بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه درکشت درون شیشه‌ای

مریم ابراهیمی، خدیجه کیارستمی* و زهرا ناظم بکایی

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴/ اصلاح: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸/ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰ / انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

چکیده. بادرنجبویه گیاهی است دارویی از تیرهٔ نعنائیان که به‌علت خواص درمانی خود در بسیاری از نقاط دنیا کشت می‌شود. این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوشاخه‌های تکثیر یافته از کشت بافت گیاه بادرنجبویه انجام شد. بذرها در محیط MS بدون هورمون برای تولید گیاهچه کشت شدند. سپس نوشاخه های حاصل به محیط کشت MS حاوی BAP ۲mg/l منتقل شدند. پس از ۴۵ روز سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به محیط کشت اضافه شد. مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه ها با استفاده از آزمون های سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد یا DPPH، سنجش قدرت کاهشی یا RP و سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید یا SO و مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و رزمارینیک‌اسید در فواصل زمانی ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز پس از تیمار اندازه گیری شد. نتایج نشان داد کمترین مقدار IC_{50} ، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت کاهشی و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید در نوشاخه های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولارسالیسیلیک اسید به‌مدت ۱۴ روز مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و بیشترین مقدار فعالیت آنیون سوپراکسید در غلظت ۵۰ میکرومولارسالیسیلیک اسید در روز ۱۴ به‌دست آمد. به طورکلی استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولارسالیسیلیک اسید به مدت ۱۴ روز برای افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ذکر شده مناسب تر تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی. ترکیبات فنلی، تنظیم کننده رشد گیاهی، رزمارینیک اسید، فلاونوئیدها، نعنائیان

Effect of salicylic acid on antioxidant properties of in vitro proliferated shoots of *Melissa officinalis* L.

Maryam Ebrahimi, Khadijeh Kiarostami * & Zahra Nazem Bokaee

Received 25.12.2016 / Revised 07.02.2018/ Accepted 11.03.2018/ Published 19.03.2019

Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
*Correspondent author: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

Abstract. *Melissa officinalis* is a medicinal plant belonging to Lamiacea family. This plant has been cultivated in many parts of the world due to its therapeutic effects. This study was conducted to improve the antioxidant activities of *Melissa officinalis* proliferated shoots obtained from tissue culture. The seeds were cultured in MS hormone-free medium in order to obtain seedlings. The shoots were then transferred to MS medium supplemented with 2 mg/ L BAP. Salicylic acid (SA) was added to the medium at concentrations of 0, 50, 100 and 200 µM after 45 days. The antioxidant activity by the methods of free radical scavenging (DPPH), reducing power (RP) and superoxide anion scavenging activity (SO) was measured and the phenolics, flavonoids and rosmarinic acid contents were evaluated in proliferated shoots, 4,7,10 and 14 days after treatment. As a result, the highest free radical scavenging and RP activity, as well as the highest value of total phenolic and rosmarinic acid, were observed in shoots after 14 days of treatment with 100 µM SA. The elevated level of SO activity and total flavonoids were obtained from the shoots treated with 50 µM SA for 14 days. In general, treatment with 100 µM SA for 14 days was proved to be better for the increase of antioxidant activity and the amount of the compounds with recognized antioxidant activity.

Keywords. flavonoids, Lamiaceae, phenolic compounds, plant growth regulator, rosmarinic acid

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis*. L.) گیاهی دارویی، علفی و پایا از تیرهٔ نعنائیان است. از رایج‌ترین خواص درمانی بادرنجبویه می‌توان به خواص آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی ، ضداسپاسمی، ضدنفخ، ضدباکتری، ضدویروسی و ضدالتهابی اشاره کرد (Yosofi *et al*., 2011). گیاه بادرنجبویه حاوی ترکیبات شیمیایی زیادی از قبیل اسانس و ترکیبات فنلی است. ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا می‌کنند و به عنوان پیش ماده‌های سنتزی ترکیبات دارویی کاربرد دارند (Mohamadi *et al*., 2014; Raghavendra *et al*., 2010). بادرنجبویه حاوی مقادیر زیادی رزمارینیک اسید است به‌نحوی که رزمارینیک اسید در همه اندام‌های گیاه بادرنجبویه یافت می‌شود (Weitzel & Petersen, 2011). رزمارینیک اسید بیشترین سهم ترکیبات فنلی بادرنجبویه (از ۰/۵ تا ۶/۸ درصد از وزن خشک گیاه) را به خود اختصاص می‌دهد (Peeva *et al*., 2011). رزمارینیک‌اسید در کنار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Ozturk *et al*., 2010) به خاطر اثرات ضد افسردگی (Khaki *et al*., 2012)، ضد آرتروز (Fletcher *et al*., 2005) و ضد سرطان (Shahadat Hossan *et al*., 2014) اهمیت ویژه‌ای دارد. بادرنجبویه در کنار رزمارینیک اسید حاوی فلاونوئیدهایی مانند سیناروزید، کاسموزین، ایزوکوئرستین و رامنوسیترین (Ondrejovic *et al*., 2012) است.

کاربرد برون‌زای برخی از ترکیبات ازجمله تنظیم‌کننده‌های رشد با فعال‌کردن ژن های مسیر سنتز متابولیت‌های ثانوی به افزایش تجمع این متابولیت‌ها منجر می‌شود. سالیسیلیک اسید یک تنظیم-کنندهٔ رشد گیاهی با ماهیت فنلی است که در فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی از قبیل مقاومت در برابر پاتوژنها، ایجاد گرما در گل آذین شیپوری، القای گل‌دهی در برخی از گیاهان، کنترل جذب یون توسط ریشه و هدایت روزنه‌ای شرکت می‌کند (Raskin, 1992; Hayat *et al*., 2008). کاربرد برون زای سالیسیلیک اسید، تحمل گیاه در برابر فلزات سمی ،گرما، سرما و تنش شوری را بهبود می دهد (Sakhanokho & Kelley, 2009; Rowshan *et al*., 2010; Kiarostami *et al*., 2013). بیان برخی از ژن‌های تولیدکنندهٔ متابولیت‌های ثانوی تحت تأثیر سالیسیلیک‌اسید القا می‌شود. آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید در گیاه تحت تأثیر سالیسیلیک‌اسید قرار می‌گیرند و میزان برخی از متابولیت‌های ثانوی مانند ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهند (Buitelaar *et al*., 1992).

سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) را تنظیم می‌کند. این آنزیم واکنش‌های بیوسنتزی تشکیل ترکیبات دفاعی را کاتالیز می‌کند. گزارش‌های معدودی در مورد اثر سالیسیلیک اسید بر سنتز متابولیت‌های ثانوی وجود دارد. به گزارش شبرنگی و بیگی جازی (2014) محتوای ترکیبات فنلی در گیاه نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) با افزودن سالیسیلیک اسید افزایش و محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کاهش یافت. به گزارش Dogbo و همکاران (2012) فعالیت آنزیم PAL در گیاه کاساوا (*Manihot esculenta*) تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به میزان زیاد افزایش یافت و به دنبال آن افزایش ترکیبات فنلی مشاهده شد. در غلظت‌های بسیار بالای سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم PAL کاهش یافت. براساس گزارش Matkowski (2008) سالیسیلیک اسید در کشت ریشه موئین گیاه ریحان (*Ocmium basilcium*) ازطریق فعال‌کردن سیستم دفاعی گیاه و به دنبال آن القای مسیر فنیل پروپانوئید باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید شد. طبق گزارش Brandão و همکاران (2014) سالیسیلیک اسید درآناغالیس (*Anagallis tenella*) سنتز بتاسیانین را افزایش می‌دهد ولی باعث افزایش در غلظت فلاونوئیدها نمی‌شود، احتمالاً به این علت که پیش ساز مشترک دو ترکیب، تیروزین است که ترجیحاً به بتاسیانین تبدیل می‌شود.

گیاه بادرنجبویه عمدتا از طریق کشت بذر تکثیر می شود. تکثیر از طریق کشت بذر با مشکلاتی همراه است. از جمله روند سبز شدن بذر طولانی است و گیاهچه ها در مراحل اول زندگی رشد کندی دارند. برای تکثیر سریع گونه‌ها یا گونه‌هایی که تکثیر آنها با مشکلاتی همراه است از روش ریزازدیادی استفاده می‌شود. از آن جایی که تکثیر گیاه بادرنجبویه در طبیعت به کندی انجام می‌شود، تکثیر نوشاخه‌ها در محیط کشت می‌تواند روشی جایگزین برای تولید انبوه بخش‌های دارویی و مورد استفاده این گیاه باشد. به-علاوه دست‌ورزی شرایط کشت می‌تواند به ایجاد نمونه‌های با متابولیت‌های دارویی بیشتر منجر شود. مطالعات چندی پیرامون ریزازدیادی گیاه بادرنجبویه انجام شده است (Ebrahimi *et al*.,

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

2015 ; Meftahizade *et al*., 2010; Meftahizade *et al*., 2012; Mohebalipour *et al*., 2012). ولی تاکنون ترکیبات فعال زیستی گیاهان تکثیر شده مورد بررسی قرار نگرفته است. این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و رزمارینیک اسید در نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه در کشت درون شیشه‌ای گیاه انجام شده است.

مواد وروش‌ها

کشت بذر و تکثیر و تیمار نوشاخه ها

بذرگیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. برای سترون سازی، بذرهای گیاه پس از شستشو با آب محتوی چند قطره شوینده در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱دقیقه قرار گرفتند. سپس با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی‌شده و ۳ بار با آب مقطرسترون شست‌وشو شدند. بذرهای سترون به محیط کشت MS بدون هورمون انتقال یافتند. همه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد تحت یک چرخه تاریکی- نور ۱۶/۸ساعت به‌وسیلهٔ نور فلورسنت با انرژی ۵۴ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند.

راس‌های نوساقه‌های۱۵ روزه حاصل از کشت بذر به طول تقریبی ۰/۵ cm، جهت تکثیر به محیط کشت MS حاوی ۲mg/l BAPمنتقل شدند. پس از یک ماه نوشاخه های حاصل به محیط کشت MS حاوی غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول سالیسیلیک اسید انتقال یافتند. ۴، ۷، ۱۰و۱۴ روز پس از تیمار با سالیسیلیک اسید، نوشاخه‌ها جمع‌آوری و جهت عصاره‌گیری و سنجش مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیهٔ عصارهٔ متانلی

برای تهیهٔ عصاره از روش Conde و همکاران (1995) با کمی تغییر استفاده شد. ۰/۲ گرم پودر خشک گیاه با ۲۰ میلی لیتر متانل ۸۰ درصد سائیده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌های حاصل پس از صاف‌شدن برای انجام سنجش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

برای سنجش رزمارینیک اسید جذب عصاره‌های متانلی حاصل از برگ گیاه در طول موج ۳۳۳ نانومتر بررسی شد و میزان رزمارینیک اسید با استفاده از منحنی استاندارد رزمارینیک اسید با غلظت‌های ۰ تا ۳۵ (µg/ml RA) تعیین شد (Lopez- Arnolds *et al*., 1995).

برای سنجش ترکیبات فنلی به ۰/۲ میلی‌لیتر عصارهٔ گیاهی ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولن-سیوکالتو و ۳ میلی-لیتر کربنات سدیم ٪۷ اضافه شد و بعد از ۹۰ دقیقه جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰، تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گالیک اسید استفاده شد (Lopez-Arnolds *et al*., 2001).

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کوئرستین استفاده شد (Kulisic *et al*., 2008).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد با ۲و۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

برای سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد با DPPH غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱۵ میلی گرم از عصاره با متانل مطلق به حجم ۱ میلی لیتر رسید و با ۱ میلی لیتر DPPH (۰/۰۰۰۴ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر متانل مطلق) مخلوط شد و حجم آن با متانل مطلق به ۳ میلی لیتر رسید. پس از ۱۵ دقیقه جذب در مقابل بلانک (۱ میلی لیتر DPPH و ۲ میلی لیتر متانل) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصارهٔ گیاهی با استفاده از فرمول زیر بدست آمد:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد (IC ٪)} = (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$$

در این فرمول A_{blank} جذب کنترل و A_{sample} جذب محلول حاوی نمونه گیاهی است (Molyneux, 2004).

سنجش قدرت کاهشی یا Reducing Power (RP)

۰/۲ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی لیتر از پتاسیم فری سیانیدین ۱ درصد مخلوط و در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از خنک شدن ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (W/V) اضافه و سپس سانتریفیوژ شد (1000g، به مدت ۱۰ دقیقه ، در دمای ۴ درجه سانتی گراد).

به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رو شناور، ۰/۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر ۰/۱ میلی‌لیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد (W/V) اضافه و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. قدرت کاهشی به عنوان میکرومول آسکوربیک اسید معادل گرم خالص وزن تر بیان شد. از منحنی استاندارد آسکوربیک اسید در دامنه۰ تا ۱۰۰میکرو مولار برای کالیبر کردن استفاده شد (Niciforovica *et al*., 2010).

سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید

۹ میلی لیتر بافر تریس- HCl (۵۰ میلی مولار و pH=۸/۲) در لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار داده شد. ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگالل (۴۵ میلی مولار پیروگالل در ۱۰ میلی مولار HCl) به ترکیب بالا اضافه و بعد از ۳ دقیقه انکوبه شدن در بن ماری ۲۵ درجه، یک قطره آسکوربیک اسید ۵ درصد به آن اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آن در ۴۹۰ نانومتر خوانده و بعنوان A_0 در نظر گرفته شد. در لوله دیگر به جای آسکوربیک اسید عصارهٔ گیاهی ریخته شد و جذب آن بعد از ۵ دقیقه در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و بعنوانA_1 در نظر گرفته شد. در A_2 که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد به جای عصاره آب مقطر ریخته شد. درصد جاروب کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Jiao *et al*., 2005):

درصد جاروب کنندگی رادیکال آزاد= $(A_0 - (A_1 - A_2)) \times 100/A_0$

تحلیل آماری

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در موارد معنی دار بودن تفاوت ها در آنالیز واریانس یک طرفه از آزمون Duncan جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS۲۱ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

در غیاب سالیسیلیک اسید بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت کاهشی در روز ۱۴ و بیشترین درصد فعالیت آنیون سوپراکسید در روز چهارم مشاهده شد (۲۷/۹۷۱ ±۸۳/۴۳). غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ بیشترین تأثیر را بر درصد فعالیت آنیون سوپراکسید داشت (۹۸/۹۶±۱/۷۸).

تغییرات ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و میزان IC_{50} در غیاب سالیسیلیک اسید خیلی محسوس نبود و غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ موجب افزایش مقدار ترکیبات فنلی شد (۰/۱۳ mg /g DW ±۶/۵۶) و کمترین مقدار IC_{50} (mg/ml ۰/۰۰۰۳ ±۰/۰۱۳)و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت کاهشی هم در همین تیمار مشاهده شد (۲۷/۴۶ µ mol ASA ± ۲۲۹۸/۵۲) (جدول ۱).

در غیاب سالیسیلیک اسید مقدار رزمارینیک اسید با افزایش زمان افزایش یافت و در ۱۴ روز به بیشترین میزان خود رسید (۰/۷ mg /g DW±۹۶/۱۷). این وضعیت در نوشاخه های تیمار شده با سالیسیلیک اسید هم مشاهده شد. مؤثرترین غلظت برای سنتز رزمارینیک اسید غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود (۴/۹۳ mg /g DW±۱۱/۱۴۲ در روز۱۴). غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ اثر بیشتری بر سنتز ترکیبات فلاونوئیدی داشت (۰/۹۴ mg /g DW ±۶۰/۹۴۷۷). در کل سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روز ۱۴ مؤثرتر تشخیص داده شد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید کاهش در پارامترهای اندازه گیری شده مشاهده شد (جدول ۱).

بحث

سالیسیلیک اسید و مشتقات آن بر فعالیت های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارند و نقش کلیدی در تنظیم رشد و تولید متابولیتها در گیاه دارند. افشانه‌کردن سالیسیلیک اسید به جوانه های گیاه جو این نتایج را تائید می‌کند(Pancheva *et al*., 1996). سالیسیلیک اسید با فعال‌سازی گروه مشخصی از ژنهای مرتبط با دفاع و تحریک سیستم دفاعی گیاه، تولید متابولیتهای ثانوی با فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد (Lee *et al*., 2003). سالیسیلیک اسید با جلوگیری از فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش تولید H_2O_2 سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌کند (Chen *et al*., 1993).

براساس یافته‌های این پژوهش سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی-اکسیدانی نوشاخه‌ها اثر مطلوب داشت. بیشترین فعالیت آنتی-اکسیدانی با روش جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) و سنجش قدرت احیایی(RP) در نوشاخه‌های تیمارشده با غلظت ۱۰۰ میکرومولارسالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که متناسب با بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید بود. بیشترین درصد جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید در غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که متناسب با بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بود. به گزارش Ghorbani و همکاران (2013) در بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات ثانوی بنفشه عطری (*Viola cornuta* L.)،

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

جدول ۱- میانگین مقدار رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی در نوشاخه های تکثیر شده گیاه بادرنجبویه ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز پس از افزودن سالسیلیک اسید. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$.

Table. 1. The mean of Rosmarinic acid, phenolics and flavonoid compounds amounts and antioxidant activity in proliferated shoots of *Melissa officinalis* 4, 7, 10 and 14, days after adding salicylic acid. Similar letters indicate no significant difference at the level of $p \leq 0.05$.

سالیسیلیک اسید (µM)	روز	رزمارینیک اسید (µg/ml RA)	ترکیبات فنلی (mgGA/gdw)	ترکیبات فلاونوئیدی (mgQE/gdw)	IC50 (µg/ml)	قدرت کاهشی (µM/ASA)	درصد جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید
۰	۴	۵۰/۱۳۳±۱/۴۸ a	۵/۳۶±۰/۰۵ cde	۴/۹۱±۰/۴۴ de	۰/۰۲۰±۰/۰۰۳ de	۸۹۷/۴۳±۲۷/۹۷ cd	۹۱/۸۷±۱/۰۸ ef
۰	۷	۴۵/۶۳۳±۰/۴۳ a	۵/۱۶±۰/۰۵ bcd	۴/۷۴±۰/۴۴de	۰/۰۲۵±۰/۰۰۶fg	۷۶۳/۱۲±۲۲/۰۱a	۸۹/۹۹±۱/۰۸de
۰	۱۰	۶۵/۹۶۵±۰/۷۴ b	۵/۰۶±۰/۰۵b	۲/۵۴±۰/۲۹a	۰/۰۲۷±۰/۰۰۳hi	۷۵۰/۹۱±۳۶/۶۳ab	۶۶/۸۷±۰/۶۲b
۰	۱۴	۱۰۷/۸۵۳ ±۱۲/۳۵ d	۵/۲۱±۰/۱۰ bcd	۴/۷۴± ۰/۱۷de	۰/۰۲۳±۰/۰۰۰۳ f	۱۲۰۸/۷۸±۲۷/۹۷ g	۸۳/۴۳± ۰/۵۳ cd
۵۰	۴	۷۸/۴۰۰±۱/۲۵ bc	۵/۴۱± ۰/۰۸ de	۳/۸۹± ۰/۳۴bcd	۰/۰۱۹± ۰/۰۰۰۸ cd	۸۹۷/۴۳± ۳۸/۱۲cd	۸۸/۱۲±۱/۰۸ de
۵۰	۷	۸۱/۵۳۳± ۱/۷۸ c	۵/۵۶± ۰/۰۸e	۳/۲۱± ۰/۱۶ab	۰/۰۱۷± ۰/۰۰۰۳c	۱۰۴۳/۹۵± ۳۱/۷۲ef	۷۰/۰۹± ۲/۷۲b
۵۰	۱۰	۷۳/۶۰۰±۲/۹۹bc	۵/۲۱±۰/۰۵bcd	۵/۷۶±۰/۱۷ ab	۰/۰۲۴±۰/۰۰۰۳f	۸۷۹/۱۱±۵۸/۸۷bc	۸۹/۶۸±۳/۵۷de
۵۰	۱۴	۱۰۹/۵۵۶±۲/۶۵ d	۵/۱۶±۰/۰۵ bcd	۶/۷۷±۰/۹۴ f	۰/۰۲۵±۰/۰۰۰۳ fg	۱۷۰۹/۳۹±۶۰/۱۲ i	۹۸/۹۶±۱/۷۸ g
۱۰۰	۴	۶۵/۹۶۰± ۳/۹۶ b	۵/۵۶±۰/۰۸e	۵/۷۶±۰/۳۴ ef	۰/۰۱۷±۰/۰۰۱۴c	۱۴۴۰/۷۷±۴۹/۹۶h	۷۹/۳۷±۱/۰۳ c
۱۰۰	۷	۵۳/۵۰۶±۰/۶۳ a	۵/۰۶±۰/۰۵ b	۴/۵۷±۰/۲۹ d	۰/۰۲۸±۰/۰۰۰۳ i	۹۴۶/۲۷±۶/۱۰cde	۸۶/۵۰±۱/۷۸ cde
۱۰۰	۱۰	۶۹/۰۷۶± ۳/۱۱ b	۵/۳۱± ۰/۱۰ bcde	۵/۰۸± ۰/۲۹ de	۰/۰۲۱± ۰/۰۰۰۸ e	۱۰۵۶/۱۶± ۴۹/۹۶ ef	۹۱/۲۳± ۰/۸۹ ef
۱۰۰	۱۴	۱۴۲/۱۱۰± ۴/۹۳ e	۶/۵۶± ۰/۱۳ g	۳/۳۸± ۰/۱۶ abc	۰/۰۱۳± ۰/۰۰۰۳ a	۲۲۴۶/۶۳± ۵۴/۲۵ j	۸۰/۴۰± ۱/۷۸ c
۲۰۰	۴	۷۱/۹۰۶± ۱/۹۸ bc	۵/۸۶± ۰ f	۴/۰۶± ۰/۲۹ bcd	۰/۰۱۵±۰/۰۰۰۳ b	۱۳۹۸/۰۳± ۵۴/۲۶ h	۸۹/۶۸± ۱/۷۸ de
۲۰۰	۷	۶۷/۶۵۶± ۰/۲۸ b	۵/۲۱± ۰/۰۵ bcd	۳/۸۹± ۰/۱۷ bcd	۰/۰۲۳± ۰/۰۰۰۳ f	۱۰۱۳/۴۳±۲۴/۴۲ def	۹۱/۲۳± ۰/۸۹ ef
۲۰۰	۱۰	۸۳/۸۶۳±۲/۲۰ c	۵/۱۱±۰/۱۵ bc	۴/۴۰±۰/۱۷ cd	۰/۰۲۶±۰/۰۰۰۳ gh	۱۱۰۵/۰۰± ۱۲/۲۱ fg	۹۷/۴۱±۶/۲۴ fg
۲۰۰	۱۴	۱۰۲/۳۳۳±۱/۵۳ d	۴/۷۶±۰/۱۳ a	۲/۵۴±۰ a	۰/۰۳۰±۰/۰۰۰۶ j	۱۰۰۱/۲۱±۳۷/۱۳ cdef	۵۶/۶۹±۲/۷۲ a

افزایش مقدار سالیسیلیک اسید اثر معنی‌داری بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش جاروب کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) داشت. این فرایند به اثر سالیسیلیک اسید بر افزایش غلظت ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نسبت داده شد. این نتایج در راستای نتایج این پژوهش است.

بررسی ما با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید درصد جاروب کنندگی آنیون سوپر اکسید کاهش یافت و غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید اثر بیشتری بر درصد جاروب کنندگی آنیون سوپر اکسید داشت. به گزارش Robak و Glyglewski (1988) ترکیبات فلاونوئیدی در جاروب کردن آنیون سوپراکسید نقش دارند و در نتایج ما بیشترین مقدار فلاونوئید متناسب با بیشترین درصد جاروب کردن آنیون سوپر اکسید بود. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مقدار فلاونوئیدها کاهش یافت. از آن جایی که مقدار کل ترکیبات فنلی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تغییر زیادی نشان نداد، می‌توان این فرایند را به سنتز سایر ترکیبات آنتی-اکسیدانی نسبت داد. در گیاه آناغالیس (*Anagallis tenella* L.) استفاده از سالیسیلیک اسید باعث افزایش سنتز بتاسیانین شد ولی مقدار فلاونوئیدها را افزایش نداد. احتمالاً به این علت که پیش ساز

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

مشترک دو ترکیب، تیروزین است که ترجیحا به بتاسیانین تبدیل می شود (Brandão *et al*., 2014).

در این پژوهش با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۱۰۰ میکرومولار، مقدار رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافت و با افزایش غلظت به ۲۰۰ میکرومولار روند کاهشی آغاز شد. میزان اثر محرکها بر تولید متابولیتهای ثانوی در کشت درون شیشه ای به غلظت ماده محرک و زمان تأثیربستگی دارد (Wen *et al*., 2008). غلظت بالای برخی از محرک‌ها (بیشتر از مقدار بهینه مؤثر برای گیاه) مانند سالیسیلیک اسید سبب القای پاسخ فوق حساس (hypersensitive response) و مرگ سلولی می‌شود، در حالی که غلظت‌های بهینه این ترکیبات با القای پاسخ دفاعی موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می شوند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. افزایش سنتز ترکیبات فنلی به افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز این ترکیبات از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمین ترانسفراز بستگی دارد. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به میزان زیاد افزایش یافته و به دنبال آن افزایش ترکیبات فنلی مشاهده می شود. با افزایش غلظت به ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار فعالیت آنزیم کاهش یافت (Dogbo *et al*., 2012).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نقش مهمی در انتقال، تحریک و سنتز ترکیبات مسیر فنیل‌پروپانوئید و تنظیم بیان ژنهای دفاعی به عهده دارد. افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، سنتز ترکیبات مشتق شده از مسیر فنیل پروپانوئید را افزایش می‌دهد. سالیسیلیک اسید می‌تواند با اثر بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سنتز ترکیبات مسیر فنیل پروپانوئید را تحت تأثیر قرار دهد (Nurgroho *et al*., 2002). در کشت ریشه موئی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) سالیسیلیک اسید با فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و به دنبال آن القای مسیر فنیل پروپانوئید باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید شد (Matkowski, 2008). در این پژوهش بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در نوشاخه های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در روز ۱۴ مشاهده شد که با نتایج Nicholson و Hammerschmidt (1992) مطابقت داشت. کاهش در مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید با نتایج Shabrangi و Beigijazi (2014) در گیاه نعنا (*Mentha piperita* L.) مطابقت داشت. به گزارش این محققین محتوای ترکیبات فنلی در حضور سالیسیلیک اسید افزایش یافت اما مقدار فلاونوئیدها کاهش یافت (Shabrangi & BeigiJazi, 2014). به گزارش Nicholson و Hammerschmidt (1992) غلظت پایین سالیسیلیک اسید مانع فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز می شود که یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتزترکیبات فنلی است ولی فعالیت چالکون سنتاز (CS) آنزیم کلیدی مسیر سنتز فلاونوئیدها را تحریک می‌کند. همچنین سبب فعال شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تولید متابولیت‌های ثانوی می شود. غلظت الیسیتور مورد استفاده از عوامل مؤثر در مقدار سنتز متابولیت‌های ثانوی است. از این رو علت تفاوت در نتایج محققین مختلف را می‌توان به غلظت سالیسیلیک اسید مورد استفاده نسبت داد (Namdeo, 2007).

در مجموع سالیسیلیک اسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه بادرنجبویه اثر مثبت دارد و می‌توان با کاربرد این تنظیم کننده رشد، گیاهانی با محتوای بالاتر متابولیتهای دارویی با ارزش مانند رزمارینیک اسید و گیاهانی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر به دست آورد. غلظت و زمان تأثیر الیسیتور از عوامل مؤثر برسنتز متابولیتهای ثانوی است (Namdeo, 2007) و در این پژوهش زمان ۱۴ روز مناسب تر تشخیص داده شد. افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی تحت تأثیر سالیسیلیک اسید به توانایی این ماده در تولید H_2O_2 و القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و به دنبال آن تغییر در بیان ژنها و افزایش مقدار پروتئینها و فعالیت آنزیم های دخیل در مکانیسم دفاع آنتی اکسیدانی بستگی دارد (Wang *et al*., 2015). شناخت مکانیسم دقیق تر اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی به پژوهش های بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه الزهرا به دلیل حمایت مالی از پژوهش حاضر قدردانی می کنند.

REFERENCES

Brandão, I.R., Kleinowski, A.M., Einhardt, A.M., Lima, M.C., Amarante, L.D., Peters, J.A. and Braga, E.J.B. 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. – Ciênc. Rural. 44: 1893-1898.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]

Buitelaar, R.M., Casário, M.T. and Tramper, J. 1992. Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetespatula.* – Enzy. Microbiol. Technol. 14: 2-7.

Chen, Z., Silva, S. and Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. – Science 262: 1883-1886.

Conde, E., Cadahia, E. and Garcia-Vallejo, M.C. 1995. HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in Eucalyptus spp. – Chromatographia 41:657-660.

Dogbo, D.O., Gogbeu, S.J., N'zue., B., Yao, K.A., Zohouri, G.P., Mamyrbekova-Bekro, J.A. and Bekro Y.A. 2012. Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in Cassava elicited cell. – Afri. Crop. Sci. J. 20: 85-94.

Ebrahimi, M., Kiarostami, Kh.and Nazem Bokaee, Z. 2015. The effect of different concentrations of kinetin on *Melissa officinalis* micropropagation and rosmarinic acid content in tissue culture. 18th National and 6th International Congress of Biology, Tehran. pp: 26-29.

Fletcher, R.S., Slimmon, T., McAuley. C.Y and Kott, L. 2005. Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L.). – Sci. Food . Agri. 85: 2429-2436.

Gorbani, N., Moradi, H., Akbarpour, A. and Ghasem-nezhad, A. 2013. The phytochemical changes of violet flowers (*Viola cornuta*) response to exogenous salicylic acid hormone. – JCHR. 3:1-8.

Hayat, S., Hasan, S.A., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. – Int. J. Plant. Sci. 3: 297-304.

Jiao. Z, Liu, J. and Wang, S. 2005. Antioxidant activity of total pigment extract from Blackberries – Food. Technol. Biotech. 43 : 97-102.

Kiarostami, Kh., abdolmaleki, N. and Heydari, M. 2013. Effect of salicylic acid on salinity stress reduction in canola. – Plant Biol. 4: 69- 82.

Kulisic-Bilusic, T., Katalinic,V., Dragovic-Uzelac,V., Ljubenkov, I., Krisco, A., Dejannovic, B. and Jukic, M. 2008. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro – Food. Technol. Biotech. 46: 368-375.

Khaki, A., Imani, S.A.M. and Golzar, S. 2012. Effects of rosmarinic acid on male sex hormones (testosterone-FSH-LH) and testis tissue apoptosis after exposure to electromagnetic field (EMF) in rats. – Afr. J. Pharm. Pharmaco. 6: 248-252.

Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J.H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. – Life. Sci. 73: 167-179.

Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros., Barcelo, A., Calderon, A.A. and Zapata, J.M. 1995. Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe^{2+} ions. – Fresen. J. Anal. Chem.- 351: 311-314.

López Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M.A and Calderón, A.A. 2001 .Change in phenol content during straberry callus. – Plant. Physiol. 113:315-322.

Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. – Biotechnol. Adv. 26: 548-560.

Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M. and Naseri, A. 2010. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. – J. Med. Plants. Res. 4: 240-246.

Meftahizade, M., Lotfi, M. and Moradkhani, H. 2012. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. – Afr. J. Biotechnol. 9: 4314-4321.

Mohebalipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motallebiazar, A. and Arefi, H.M. 2012 . Effect of .plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. – J. Food. Agric. Environ. 10: 280-286.

Mohamadi, S., Kiarostami, Kh.and Nazem Bokaii, Z. 2014. The Study of antioxidant property of metanolic extracts of *Melissa officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. on stability of soybean oil. – J. Agroaliment. Proc. Technol. 20: 293-297.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. – J. Sci. Technol. 26: 211-219.

Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites-A review. – Pharm. Rev. 1: 69-79.

Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic,S., Stojkovic, A. and PavlovicMuratspahic, D. 2010. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. – Food Chem. Toxicol. 48: 3125-3130.

Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. – Annu. Rev. Phytopathol. 30: 369-389.

Nurgroho, L.H., Verberne, M.C and Verpoorte, R. 2002 .Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. – Plant Physiol. Bioch. 40: 755-760.

Ozturk, M.E., Duru, M., Burco, I., Harmandar, M. and Topcu, G. 2010. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. – Food. Chem. 123. 1352-1356.

Ondrejovic. M., Kraic. F., Benkovicova, H. and Silhar, S. 2012. Optimization of antioxidant extraction from Lemon Balm (*Melissa officinalis*). – Czech. J. Food. Sci. 30: 385-393.

Pancheva, T.V., Popova, L.P. and Uzunova, A.N. 1996. Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. – J. Plant. Physiol. 149: 57-63.

Peeva, G., Penchevb, P., Pesheva, D. and Angelovb, G. 2011. Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. – Chem. Eng. Res. Des. 89: 2236-2243.

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. – Annu. Rev. Plant Biol. 43: 439-463.

Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi,G. and Hiremath, A. 2010.In vitro antioxidant activity of *Vitexnegundo* L. Leaf extracts. – Chiang Mai. J. Sci. 37: 489-497.

Robak, J. and Gryglewski, R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. – Biochem. Pharmacol. 37: 837-841.

Rowshan, V., Khosh Khoi, M. and Javidnia, K. 2010. Effects of salicylic acid on quality and quantity of essential oil components in *Salvia macrosiphon*. – J. Biol. Environ. Sci. 4: 77-82.

Sakhanokho, H.F. and Kelley, R.Y. 2009. Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). – Afr. J. Biotechnol. 8: 1474-1481.

Shabrangi, A. and BeigiJazi, E.A. 2014. Effect of salicylic acid on the amount of essential oil, phenolic compo-unds, flavonoids and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. – Int. J. Agric. Crop. Sci. 7-8: 499-502.

Shahadat Hossan, M.D., Shiblur Rahman, A.B.M., Anwarul Bashar, A.B.M. and Rahmatollah, M. 2014. Rosmarinic acid :A review of its anticancer. – W. J. Pharm. Pharmace. Sci. 3: 57-70

Weitzel, C. and Petersen, M. 2011. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. – Phytochem. 72 : 572-578.

Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J. and Jiang, W. 2015. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. – Scientia. Hort. 181: 113-120.

Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J.C., Pan, Q.H. and Huang, W.D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia lyase in grape berry in response to high temperature stress. – Plant .G. Regu 55: 1-10.

Yosofi, M., Hojjati , M.R., Moshtaghi, E., Rahimiyan, R., Dawodiyan Dehkordi, A. and Rafieian, M. 2011. The effect of hydro-alcoholic extract of *Melissa officinalis* on learning and spatial memory in Balb/c mice. – J. Shahrekord. Uni. Med. Sci. 13: 51-59.

*****

How to cite this article:

Ebrahimi, M., Kiarostami, Kh. and Nazem Bokaee, Z. 2019. Effect of salicylic acid on antioxidant properties of in vitro proliferated shoots of *Melissa officinalis* L. – Nova Biol. Reperta 5: 420-427.

ابراهیمی، م.، کیارستمی، خ. و ناظم‌بکایی، ز. ۱۳۹۷. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه درکشت درون شیشه‌ای. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۴۲۰-۴۲۷.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.2.6]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.420]