتبه سوم ۱۵ دقیقه به طول انجامید. سپس بذرها در چهار عدد شیشه کشت حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت موراشیگی و اسکوک در دمای معمولی و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت چهار هفته نگهداری شدند. پس از ۴ هفته نوک شاخه‌های دانه‌ها به طول حدود ۱ سانتی متر جدا

9.1 شده و عملیات تجزیه واریانس و همین طور مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ بر اساس نوع طرح (فاکتوریل ۴×۳) انجام گردید و میانگین مربعات، مقایسه میانگین اثر ساده تیمارها و مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها به دست آمد.

### نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس تأثیر متیل جاسمونات بر فلاونوئید کل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم PAL و اثر سالیسیلیک اسید بر هایپرپرسیسین معنی دار گردید. همچنین اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار هایپرپرسیسین معنی دار شد. بر طبق نتایج مقایسه میانگین اختلاف بین تیمارها در اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار هایپرپرسیسین، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها معنی دار بود. بیشترین مقدار هایپرپرسیسین در غلظت های صفر و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید به دست آمد. تغییر میزان فنل ها تحت اثر سالیسیلیک اسید نبود. بیشترین مقدار فنل کل در غلظت صفر و کمترین در غلظت ۲۲۵ میکرومولار به دست آمد؛ مقدار این ماده در تیمارهای ۷۵ و ۱۵۰ تقریباً مساوی بود. تأثیر سالیسیلیک اسید مقدار فلاونوئید کل معنی دار شد به طوری که بیشترین مقدار فنل در تیمار ۷۵ سالیسیلیک اسید تولید شد. بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار ۱۵۰ میکرومولار به دست آمد؛ در حالی که در بقیه تیمارها، این مقدار تقریباً با هم برابر بود. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید تا غلظت ۱۵۰ میکرومولار روند افزایشی داشته و در غلظت ۲۲۵ از مقدار فعالیت آن کاسته شد (جدول ۱).

#### اثر متیل جاسمونات بر فاکتورهای اندازه گیری شده

براساس نتایج به دست آمده مقایسه میانگین اثر متیل جاسمونات بر مقدار هایپرپرسیسین معنی دار نشد. در تیمار شاهد و ۷۵ میکرومولار مقدار هایپرپرسیسین با هم برابر بوده و در تیمار ۱۵۰ مقدار هایپرپرسیسین کاهش یافت. اثر این هورمون بر مقدار فنل معنی دار نشد ولی بیشترین مقدار فنل در تیمار ۱۵۰ و پس از آن در شاهد مشاهده شد. مقدار فلاونوئید تحت تأثیر تیمار

(Wang *et al.*, 2015) اندازه گیری گردید و جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر در اسپکتروفوتومتر قرائت شد. برای سنجش میزان آنتوسیانین کل مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی لیتر متانول کلریدریک اسید با نسبت ۱:۹۹ در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتیفریژ گردید. بخش رویی را برداشته و جذب محلول ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه گیری شد. از ۴ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک ۰/۱ متانول به عنوان شاهد استفاده شد. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه مقابل محاسبه گردید (Mohammadi *et al.*, 2014)

$$A = A_{530} - (0.25 \times A_{657})$$

A (جذب محلول)، اعداد اندیس نشانگر طول موج هایی است که جذب در آنها اندازه گیری شد. سنجش آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز طبق روش ساندرس و مسلور (۱۹۷۴) انجام شد. محتویات سنجش آنزیم شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۵۰ میکرولیتر بافر بورات سدیم، ۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به اضافه ۲۵۰ میکرولیتر بافر سوبسترای فنیل آلانین. در این روش نمونه ها در میکروتیوب آماده می شوند. جذب اولیه و جذب نهایی به ترتیب قبل و بعد از نگهداری در حمام بن ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده می شود (قبل از قرائت، واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳ نرمال متوقف می شود). محاسبه فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی (۹۶۳۰) بر اساس غلظت ترانس سینامیک اسید  $\mu\text{Mol/g FW.min}$  انجام می گیرد (Hamedani *et al.*, 2014).

$$c = A/9630$$

$$A = 9630c, A$$

C: غلظت ترانس سینامیک اسید

#### تجزیه آماری

مقادیر به دست آمده از اندازه گیری ها وارد نرم افزار SAS

به ترتیب مربوط به تیمارهای صفر، ۱۵۰ و ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید به همراه تیمار ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بیشترین مقدار هایپرپسین به دست آمد و پس از آن تیمارهای صفر (شاهد) و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات قرار داشتند. در مجموع بیشترین مقدار هایپرپسین در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با صفر میکرومولار متیل جاسمونات و همین طور تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد (جدول ۳).

#### اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر فنل کل

در تیمار شاهد سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار فنل کل مربوط به ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بود. در تیمار ۷۵ سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار، مربوط به ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود. مقدار فنل کل تولیدشده در اثر متقابل ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و صفر متیل جاسمونات در بین کل تیمارها بیشترین بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین فنل کل در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد. به جز تیمار شاهد سالیسیلیک اسید در بقیه تیمارها کمترین میزان فنل کل مربوط به تیمارهای ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بود. بیشترین فنل کل در ۱۵۰ سالیسیلیک اسید در غیاب متیل جاسمونات و پس از آن در تیمار ۲۲۵ سالیسیلیک اسید در ترکیب با ۱۵۰ متیل جاسمونات به دست آمد (جدول ۳).

متیل جاسمونات نبود ولی کمترین مقدار فلاونوئید در تیمار ۷۵ میکرومولار دیده شد. مقدار آنتوسیانین کل در هر سه غلظت مورد استفاده تقریباً با هم برابر شد. بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز از تیمار ۱۵۰ میکرومولار به دست آمد و مقدار فعالیت این آنزیم در تیمارهای شاهد و ۷۵ میکرومولار تقریباً با هم برابر بود هر چند که این مقدار در شاهد بیشتر بود (جدول ۲).

#### اثر متقابل تیمارها بر صفات اندازه گیری شده

بر اساس جدول مقایسه میانگین اثر متقابل، اثر متقابل تیمارها بر مقدار هایپرپسین معنی دار بود. برای فنل کل اختلاف معنی دار میان تیمارها به وجود آمد و بهترین تیمار برای فنل تیمار ۱۵۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید بدون حضور تیمار متیل جاسمونات بود. اختلاف بین میانگین های آنتوسیانین نیز معنی دار شده و بهترین تیمار، تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بدون حضور متیل جاسمونات بود. اثر متقابل تیمارها در دیگر صفات اختلاف معنی داری را نشان نداد (جدول ۳).

#### اثر متقابل سالیسیلیک اسید (SA) و متیل جاسمونات (MJ) بر مقدار هایپرپسین

در تیمار صفر سالیسیلیک اسید، مقدار هایپرپسین در غلظت های مختلف متیل جاسمونات تفاوتی نداشت. در تیمار ۷۵ سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار هایپرپسین مربوط به غلظت ۷۵ متیل جاسمونات و کمترین مقدار مربوط به تیمار ۱۵۰ متیل جاسمونات بود. در تیمار ۱۵۰ سالیسیلیک اسید بیشترین مقادیر هایپرپسین

جدول ۱. اثر سالیسیلیک اسید بر تغییر صفات اندازه گیری شده در کالوس گل راعی *Hypericum perforatum* L.

Table 1. Effect of Salicylic acid on secondary metabolite in *Hypericum perforatum* L.

PAL	TA	TF	TP	HYP	
4.069	14.143	4.736	11.486	2.121	Control
8.888	15.282	6.312	8.632	1.746	75
9.760	25.892	3.967	7.120	1.665	150
15.323	16.458	6.707	6.073	1.990	225

Hyp: هایپرپسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل (میلی گرم در اکی والانت گالیک اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (میکرومول ترانس سینامیک اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin ( $\mu\text{g/g DW}$ ), TP: Total Phenolics ( $\text{meq/g Galic acid/g DW}$ ), TF: Total Flavonoids ( $\text{mg/g DW}$ ), TA: Total Anthocyanin ( $\text{mg/g DW}$ ), PAL: Phenylalanine Amonia lyase ( $\mu\text{Mol trans cinnamic acid/g FW.min}$ )

جدول ۲. اثر متیل جاسمونات بر صفات اندازه گیری شده در کالوس گل راعی *Hypericum perforatum* L.Table 2. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolite in *Hypericum perforatum* L.

PAL	TA	TF	TP	HYP	
8.373	18.305	5.406	8.055	1.998	Control
7.242	18.167	4.856	5.736	2.130	75
12.212	17.861	5.788	11.379	1.530	150

Hyp: هایپریسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل (میلی گرم در اکی والانت گالیک اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (میکرومول ترانس سینامیک اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin ( $\mu\text{g/g DW}$ ), TP: Total Phenolics (mequiv.g Galic acid/g DW), TF: Total Flavonoids (mg/g DW), TA: Total Anthocyanin (mg/g DW), PAL: Phenylalanin Amonia lyase ( $\mu\text{Mol trans cinnamic acid/g FW.min}$ ).

جدول ۳. اثر متقابل SA و MJ بر مقدار متابولیت های ثانوی و فعالیت آنزیمی در گل راعی *Hypericum perforatum* L.Table 3. Interaction of SA and MJ on Secondary Methabolites in stJohns Wort *Hypericum perforatum* L.

SA	MJ	PAL	TA	TF	TP	HYP
0	0	4.05 <sup>a</sup>	13.00 <sup>ab</sup>	7.7 <sup>a</sup>	9.16 <sup>a</sup>	2.56 <sup>ab</sup>
	75	4.77 <sup>a</sup>	16 <sup>ab</sup>	4.87 <sup>b</sup>	11.66 <sup>a</sup>	2.45 <sup>ab</sup>
	150	2.33 <sup>a</sup>	18.13 <sup>ab</sup>	3.54 <sup>b</sup>	9.37 <sup>a</sup>	2.42 <sup>ab</sup>
75	0	2.59 <sup>a</sup>	21.75 <sup>ab</sup>	4.8 <sup>b</sup>	9.58 <sup>a</sup>	1.54 <sup>ab</sup>
	75	2.44 <sup>a</sup>	5.00 <sup>b</sup>	7.46 <sup>ab</sup>	8.95 <sup>a</sup>	2.15 <sup>ab</sup>
	150	1.87 <sup>a</sup>	20.75 <sup>ab</sup>	5.71 <sup>ab</sup>	15.14 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>
150	0	2.5 <sup>a</sup>	42.75 <sup>a</sup>	6.10 <sup>ab</sup>	22.91 <sup>a</sup>	3.03 <sup>a</sup>
	75	0.27 <sup>a</sup>	27.67 <sup>ab</sup>	4.00 <sup>b</sup>	2.21 <sup>a</sup>	1.54 <sup>ab</sup>
	150	2.7 <sup>a</sup>	20.13 <sup>ab</sup>	4.61 <sup>b</sup>	6.87 <sup>a</sup>	2.36 <sup>ab</sup>
225	0	1.99 <sup>a</sup>	14.38 <sup>ab</sup>	6.62 <sup>ab</sup>	3.85 <sup>a</sup>	2.10 <sup>ab</sup>
	75	0.72 <sup>a</sup>	14.25 <sup>ab</sup>	2.66 <sup>b</sup>	1.66 <sup>a</sup>	3.08 <sup>a</sup>
	150	2.38 <sup>a</sup>	11.5 <sup>ab</sup>	12.01 <sup>a</sup>	15.83 <sup>a</sup>	0.82 <sup>ab</sup>

Hyp: هایپریسین (میکروگرم بر گرم وزن خشک)، TP: فنل کل (میلی گرم در اکی والانت گالیک اسید بر گرم وزن خشک)، TF: فلاونوئید کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، TA: آنتوسیانین کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، PAL: فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (میکرومول ترانس سینامیک اسید بر گرم وزن تر در دقیقه).

Hyp: Hypericin ( $\mu\text{g/g DW}$ ), TP: Total Phenolics (mequiv.g Galic acid/g DW), TF: Total Flavonoids (mg/g DW), TA: Total Anthocyanin (mg/g DW), PAL: Phenylalanin Amonia lyase ( $\mu\text{Mol trans cinnamic acid/g FW.min}$ ).

### اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار آنتوسیانین

مقدار آنتوسیانین در اثر متقابل تیمار صفر سالیسیلیک اسید و تیمارهای مختلف متیل جاسمونات معنی دار نشد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار آنتوسیانین کل در غلظت های صفر و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد. در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین میزان تولید آنتوسیانین کل مربوط به غلظت شاهد و پس از آن ۷۵ میکرومولار و کمترین میزان مربوط به غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود. تأثیر متقابل سالیسیلیک اسید در غلظت ۲۲۵ میکرومولار در ترکیب با غلظت های متیل جاسمونات اثر معنی داری بر تولید آنتوسیانین کل نداشت ولی با افزایش غلظت متیل جاسمونات مقدار آنتوسیانین کل کاهش یافت. در مجموع بیشترین مقدار تولید آنتوسیانین کل در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با تیمار

### اثر متقابل سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار فلاونوئید

در تیمار شاهد سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار فلاونوئید به ترتیب در تیمارهای صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین و کمترین مقدار فلاونوئید کل به ترتیب مربوط به تیمارهای ۷۵ و صفر متیل جاسمونات بود. در تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید میزان تولید فلاونوئید در غلظت شاهد متیل جاسمونات بیشترین و در غلظت ۷۵ متیل جاسمونات کمترین بود. در تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین مقدار در غلظت ۱۵۰ و کمترین مقدار فلاونوئید کل در غلظت ۷۵ متیل جاسمونات به دست آمد. بیشترین مقدار فلاونوئید در تأثیر متقابل سالیسیلیک اسید در غلظت ۲۲۵ میکرومولار و متیل جاسمونات در غلظت ۱۵۰ میکرومولار به دست آمد (جدول ۳).

*et al.* (2002) نشان داد که جازمونیکاسید تولید هایپرین را افزایش داد. جازمونیکاسید یک الیسیاتور مؤثر برای تولید هایپرین در کشت سلولی گل راعی است (Coste *et al.*, 2011). اثر سالیسیلیکاسید و جازمونیکاسید را بر تولید متابولیت‌های ثانوی در گونه‌های *Hypericum hirsutum* و *Hypericum maculatum* بررسی کردند. تیمار با جازمونیکاسید (حداکثر ۲۵۰ میکرومولار) تجمع هایپرین و سودوهایپرین را در هر دو گونه افزایش داد ولی باعث کاهش مقدار هایپرین در گونه *H. hirsutum* شد. اثر بازدارندگی متیل‌جاسمونات بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی در گیاهان نشان داده شده است. جازمونیکاسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار رشد سلولی، تقسیم میتوز و همانندسازی را در کالوس توتون متوقف کرده و سلول را در مرحله رشد G1 نگه می‌دارد (Rezaei *et al.*, 2011). بیوسنتز نفتودی‌آنترون‌ها از مسیر پلی‌کتید و با دخالت آنزیم پلی‌کتیدسنتاز انجام می‌شود (Rajabi *et al.*, 2016). اثر محرک‌های شیمیایی متیل‌جاسمونات و سالیسیلیکاسید در محیط کشت پایه MS بر تحریک تولید هایپرین در یک دوره ۴۲ روزه مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات نسبت به سایر غلظت‌ها بیشترین میزان هایپرین (۶۶/۳۴٪) را تولید می‌کند. همچنین نیز استفاده از غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیکاسید باعث از بین رفتن نمونه‌های کشت بافتی گیاه گل راعی شد. همچنین در یک پژوهش مشخص شد که سالیسیلیکاسید در غلظت‌های بالا باعث از بین رفتن گیاهان بابونه آلمانی شد (Zarinkamar *et al.*, 2013). فنیل‌آلانین‌آمونالیاز اولین آنزیم در بیوسنتز فنیل‌پروپانویید در گیاهان است که با دآمیناسیون فنیل‌آلانین با آزاد کردن آمونیوم، تولید ترانس‌سینامیکاسید می‌کند (Rajaeian *et al.*, 2015) و نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئید، لیگنین و ترکیبات دیگر دارد. مقدار فلاونوئید با بیشتر شدن غلظت هر دو محرک افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونالیاز پس از تیمار اغلب در کشت سلولی باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Wang *et al.*, 2015). در یک تحقیق مقدار نفتودی‌آنترون‌ها و

صفر متیل‌جاسمونات به دست آمد و پس از آن ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیکاسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات بیشترین مقدار آنوسیانین کل را تولید کرد (جدول ۳).

#### اثر متقابل سالیسیلیکاسید و متیل‌جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم PAL

بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین، اثر متقابل تیمارها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونالیاز بی‌تأثیر بود. میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار صفر میکرومولار سالیسیلیکاسید با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات از صفر به ۷۵ میکرومولار افزایش داشته است ولی با افزایش غلظت به ۱۵۰ میکرومولار از فعالیت آنزیم به‌طور قابل توجهی کاسته شد. در تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیکاسید افزایش غلظت متیل‌جاسمونات کاهش فعالیت آنزیم را به همراه داشت. تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیکاسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات میزان فعالیت آنزیمی به کمترین حد رسید. ولی فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد و ۱۵۰ متیل‌جاسمونات با هم برابر بود. میان تیمارهای مختلف متیل‌جاسمونات در ترکیب با تیمار ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیکاسید هم کمترین فعالیت آنزیم در تیمار ۷۵ متیل‌جاسمونات مشاهده شد. در مجموع تیمار ۷۵ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ترکیب با صفر سالیسیلیکاسید و پس از آن تیمار شاهد متیل‌جاسمونات در ترکیب با تیمار شاهد سالیسیلیکاسید بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونالیاز (برحسب ترانس‌سینامیکاسید) را تولید کرد. همچنین کمترین مقدار فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای ۱۵۰ سالیسیلیکاسید در ترکیب با ۷۵ متیل‌جاسمونات و تیمار ۲۲۵ سالیسیلیکاسید در ترکیب با ۷۵ متیل‌جاسمونات به دست آمد (جدول ۳). سالیسیلیکاسید و متیل‌جاسمونات به‌عنوان ترکیبات الفاکنده تنش، مسیر سیگنالینگ را فعال نموده و با افزایش رونویسی mRNA آنزیم PAL سبب افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌گردد (Samadi *et al.*, 2014). سالیسیلیکاسید یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های گیاهی است که ژن‌های دفاعی را فعال می‌کند. مطالعه Walker

نوری و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در میان نتایج به دست آمده از این پژوهش، بیشترین میزان هایپریسین تولید شده از اثر متقابل ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات و همین طور اثر ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به دست آمد. مقدار فلاونوئید با بیشتر شدن غلظت هر دو محرک افزایش یافت. مقدار آنتوسیانین در ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات در ترکیب با همه غلظت های سالیسیلیک اسید کمترین بود؛ اما بیشترین مقدار آن در تیمارهای ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در غیاب متیل جاسمونات و همین طور ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد.

در تیمارهای صفر و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید با افزایش غلظت متیل جاسمونات فعالیت آنزیم PAL کاهش یافت. اما غلظت های ۱۵۰ و ۲۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید در ترکیب با ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات باعث بیشترین فعالیت آنزیمی شد. در نتیجه این تحقیق مشخص شد که تیمار کالوس های گل راعی رقم توپاز تحت تیمار ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و صفر تا ۷۵ میکرومولار متیل جاسمونات بهترین نتیجه را در پی داشت. پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده مدت زمان اعمال تیمار، کاهش یافته و به منظور اندازه گیری مقادیر هایپریسین، از کروماتوگرافی مایع استفاده شود. همچنین از آنجاکه در این تحقیق اثر سالیسیلیک اسید بیشتر بود پیشنهاد می گردد که در استفاده از الیسیاتور هورمونی، اثر این هورمون بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

فنیل پروپانویدها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه علف چای پس از تحریک با جاسمونیک اسید افزایش یافت (Gadzavska et al., 2007). اثر سالیسیلیک اسید در گیاه به صورت تحریک پاسخ های دفاعی با تحریک تولید کمپلکس های پروتئینی مربوط به دفاع گیاهی می باشد. سیستم های کشت تمایز نیافته شامل کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی، با افزایش سطوح نفتودی آترونها به تیمار سالیسیلیک اسید پاسخ می دهند. به نظر می رسد بهترین مدت زمان قرار گرفتن ریزنمونه در معرض محرک های سالیسیلیک اسید یک تا دو هفته باشد. (Gadzovska et al., 2013) نتیجه گرفتند که در کشت شاخه گل راعی هیچ کدام از غلظت های کم و زیاد (۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر روی نمو اثری نداشت. اگر چه سلول ها، کالوس ها و شاخه ها شامل هایپریسین و سودوهاپریسین می باشند، ولی فقط در کالوس و سوسپانسیون های سلولی مقدار متابولیت ها در اثر استفاده از سالیسیلیک اسید افزایش می یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت؛ ولی در تحقیق Gadzovska et al. (2007) و همین طور Gadzovska et al. (2013) مقدار هایپریسین تا چهار روز و دیگر فاکتورها تا حداکثر هفت روز افزایش نشان می دادند؛ اما پس از آن افزایش نداشته و حتی کاهش نیز داشته اند.

### نتیجه گیری

بر طبق نتایج به دست آمده، در کشت های سلولی گیاه گل راعی، غلظت های پایین (حدود ۱۰۰ میکرومولار) هر دو محرک به ویژه سالیسیلیک اسید برای تولید هایپریسین مؤثر می باشد. در این تحقیق همه نمونه ها در شرایط

### REFERENCES

1. Barnes, J., Anderson, L. A. & Phillipson, J. D. (2007). *Herbal Medicin* (3rd Ed). Pharmaceutical Press. London.UK, 710 pp.
2. Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. & Coldea, G. (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 106, 279-288.
3. Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C. & Hagège, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 89, 1-13.
4. Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagege, D., Courtois, D. & Joseph, C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 113, 25-39.

5. Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C. & Hagège, D. (2014). Effects of Poly saccharide Elicitors on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Response in *Hypericum perforatum* L. Shoot Cultures. *Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal*, 1-10.
6. Hamedani, M., Moradi, H. & Ghanbari, A. (2014). Effect of harvesting time and durability age on quality of blod orange (*Citrus sinensis* L.) cv Moro fruits. *Journal of Iranian horticultural sciences (IJSH)*, 28(2), 252-259. (in Farsi)
7. Jaimand, K., Rezaei, M., Mozafarian, V., Azadi, R., Naderihajibagherkendi, M., Moshkizadeh, M. & Golipour. (2007). determination of Hypericin content in leaf and Flower in 8 speies of *Hypericum*. *Journal of Medicinal plants (JMP)*, 25, 49-55. (in Farsi)
8. Mohammadi, M., Kazemitabar, K., Asili, J. & Kamali, H. (2014). Study of the antioxidant and antibac terial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 1, 161-167. (in Farsi)
9. Morshedloo, M., Ebadi, A., Fatahimoghadam, M. & Yazdani, D. (2011). Study of parts of Essence, phenolic content and antioxidant activity in stGohns wort (*Hypericum perforatum* L.) Extract collecting from north of Iran. *Journal of Medicinal Plant*, 11(8), 218-226. (in Farsi)
10. Mozafarian, V. (2012). Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang e moaser Press. (in Farsi)
11. Naik, P. M. & Al HKhairy, J. M. (2016). *Abiotic and Biotic Elicitors Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants*, (pp. 247-277.) Intech.
12. Namli, S., Isikalan, C., Akbas, F., Toker, Z. & Tilkat, E. (2014). Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under in vitro conditions. *Taylor&Francis*, 28(24), 2286-2292.
13. Omidbeigy, R. (2009). *Production and Process of Medicinal Plant*. (Volum 2). 5<sup>th</sup> Publishing. Behnashr Press (Astan-e-Ghods-e-Razavi). (in Farsi)
14. Rajabi, A., Abaspoor, H. & Masood sinki, J. (2016). Effect of Methyl Jasmonate and salicylic acid Elicitors in stimulate the production of on the Hypericin in (*Hypericum perforatum* L.). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(22), 41-50. (in Farsi)
15. Rajaeian, S., Ehsanpour, A. & Toghyani, M. (2015). Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under in vitro salt stress condition. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(26), 1-13. (in Farsi)
16. Rezaei, A., Ghanati, F. & 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 Biology*, 7, 55-72. (in Farsi)
17. Samadi, S., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Investigation on phenylalanine ammonialyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *journal of plant production*, 21(4), 135-148. (in Farsi)
18. Saunders, J. A. & McClure, J. W. (1974). The suitability of a quantitive spectrophotometric assay for phenyl alanine ammonia lyase activity in barely, buckwheat and pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 54, 412-413.
19. Walker, T., Bais, H. & Vivanco, J. (2002). Jasmonic acid induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60, 289-293.
20. Wang, J., Qian, J., Yao, L. & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(5), 1-9.
21. Yamaner, O., Erdag, B. & Gokbulut, C. (2013). Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish journal of botany*, 37, 153-159.
22. Zarinkamar, F., Abdollahzadeh Zaviehjak, A., Sharifi, M. & Behmanesh, M. (2013). Effect of salicylic acid on flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Matricaria chamomilla* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 17, 67-74. (in Farsi)