

Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth

Ziba Ghasimi Hagh ^{1*}, Somayyeh Jokar ¹, Hojatollah Bodaghi ¹, Masoomeh Modarres ²

¹ Department of Horticulture science and plant protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

² Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Hasheminegad Campus, Farhangian University, Mashhad, Iran

Abstract

In this study, callus formation of *Salvia leriifolia* Benth by stem and leaf explants in the combination of NAA and 2,4-D with Kin and the effect of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors (50, 100, 150 mM) in callus on some secondary metabolites were studied. NAA in combination with Kin had no callus production in both of stem and leaf explants, while the most appropriate callus produced by leaf explant at a concentration of 1 mg/L Kin with 2 mg/L 2,4-D. The highest fresh and dry weight, total phenol and flavonoids content were observed in calluses treated with 100 µM of methylisammonate, however, with increasing salicylic acid concentration, fresh and dry weight, total phenol content, flavonoids, rosmarinic acid increased, and the highest content of rusamicin acid and caffeic acid was observed in calluses treated with 100 and 150 µM salicylic acid, respectively. According to the results, it is stated that, by optimizing the concentrations of the elicitors, it is possible to produce the desired secondary metabolites of salvia in *in vitro* conditions.

Keywords: *Salvia leriifolia* B., salicylic acid, methyl jasmonate, rosemaric acid, caffeic acid

* Corresponding Author: zghasimi@shahroodut.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شماره سی و پنجم، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۸۰-۶۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷ و ۹۷/۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵

تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت کالوس نوروبزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

زیبا قسیم‌ی حق^{۱*}، سمیه جوکار^۱، حجت اله بدایقی^۱، معصومه مدرس^۲

^۱ گروه علوم باغبانی و گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، پردیس شهید هاشمی نژاد، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، کالوس‌زایی گیاه دارویی نوروبزک (*Salvia leriifolia* Benth.) با جداکشت ساقه و برگ در ترکیب اکسین‌های ۱ - نفتالن استیک اسید (NAA) و 2, 4-D با سیتوکینین Kin و سپس اثر الیستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار) در کالوس بر محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه بررسی شدند. ۱ - نفتالن استیک اسید با Kin در جداکشت ساقه و برگ کالوس‌زایی نکرد؛ درحالی‌که با جداکشت برگ در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D مناسب‌ترین کالوس تولید شد. بیشترین میزان وزن تر و خشک، محتوای فنل کل و فلاونوئید در کالوس‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شدند؛ باوجوداین با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، وزن تر و خشک، محتوای فنل کل، فلاونوئید، رزمارینیک اسید روند روبه‌افزایش داشتند و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید به ترتیب در کالوس‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار مشاهده شدند. نتایج نشان دادند بهینه‌کردن غلظت الیستورها، بر تولید متابولیت‌های ثانویه مدنظر در نوروبزک در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر می‌گذارد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، سورگوم، فنیل آلانین آمونیا لیا، کربوهیدرات‌ها، کمبود آهن، کمبود بور

* نگارنده مسؤل: نشانی پست الکترونیک: zghasimi@shahroodut.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۳۳۲۳۳۷۷۴۸

مقدمه

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و گیاهی چندساله، علفی است که برگ و گل‌های معطر دارد و از جمله گیاهان باارزش مناطق کویری ایران از جمله استان خراسان رضوی و سمنان است. این گیاه از جنس مریم‌گلی (*Salvia*) است که ۹۰۰ گونه آن در سراسر جهان شناسایی شده‌اند و حدود ۱۷ گونه از آنها بومی ایران هستند (Hedge, 1986). ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها از متابولیت‌های ثانویه باارزش موجود در گیاه نوروزک هستند (Tabatabai Yazdi, 1995) که از این مواد، کافنیک اسید و رزمارینیک اسید با خواص آنتی‌اکسیدانی در گروه فلاونوئیدها قرار دارند (Kahkonen *et al.*, 1999). کافنیک اسید در گونه‌های مریم‌گلی، واحد سازنده انواع متابولیت‌های فنلی از مونومرهای ساده تا انواع فراورده‌های الیگومری است و رزمارینیک اسید فراوان‌ترین دایمرکافنیک اسید و مهم‌ترین ترکیب فنلی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مریم‌گلی را بیشتر به‌علت وجود این ترکیب می‌داند (Lu and Foo 2002; Kamatou *et al.*, 2008). استفاده از کالوس‌های حاصل از کشت‌بافت گیاهی راهکاری مناسب برای تولید پایدار با کارایی زیاد و بدون وابستگی به فصول کشت گیاهی چنین متابولیت‌هایی است. تولید کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای متأثر از عواملی مانند ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع کربوهیدرات، نوع جداکشت و شرایط محیطی است (Han *et al.*, 2011). Modarres و همکاران

(۲۰۱۳، ۲۰۱۴) در گیاه نوروزک با جداکشت برگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) با ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید (NAA) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و با جداکشت مریستم جوانه انتهایی حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D، کالوس‌زایی مشاهده کردند. کاربرد الیستورهای غیرزیستی یکی از راهکارهای مهم برای القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند در محیط‌های کشت‌بافت است. الیستورهای غیرزیستی با فعال کردن سازوکارهای دفاعی، تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های بیش حساس را القا می‌کنند. عوامل مختلفی مانند غلظت الیستور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیستور به محیط کشت و مدتی که محیط یا جداکشت در معرض الیستور قرار می‌گیرد بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Vasconsuelo and Boland, 2007). الیستورهایی مانند سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه دارای ارزش دارویی، نقش کلیدی دارند و با سرعت‌دادن به تشکیل متابولیت‌های ثانویه زمان دستیابی را به مقادیر زیاد متابولیت‌ها کاهش می‌دهند (Singh and Dwivedi, 2018). سالیسیلیک اسید در گیاه سیاه‌دانه فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمولیاز (PAL) و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی (Kabiri *et al.*, 2014)؛ در کشت سلولی پونه، ماده مؤثر بتاکاریوفیلین (Darvishi *et al.*, 2017) و در گل همیشه‌بهار مقدار فلاونوئید را

شدند؛ سپس بذرها ۳ بار با آب مقطر استریل آب‌شویی شدند و پوسته نازک بذرها با پنس و سوزن‌های استریل جدا شد. در این مرحله، رویان‌های چند میلی‌متری با پنس و سوزن‌های استریل، با دقت از داخل لپه‌ها جدا و در شیشه‌های کشت حاوی محیط کشت MS کشت داده شدند و به شرایط تاریکی به مدت یک هفته با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از یک هفته جنین‌های با رشد اولیه به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند و پس از ۴ هفته گیاهان استریل نوروبزک درون شیشه‌ای به دست آمدند.

تأثیر اکسین‌های ۱ - نفتالن استیک اسید و 2, 4-D با Kin در کالوس‌زایی از جداکشت‌های ساقه و برگ: برای بهینه‌کردن کالوس‌زایی، چهار آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و در هر تکرار با پنج جداکشت ساقه یا برگ در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز انجام شدند. ۱ - نفتالن استیک اسید با چهار غلظت (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و 2, 4-D با پنج غلظت (صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) با سه غلظت سیتوکینین Kin (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. از گیاهان نوروبزک چهار هفته‌ای استریل، جداکشت‌های ساقه و برگ ۱ سانتی‌متری تهیه شدند. جداکشت‌ها برای تولید کالوس در تاریکی با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت چهار هفته صفات مورفولوژیک کالوس‌ها اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک کالوس‌ها: پس از گذشت ۴ هفته (اوایل هفته پنجم)

افزایش داد (Pacheco et al., 2013). Samadi و همکاران (۲۰۱۴) با کاربرد سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به تنهایی و باهم در کالوس‌کنگرفرنگی مشاهده کردند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، افزایش فنیل پروپانوید را سبب شد؛ ولی با افزایش غلظت الیستورها کاهش چشمگیری در مقدار فنل کل مشاهده شد. با توجه به اینکه گزارشی درباره اثر اکسین ۱ - نفتالن استیک اسید با سیتوکینین Kin در جداکشت ساقه و برگ و 2, 4-D با سیتوکینین Kin در جداکشت ساقه پس از بهینه‌کردن کالوس‌زایی وجود ندارد، اثر الیستورهای غیرزیستی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر محتوای فنلی، فلاونوئیدی، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید گیاه نوروبزک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهان استریل درون شیشه‌ای: این آزمایش در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. برای دستیابی به جداکشت‌های برگ و ساقه استریل، ابتدا بذرها گیاه نوروبزک از منطقه بجنستان واقع در استان خراسان رضوی در خردادماه جمع‌آوری شدند. بذرها پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا نیاز سرمایی برای جوانه‌زنی بذرها رفع شود. ضدعفونی‌کردن بذرها با روش Modarres و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. برای ضدعفونی‌کردن بذرها نوروبزک پس از جداکردن پوسته سخت آنها در زیر هود، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار داده

Memmert، آلمان) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفیوژ (مدل 5810R، شرکت Eppendorf، آلمان) و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل و فلاونوئید استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین - سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل، پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه با دستگاه اسپکتوفوتومتر (مدل 2150، شرکت Unico، آمریکا) با طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی بر مبنای مقدار جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین - سیوکالتیو و بر اساس مقایسه آن با محلول‌های استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. برای شاهد نیز به جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. آزمایش سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: سنجش فلاونوئید کل نیز بر اساس نمودار استاندارد Rutin سنجیده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۲۵۱ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید مطابق با رابطه به دست آمده از نمودار استاندارد محاسبه شد (Akkol et al., 2008).

اندازه‌گیری رزمارینیک اسید: عصاره‌گیری و سنجش رزمارینیک اسید با روش (Tepe (۲۰۰۷) انجام شدند. در این روش ۰/۵ گرم کالوس تر پس از توزین، در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد به خوبی

ویژگی‌های ظاهری کالوس‌ها مانند درصد کالوس‌زایی، رنگ، شکل و نوع کالوس یادداشت‌برداری شدند. درصد کالوس‌زایی بر اساس نسبت تعداد جداگشت‌های دارای کالوس به تعداد کل جداگشت‌های کشت شده در یک ظرف کشت به دست آمد. میانگین وزن آنها به صورت میانگین مجموع وزن تر بررسی شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌های مدنظر در ورق آلومینیومی بسته‌بندی شدند و به مدت ۳۶ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در نهایت، وزن کالوس محاسبه شد.

القای ایستورهای سالیسیلیک اسید و متیل

جاسمونات: پس از بهینه‌کردن کالوس‌زایی، برای بررسی اثر ایستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار با پنج جداگشت) انجام شد. با توجه به ناپایداری این دو ماده در دمای زیاد، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت در زیر هود لامینار و در شرایط استریل، زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید با فیلتر سلولزی ۰/۲ میکرون، استریل و به محیط کشت اضافه شدند. جداگشت‌های تیمار شده به اتاقک رشد تاریک با همان شرایط نگهداری کالوس انتقال یافتند.

اندازه‌گیری فنل کل: سنجش فنل کل با روش

فولین - سیوکالتیو انجام شد (Singleton and Rossi, 1965). ابتدا ۰/۵ گرم از کالوس‌های تازه در ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد و به مدت ۳ ساعت در بن ماری (مدل WNB 14، شرکت

تا حجم نهایی به ۱۰ میلی لیتر رسید؛ سپس نمونه‌ها ورتکس شدند و بلافاصله جذب آنها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در نمونه شاهد به جای عصاره، ۱ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد.

نتایج و بحث

اثر اکسین ۱ - نفتالن استیک اسید با Kin در کالوس‌زایی با جداکشت ساقه و برگ: جداکشت‌های ساقه و برگ گیاه نوروبزک پس از چهار هفته در غلظت‌های مختلف ۱ - نفتالن استیک اسید و Kin، کالوس‌زایی نشان ندادند. در گیاه S. nemoroza با جداکشت برگ مطابق با نتایج این آزمایش کالوس‌زایی مشاهده نشد (Ewa and Halina, 2004)؛ درحالی‌که در *S. canariensis* با جداکشت ساقه در محیط حاوی ۱ - نفتالن استیک اسید در ترکیب با ۶ - بنزیل آمینو پورین کالوس‌زایی مشاهده شد (Mederos-Molin, 2004).

اثر اکسین 2, 4-D با Kin در کالوس‌زایی با جداکشت‌های ساقه و برگ: نتایج محاسبه میزان کالوس‌زایی در ساقه در غلظت‌های مختلف Kin و 2, 4-D نشان دادند در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر 2, 4-D هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد؛ درحالی‌که بیشترین میزان کالوس‌زایی و وزن تر و خشک در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر 2, 4-D با ۰/۳ میلی گرم بر لیتر Kin به دست آمد. نتایج بافت کالوس‌ها هیچ تفاوتی بین تیمارها نشان ندادند و کالوس‌ها متراکم بودند؛ ولی رنگ کالوس‌ها در تیمار ۱ و ۰/۳ میلی گرم بر لیتر Kin به ترتیب در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر 2, 4-D کرمی و در سایر تیمارها سفید بودند (جدول ۱).

ساییده و به مدت یک ساعت در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن با روتاری (شرکت دنا، ایران)، حلال اتانول از محلول حذف و باقی‌مانده‌های کالوس در ۲۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد. در این مرحله محلول به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت، محلول برای فیلتر شدن، دو مرتبه از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و محلول صاف حاصل از آن تا زمان سنجش رزمارینیک اسید به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. برای سنجش، عصاره‌های گرفته شده درون سل‌های پلاستیکی سه میلی‌لیتری ریخته و جذب آنها در طول موج ۳۲۷ نانومتر خوانده شد. غلظت رزمارینیک اسید در هر نمونه با نمودار استاندارد رزمارینیک اسید بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد. برای شاهد از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد.

اندازه‌گیری کافنیک اسید: برای سنجش کافنیک اسید، روش Sauvesty و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. نمونه‌ها روی یخ و با متانول ۸۰ درصد با نسبت حجمی - وزنی ۱/۵ تا ایجاد یک محلول همگن ساییده شدند. همگنای حاصل به مدت سه ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد؛ سپس به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از روشناور حاصل برای سنجش کافنیک اسید استفاده شد. ۱ میلی لیتر از عصاره‌های متانولی ۸۰ درصد برداشته و به آن ۱ میلی لیتر معرف آرنو (سدیم مولیدات ۱۰ درصد و سدیم نترات درصد)، ۱ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار و ۱ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار افزوده شد

نتایج محاسبه میزان کالوس‌زایی در برگ در غلظت‌های مختلف Kin و 4-D، 2 نشان دادند در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 4-D، 2 هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد. بیشترین میزان کالوس‌زایی و وزن تر و خشک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 4-D، 2 با ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin به دست آمد. در همه تیمارها کالوس‌های کرم‌رنگ و متراکم مشاهده شدند (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه مقدار کالوس‌زایی و ویژگی‌های کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ساقه در محیط MS حاوی 2، 4-D و Kin

نوع تیمار (میلی‌گرم بر لیتر)	مقدار کالوس‌زایی پس از سه هفته (درصد)	وزن تر کالوس (گرم)	وزن خشک کالوس (گرم)	ویژگی‌های بافت کالوس
2, 4-D 0, Kin 0	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1, Kin 0.3	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1, Kin 1	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1.5, Kin 0.3	۵۸/۳۳ ± ۱/۸ ^c	۰/۳۱ ± ۰/۰۲ ^b	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۳ ^b	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 1.5, Kin 1	۵۷ ± ۱/۵ ^c	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ ^d	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۱ ^c	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2, Kin 0.3	۶۶/۶۷ ± ۱/۳ ^b	۰/۳۲ ± ۰/۰۳۶ ^b	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۲ ^b	کرم‌رنگ، متراکم
2, 4-D 2, Kin 1	۵۸/۳۳ ± ۱/۴ ^c	۰/۲۵ ± ۰/۰۳ ^c	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۱ ^b	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 0.3	۷۵ ± ۲/۷ ^a	۱/۰۳ ± ۰/۰۸ ^a	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۰۵ ^a	سفیدرنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 1	۵۲ ± ۱/۱ ^d	۰/۲۷ ± ۰/۰۱ ^c	۰/۰۲۱ ± ۰/۰۰۲ ^b	سفیدرنگ، متراکم

مقادیر، میانگین پنج تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) ± SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

بود که علاوه بر کالوس‌زایی فراوان در برگ، کالوس‌ها بزرگ‌تر و بهتر بودند. Mederos- Molina (۲۰۰۴) و Kintzios و همکاران (۱۹۹۹) نتایج مشابهی در گونه *canariensis* گزارش کردند. به‌طور کلی استفاده هم‌زمان از 2، 4-D و Kin با نسبت‌های زیاد 2، 4-D به Kin بر کالوس‌زایی در جداکشت‌های برگ گیاه نوروژک تأثیر بسزایی دارد پس نوع، غلظت اکسین و جداکشت بر کالوس‌زایی مؤثر هستند. به نظر می‌رسد شرایط محیطی انتخاب‌شده برای القا و رشد کالوس مناسب بوده‌اند؛ به‌طوری‌که کالوس‌ها بافت متراکم و رنگ سفید تا کرمی به

در پژوهش حاضر، القای کالوس در ساقه و برگ گیاهان نوروژک ۴ هفته‌ای (۵ تا ۶ برگ) حاصل از کشت رویان، انجام شد که با نتایج گزارش‌های قبلی در گونه‌های جنس *Salvia* هم‌راستا است (Kintzios et al., 1999; Mederos- Molina, 2004). در هر دو جداکشت ساقه و برگ، القای کالوس در غلظت‌های زیاد 2، 4-D انجام شد و غلظت‌های کمتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر در برگ تأثیری نداشتند؛ هرچند با جداکشت ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2، 4-D کالوس‌زایی مشاهده شد. بیشترین میزان کالوس‌زایی در جداکشت ساقه، ۷۵ درصد و در برگ، ۱۰۰ درصد

جدول ۲- مقایسه مقدار کالوس زایی و ویژگی های کالوس های حاصل از جداکشت های ساقه در محیط MS حاوی 2, 4-D Kin

نوع تیمار (میلی گرم بر لیتر)	مقدار کال زایی پس از سه هفته (درصد)	وزن تر کالوس (گرم)	وزن خشک کالوس (گرم)	ویژگی های بافت کالوس
2, 4-D 0, Kin 0	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1, Kin 0.3	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1, Kin 1	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1.5, Kin 0.3	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 1.5, Kin 1	۰ ^e	۰ ^e	۰ ^d	-
2, 4-D 2, Kin 0.3	۶۵/۴±۸/۸ ^c	۰/۲۴±۰/۰۶ ^d	۰/۰۱۷±۰/۰۰۴ ^c	کرم رنگ، متراکم
2, 4-D 2, Kin 1	۱۰۰±۰ ^a	۲/۳±۰/۱۲ ^a	۰/۱۶۳±۰/۰۰۹ ^a	کرم رنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 0.3	۲۲±۴/۵ ^d	۰/۲۹±۰/۰۴ ^c	۰/۰۲۱±۰/۰۰۲ ^c	کرم رنگ، متراکم
2, 4-D 2.5, Kin 1	۸۱/۶۹±۸/۹ ^b	۰/۷۶±۰/۰۸ ^b	۰/۰۸۲±۰/۰۰۶ ^b	کرم رنگ، متراکم

مقادیر، میانگین پنج تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) \pm SE هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار با آزمون LSD هستند.

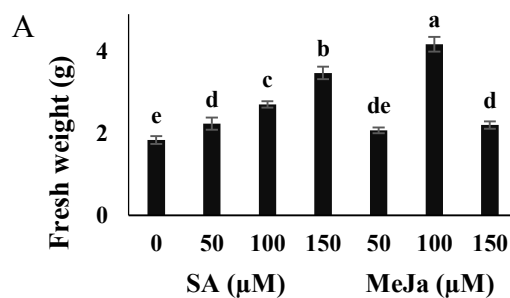
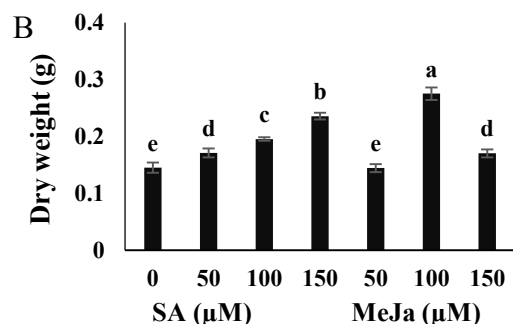
کالوس، ۱۰ روز پس از کشت ایجاد شدند و با روند افزایش دوره تا چهار هفته کالوس های بزرگ تشکیل شدند. رنگ کالوس ها با گذشت زمان از سبز به کرمی در حال تغییر بود که البته تغییر رنگ به کرمی در جداکشت های تیمار شده با سالیسیلیک اسید کمتر و در تیمار متیل جاسمونات و شاهد بیشتر بودند. سالیسیلیک اسید از فعالیت آنزیم ACC سنتز ممانعت می کند که به کاهش تولید اتیلن منجر می شود و به دنبال آن از تخریب کلروفیل در سلول ها جلوگیری می شود (Li et al., 1992). اثر کمتر متیل جاسمونات بر جلوگیری از تغییر رنگ کالوس نسبت به سالیسیلیک اسید ممکن است به علت محافظت کنندگی غیریکسان کلروفیل a و b

دست آوردند. تفاوت در کارایی 2, 4-D نسبت به ۱ - نفتالن استیک اسید در پژوهش حاضر ممکن است از یک سو به ساختار این ترکیبات و از سوی دیگر به تخصصی شدن گیرنده های اکسین در بافت های مختلف گیاهان برای نوع اکسین مربوط باشد که 2, 4-D ترکیبی فنوکسی است؛ در حالی که ۱ - نفتالن استیک اسید ترکیبی نفتالینی است (Moore, 1989).

صفات مورفولوژیک کالوس های تیمار شده با ایستورها: نتایج به دست آمده از این آزمایش، نشان دادند ایستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات تأثیری بر میزان کالوس زایی نداشتند و در همه محیط ها ۱۰۰ درصد کالوس زایی مشاهده شد. بررسی جداکشت ها نشان داد نخستین توده های

الفای فعالیت‌های متابولیکی اولیه هستند که به افزایش وزن سلول‌ها منجر می‌شوند (Namdeo, 2007). تیمارهای متیل جاسمونات ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار نسبت به شاهد وزن تر و خشک کالوس‌ها را افزایش دادند. در کشت کالوس‌های رودندرون هندی، افزایش وزن تر و خشک کالوس با افزایش غلظت متیل جاسمونات همراه بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Suan See *et al.*, 2011). برخی از بررسی‌ها نشان دادند استفاده از غلظت‌های زیاد جاسمونات اثر تحریک‌کنندگی و بازدارندگی بر رشد و فعالیت متابولیک گیاهان دارد و آثار بازدارندگی مشابه آبسزیک اسید و اتیلن از خود نشان می‌دهد که تأییدکننده نتایج پژوهش حاضر در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات است (Swiatek *et al.*, 2003 and Chong *et al.*, 2005).

و توانایی کمتر متیل جاسمونات در حفظ محتوای کلروفیل b باشد (Hanaka *et al.*, 2015). بیشترین وزن تر و خشک به ترتیب ۴/۱۶۷ و ۰/۲۷۵۰ گرم در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شدند و کمترین وزن تر (۱/۸۳ گرم) در کالوس شاهد و کمترین وزن خشک (۰/۱۶۴۳ گرم) در تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات حاصل شد. وزن تر و خشک کالوس‌ها با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید روند روبه‌افزایش داشتند (شکل ۱). نتایج پژوهش حاضر با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم بین سالیسیلیک اسید، تحریک سلول‌ها و فعالیت متابولیسم اولیه در کالوس روناس مطابقت دارند (Bulgakov *et al.*, 2002). نوع ترکیب، غلظت سالیسیلیک اسید و گونه گیاه، تعیین‌کننده وجود یا نبود ارتباط مستقیم بین غلظت‌های القاکنندگی و



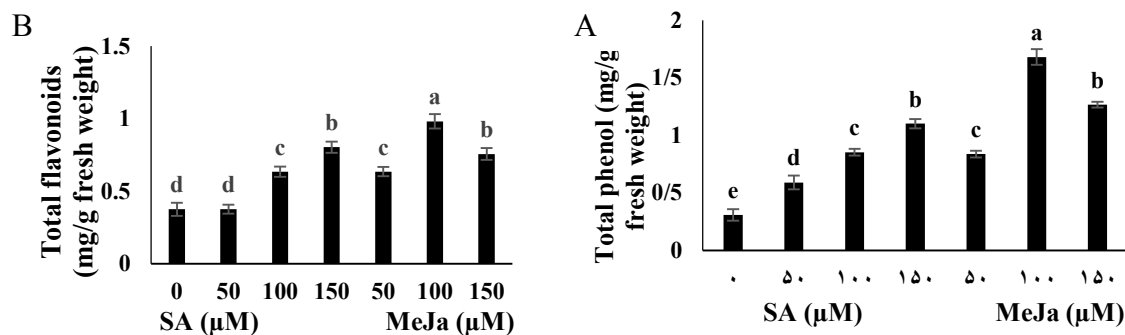
شکل ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید (SA) و متیل جاسمونات بر وزن خشک (A) و وزن تر (B) کالوس برگ گیاه نوروزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداگشت) \pm SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

فلاونوئید کل با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید روند روبه‌افزایش نشان دادند؛ به طوری که این مقادیر در غلظت ۱۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ترتیب حدود ۳/۵ و ۲ برابر شاهد افزایش نشان

باتوجه به شکل ۲ بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و کمترین میزان، در کالوس‌های شاهد مشاهده شد. محتوای فنل و

2014) مطابقت دارد و با غلظت‌های متیل جاسمونات، با پژوهش‌های Samadi و همکاران (۲۰۱۴)، Mehrabani و همکاران (۲۰۱۳) و Kim و همکاران (۲۰۰۶) هم‌راستا است؛ زیرا چالکون سنتاز که پیش‌ساز فلاونوئیدها را تولید می‌کند با متیل جاسمونات القا می‌شود (Pinot et al., 1998).

دادند (شکل ۲). افزایش محتوای فنل کل و فلاونوئید با تیمار سالیسیلیک اسید در پژوهش حاضر با نتایج بررسی‌های قبلی در شیرین‌بیان گل (Shabani and Ehsanpour, 2010)، همیشه‌بهار (Pacheco et al., 2013)، کنگرفرنگی (Kabiri et al., 2014) و سیاه‌دانه (Samadi et al., 2014)

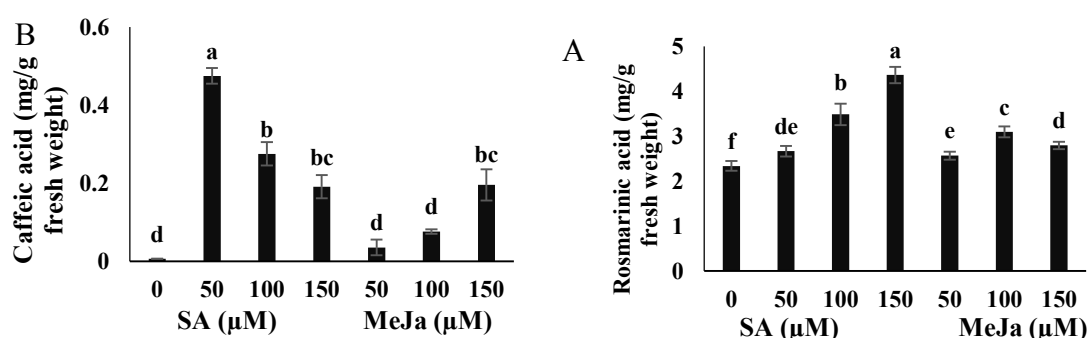


شکل ۲- تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار فلاونوئید کل (A) و فنل کل (B) کالوس برگ گیاه نوروبزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) \pm SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

میکرومولار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان رزمارینیک اسید حاصل و کمترین میانگین در شاهد مشاهده شد. همه تیمارهای متیل جاسمونات نیز افزایش میزان رزمارینیک اسید را نسبت به شاهد سبب شدند؛ ولی نسبت به تیمارهای سالیسیلیک اسید تأثیر کمتری بر افزایش محتوای این ماده داشتند (شکل ۳-B).

داده‌های حاصل از سنجش مقدار کافئیک اسید در پژوهش حاضر با نتایج گزارش‌های قبلی در کنگرفرنگی (Samadi et al., 2014) و گیاه *Salvia miltiorrhiza* (Dong et al., 2010) هم‌راستا هستند. بسیاری از بررسی‌ها نشان می‌دهند افزودن سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات خارجی

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند مقدار کافئیک اسید در گیاه نوروبزک به‌طور طبیعی بسیار ناچیز است؛ درحالی‌که با تیمار سالیسیلیک اسید افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشته است؛ ولی با افزایش غلظت، روند روبه‌کاهش داشته است و بیشترین کاهش، در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد. نتایج مربوط به اثر متیل جاسمونات بر محتوای کافئیک اسید نشان دادند تنها غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات میزان کافئیک اسید را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۳-A). نتایج مقایسه میانگین اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای رزمارینیک اسید نشان دادند با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، مقدار رزمارینیک اسید نیز روند روبه‌افزایش داشته است؛ به‌طوری‌که با غلظت ۱۵۰



شکل ۳- تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر مقدار کافنیک اسید (A) و زمارنیک اسید (B) کالوس برگ گیاه نوروزک- مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار پنج جداکشت) \pm SE هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD هستند.

کالوس‌های حاصل، جداکشت برگ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 4-D, 2, مناسب‌ترین کالوس را تولید کرد که در بررسی اثر الیستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات از آن استفاده شد. در آزمایش حاضر نشان داده شد میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه نوروزک به غلظت محرک محیط بستگی دارد. همچنین افزایش محرک بیش از مقدار معمول، افزایش متابولیت‌های ثانویه را در بر ندارد؛ بلکه تولید متابولیت‌های ثانویه را کاهش می‌دهد؛ بنابراین با بهینه کردن غلظت محرک در محیط کشت، بدون دست‌ورزی در ساختار ژنتیکی گیاه میزان تولید متابولیت‌های ثانویه مدنظر افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

در اینجا از مسئولان و کارکنان دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود بابت فراهم کردن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

احتمالاً با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، پروتئین کینازها، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات می‌شود (Andi *et al.*, 2001; Raman and Ravi, 2011) و از این رو با تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه، تولید این ترکیبات را افزایش می‌دهند. در واقع متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز، فعال کردن مسیر فنیل پروپانوییدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی را سبب می‌شوند (Wang *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2005).

جمع‌بندی

استفاده از اکسین ۱ - نفتالن استیک اسید و 2, 4-D پس از چهار هفته در کالوس‌زایی با جداکشت ساقه و برگ گیاه نوروزک نشان داد اکسین ۱ - نفتالن استیک اسید با غلظت‌های مصرفی با Kin کالوس تولید نکرد؛ در حالی که 4-D, 2, جداکشت ساقه نسبت به جداکشت برگ با غلظت کمتر، کالوس تولید کرد و باتوجه به بافت و اندازه

منابع

- Akkol, E. K., Göger, F., Koşar, M. and Başer, K. H. C. (2008) Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry* 108: 942-949.
- Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2001) Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 42(4): 446-449.
- Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., Zvereva, E. V., Fedoreyev, S. A. and Zhuravlev, Y. N. (2002) Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. *Journal of Biotechnology* 97(3): 213-221.
- Chong, T. M., Abdullah, M. A., Fadzillah, N. M., Lai, O. M. and Lajis, N. H. (2005) Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme and Microbial Technology* 36(4): 469-477.
- Darvishi, E., Kahrizi, D., Bahraminejad, S. and Mansouri, M. (2017) Study of yeast extract and salicylic acid elicitors effects on percentage of cell survival and the amount of beta-caryophyllene and isopulegone secondary metabolites in Pennyroyal (*Mentha pulegium*) cell culture. *Journal of Cellular and Molecular Research* 29(4): 370-381 (in Persian).
- Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148(2): 99-104.
- Ewa, A. and Halina, S. (2004) *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40: 596-602.
- Han, Y., Jin, X. L., Wu, F. B. and Zhang, G. P. (2011) Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University-Science* 12(5): 399-407.
- Hanaka, A., Maksymiec, W. and Bednarek, W. (2015) The effect of methyl jasmonate on selected physiological parameters of copper-treated *Phaseolus coccineus* plants. *Plant Growth Regulator* 77: 167-177.
- Hedge, I. C. (1986) Labiatae In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 150. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. (2014) Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* Plant under hydroponic culture. *Plant Protection Science* 50(1): 43-51.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 3954-3962
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N. and Viljoen, A. M. (2008) South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 664-672.
- Kim, H. Y., Chen, F., Wang, Z. and Rajapakse, N. (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2327-2332.
- Kintzios, S., Nikolaou, A. and Skoula, M. (1999) Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf

- callus cultures. *Plant Cell Reports* 18: 462-466.
- Li, N., Parsons, B. L., Liu, D. R. and Mattoo, A. K. (1992) Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology* 18: 477-487.
- Lu, Y. and Foo, L. Y. (2002) Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry* 59: 117-140.
- Mederos-Molina, S. (2004) *In vitro* Callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tissue Culture* 14: 167-172.
- Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, K. (2013) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koochi (*Stachys lavandulifolia* Vahi.) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. *Journal of Agricultural Biotechnology* 4(2): 77-88 (in Persian).
- Modarres, M., Abrishamchi, P., Ejtahadi, H. and Ramezani, A. (2007) Propagation of *Salvia leriifolia* by embryo culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 15(2): 129-141 (in Persian).
- Modarres, M., Asili, J., Gangali, A., Iranshahy, M. and Sahebkar, A. (2014) Simultaneous rosmarinic acid, salvianolic acid b and caffeic acid in *salvia leriifolia* benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diodearray detection technique. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 37(12): 1721-1730.
- Modarres, M., Lahooti, M., Asili, J., Kafi, M. and Ramazani, A. (2013) Optimizing leaf callus culture in *Salvia leriifolia* for phenolic acids production. *Plant Process and Function* 2(2): 65-74.
- Moore, T. C. (1989) *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer Verlag, Inc., New York.
- Namdeo, A. G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69-79.
- Pacheco, A. C., da Silva Cabral, C., da Silva Fermino, E. S. and Aleman, C. C. (2013) Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(42): 3158-3163.
- Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J. P. and Durst, F. (1998) Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiology* 118(4): 1481-1486.
- Raman, V. and Ravi, S. (2011) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(3): 1043-1049.
- Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. (2014) Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in *in-vitro* conditions. *Journal of Plant Production Research* 21(4): 135-148 (in Persian).
- Sauvesty, A., Page, F. and Huot, J. (1992) A simple method for extracting plant phenolic compounds. *Canadian Journal of Forest Research* 22(5): 654-659.
- Shabani, L. and Ehsanpour, A. (2010) Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. *Iranian Journal of Biology* 2(2): 691-703 (in Persian).
- Singh, A. and Dwivedi, P. (2018) Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(1): 750-757.
- Singleton, V. L. and Rossi, A. J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Suan See, K., Bhatt, A. and Lai Keng, C. (2011) Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum*

- (Melastomaceae). *Revista de Biología Tropical* 59(2): 597-606.
- Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E. and Van Onckelen, H. (2003) Stress messenger's jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29: 172-178.
- Tabatabai Yazdi, F. (1995) Antioxidant effects of essential oil and leaf extract of *Salvia leriifolia* and its phytochemical identification. MSc thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (in Persian)
- Tepe, B. (2007) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret and Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology* 99: 1584–1588.
- Vasconsuelo, A. and Boland, R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172(5): 861-875.
- Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z. and Zheng, Y. (2009) Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese bayberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(13): 5809-5815.
- Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D. (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* 169(5): 928-934.

