**Research Article**

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/IJRFPBGR.2024.363348.1447

Vol. 31, No. 2, Page 258-274 (2024)

# The effect of fungal cellulase elicitor on antioxidant activity and enzymes in licorice cell suspension culture (*Glycyrrhiza glabra* L.)

**M. Allahdou[1*] and S. Saber[2]**

1*- Corresponding author, Assist. Prof., Dept. Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran
E-mail: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir
2- Researcher, M.Sc. Analytical Chemistry, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran

Received: 29.08.2023 Accepted: 10.01.2024

## Abstract

**Background and objectives**:
Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) is a perennial plant from the Fabaceae family rich in bioactive secondary metabolites used to treat many human diseases. Recent advances in plant tissue culture techniques have shown promising results in improving productivity and allowing the gradual replacement of whole plant culture as a source of valuable secondary metabolites. Today, various tissue culture methods are used to increase the performance of secondary metabolites by strengthening plant defense and stimulating stress response in plant cells with the help of elicitors. Plant pathogenic fungi produce cellulase, which is used as an elicitor to stimulate the production of secondary metabolites in plant cell suspension culture conditions. This research aimed to study the effect of cellulase enzyme obtained from *Aspergillus nigar* fungus on the amount of antioxidant activity (DPPH method) and antioxidant enzyme activity in licorice cell suspension culture conditions.

**Methodology**:
Licorice seeds were collected from the Semirom region, Isfahan province, Iran. Seeds were cultured in the ½ MS medium after disinfection. In order to induce callus, the hypocotyl and cotyledon were cultured in MMS medium containing growth regulators (2 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA) with 3% sucrose and 0.7% agar. Then 0.5 g of fibrous callus produced under a sterile hood was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 cc of MMS liquid culture medium containing 2 mg/liter of BA hormone and 0.5 mg/liter of NAA hormone and was placed in a shaker incubator with a speed of 150 rpm, a temperature of 25oC and darkness. On the 19th day after cultivation, cellulase enzyme with a 200 µg/ml concentration was added to each Erlens under a sterile hood.
Then, harvesting was done at zero-time intervals (control) 24, 48 and 72 hours after adding the elicitor. Late cultured calli were also considered as a treatment. Statistical analysis was carried out using a completely randomized design with three replications. Data were collected for DPPH and all antioxidant enzyme activities such as catalase, superoxide dismutase, polyphenol oxidase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase. A regression analysis was used to determine the relationship between DPPH and antioxidant enzyme activities at the time interval after adding the elicitor.

**Results:**
The effect of cellulase enzyme on all traits except superoxide dismutase was significant ($P<0.01$). The activity of antioxidant enzymes and antioxidant activity (DPPH method) within 72 hours of applying treatment showed the most significant increase compared to the control. Correlation

Copyright: © 2024 by the authors. Published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//) .This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0),(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

between traits showed that catalase enzyme had a positive and significant correlation with polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase enzymes. Similarly, the guaiacol peroxidase enzyme positively correlated with the polyphenol oxidase enzyme ($P<0.01$). Antioxidant activity (DPPH method) also showed a positive and significant correlation with catalase, polyphenol oxidase and catalase enzymes. The result of simple regression analysis using DPPH and all antioxidant enzyme activities as dependent variables and the time interval after adding the elicitor as independent variables showed that all DPPH and all enzyme activities (except superoxide dismutase and ascorbate peroxidase) had increased by 72 hours after adding the elicitor.

**Conclusion**:

The use of cellulase enzyme derived from *Aspergillus nigar* fungus in the conditions of cell suspension culture increases the antioxidant activity (DPPH method) and the activity of oxidant enzymes. Therefore, it was concluded that the cellulase enzyme caused cell stress in the conditions of cell suspension, and this stress caused the stimulation of the plant's defense mechanisms, such as antioxidant enzymes. A positive and significant correlation was observed between the antioxidant activity and some antioxidant enzymes, such as polyphenol oxidase and catalase, which indicates the positive effect of the fungal elicitor in stimulating the production of secondary metabolites and increasing the potential of inhibiting free radicals in licorice plant cell suspension culture conditions. The DPPH and all enzyme activities (except superoxide dismutase and Ascorbate Peroxidase) were increased 72 hours after adding the elicitor.

**Keywords**: cell response, cellulase, defense mechanisms, reactive oxygen species, stimulus

# تأثیر الیسیتور قارچی سلولاز بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)

مریم الهدو[۱*] و ساجده صابر[۲]

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

پست‌الکترونیک: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

۲- محقق، کارشناس ارشد شیمی تجزیه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰

## چکیده

**سابقه و هدف:**

شیرین‌بیان (*Glycirrhiza glabra* L.)، گیاهی چندساله از خانواده Fabaceae، سرشار از متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی است که برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود. امروزه از روش‌های مختلف کشت بافت برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند دفاع گیاه و تحریک پاسخ استرس در سلول‌های گیاهی به کمک الیسیتورها استفاده می‌شود. قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، سلولاز تولید می‌کنند و سلولاز می‌تواند به عنوان محرکی برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلول‌های گیاهی استفاده شود. هدف از این تحقیق، اثر آنزیم سلولاز به‌دست‌آمده از قارچ*Aspergilus niger* بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان است.

**مواد و روش‌ها**

بذر شیرین‌بیان از منطقه سمیرم استان اصفهان جمع‌آوری شد. بذرها پس از ضدعفونی در یک محیط MS 1/2 کشت داده شدند. به منظور القای کالوس، هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط MMS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (دو میلی‌گرم در لیتر BA و نیم میلی‌گرم در لیتر NAA) با ساکارز ۳٪ و آگار ۰/۷ درصد کاشته شدند. نیم گرم کالوس فیبری تولید شده در زیر هود استریل به ارلن‌های حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع MMS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و نیم میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA منتقل و در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تاریکی قرار داده شد. در روز نوزدهم پس از کشت، آنزیم سلولاز با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هریک از ارلن‌ها در زیر هود استریل اضافه گردید. سپس برداشت در فواصل زمانی صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن الیسیتور انجام شد. کالوس‌های دیر واکشت شده نیز به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد. تجزیه آماری به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. صفات مورد بررسی شامل: فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) بودند. برای تعیین روابط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌ها از تجزیه همبستگی استفاده شد و برای تعیین روابط بین فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت افزودن الیسیتور بر فعالیت‌های آنزیمی، از تجزیه رگرسیون استفاده گردید.

**نتایج**

اثر آنزیم سلولاز بر تمامی صفات به‌جز سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی اکسیدانی (روش DPPH) در ۷۲ ساعت پس از تیمار، بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشت. تجزیه همبستگی بین صفات نشان داد که همبستگی

بین آنزیم کاتالاز با آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز و همبستگی بین آنزیم گایاکول پراکسیداز با آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مثبت و معنی‌دار بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز نشان داد. نتایج تجزیه رگرسیون رابطه مثبت و معنی‌داری بین فواصل زمانی افزودن الیسیتور بر فعالیت‌های آنزیمی (بجز سوپراکسید دیسموتاز و اسکوربات پراکسیداز) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد.

نتیجه‌گیری

استفاده از آنزیم سلولاز مشتق از قارچ *Aspergilus niger* در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شیرین‌بیان شده است. آنزیم سلولاز در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی باعث ایجاد تنش سلولی می‌شود و این تنش باعث تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنل‌اکسیداز و کاتالاز مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت عامل قارچی در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان است. با توجه به رابطه خطی معنی‌دار بین فواصل زمانی افزودن الیسیتور بر فعالیت‌های آنزیمی (بجز سوپراکسید دیسموتاز و اسکوربات پراکسیداز) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مدت زمان ۷۲ ساعت به‌عنوان بهترین فاصله زمانی اعمال الیستور قارچی تعیین شد.

**واژه‌های کلیدی:** پاسخ سلولی، سلولاز، گونه‌های اکسیژن فعال، سازوکارهای دفاعی، محرک

## مقدمه

شیرین‌بیان (*Glycirrhiza glabra* L.) گیاهی چندساله از خانواده Fabaceae، سرشار از متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی است که برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود (Wang *et al*., 2013). شیرین‌بیان گیاهی مدیترانه‌ای بوده و در جنوب‌شرق آسیا گسترش زیادی دارد. این گیاه از جنوب اروپا تا آسیای مرکزی میان دو عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۴۵ درجه نیمکره شمالی رویش دارد. شیرین‌بیان در سطوح وسیعی در کشورهای انگلیس، بلژیک، فرانسه، آلمان، ایتالیا، یونان و ترکیه کشت می‌شود. در ایران نیز تقریباً در تمام شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به فراوانی یافت می‌شود (Mirhaidar, 1993). اگرچه در بسیاری از کشورها به عنوان یک گیاه دارویی کشت و کار می‌شود، ولی در دیمزارهای استان کرمانشاه، ایلام و فارس و بعضی از مزارع و مناطق مرکزی ایران مانند اصفهان و اراک به عنوان یک علف هرز در مزارع نخود و گندم محسوب می شود. سطح زیر کشت گیاهان دارویی مختلف در کشور حدود ۶۶ هزار هکتار است که از این مقدار، سهم شیرین‌بیان ناچیز است. در حالی که بالاترین حجم صادرات گیاهان دارویی مربوط به گیاه شیرین‌بیان است (Ghahraman, 1999). شیرین‌بیان بیش از ۲۰۰۰ سال است که به‌طور گسترده به عنوان یک داروی سنتی چینی استفاده می‌شود. این گیاه نه تنها دارای فعالیت‌های ضد التهابی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی است، بلکه دارای فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد نیز می‌باشد (Shetty *et al*., 2002).

گلیسیریزین، یک تری‌ترپنوئید و فعال‌ترین ترکیبی است که طعم شیرین ریشه شیرین‌بیان را منعکس کرده و به‌طور انحصاری از ریشه‌های خشک شده و استولون‌های شیرین‌بیان به‌دست آمده و در درمان بیماری‌های کبدی و آلرژیک استفاده می‌شود. گلیسیریزین ۵۰ برابر یا بیشتر شیرین‌تر از شکر است و به‌عنوان یک شیرین‌کننده غیر مغذی قیمت بالایی را در سطح جهانی دارد (Jaiswal *et al*., 2017). از شیرین‌بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک (peptic) استفاده می‌شود (Baba & Shigeta,

(1993; Lentihet & Nigren, 1997). این گیاه در طب سنتی چین نیز برای درمان هپاتیت، رشد تومور و بیماریهای قلبی کاربرد دارد ( Blumenthal *et al*., 2000). در طب سنتی ایران نیز به عنوان درمان ورم معده و ضدسرفه استفاده می‌شود (Li *et al*., 2011 ). همچنین اثبات شده است که لیکوریک یا ریشه خشک شیرین‌بیان در افزایش ترشح سرتونین و پروستاگلندین در معده اثر گذاشته و خاصیت ضد تورم معده را از این طریق اعمال می‌کند (Colalto, 2010). ثابت شده است که اثرهای محافظتی گیاه در برابر اختلالات کبدی، بیماری‌های آلرژیک، التهاب و زخم‌های معده تا حد زیادی وابسته به گلیسیریزین است (Wang *et al*., 1995).

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های کشت بافت گیاهی، نتایج امیدوارکننده‌ای را برای بهبود بهره‌وری نشان داده و امکان جایگزینی تدریجی کشت کل گیاه را به عنوان منبع متابولیت‌های ثانویه مفید فراهم کرده است. امروزه از روش‌های مختلف کشت بافت برای افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه از طریق تقویت دفاع گیاه و تحریک پاسخ استرس در سلول‌های گیاهی با کمک السیتورها استفاده می‌شود (Chattopadhyay *et al*., 2002). الیسیتورها را به سه دسته تقسیم می‌کنند، دسته اول الیسیتورهای زیستی بوده که معمولاً مولکول‌های مشتق شده از میکروب هستند که متابولیسم ثانویه را تحریک می‌کنند و شامل پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم و دیواره‌های سلولی باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند. دسته دوم، الیسیتورهای غیرزیستی، مانند تابش اشعه ماوراء بنفش، نمک‌های فلزات سنگین و مواد شیمیایی مختلف هستند و دسته سوم الیسیتورهای درون‌زا می‌باشند که مواد شیمیایی هستند و در داخل سلول به عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه تولید می‌شوند، مانند متیل جاسمونات ( Fu *et al*., 1999).

نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نیز الیسیتورها بر روی میزان کالوس‌دهی و متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد. افزودن اسید اسکوربیک در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه از شیرین‌بیان بالاترین شاخص رشد کالوس را دربر داشت (Allahdou *et al*., 2019). اثر ریزنمونه و تنظیم‌کننده های رشد گیاهی بر روی میزان کالوس‌دهی گیاه اسطوخودوس نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون و تنظیم‌کننده های رشد 2,4,D به میزان نیم میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان ۰/۲۵ گرم در لیتر بهترین تیمار برای کالوس‌زایی بودند (Abbaszadeh *et al*., 2022). استفاده از قارچ‌ها برای بهبود تولید آلکالوئیدها در بسیاری از گیاهان از اوایل دهه ۱۹۹۰ گزارش شده است ( Christen *et al*.,1991; Strobel *et al*.,1992). قارچ‌های اندوفیتیک میکرو قارچ هایی هستند که حداقل در بخشی از چرخه زندگی خود با گیاهان ارتباط داشته و هیچ‌گونه آسیب قابل‌توجهی به آنها وارد نمی‌کنند (Abdel-Azeem *et al*.,2019). آنها تقریباً در همه گونه‌های گیاهی وجود دارند و از طریق برهم‌کنش‌های میکروب و میزبان در توسعه گیاه میزبان نقش مهمی ایفا می کنند ( Kaul *et al*.,2014). همچنین به دلیل نقش احتمالی در سنتز مواد فعال یا تبدیل متابولیت‌های ثانویه به عنوان الیسیتور استفاده می‌شوند (Boller *et al*., 1995).

یک تعداد از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، سلولاز تولید می‌کنند (Carpita & Gibeaut, 1993). برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ گزارش شد که سلولاز می‌تواند به عنوان یک الیسیتور عمل کند (Threlfall & Whitehead, 1988; Whitehead *et al*., 1988). یک اندوسلولاز جدا شده از قارچ *Rhizoctonia solani* باعث مرگ سلولی در ذرت، تنباکو و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شده و علاوه بر این، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، قلیایی شدن محیط، تجمع $Ca^{2+}$ و بیوسنتز اتیلن سلول‌های تنباکوی کشت شده را القا کرده، ازاین‌رو این اندوسلولاز یک الیسیتور بوده و فعالیت آنزیمی آن برای فعالیت الیسیتوری مورد نیاز نیست (Yanan *et al*., 2015).

فرایند تحریک‌سازی[1]، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)

[1] Elicitation

ازجمله سوپراکسید ($O_2^-$) و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) را القا می‌کند. ROS ممکن است از طریق اکسیداسیون DNA، RNA، لیپیدها و پروتئین‌ها، باعث آسیب اندامک، غشاء و سلول شود. سلول‌های گیاهی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی مانند سوپراکسید، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز برای محدود کردن یا کاهش ROS دارند، بنابراین این آنزیم ها در دفاع از تنش اکسیداتیو عمل می‌کنند. SOD تبدیل سوپراکسید ($O_2^-$) به پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) و اکسیژن ($O_2$) را کاتالیز می‌کند، در حالی که CAT و GPx پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کنند (Ali *et al.*, 2006). درک کنترل فعالیت این آنزیم‌ها در سلول‌های گیاهی و فعالیت‌های بیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها می‌تواند به توضیح و عملکرد فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در طی کشت و تحریک‌سازی سلول کمک کند. ازاین‌رو، در این تحقیق نقش الیسیتور قارچی (آنزیم سلولاز گرفته شده از قارچ *Aspergilus niger*) بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز بررسی و نیز تأثیر این الیسیتور بر رادیکال‌های آزاد تولیدی در کشت سوسپانسیون سلولی ارزیابی گردید و در نهایت ظرفیت الیسیتور قارچی برگرفته شده از قارچ *Aspergilus niger* به عنوان محرک سازوکارهای دفاعی در کشت سلولی شیرین‌بیان آزمون شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه بذر و کشت

بذر شیرین‌بیان از منطقه سمیرم استان اصفهان جمع آوری و بعد به منظور خراش‌دهی به مدت ۱۵ دقیقه در اسید سولفوریک ۵۰ درصد قرار گرفته و سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. به منظور ضدعفونی در زیر هود استریل از هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (غلظت کلر ۹ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه استفاده و سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در نهایت به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردید. بذرهای ضد عفونی شده در محیط کشت MS ½ کشت گردیده و به منظور تهیه گیاهچه استریل در تغییرات نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی به مدت چهار هفته نگهداری شد.

القای کالوس

هیپوکوتیل و کوتیلدون رشد کرده در محیط کشت ½ MS به قطعات کوچک تقسیم و در محیط کشت MMS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و نیم میلی‌گرم بر لیتر NAA) با ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت شدند. کالوس‌های تولیدی در مرحله اول قطعه قطعه شده و به محیط کشت‌های جدید منتقل گردیدند و هر سه هفته یکبار واکشت در محیط‌های جدید انجام شد.

سوسپانسیون سلولی و تیمار با الیسیتور

مقدار نیم گرم کالوس فیبری تولید شده در زیر هود استریل به ارلن‌های محتوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع MMS محتوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و نیم میلی گرم بر لیتر هورمون NAA منتقل شده و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تاریکی قرار داده شد. در روز نوزدهم پس از کشت، آنزیم سلولاز با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زیر هود استریل به هریک از ارلن‌ها اضافه و نمونه‌ها دوباره به انکوباتور شیکردار منتقل شدند. سپس در فواصل زمانی صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اضافه کردن الیسیتور، برداشت انجام شد. بدین صورت که در زیر هود استریل سوسپانسیون سلولی از صافی عبور داده شده و سلول‌ها بعد از شستشو با آب مقطر استریل در ظروف مناسب قرار گرفته و همراه با کالوس‌های دیر واکشت شده تا انجام آنالیز در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

**آنزیم کاتالاز:** ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با ۲/۸ میلی-لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط و در طول موج ۲۴۰

نانومتر به مدت ۲ دقیقه سرعت حذف پراکسید هیدروژن اندازه‌گیری شد. از بافر فسفات پتاسیم حاوی پراکسید هیدروژن به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. میزان فعالیت

آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی mM-1cm-1 ۳۹/۴ و از تقسیم فعالیت حجمی کاتالاز بر میزان پروتئین عصاره محاسبه شد (Beers & Sizer, 1952).

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

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

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

**آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، متیونین ۱۳ میلی مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید (Nitro-blue tetrazolium chloride) ۷۵ میکرو مولار، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار و ریبوفلاوین ۴ میکرو مولار تهیه و یک نمونه حاوی همه مواد به غیر از عصاره آنزیمی نیز به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی و نمونه شاهد زیر لامپ فلورسنت به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از آن جذب محلول‌های واکنش با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یکی از محلول‌ها تحت تابش نور قرار داده نشده و به عنوان شاهد (بلانک) بود. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، میزان آنزیمی است که می‌تواند تا ۵۰ درصد از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید جلوگیری کند. میزان اختلاف جذب نمونه و شاهد در ۵۶۰ نانومتر، بیانگر مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در نمونه می‌باشد. براساس این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها اندازه‌گیری و فعالیت ویژه آنزیم برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) محاسبه شد (Giannopolities & Ries, 1977).

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

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

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

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

As و Ac: به ترتیب عدد جذب مربوط به نمونه‌های آزمایشی و نمونه شاهد

**تجزیه وتحلیل داده‌ها**

تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق شامل ۵ تیمار: کالوس‌های دیر واکشت شده، برداشت سلول بعد از اضافه کردن الیسیتور در فواصل زمانی صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در سه تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. قبل از تجزیه واریانس، داده‌ها در نرم‌افزار نسخه Minitab Ver18از نظر نرمال بودن با استفاده از روش کولموگراف اسمیرناف بررسی گردیدند و پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها، خطاها نیز از نظر نرمال بودن بررسی شدند. سپس تجزیه واریانس کلیه صفات و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. برای تعیین روابط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از تجزیه همبستگی و برای تعیین روابط بین فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه گیری فعالیت‌های آنزیمی از تجزیه رگرسیون استفاده شد. برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS 2010) و برای رسم نمودارهای مقایسه میانگین صفات از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۷ استفاده شد.

## نتایج

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد تفاوت بین فواصل زمانی برای فعالیت کلیه آنزیم‌ها به استثنای سوپر اکسید دسموتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱) که نشان‌دهنده تأثیر آنزیم سلولاز در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز میزان مهار رادیکالهای آزاد در شرایط کشت سلولی می‌باشد. کلیه آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیشترین افزایش را داشته، به‌طوری‌که آنزیم گایاکول پراکسیداز در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۱/۱۷ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱/۴۳ برابر، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۱/۴۷ برابر و در کالوس های دیر واکشت شده ۱/۶۵ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. در آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۲۴ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور ۱/۰۵ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۰/۸ برابر، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۱/۱۶ برابر و در کالوس‌های دیر واکشت شده ۱/۱۹ برابر نسب به تیمار شاهد افزایش نشان داد. آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۰/۸۷ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱/۵۱ برابر، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۱/۸۵ و در کالوس های دیر واکشت شده ۱/۶۱ برابر نسب به تیمار شاهد افزایش نشان داد. آنزیم کاتالاز در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۱/۱۴ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱/۵۰، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۲/۲۴ و در کالوس‌های دیر واکشت شده ۲/۱۶ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دادند. آنزیم سوپراکسید دسموتاز با وجود عدم معنی‌داری، در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۱/۰۲ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۰/۹۵ برابر، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۱/۰۹ برابر و در کالوس های دیر واکشت شده ۰/۸۳۶ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش DPPH) نیز بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نشان داده، به‌طوری‌که در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۱/۳۹ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱/۵۶ برابر، در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۲/۲۷ برابر و در کالوس‌های دیر واکشت شده نیز ۱/۶۶ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. در بیشتر این

صفات تیمار ۷۲ ساعت بیشترین افزایش را نسبت به شاهد (بدون الیسیتور قارچی) نشان داد.

**جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر آنزیم سلولاز بر فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی در کشت سوسپانسیون شیرین‌بیان**

**Table 1. Results of variance analysis of the effect of cellulase enzyme on the activity of oxidant enzymes in licorice suspension culture**

| Sources | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Guaiacol peroxidase | Ascorbate Peroxidase | Poly phenol Oxidase | Catalase | Super Oxide Dismutase | Antioxidant Activity DPPH method |
| Treatment | 4 | 68.366** | 296.096** | 13.89** | 93.47** | 0.9467ns | 699.392** |
| Error | 10 | 23.795 | 33.016 | 2.049 | 5.629 | 0.0214 | 19.93 |
| (%)C.V | - | 19.835 | 8.97 | 20.22 | 15.095 | 7.95 | 8.97 |

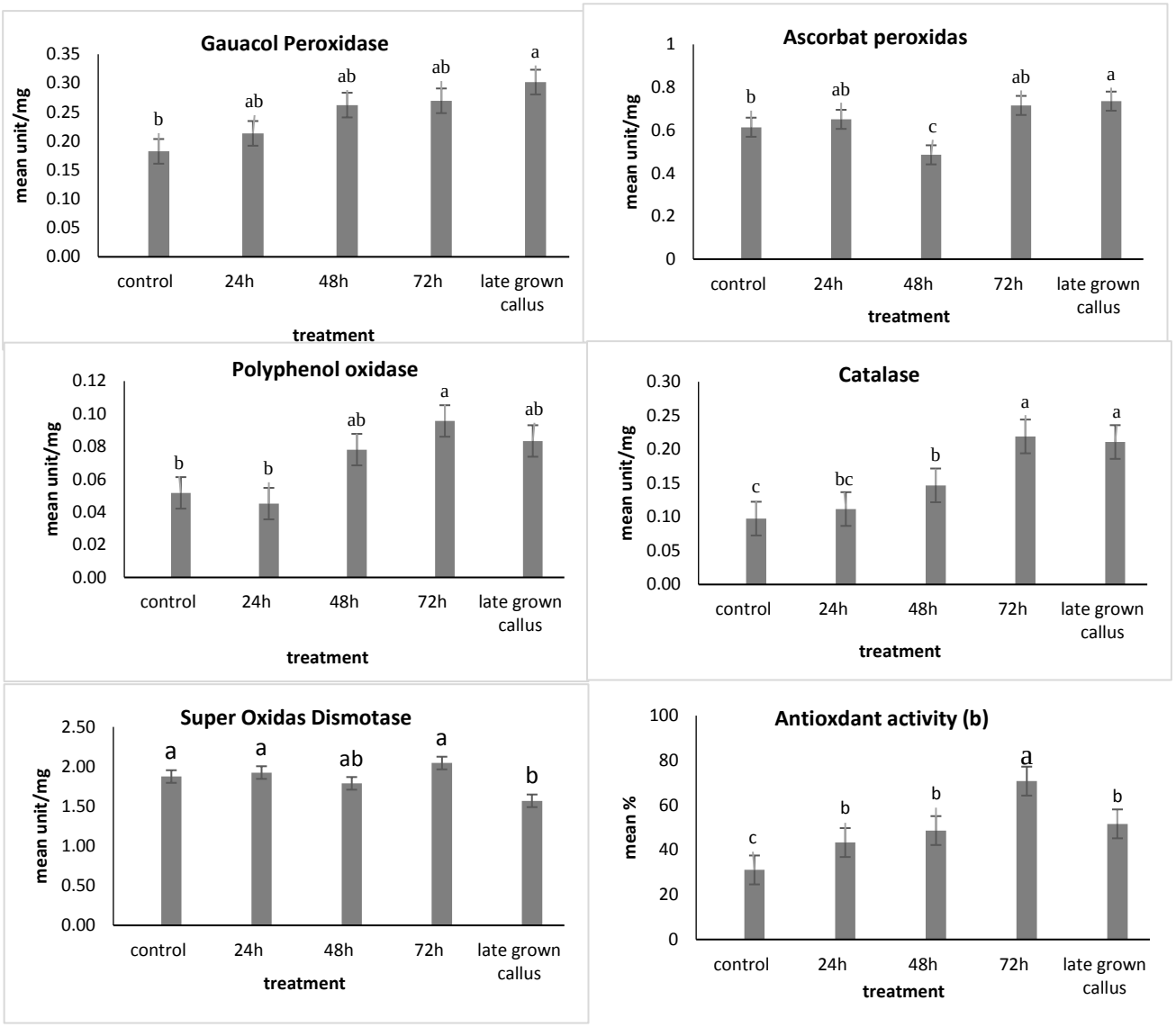
ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ و ۱٪

ns, * and ** non-significant, significant at the 5% and 1% probability level, respectively

نتایج مقایسه میانگین آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان داد که تیمار شاهد (بدون الیسیتور) و ۲۴ ساعت بعد از کاربرد الیسیتور در گروه b و تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کاربرد الیسیتور و نیز کالوس‌های دیر واکشت شده نیز در گروه a قرار گرفتند (شکل ۱). در مقایسه میانگین آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز تیمار ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و کالوس‌های دیر واکشت شده در گروه a قرار گرفته و بیشترین افزایش را نشان داده، تیمار شاهد در گروه b ولی تیمار ۴۸ ساعت بیشترین کاهش را نشان داده و در گروه c قرار گرفت (شکل ۱). در مقایسه میانگین آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز تیمار ۷۲ ساعت بیشترین افزایش را نشان داده و در گروه a، بعد از آن تیمار ۴۸ ساعت و کالوس‌های دیر واکشت شده نیز افزایش نشان داده و در گروه ab قرار گرفته ولی تیمار ۲۴ ساعت و شاهد (بدون مصرف الیسیتور) کمترین افزایش را داشته و در گروه b قرار گرفتند (شکل ۱). در آنزیم کاتالاز نیز تیمار ۷۲ ساعت و کالوس‌های دیر واکشت شده بیشترین افزایش را نشان داده و در گروه a، تیمار ۴۸ ساعت در گروه b و تیمار ۲۴ ساعت و شاهد در گروه c قرار گرفتند (شکل ۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) نیز در ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور قارچی بیشترین افزایش را نشان داده و در گروه a قرار گرفته، تیمارهای ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و کالوس‌های دیر واکشت شده در گروه b و تیمار شاهد که کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت در گروه c قرار گرفت.

همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

همبستگی بین صفات نشان داد آنزیم کاتالاز با آنزیم پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز و آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز با آنزیم پلی فنل اکسیداز همبستگی مثبت و معنی دار داشت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار داشتند (جدول ۲).




شکل ۱. مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، در زمان‌های مختلف بعد از تیمارها (کنترل، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور سلولاز و کالوس‌های دیر واکشت شده)

بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد بوده و حروف متفاوت در ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.

Figure 1. Comparison of the average amount of antioxidant enzyme activity and antioxidant activity (by DPPH method) in licorice cell suspension culture (*Glycyrrhiza glabra)* at different times after treatment with (control, 24, 48, 72 hours after treatment with cellulase elicitor and late grown callus).

Error bars are standard errors. Different letters above bars show a significant difference based on the Duncan test; ($P \leq 0.01$).

جدول ۲. همبستگی بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سلولی شیرین‌بیان تحت تیمار سلولاز

Table 2. Correlation between antioxidant enzymes activity and antioxidant activity (DPPH method) in licorice cell culture under cellulase treatment

| Enzymes | Guaiacol peroxidase | Ascorbate Peroxidase | Poly phenol Oxidase | Catalase | Super Oxid Dismutase |
|---|---|---|---|---|---|
| Ascorbate Peroxidase | -0.08 | | | | |
| Polyphenol Oxidase | 0.79** | -0.03 | | | |
| Catalase | 0.87** | 0.31 | 0.89** | | |
| Super Oxid Dismutase | -0.65 | 0.21 | -0.07 | -0.29 | |
| Antioxidant Activity | 0.59 | 0.27 | 0.84** | 0.83** | 0.20 |

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ,** significant at the 1% level

تجزیه رگرسیون بین فواصل زمانی بعد از افزودن الیسیتور و میزان فعالیت‌های آنزیمی

به منظور تعیین روابط بین فواصل زمانی شاهد، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت افزودن الیسیتور بر فعالیت‌های آنزیمی، از تجزیه رگرسیون استفاده شد. در تجزیه رگرسیونی از فواصل زمانی مختلف اعمال تیمار الیسیتور قارچی (سلولاز) به‌عنوان متغیر مستقل (X) و از میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سلولی شیرین‌بیان به‌عنوان متغیر تابع (Y) استفاده شد. نتایج نشان داد رابطه خطی مثبت و معنی‌دار بین فواصل زمانی افزودن الیسیتور بر فعالیت‌های آنزیمی گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در سطح ۱ درصد وجود دارد و فعالیت‌های پلی فنل اکسیداز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش DPPH) در سطح احتمال ۵ درصد مشاهد شد (جدول۳) که نشان‌دهنده این است که با افزایش فاصله زمانی اعمال الیسیتور قارچی میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش داشته که با توجه به رابطه خطی معنی‌دار در ۴ صفت مذکور، ۷۲ ساعت به‌عنوان بهترین فاصله زمانی اعمال الیسیتور قارچی تعیین شد (شکل ۱ و جدول ۳).

جدول ۳. رابطه رگرسیون خطی بین زمان‌های مختلف اعمال تیمار الیسیتور قارچی (سلولاز) **(X)** بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سلولی شیرین‌بیان **(Y)**

Table 3. Linear regression between times of adding the elicitor (cellulose) as independent variable (X) antioxidant enzymes activity and antioxidant activity (DPPH method) in licorice cell culture as dependent variable (Y)

| Enzymes | Constant | b value | Regression equation | Coefficient of determination ($R^2$) |
|---|---|---|---|---|
| Guaiacol peroxidase | 0.137 | 0.033** | Y=0.137+0.033X | 0.79 |
| Ascorbate Peroxidase | 0.586 | 0.022ns | Y =0.586+0.022X | 0.12 |
| Poly phenol Oxidase | 0.040 | 0.009* | Y=0.040+0.009X | 0.56 |
| Catalase | 0.048 | 0.034** | Y=0.048+0.034X | 0.88 |
| Super Oxid Dismutase | -0.049 | 1.988ns | Y= -0.049+1.988X | 0.20 |
| Antioxidant Activity | 28.50 | 6.860* | Y=28.50+6.860X | 0.56 |

* و **: ضرایب رگرسیون به ترتیب در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار است

*, ** regression coefficients are significant at the 5 and 1% probability levels, respectively.

## بحث

الیسیتورها سیگنال‌های دفاعی گیاه را با یک پاسخ سلولی فوری تحریک می‌کنند که تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل (OH-)، پراکسید هیدروژن (H2O2) و آنیون‌های سوپراکسید ($O_2^-$) را افزایش می‌دهد. به منظور کاهش بیش از حد این ROS، محفظه‌های سلولی مختلف از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) برای فعال کردن سیستم‌های دفاعی سلول استفاده می‌کنند (Martinez *et al*., 2016). در این تحقیق فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و

گایاکول پراکسیداز در ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور قارچی بیشترین افزایش را داشته و آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در کالوس‌های دیر واکشت شده نیز افزایش فعالیت نشان دادند. ازاین‌رو، می‌توان گفت الیسیتور سلولاز به عنوان یک الیسیتور قارچی پاسخ سلولی را تحریک کرده و با فعال کردن این آنزیم‌ها سبب کاهش ROS شده‌اند. در کالوس‌های دیر واکشت شده نیز کمبود مواد غذایی به عنوان یک محرک عمل کرده و سبب تحریک سیستم دفاعی گیاه شده است. کاربرد الیسیتور قارچی سبب اختلاف شدید بین تولید ROS و دفاع آنتی اکسیدانی شده و در پی آن تنش اکسیداتیو ایجاد شده، باعث آسیب سلولی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zhao *et al*., 2005). $H_2O_2$ با فعال کردن ژن‌های دفاعی سیگنالینگ و هماهنگی با پاسخ آنتی‌اکسیدانی، تولید فیتوالکسین را افزایش داد (Ramos-Valdivia *et al*., 2012). بنابراین در این مطالعه نیز الیسیتور قارچی و تنش کمبود مواد غذایی در کالوس‌های دیر واکشت شده سبب ایجاد پاسخ دفاعی شده و آسیب سلولی ایجاد شده منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه خواهد شد.

در طی فرایند سم‌زدایی ROS، سوپراکسید دیسموتاز SOD با ارائه اولین خط دفاعی در برابر اثرهای سمی ROS، واکنش اولیه را کاتالیز می‌کند (Ali *et al*,. 2006). در تحقیقی Martinez و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که الیسیتورهای غیرزیستی باعث افزایش فعالیت‌های SOD، CAT، APX و POX می‌شوند. الیسیتور استفاده شده در این تحقیق یک الیسیتور قارچی (الیسیتور زیستی) بوده که مشابه با الیسیتورهای غیر زیستی سبب افزایش فعالیت SOD (با وجود عدم معنی‌داری)، CAT، APX و GUP شده است. ازاین‌رو، این نتایج تأکید بر نتایج یکسان دو نوع الیسیتور زیستی و غیر زیستی در مورد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد.

در شرایط نامطلوب، SOD اولین چیزی است که سطح $O_2$ سمی را از بین می‌برد و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (APX، CAT، GR و POX) $H_2O_2$ را به $H_2O$ و اکسیژن مولکولی تبدیل و از آسیب سلولی جلوگیری می‌کند (Scandalios, 2005). در چندین جنس گیاهی، تحریک کردن باعث افزایش تنش شد که به نوبه خود منجر به افزایش فعالیت SOD شد (Samar *et al*., 2011). در این تحقیق نیز آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با وجود عدم معنی داری بین تیمارها، در ۲۴ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داده ولی پس از آن کاهش یافت. در کالوس‌های دیر واکشت شده نیز میزان این آنزیم نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. در حالی که سایر آنزیم‌ها مانند گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. ازاین‌رو، نتایج این تحقیق حکایت از آن دارد که شیرین‌بیان در شرایط سوسپانسیون سلولی از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها سبب مهار ROS شده و بر تنش ایجاد شده توسط الیسیتور قارچی غلبه خواهد کرد. تنوع در فعالیت SOD می‌تواند به دلیل قرار گرفتن آنزیم‌های SOD در بخش‌های مختلف (سیتوزول، کلروپلاست و میتوکندری) سلول باشد (Soundararajan *et al*., 2017). در طول تحریک کردن، صرف‌نظر از تغییرات مخصوص دوز الیسیتور و بافت گیاهی، یک الگوی مشابه برای فعالیت CAT، POD و APX مشاهده شد (Elkahoui *et al*., 2005). تیم‌های دفاعی مانند CAT و POX سلول‌های محافظ را در برابر آسیب اکسیداتیو هدف قرار دادند (Mittler, 2002). سالیسیلیک اسید فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی را در بسیاری از گونه‌های گیاهی دیگر افزایش داد (Rehman *et al*., 2017). همچنین گزارش شده است که آدنین سولفات باعث ایجاد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف در سایر گونه‌های گیاهی می‌شود (Ahmad *et al*., 2017). پلی‌آمین‌ها به‌طور مؤثری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی را بهبود بخشیده‌اند (Asthir *et al*., 2012).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در بیشتر تیمارها افزایش نشان داد، به‌طوری‌که در تیمار ۷۲ ساعت و کالوس های دیر واکشت شده بیشترین افزایش را نشان دادند. در

تطابق با نتایج این تحقیق نیز گزارش شده که رشد کالوس های *Cnidium officinale* در تاریکی موجب افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز نسبت به کالوس هایی که در معرض روشنایی (نور سفید و نور آبی) بودند، شده است (Adil *et al*., 2019). افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ممکن است سطح بالاتر $H_2O_2$ را در سلول‌های رشد کرده در شرایط تاریک مداوم نشان دهد. همچنین می‌توان آن را با این واقعیت تفسیر کرد که GPX و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جنین‌زایی رویشی نقش دارند (Manivannan *et al*., 2015). شایان ذکر است که آنزیم گایاکول پراکسیداز از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول گیاهی جلوگیری می‌کند ( Chen *et al*., 2004). در این تحقیق نیز با توجه به شرایط یکسان در همه تیمارها (رشد کلیه سلول‌ها در تاریکی مطلق)، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه گایاکول پراکسیداز و کاتالاز را می‌توان به تأثیر الیسیتور قارچی و تنش ایجاد شده در سلول‌ها نسبت داد که منجر به افزایش تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌ها شده، بنابراین در پاسخ به تنش ایجاد شده و مقابله با ROS سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول افزایش می یابد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های وحشی و کالوس های گیاهانی مانند *Cnidium officinale* با متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها همبستگی مثبت دارند (Adil *et al*., 2018). به‌طور مشابه در این تحقیق نیز مشاهده شد. در تحقیق دیگری Adil و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های رشد کرده در تاریکی کمتر از کالوس‌های رشد کرده در شرایط نور بود که علت آن را کاهش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئید در کالوس‌های رشد کرده در تاریکی نسبت داد. در این تحقیق، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمام تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داده و در تیمار ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار خود رسیده بود. ازاین‌رو، می‌توان چنین استنباط کرد که الیسیتور قارچی با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی منجر به تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان خواهد شد. البته بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و کاتالاز نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد که نشان دهنده تأثیر مثبت الیسیتور قارچی در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی می‌باشد. بدین صورت که با تنش ایجاد شده توسط این الیسیتور، سازوکارهای دفاعی سلول تحریک شده و سلول در پاسخ به آن اقدام به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و کاتالاز کرده و این افزایش، ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تولید متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش افزایش می‌یابد.

تجمع و سنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان بستگی به فاکتورهای مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، توده مورد تلقیح، زمان اضافه کردن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که محیط کشت در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد دارد (Svanandhan et al., 2012; Svanandhan et al., 2013) . در این تحقیق اثر مدت زمان در معرض قرار گرفتن الیسیتور به عنوان متغیر ثابت و مستقل بر روی میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بررسی شد، نتایج نشان داد که تیمار ۷۲ ساعت اثر قوی و معنی‌داری بر روی این صفات داشته و سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. بنابراین اضافه کردن الیسیتور در روز نوزدهم (پایان مرحله رشدی) و نیز مدت زمان ۷۲ ساعت سبب تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه شده که موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

## نتیجه‌گیری

به‌کارگیری آنزیم سلولاز برگرفته از قارچ آسپرژیلوس (*Aspergilus nigar*) در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنل‌اکسیداز شده و در تیمار ۷۲ ساعت

بیشترین مقدار را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. بنابراین می توان گفت آنزیم سلولاز در شرایط سوسپانسیون سلولی سبب تنش سلولی شده و این تنش سبب تحریک سازوکار های دفاعی گیاه مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است. البته بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بعضی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنل اکسیداز و کاتالاز همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت الیسیتور قارچی در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی گیاه شیرین‌بیان می‌باشد. ازاین‌رو، نقش سلولاز برگرفته شده از قارچ آسپرژیلوس (*Aspergilus nigar*) به عنوان یک الیسیتور در تحریک سازوکارهای دفاعی از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیز آنزیم های آنتی‌اکسیدانی تأیید می‌گردد. افزودن الیسیتور در روز نوزدهم کشت و نیز مدت زمان ۷۲ ساعت در معرض قرارگیری بهترین پاسخ را دربر داشت. بنابراین پیشنهاد می شود تأثیر این آنزیم در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه مهم این گیاه مانند گلیسیریزین نیز در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی بررسی شود. تأثیر این آنزیم در افزایش میزان گلیسیریزین در شرایط کشت ریشه موئین نیز در حال انجام است.

## Refrences


- Abbaszadeh, F., Daneshvar, M.H., Salehi Salimi, M., & Lotfi Jalal Abadi, A. 2023. Determining the best combination of explant and plant growth regulators on callogenesis, indirect organogenesis, proliferation, and rooting of *Lavandula officinalis* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 30(2): 306-323. (in Persian).
- Abdel-Azeem, A.M., Abdel-Azeem, M.A., & Khalil, W.F. 2019. Endophytic fungi as a new source of antirheumatoid metabolites. In Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Diseases, 2nd ed.;Watson, R.R., Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 355-384.
- Adil, M., Ren, X., & Ryong Jeong, B. 2019. Light elicited growth, antioxidant enzymes activities and production of medicinal compounds in callus culture of *Cnidium officinale* Makino. Journal of Photochemistry & Photobiology, *B: Biology*. 196: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.05.006.
- Adil, M., Ren, X., Kang, D.I., & Jeong, B.R. 2018. Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino. Molecular Biology Reports. 45 (3): 1919-1927. https://doi.org/10.1007/s11033-018-4340-3.
- Ahmad, Z., Shahzad, A., & Sharma, S. 2018. Enhanced multiplication and improved *ex vitro* acclimatization of *Decalepis arayalpathra*. *Biologia Plantarum*. 1: 1-10. https://doi.org/10.1007/s10535-017-0746-3.
- Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., & Paek, K.Y. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Reports. 25 (6): 613-620. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6.
- Ali, MB., Yu, KW., Hahn, EJ., & Paek, KY. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture Panax ginseng roots in bioreactors. Plant Cell Report. 25 (6): 613-620. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6.
- Allahdou, M., Omidi, M., Bihamta, M.R., Abbasi, A.R., & Fakheri, B.A. 2019. Study of the effect of different antioxidants in reducing the browning of callus and its biomass production in two species of licorice. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 27(1): 120-131. (in persian).
- Asthir, B., Koundal, A., & Bains, N.S. 2012. Putrescine modulates antioxidant defense response in wheat under high temperature stress. *Biologia Plantarum*. 56: 757-761. https://doi.org/10.1007/s10535-012-0209-1.
- Baba, M. and Shigeta, S. 1993. Antiviral activity glycyrrhizin against varicella zoster

- Giannopolities, C. N. & Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59: 309-314. https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309
- Ghahraman, A. (1999). Basic Botany: Anatomy and Morphology, University of Tehran Press. 1, 539-542.
- Haji Mehdipor, H., Amanzade, Y., Hasanlu, T., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M. 2009. Quality survey of collected Licorice root from different sites of Iran. Med Plant. J. 7: 3. 106-114. (In Persian).
- Jaiswal, N., Verma, Y. & Misra, P. 2017. Micropropagation and in vitro elicitation of licorice (*Glycyrrhiza spp*.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant, 53(36): 145-166. https://doi.org/ 10.1007/s11627-017-9832-7.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M., & Nicolas, J. J. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. Journal of Agricultural Food Chemistry, 38, 926-931. https://doi.org/10.1021/jf00094a002
- Kaul, S., Ahmed, M., Sharma, T., & Dhar, M.K. 2014. Unlocking the myriad benefits of endophytes: An overview. *In Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*; Kharwar, R.N., Upadhyay, R., Dubey, N., Raghuwanshi, R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany. 41-57.
- Lentihet, M.& Nygren, A. (1997). Licorice an old drug and currently a candy with metabolic effects. *Journal oral Pathology Medicine*, 26 (1), 9-36.
- Li, Y.J., Chen, J., Li, Y., Li, Q., Zheng, Y.F., Fu, Y.& Li, P. 2011. Screening and characterization of natural antioxidants in four Glycyrrhiza species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight tanden mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1218 (45),8181-8191.
- Manivannan, A., Jana, S., Soundararajan, P., Ko, C.H., & Jeong, B.R. 2015. Antioxidant enzymes metabolism and cellular differentiation during the developmental stages of somatic embryogenesis in *'Torilis japonica'*(Houtt.) DC. *Plant Omics Journal* .8 (5): 461-471.
- Martinez, F.Z., Constantino, G.G.L., Noyola, T.P., Garcia, F.E., Varaldo, H.P., Rojas, virus in vitro. *Mund Kiefer Gesichtchir*,3 (1), 3-30.
- Beers, G. R. & sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biological Chemistry*. 195(1): 133-140.
- Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review Plant Biology*. 46 (1):189-214. https://doi.org/ 10.1146/annurev.pp.46.060195.001201.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants, consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant Journal, 3: 1-30. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. & Bisaria, V.S. 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. Biotechnology Bioprocess Engineering, 7(3): 138-149. https://doi.org/10.1007/BF02932911.
- Colalto, C. 2010. Herbal in traction on absorbtion of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacology Research*, 62,207-227.
- Chen, S., Vaghchhipawala, Z., Li, W., Asard, H., & Dickman, M.B. 2004. Tomato phospholipid Hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. Plant Physiology. 135 (3): 1630–1641. https://doi.org/10.1104/pp.103.038091.
- Christen, A., Gibson, D., & Bland, T. 1991. Production of Taxol or Taxol-Like Compounds in cell Culture. US Patent 5019504A,
- Elkahoui, S., Hernandez, J.A., Abdelly, C., Ghrir, R., & Limam, F. 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. Plant Science. 168 (3): 607-613. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.09.006.
- Fielding, J. L. & Hall. J., 1978. A biochemical and cytochemical Study of peroxidase a activity in root pea. *Journal of Experimental Botany*, 29: 98-989.
- Fu, TJ., Singh, G., & Curtis, WR. 1999. Plant cell culture for the production of food ingredients. Plenum Publisher, New York.

recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. *Frontiers in Plant Science*. 8:1-17. https://doi.org/ 10.3389/fpls.2017.00738.
- Strobel, G.A., Stierle, A., & van Kuijk, F.J. 1992. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia.* Plant Science. 84: 65-74.
- Sivannandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T. S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N., & Ganapathi. 2012. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withnia somnifera* (L.) Dunal. Industrial Crops and Products, 37: 124-129.
- Sivanandhan, G., Dev, G. K., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M. Manickavasagam, M. Selvaraj, N., & Canapathi, A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withnia somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 114: 121-129.
- Threlfall D.R, & Whitehead I.M. 1988. Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry. 27 (8): 2567-2580. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87028-6.
- Wang, X., Zhang, H., Chen, L., Shan, L., Fan, G., & Gao, X. 2013. Liquorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: A review of its role in drug interactions. *Journal of Ethnopharmacol*, 150 (3):781-790. https://doi.org/ 10.1016/j.jep.2013.09.055.
- Wang, Zh., Nishioka, M., Kurosaki, Y., Nakayama, T. & Kimura, T. 1995. Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from Glycyrrhiza extract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 18: 9. 1238-41. https://doi.org/ 10.1248/bpb.18.1238.
- Whitehead, I.M., Ewing, D.F., & Threlfall, D.R. 1988. Sesquiterpenoids related to the phytoalexin debneyol from elicited cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry, 27 (5): 1365-1370. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80195-X.
C.M.C., Tapia, G.T. & Valdivia, A.C.R. 2016. Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 127 (1): 47-56. https://doi.org/10.1007/s11240-016-1028-z.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends plant Science, 7: 405-410.
- Mirhaidar, H. 1993. Licorice, Herbal plants used in the treatment of diseases and education. Office of Islamic culture publication, 3: 6-12.
- Ramos-Valdivia, A.C., Huerta-Heredia, A.A., Trejo-Tapia, G., & Cerda-Garcı´a-Rojas, C.M. 2012. Secondary metabolites as nonenzymatic plant protectors from oxidative stress. In: Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance. (Anjum, N.A., Umar, S. and Ahmad, A. eds.). International Publishing House, New Delhi. 413-441.
- Rehman, R.U., Zia, M., & Chaudhary, M.F. 2017. Salicylic acid and ascorbic acid retrieve activity of antioxidative enzymes and structure of *Caralluma tuberculata* Calli on PEG stress. General Physiology and Biophysics. 36 (2):167-174. https://doi.org/10.4149/gpb_2016027.
- Samar, F., Mujib, A., & Samaj, J. 2011. Anti-oxidant enzyme responses during in vitro embryogenesis in *Catharanthus roseus*. Journal of Horticulture Science Biotechnology. 86 (6): 569-574. https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512805.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil Journal of Medicinal Biology Research*. 38(7): 995-1014. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003.
- Shetty, T. K., Satav, J. G, & Nair C. K. K. 2002. Protection of DNA and microsomal membranes *in vitro* by *Glycyrrhiza glabra* L. against gamma irradiation. Phytotherapy Research. 16: 576-578. https://doi.org/10.1002/ptr.927.
- Soundararajan, P., Manivannan, A., Cho, Y.S., & Jeong, B.R. 2017. Exogenous supplementation of silicon improved the

ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*. 123:223-233. https://doi.org/10.1104/pp.123.1.223

– Zhao, J., Davis, L.C & Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23, 283-333.

– Yana, MA., Chao, H., Jinyin, C., Haiyun, LI., Kun, HE., Aixin, L., & Duochuan, L. 2015. Fungal cellulase is an elicitor but its enzymatic activity is not required for its elicitor activity. *Molecular Plant Pathology*. 16(1): 14-26. https://doi.org/10.1111/mpp.12156.

– Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach