

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

M. Allahdou^{1*} and S. Saber²

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

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 niger* 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 25°C 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 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 niger* 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

پست الکترونیک: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

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

چکیده

سابقه و هدف:

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza 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 *Aspergillus 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 شیک‌رادر 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 آنتی‌اکسیدانی (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

معنی داری بین فواصل زمانی افزودن الیستور بر فعالیت‌های آنزیمی (بجز سوپراکسید دیسموتاز و اسکوربات پراکسیداز) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد.

نتیجه‌گیری

استفاده از آنزیم سلولاز مشتق از قارچ *Aspergillus niger* در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شیرین بیان 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 شیرین بیان است. با توجه به رابطه خطی معنی‌دار بین فواصل زمانی افزودن الیستور 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

شیرین بیان (*Glycyrrhiza 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). شیرین بیان گیاهی مدیترانه‌ای بوده و در جنوب شرق آسیا گسترش زیادی دارد. این گیاه از جنوب اروپا تا آسیای مرکزی میان دو عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۴۵ درجه نیمکره شمالی رویش دارد. شیرین بیان 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان یک علف هرز در مزارع نخود و گندم محسوب می‌شود. سطح زیر کشت گیاهان دارویی مختلف در کشور حدود ۶۶ هزار هکتار است که از این مقدار، سهم شیرین بیان ناچیز است. در حالی که بالاترین حجم صادرات گیاهان دارویی مربوط به گیاه شیرین بیان است (Ghahraman, 1999).

شیرین بیان بیش از ۲۰۰۰ سال است که به‌طور گسترده به‌عنوان 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 شیرین بیان را منعکس کرده و به‌طور انحصاری از ریشه‌های خشک شده و استولون‌های شیرین بیان 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 شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک (peptic) استفاده می‌شود (Baba & Shigeta, 1997; Lentihet & Nigren, 1993). 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 به‌عنوان درمان ورم معده

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 قارچ‌هایی 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 میکروبی و میزبان در توسعه گیاه میزبان نقش مهمی ایفا می‌کنند (Kaul *et al.*, 2014). همچنین به دلیل نقش احتمالی در سنتز مواد فعال یا تبدیل متابولیت‌های ثانویه به عنوان الیستور استفاده می‌شوند (Boller *et al.*, 1995).

یک تعداد از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، سلولاز تولید می‌کنند (Carpita & Gibeau, 1993). برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ گزارش شد که سلولاز می‌تواند به عنوان یک الیستور 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)، قلبیایی شدن محیط، تجمع Ca^{2+} و بیوسنتز اتیلن سلول‌های تنباکوی کشت شده را القا کرده، از این رو این اندوسلولاز یک الیستور بوده و فعالیت آنزیمی آن برای فعالیت الیستوری مورد نیاز نیست (Yanan *et al.*, 2015).

فرایند تحریک‌سازی^۱، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از جمله 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

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 الیستورها استفاده می‌شود (Chattopadhyay *et al.*, 2002). الیستورها را به سه دسته تقسیم می‌کنند، دسته اول الیستورهای زیستی بوده که معمولاً مولکول‌های مشتق شده از میکروبی 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، الیستورهای غیرزیستی، مانند تابش اشعه ماوراء بنفش، نمک‌های فلزات سنگین و مواد شیمیایی مختلف هستند و دسته سوم الیستورهای 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 الیستورها 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

¹ Elicitation

نگهداری شد.

القای کالوس

هیپوکوتیل و کوتیلدون رشد کرده در محیط کشت ۱/۲ 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 واگشت در محیط‌های جدید انجام شد.

سوسپانسیون سلولی و تیمار با الیسیاتور

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 میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA منتقل شده و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 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 الیسیاتور، 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 واگشت شده تا انجام آنالیز در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

آنزیم کاتالاز: ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با ۲/۸ میلی‌لیتر 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

مختلفی مانند سوپراکسید، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز برای محدود کردن یا کاهش ROS دارند، بنابراین این آنزیم‌ها 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. از این رو، در این تحقیق نقش الیسیاتور قارچی (آنزیم سلولاز گرفته شده از قارچ *Aspergillus niger*) بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز بررسی و نیز تأثیر این الیسیاتور بر رادیکال‌های آزاد تولیدی در کشت سوسپانسیون سلولی ارزیابی گردید و در نهایت ظرفیت الیسیاتور قارچی برگرفته شده از قارچ *Aspergillus niger* به عنوان محرک سازوکارهای دفاعی در کشت سلولی شیرین بیان آزمون شد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و کشت

بذر شیرین بیان 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 ۱/۲ کشت گردیده و به منظور تهیه گیاهچه استریل در تغییرات نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی به مدت چهار هفته

(Klapp *et al.*, 1990).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: ۳ میلی لیتر محلول واکنش حاوی ۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، متیونین ۱۳ میلی مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید (Nitro-blue tetrazolium chloride) ۷۵ میکرو مولار، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار و ربیوفلاوین 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 سوپراکسید 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 (میلی گرم) محاسبه شد (Giannopolities & Ries, 1977).

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

(1-picrylhydrazyl)

۰/۱ میلی لیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها به ۵ میلی لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۱ میلی مولار اضافه گردید. مخلوط به شدت تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. یک نمونه حاوی ۰/۱ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد و ۵ میلی لیتر 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)

آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 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 میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی مولار 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 میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، اسکوربات ۵ میلی مولار 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 اسکوربات 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 هر یک ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) و ۲۰ میکرولیتر پیروگال (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 میلی گرم پروتئین ثبت شد (Janovitz-

(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 آنتی‌اکسیدانی در ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیشترین افزایش را داشته، به طوری که 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 کالوس‌های دیر واکشت شده ۱/۶۵ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. در آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۲۴ ساعت بعد از تیمار با الیستور 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 نسبت 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 کالوس‌های دیر واکشت شده ۱/۶۱ برابر نسبت 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 کالوس‌های 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، به طوری که 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 الیستور قارچی) نشان داد.

استفاده گردید. درصد بازدارندگی (Inhibition%) نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ang et al., 2015).

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

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

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق شامل ۵ تیمار: کالوس‌های دیر واکشت شده، برداشت سلول بعد از اضافه کردن الیستور 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 Ver18 از 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 اندازه‌گیری 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. تجزیه واریانس تأثیر آنزیم سلولاز بر فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی در کشت سوسپانسیون شیرین بیان
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**	0.9467 ^{ns}	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٪

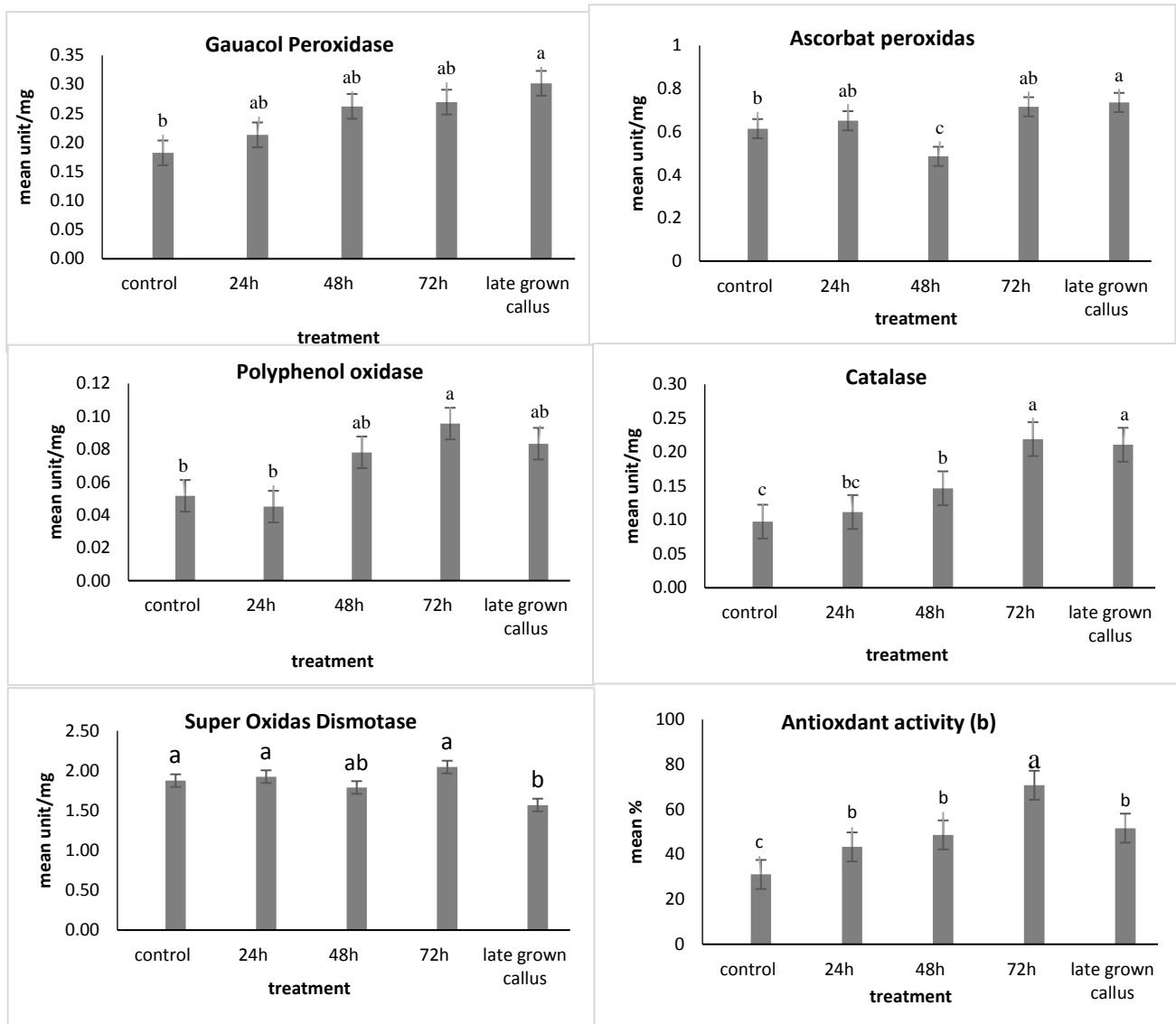
ns, * and ** non-significant, significant at the 5% and 1% probability level, respectively

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 الیسیستور 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 معنی‌دار داشت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار داشتند (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان داد که تیمار شاهد (بدون الیسیستور) و ۲۴ ساعت بعد از کاربرد الیسیستور در گروه b و تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کاربرد الیسیستور 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 الیسیستور) 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،



شکل ۱. مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*).

در زمان‌های مختلف بعد از تیمارها (کنترل، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیسیاتور سلولاز و کالوس‌های دیر واکنش 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

** significant at the 1% level,

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

داد رابطه خطی مثبت و معنی‌دار بین فواصل زمانی افزودن الیسیاتور 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 مشاهده شد (جدول ۳) که نشان‌دهنده این است که با افزایش فاصله زمانی اعمال الیسیاتور قارچی میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش داشته که با توجه به رابطه خطی معنی‌دار در ۴ صفت مذکور، ۷۲ ساعت به‌عنوان بهترین فاصله زمانی اعمال الیسیاتور قارچی تعیین شد (شکل ۱ و جدول ۳).

تجزیه رگرسیون بین فواصل زمانی بعد از افزودن الیسیاتور و میزان فعالیت‌های آنزیمی به منظور تعیین روابط بین فواصل زمانی شاهد، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت افزودن الیسیاتور بر فعالیت‌های آنزیمی، از تجزیه رگرسیون استفاده شد. در تجزیه رگرسیونی از فواصل زمانی مختلف اعمال تیمار الیسیاتور 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

جدول ۳. رابطه رگرسیون خطی بین زمان‌های مختلف اعمال تیمار الیسیاتور 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

محفظه‌های سلولی مختلف از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون 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

الیسیاتورها 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 (O₂⁻) را افزایش می‌دهد. به منظور کاهش بیش از حد این ROS،

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 الیستور 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 گاپاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. از این رو، نتایج این تحقیق حکایت از آن دارد که شیرین بیان در شرایط سوسپانسیون سلولی از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها سبب مهار ROS شده و بر تنش ایجاد شده توسط الیستور 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، صرف نظر از تغییرات مخصوص دوز الیستور 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). پلی آمین‌ها به طور مؤثری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی را بهبود بخشیده‌اند (Asthir et al., 2012).

فعالیت آنزیم گاپاکول پراکسیداز در بیشتر تیمارها افزایش نشان داد، به طوری که در تیمار ۷۲ ساعت و کالوس‌های دیر واکشت شده بیشترین افزایش را نشان دادند. در

گاپاکول پراکسیداز در ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیستور قارچی بیشترین افزایش را داشته و آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گاپاکول پراکسیداز در کالوس‌های دیر واکشت شده نیز افزایش فعالیت نشان دادند. از این رو، می‌توان گفت الیستور سلولاز به عنوان یک الیستور 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 الیستور 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 الیستور 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 الیستورهای غیر زیستی باعث افزایش فعالیت‌های SOD، CAT، APX و POX می‌شوند. الیستور استفاده شده در این تحقیق یک الیستور قارچی (الیستور زیستی) بوده که مشابه با الیستورهای غیر زیستی سبب افزایش فعالیت SOD (با وجود عدم معنی داری)، CAT، APX و GUP شده است. از این رو، این نتایج تأکید بر نتایج یکسان دو نوع الیستور 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

شرایط کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان 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 پلی‌فنل 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., 2013; Svanandhan et al., 2012). 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 *Aspergillus niger* در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز شده و در تیمار ۷۲ ساعت

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 روشنائی (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 می‌یابد.

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. از این رو، می‌توان چنین استنباط کرد که الیسیتور قارچی با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی منجر به تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در

- 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., Omid, 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

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 آنزیم های آنتی اکسیدانی شده است. البته بین فعالیت آنتی اکسیدانی و بعضی آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند پلی فنل اکسیداز و کاتالاز همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد که نشان دهنده تأثیر مثبت الیستور قارچی در تحریک تولید متابولیت های ثانویه و افزایش ظرفیت مهار رادیکال های آزاد در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی گیاه شیرین بیان می باشد. از این رو، نقش سلولاز برگرفته شده از قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus nigar*) به عنوان یک الیستور در تحریک سازوکار های دفاعی از طریق افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و نیز آنزیم های آنتی اکسیدانی تأیید می گردد. افزودن الیستور 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 متابولیت های 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.

References

- 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.

- 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 tandem 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 Gesichtschir*,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, T.J., Singh, G., & Curtis, W.R. 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](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](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-García-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. Antioxidant 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