

## بررسی اثر نیترات نقره بر ترکیبات و فعالیت آنتی اکسیدانی کالوسهای حاصل از جدا کشت برگ گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill. )

فیروزه علیرضایی<sup>۱</sup>، خدیجه کیارستمی<sup>۲\*</sup>، منیر حسین زاده نمین<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۱

تاریخ تصویب: ۹۵/۹/۲۲

چکیده

اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula angustifolia* Mill. گیاهی است متعلق به خانواده نعنا عیان و غنی از ترکیبات ثانوی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا است و می تواند منبع مناسبی برای تهیه آنتی اکسیدانها در شرایط کشت بافت باشد. در این بررسی با هدف افزایش متابولیت های ثانوی با خاصیت آنتی اکسیدانی از الیسیتور غیر زیستی نیترات نقره استفاده شد. میزان ۴،۲،۱ و ۶ mg/l نیترات نقره به کالوسهای یک ماهه رشد کرده در محیط MS دارای هورمون های نفتالن استیک اسید 2 mg/l (NAA) و بنزیل آمینوپورین 1 mg/l (BAP)

۱ کارشناس ارشد. گروه علوم گیاهی، دانشگاه الزهرا (س) دانشکده علوم زیستی (نویسنده مسئول kh.kiarostami@alzahra.ac.ir)

۲ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)

۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)

4/ اضافه شد و پس از یک ماه کالوسها برداشت و آنالیزها انجام شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت نیترات نقره در محیط کشت، میزان رشد کالوسها افزایش یافت و افزایش میزان نیترات نقره تا غلظت ۴ mg/l سبب افزایش میزان رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین فعالیت آنی اکسیدانی شد، اما در غلظت های بالاتر از ۴ mg/l اثرات سمی یونهای نقره آشکار شد و باعث کاهش میزان رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنی اکسیدانی شد.

**واژه های کلیدی:** اسطوخودوس، رزمارینیک اسید، ترکیبات فنلی، فلاونوئید، فعالیت آنی اکسیدانی

## مقدمه

اسطوخودوس با نام علمی *Lavandu-la angustifolia* Mill گیاهی است متعلق به خانواده نعنا عیان و منشاء این گیاه مناطق مدیترانه ای و جنوب اروپا و اسپانیا است. تاکنون ۴۸ گونه از این گیاه شناسایی شده است. از قرن سیزدهم اسطوخودوس در اروپا شناسایی و مورد استفاده فراوان قرار گرفت. منشاء اصلی این گیاه مناطق مدیترانه ای گزارش شده اما به صورت خودرو در تمام نقاط جهان رشد می کند. این گیاه درختچه چند ساله و ویژه مناطق خشک و نیمه می باشد (Nobern, 1996); Tognoni and Panizza, (1988). بخشهای این گیاه به خصوص برگ آن غنی از مواد فعال دارویی با خاصیت آنتی اکسیدانی است و همین امر باعث شده که یک منبع خوب برای تولید آنتی اکسیدان ها در شرایط کشت بافت باشد. امروزه، گیاهان دارویی توجه بسیاری را به عنوان منابع بالقوه آنتی اکسیدان های طبیعی به خود جلب کرده اند. این ترکیبات کاربرد های فراوانی به عنوان مکمل غذایی و در درمان و پیشگیری از بیماری های قلبی و عروقی، سکته و سرطان دارند و قادر به مقابله با استرس اکسیداتیو و کاهش اثرات مخرب آن بر سلامت انسان می باشند

Diplock et al, (1998).

مطالعات پیشین در مورد آنتی اکسیدان های مشتق شده از گیاهان ترکیبات فنلی را به عنوان مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدان گیاهی معرفی کرده است (Periera(2009) Maure et al. (2001). ترکیبات فنلی گروه بزرگی از متابولیت های ثانوی گیاهی با ساختارهای بسیار متنوع هستند. پیشگیری از آسیب اکسیداتیو از طریق فعالیت مهار رادیکال های آزاد، ممانعت از شکل گیری رادیکالهای آزاد با توجه به خواص کلاته کنندگی فلزات و همچنین اثر برمسیر علامت دهی سلولی و بیان ژن را به عنوان مکانیسم اولیه عملکرد آنتی اکسیدانی این ترکیبات می توان در نظر گرفت Perron et al, (2009); Soobratte et al, (2005). ترکیبات فنلی نقش مهمی در بر هم کنش بین گیاه و محیط ایفا می کنند. این ترکیبات در هر شرایطی و در تمام اندامها و بافتهای گیاه سنتز می شوند، اما تنش های محیطی مختلف مقدار آنها را در سلول تغییر می دهند. عواملی مانند آلودگی های آب و خاک، زخمی شدن، تنش دمایی و UV می توانند در تولید ترکیبات فنلی در بخشهای مختلف گیاه تأثیرگذار باشند (Vogt (2010) ; Boudet (2007) . رزمارینیک اسید یکی از مهمترین ترکیب فنلی موجود در خانواده نعناعیان است. این ترکیب در تمام بافتهای گیاهی وجود

و مواد غذایی بستری مناسب برای تهیه کالوس در شرایط یکسان را فراهم می کند (1994). Begum and Tamaki. استخراج و خالص سازی آسان، تولید ترکیبات در مقادیری که در طبیعت پیدا نمی شوند، وابسته بودن به عوامل آب و هوایی و فصلی و کنترل بیشتر مسیرهای بیوسنتزی برای دستیابی به ترکیبات شیمیایی در مقادیر مطلوب از دیگر مزایای تولید متابولیت های ثانوی در شرایط کشت درون شیشه است (Misawa et al., 1994). در کشت بافت و سلول از الیسیتور برای بهبود تولید متابولیت های ثانوی استفاده می شود. الیسیتورها تولید متابولیت های ثانوی را تحت تأثیر قرار می دهند (Furden et al., 2005). الیسیتورها ترکیبات زیستی یا غیر زیستی هستند که برای افزایش تولید متابولیت های ثانوی و افزایش میزان رشد مورد استفاده قرار می گیرند (Ramachandra and Srinivasa, 2008).

در این بررسی از نیترات نقره به عنوان الیسیتور غیر زیستی استفاده شد. نیترات نقره ترکیبی بی رنگ، بسیار محلول و سمی است و به سادگی به یون نقره تبدیل می شود. از آن در تهیه ترکیبات دیگر نقره استفاده می کنند. ویژگی های نیترات نقره مثل دسترسی آسان، حلالیت در آب این ماده را برای کاربرد در تنظیم خارجی رشد گیاه مناسب کرده است. ثابت شده

دارد و به طور ویژه در واکنش انباشته می شود. رزمارینیک اسید از مسیر فنیل پروپانویید سنتز می شود (Peterson (1994); Hausler et al., (1993). رزمارینیک اسید دارای اثرات ضد التهاب و ضد افسردگی است (Lee et al., 2008). فعالیت آنی اکسیدانی رزمارینیک اسید از ویتامین E بیشتر است (Cuvelier et al., 1996). بخش مهمی از سیستم دفاعی گیاه به رزمارینیک اسید مربوط می شود (Peterson, 1994). تولید متابولیت های ثانوی با خاصیت آنی اکسیدانی بالا با روشهای زیست فناوری همانند کشت سلول و بافت ارزش فراوان دارد (شریفی و همکاران ۱۳۹۲). یکی از روشهایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگری در زمینه بررسی متابولیت های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است روش کشت اندام، بافت و سلول های گیاهی است. با این روش می توان مقادیر بیشتری از ترکیبات ثانوی را با استفاده از کشت بافت نسبت به حالت طبیعی به دست آورد. از مزایای روش کشت سلول و بافت، مستقل بودن از تغییرات آب و هوایی، تنش های محیطی و سرعت بالای رشد است. در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شوند که در حالت عادی در گیاه مادری وجود ندارند. علاوه بر این کشت و تکثیر گیاهان با روش کشت در شیشه ضمن غلبه بر محدودیت های آب و هوایی، فصلی و دسترسی به آب

که نیترات نقره بازدارنده قوی فعالیت اتیلن بوده و به صورت گسترده در کشت بافت گیاهی کاربرد دارد. همچنین از جمله عملکردهای نیترات نقره اثر بر آنزیم‌های مختلف داخل سلول است که از این طریق می‌تواند بیان ژنها را تغییر و تغییراتی در تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاه ایجاد کند (اصغری و همکاران، ۱۳۹۰).

تا کنون مطالعاتی نظیر بررسی اثر نیترات نقره بر ریزازدیادی گیاه *Vitex negundo* (2010) Stephen et al., ممانعت از فعالیت اتیلن در *Arabidopsis thaliana* (2012) Kathleen., میزان محصول در *Ocimum basilicum* (Nejatzade et al., 2014)، تولید تیمول در *Thymus Vulgaris* (2013) Moses and Mukundan, تولید تاکسول در *Taxus bacata* (اصغری و همکاران، ۱۳۹۰)، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در chick pea Lakshmi et al., (2013) کالوس زایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در *Triticuma astivum* (2012) Liao et al., میزان برخی ترکیبات ثانوی در *Oroxylum indicu* Gokhale (2010) and Bansal، فعالیت آنزیم‌های تولید کننده رزمارینیک اسید در *Salvia miltiorrhiza* Yan et al., (2006) اما تاکنون مطالعه ای در مورد بررسی اثر نیترات نقره بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات آنتی اکسیدانی مورد بررسی در

این پژوهش گزارش نشده است.

**مواد و روش ها**

**مواد گیاهی**

برای کشت بافت از گیاه اسطوخودوس رشد کرده در محوطه دانشگاه الزهراء در تهران و قبل از مرحله گلدهی استفاده شد.

**سترون کردن واماده سازی نمونه برای کشت بافت**

برای کشت بافت برگ های ناحیه ۵ سانتی متری راس گیاه اسطوخودوس مورد استفاده قرار گرفت. برگ ها به طور کامل از ساقه جدا شدند، برای حذف گرد و غبار روی برگ ها نمونه ها ابتدا با آب جاری و ماده شوینده شست و شو داده شدند. سپس ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. قطعات برگ ۳ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند، سپس الکل خارج و نمونه ها با آب مقطر استریل شست و شو شدند سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد قرار گرفتند و پس از آن ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو شدند. تمام مراحل در زیر هود لامینار استریل انجام شد.

**اماده سازی محیط کشت و افزودن الیسیاتور**

در مرحله اول برای کشت نمونه ها از

محیط MS(1962 Murashing and Skooge) شد (Lopez-Arnaldos et al., 1995).  
(, با pH ۵/۷-۵/۸ به همراه هورمون های ۲mg/l NAA و ۴mg/l BAP استفاده شد. محیط های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱ atm به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. در هر ظرف پتری ۵ جداکشت برگ قرار گرفت. پس از یک ماه کالوسها واکشت شدند و در محیط کشت جدید با همان ترکیبات محیط اولیه به همراه غلظت های ۲،۱، ۴، ۶ و ۸ mg/l نیترات نقره قرار گرفتند. پس از یک ماه کالوسها برداشت شدند و آنالیزها انجام شد.

#### تهیه عصاره متانولی

برای تهیه عصاره از روش Conde و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات استفاده شد. ۲/۰ گرم پودر خشک کالوس با ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد سائیده شد و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. عصاره پس از صاف شدن تا انجام سنجش در فریزر ۷۰°C قرار گرفتند.

#### سنجش میزان رزمارینیک اسید

جذب عصاره متانولی تهیه شده در ۳۳۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL9000SERIES, ENGLAND) خوانده شد سپس با استفاده از منحنی استاندارد غلظت رزمارینیک اسید تعیین

#### سنجش ترکیبات فنلی

۰/۲ میلی لیتر از عصاره به همراه ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش مخلوط شدند، به مخلوط حاصل ۰/۲ میلی لیتر معرف Folin-ciocalteu اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷% به لوله های آزمایش اضافه شد. سپس ۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. بعد از گذشت ۹۰ دقیقه قرار گرفتن نمونه ها در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL9000SERIES, ENGLAND) خوانده شد و به صورت میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک محاسبه گردید. ( برای هر نمونه سه تکرار انجام شد و میانگین نتایج محاسبه گردید (Lopez-Arnaldos et al., 2001).

#### سنجش میزان فلاونوئید

برای تعیین میزان فلاونوئید ۰/۲ میلی لیتر عصاره متانولی به ۰/۲ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد اضافه گردید و مخلوط شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد اضافه شد و پس از مخلوط کردن، محلول با اتانول ۹۰ درصد به حجم ۵ میلی لیتر رسید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ۴۱۴ نانومتر توسط دستگاه

تاریکی انجام شد و در نهایت جذب در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (CE- (CIL9000SERIES ENGLAND خوانده شد و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط فرمول زیر محاسبه شد.

$$= (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$$

درصد بازداری رادیکال آزاد (IC%)

در این فرمول  $A_{blank}$  جذب نوری نمونه کنترل فاقد عصاره است و  $A_{sample}$  جذب غلظت های مختلف عصاره است. در این سنجش توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره های مختلف با میزان بی رنگ کردن محلول DPPH در متانل سنجش شد. به منظور مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها از مفهوم IC<sub>50</sub> استفاده شد. IC<sub>50</sub> بیانگر غلظتی از آنتی اکسیدان مورد نظر است که ۵۰٪ از رادیکال های آزاد DPPH را در یک دوره زمانی خاص خنثی می کند (Molyneux, 2004).

### سنجش فعالیت قدرت کاهش دهنده یا

#### Reducing power (RP)

۰/۲ میلی لیتر عصاره رقیق شده به همراه ۰/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲ مولار (pH/۶=) و ۰/۵ میلی لیتر از پتاسیم فری سیانیدین ۱٪ مخلوط شد و در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از خنک شدن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (W/V) ۱۰٪ اضافه

اسپکتروفتومتر (CECIL9000SERIES ENGLAND) خوانده شد. برای هر نمونه سه تکرار انجام شد و میانگین نتایج محاسبه شد (Kulisic et al., 2006).  
سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد با ۲ و ۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

در این سنجش، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی توسط اندازه گیری توانایی عصاره ها در جاروب کردن رادیکال های آزاد ۲،۲-diphenyl-۱-picrylhydrazyl (DPPH) بررسی شد.

آماده کردن معرف: مقدار ۰/۰۰۴ گرم DPPH با ترازوی حساس وزن شده و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتر ریخته شد و با کمی متانل مطلق حل شد و سپس با متانل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. این مرحله در تاریکی انجام شد. یک لوله بعنوان شاهد و یکی بعنوان بلانک در نظر گرفته شد. در لوله حاوی بلانک ۱ میلی لیتر محلول DPPH و ۲ میلی لیتر متانل مطلق و در لوله شاهد تنها ۳ میلی لیتر متانل مطلق ریخته شد. در بقیه لوله ها از ۰/۰۱ میلی گرم تا ۰/۱ میلی گرم عصاره به همراه متانل مطلق به حجم ۱ میلی لیتر رسید و ۱ میلی لیتر DPPH به محلول اضافه شد و با متانل مطلق محلول به حجم ۳ میلی لیتر رسانیده شد. در آخر ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. تمامی مراحل این آزمایش در

ریخته شد که بعنوان شاهد بود. درصد جاروب کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Jiao and Wang, 2005)

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

### نتایج و بحث

با توجه به نتایج به دست آمده افزودن نیترات نقره به محیط کشت بر تمام موارد مورد بررسی اثر معنی داری داشت. افزایش غلظت نیترات نقره سبب افزایش وزن تر و خشک کالوسها در تمام تیمارها نسبت به شاهد شد به نحوی که بیشترین وزن تر کالوسها در ۶ mg/l نیترات نقره به میزان ۱۱/۹۳ g و کمترین در تیمار شاهد به میزان ۷/۱ g مشاهده شد. بیشترین وزن خشک کالوسها در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره به میزان ۰/۵۰ g و کمترین وزن خشک کالوسها مربوط به تیمار شاهد به میزان ۰/۲۴ g بود (شکل های ۱ و ۲).

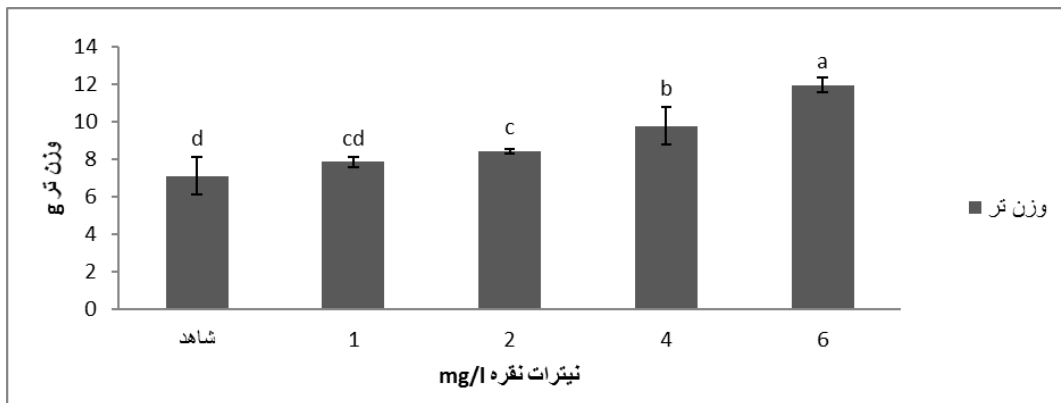
افزودن نیترات نقره به محیط کشت سبب تغییر قابل ملاحظه در محتوای رزمارینیک اسید شد و افزایش غلظت نیترات نقره در محیط کشت، در تمام غلظت ها به جز در ۶ mg/l سبب افزایش رزمارینیک اسید شد. بیشترین میزان رزمارینیک اسید (۴ mg/l) نیترات نقره به میزان (۲۶/۳۲ gdw) و کمترین میزان در ۶ mg/l

و سپس سانتریفوژ شد (۱۰۰۰g، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد). به ۰/۵ میلی لیتر از روشنآور، ۰/۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر فریک کلرید (۱ W/V) (۰٪) اضافه شد و جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. قدرت کاهشی به عنوان میکرومول آسکوربیک اسید معادل گرم خالص وزن تر بیان شد (Niciforovic et al., 2010).

### سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید

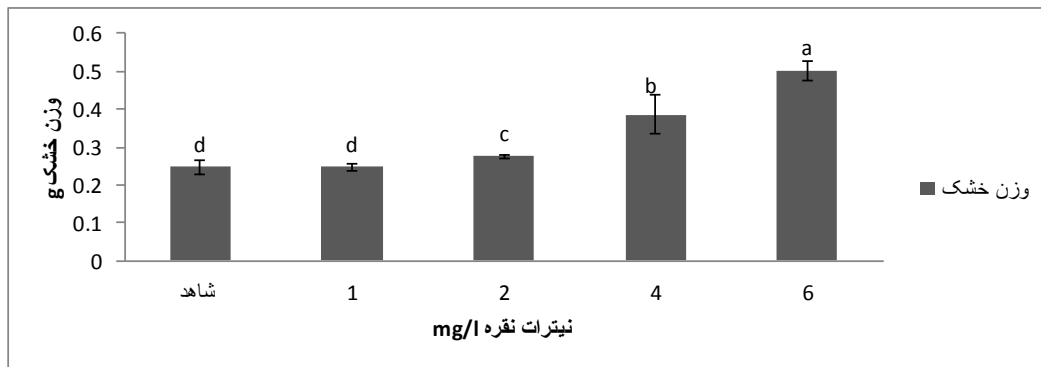
برای سنجش رادیکال آنیون سوپراکسید، رادیکال های آزاد آنیون سوپراکسید با سیستم خود اکسایش پیروگالل تعیین شدند. ۹ میلی لیتر بافر تریس-HCl (PH/۲، ۵۰ = mmol/L) در لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار داده شد. ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگالل (۴۵ میلی مولار پیروگالل در ۱۰ میلی مولار HCl) به ترکیب بالا اضافه شد و بعد از ۳ دقیقه انکوبه شدن در بن ماری ۲۵ درجه، یک قطره آسکوربیک اسید ۵٪ به آن اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آن در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. این مقدار بعنوان  $A_0$  در نظر گرفته شد. در لوله دیگر عصاره گیاهی ریخته شد و جذب آن بعد از ۵ دقیقه در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد که عدد خوانده شده معادل  $A_1$  است. در  $A_2$  به جای عصاره آب مقطر





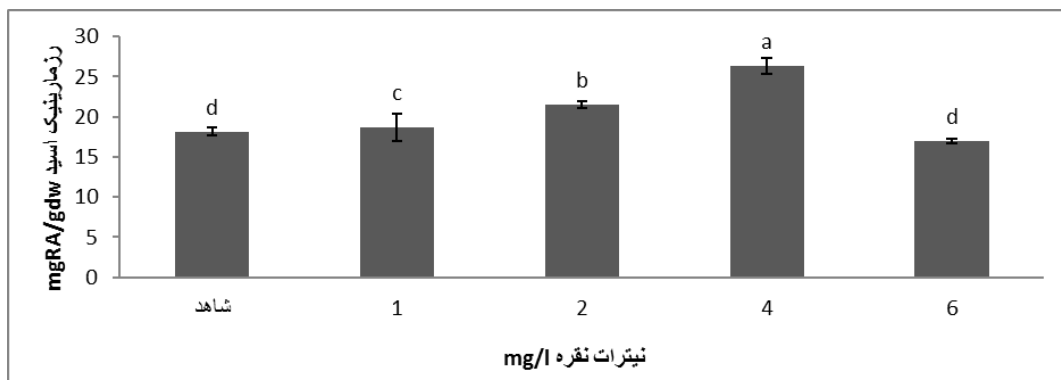
شکل ۱: مقایسه وزن تر کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترات نقره . حروف مشابه نشان دهنده عدم

اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$



شکل ۲: مقایسه وزن خشک کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترات نقره . حروف مشابه نشان دهنده عدم

اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$



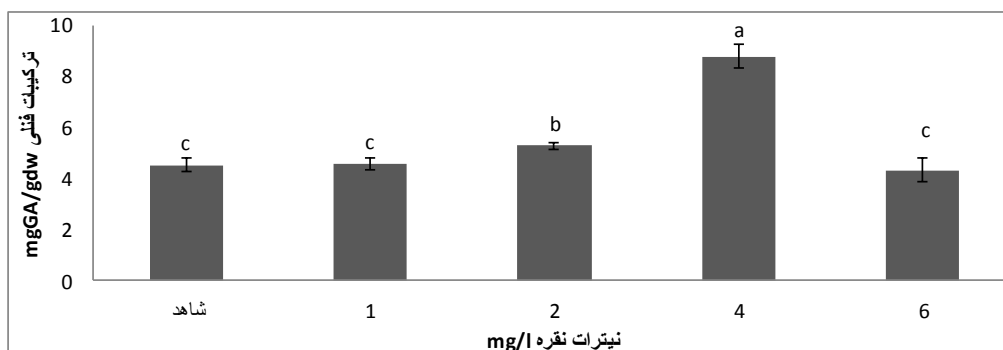
شکل ۳: مقایسه میزان رزمارینیک اسید در کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترات نقره . حروف مشابه

نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$

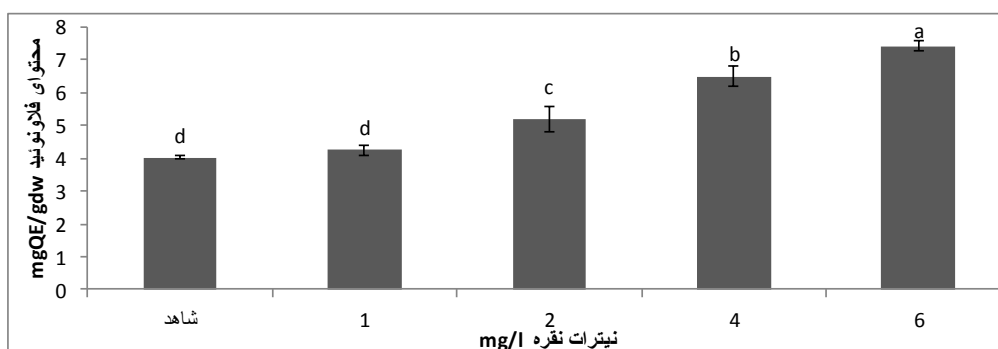
نیترات نقره (۱۶/۹۸ mgRA/gdw) مشاهده افزودن نیترات نقره به محیط کشت باعث افزایش چشمگیر در میزان ترکیبات شد (شکل ۳).

فنی شد و همانند رزمارینیک اسید میزان ترکیبات فنی نیز در حضور نیترات نقره تا غلظت ۴ mg/l افزایش یافت و پس از آن اثر کاهشی مشاهده شد به نحوی که بیشترین میزان ترکیبات فنی در ۴ mg/l نیترات نقره به میزان (۷۷/۸ mgGA/gdw) و کمترین میزان ترکیبات فنی در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره (۳۱/۴ mgGA/gdw) مشاهده شد (شکل ۴). نیترات نقره به عنوان الیسیتور غیر زیستی تولید فلاونوئیدها را تحریک کرد و این اثر در غلظت ۶ mg/l نیترات نقره قابل ملاحظه تر از سایر غلظت ها بود و غلظت بهینه برای تولید فلاونوئیدها ۶ mg/l نیترات نقره بود. بیشترین میزان فلاونوئید در ۶ mg/l نیترات نقره به میزان (۷/۵۴ gdw) و کمترین محتوای فلاونوئید در تیمار شاهد به میزان (۴/۰۱ mgQE/gdw) مشاهده شد (شکل ۵).

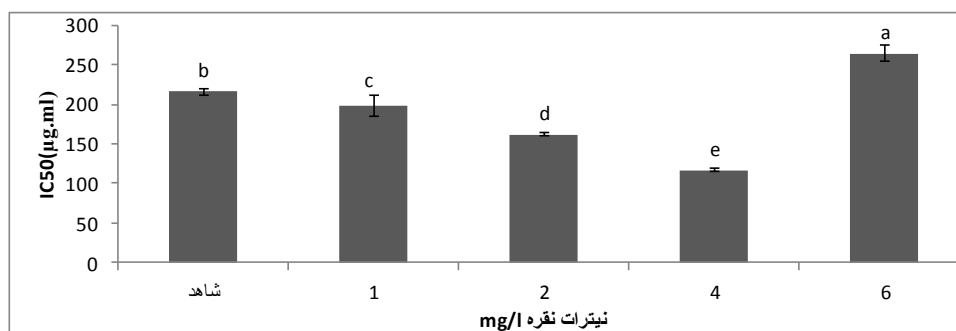
با توجه به شکل های ۶، ۷ و ۸ از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش جاروب کنندگی رادیکال DPPH و قدرت کاهشی و فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید نتایج مشابهی به دست آمد. بیشترین



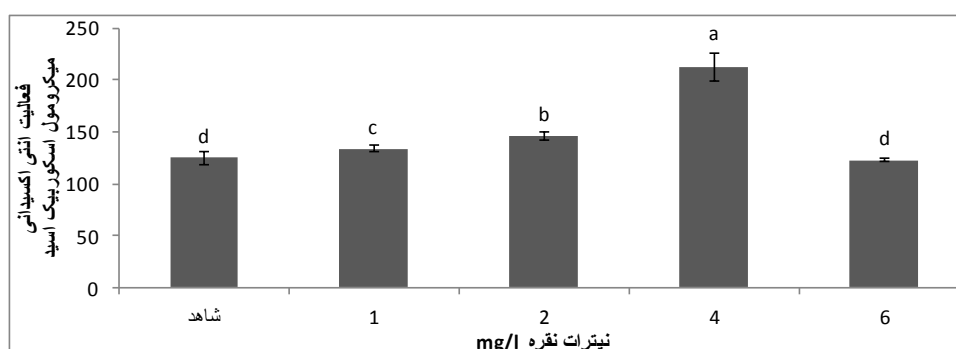
شکل ۴: مقایسه محتوای ترکیبات فنی در کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترات نقره. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$



شکل ۵: مقایسه محتوای فلاونوئید کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترات نقره. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$



شکل ۶: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (IC50) کالوس ها در حضور غلظت های مختلف نیترا ت نقره حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$



شکل ۷: مقایسه قدرت کاهشی RP در کالوسها در حضور غلظت های مختلف نیترا ت نقره . حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$

آنتی اکسیدانی در تیمار ۶ mg/l نیترا ت نقره به میزان (۲۶۴ g/mlµ) مشاهده شد (شکل ۶).

نتایج نشان داد با افزایش غلظت نیترا ت نقره تا ۴ mg/l قدرت کاهشی افزایش یافت و پس از این غلظت اثر کاهشی مشاهده شد. بیشترین قدرت کاهشی در ۴ mg/l نیترا ت نقره (۲۱۲/۴۵ میکرومول اسکوربیک اسید) و کمترین قدرت کاهشی در ۶ mg/l نیترا ت نقره به میزان (۱۲۲/۹۵ میکرومول اسکوربیک اسید) مشاهده شد (شکل ۷).

همانند سایر روشهای سنجش فعالیت

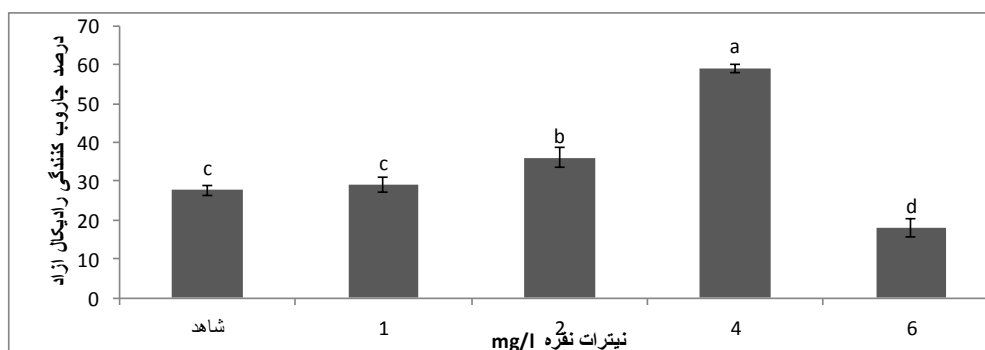
فعالیت آنتی اکسیدانی با هر ۳ روش در تیمار ۴ mg/l نیترا ت نقره و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی با هر ۳ روش در تیمار ۶ mg/l نیترا ت نقره مشاهده شد. قرار گیری در معرض نیترا ت نقره به صورت قابل ملاحظه ای در بالاترین غلظت سبب کاهش قدرت جاروب کنندگی رادیکال DPPH شد به نحوی که کمترین قدرت حذف رادیکالهای آزاد DPPH در ۶ mg/l نیترا ت نقره مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۴ mg/l نیترا ت نقره به میزان (۱۱۷ µg/ml) و کمترین فعالیت

یونهای  $Ag^+$  را تولید می‌کنند این یونها طی واکنش جانشینی می‌توانند در ساختار DNA تغییر ایجاد کنند و بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند و از طریق نفوذ به DNA رونویسی از آنزیم‌هایی را فعال کنند که در افزایش رشد دخالت دارند. یونهای نقره در مرحله تقسیم سلولی وارد عمل شده و از آنجایی که قدرت اتصال به DNA را دارند در نتیجه باعث تغییر رونویسی از برخی ژن‌ها می‌شوند و شاید افزایش بیومس را با افزایش رونویسی از ژن‌های دخیل در این فرایند کنترل کنند (Elumali et al., 2010).

یکی دیگر از مکانیسم نیترات نقره در افزایش رشد ممانعت از سنتز و فعالیت اتیلن است. برای اولین بار در گزارشی در سال ۱۹۷۶ مطرح شد که نیترات نقره قادر به جلوگیری از فعالیت اتیلن مصنوعی در واکنش‌هایی مانند ریزش، پیری و کاهش رشد می‌باشد (1976,

آنتی‌اکسیدانی در این بررسی با افزایش غلظت نیترات نقره تا  $4 \text{ mg/l}$  افزایش قدرت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید مشاهده شد. پس از آن کاهش فعالیت اتفاق افتاد. نیترات نقره در تمام غلظت‌ها به جز  $6 \text{ mg/l}$  سبب افزایش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید شد به نحوی که بیشترین فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در تیمار  $4 \text{ mg/l}$  نیترات نقره به میزان  $59\%$  و کمترین فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در تیمار  $6 \text{ mg/l}$  نیترات نقره  $18\%$  مشاهده شد. غلظت بهینه نیترات نقره برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی با هر ۳ روش غلظت  $4 \text{ mg/l}$  نیترات نقره بود (شکل ۸).

نتایج نشان داد که رشد کالوسها با افزودن نیترات نقره به محیط کشت افزایش یافت. یکی از مکانیسم‌هایی که می‌توان اثر نیترات نقره را تفسیر کرد مکانیسم اثر یونی می‌باشد. ذرات نقره به مرور زمان



شکل ۸: مقایسه فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در کالوسها در حضور غلظت‌های مختلف نیترات نقره. حروف

مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p \leq 0/05$

گیاه *Echinacea angostifolia* مطابقت داشت.

در این بررسی میزان رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی با افزودن نیترات نقره به محیط کشت تغییر چشمگیری داشت و در بالاترین غلظت نیترات نقره میزان این متابولیت های ثانوی به شدت نسبت به کنترل کاهش یافت. برخی الیستیورها همانند شرایط تنش را عمل می کنند و باعث می شوند سیستم دفاعی گیاه فعال شود در نتیجه فعالیت آنزیم های دفاعی و تولید کننده متابولیت های ثانویه مثل آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) افزایش یابد، اما این که گیاه به الیستیور همانند شرایط تنش واکنش نشان دهد و غلظت بهینه الیستیور بستگی به گونه گیاهی دارد. برخی گونه های گیاهی در غلظت های بالای نقره بدون هیچ اثر ممانعتی به رشد و تولید ترکیبات ثانوی ادامه می دهند اما برخی گونه ها در غلظت های بالا آسیب می بینند و تولید متابولیت های ثانوی و فعالیت آنتی اکسیدانی در آن ها کاهش می یابد (Szabo et al., 1999). همچنین کاهش میزان رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی می تواند به علت سرکوب آنزیم PAL باشد و سرکوب آنزیم PAL نیز می تواند به علت فعال شدن یک سری سیگنال های داخلی مهار کننده آنزیم PAL توسط عوامل خارجی باشد

(Beyer). سنتز اتیلن در شرایط پیری و تنش در گیاه تحریک می شود به طور کلی سنتز اتیلن از طریق سیگنال های داخلی یا خارجی تحریک می شود و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می دهد Wang and Ecker (2002). مکانیسم اثر نیترات نقره در افزایش رشد به این صورت بیان می شود که یون نقره می تواند در مسیر فعالیت اتیلن تداخل ایجاد کند و جایگزین یون مس در گیرنده پروتئینی اتیلن شود. همچنین ثابت شده یون نقره از اتصال اتیلن به گیرنده در سلول گیاهی ممانعت می کند و به این صورت از فعالیت اتیلن جلوگیری و باعث افزایش رشد می شود (Kushad and Paviah, 1984). تحقیقات بسیاری در زمینه اثر نیترات نقره در جلوگیری از فعالیت اتیلن و افزایش رشد در شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام شده است. برای مثال بررسی اثر نیترات نقره بر رشد گیاه سیب زمینی در محیط MS نشان داد مصرف  $AgNO_3$  در محیط کشت سبب افزایش رشد نسبت به کنترل می شود (Turhan 2004). نتایج ما با نتایج Radhakrishnan و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر نیترات نقره در کشت بافت گیاه بادام زمینی، شاخه زایی گیاه *Echinacea angustifolia* Chen Chae et al., (2012) و نتایج Park و همکاران (2008) در بررسی اثر نیترات نقره در کشت بافت

کشت ریشه‌های موئی *Salvia Milthoriza*

پرداختند و افزایش میزان رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی در غلظت های متوسط و کاهش این متابولیت ها را در غلظت های بالای نیترات نقره مشاهده کردند و نتایج Ghokhale و (Bansal, 2010) که اثر نیترات نقره را بر میزان فلاونوئید در کشت بافت گیاه *Orxylum indicum* بررسی کردند مطابقت داشت.

نیترات نقره توانایی تغییر بسیاری از ژنها را دارد. در بررسی که روی *Arabidop-sis thaliana* صورت گرفت مشخص شد که نقره در پاسخ های گیاه به تنش های مختلف دخالت می کند و ژنهایی را تنظیم می کند که در پاسخ گیاه نسبت به فلزات سنگین و تنش های اکسیداتیو دخالت دارند مثل ژنهای دخیل در عملکرد واکوئل و ژنهای جابه جا کننده پروتون، سوپراکسید دیسموتاز، اکسیداز مربوط به سیتوکروم p-۴۵۰، و پراکسیداز، همچنین توانایی تغییر در ژنهای تنظیم کننده فعالیت اکسین در تنظیم اندازه ارگانها (ARGOS = auxin Regulated gene involve in organ size) و ژنهای مسیر علامت دهی اتیلن و همچنین مقاومت سیستمیک (SAR= Systemic acquired resistance) را تغییر می دهد (Kaveh et al., 2013) و همین امر نشان دهنده این است که نیترات نقره توانایی تغییر در میزان پروتئین های گیاهی و به

(1976), Creasy.

از سوی دیگر افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله نقره در بافت های گیاهی در غلظت های پایین با تحریک سیستم دفاعی سبب افزایش ترکیبات فنلی می شود و در غلظت های بالا سبب اکسیداسیون ترکیبات فنلی می شود و همچنین این ترکیبات خود مسبب کلاته شدن فلزات سنگین می شوند و به علت گروه های آروماتیک که در ساختار خود دارند واکنش پذیری بالا با فلزات سنگین نشان می دهند و با اتصال به فلزات سنگین میزان ترکیبات فنلی کاهش می یابد

(2007), Elzaawely and Tawata. بنابراین با افزایش غلظت نیترات نقره در محیط کشت، میزان ترکیبات فنلی به علت ورود نقره به بافتها و ایجاد سمیت کاهش می یابد .

فلاونوئیدها از مهم ترین ترکیبات پلی فنلی هستند. با ایجاد شرایطی همانند تنش های اکسیداتیو حاصل از افزایش فلزات سنگین مانند نقره، مسیر فنیل پروپانویید به ویژه مسیر بیوستنز فلاونوئیدها افزایش می یابد فلاونوئیدها نقش مهمی در حفاظت در مقابل رادیکالهای آزاد دارند و قادرند این رادیکالها را جاروب کنند (Rice – Evans, et al (1996). نتایج این بررسی با نتایج Yan و همکاران (۲۰۰۶) که به بررسی تولید رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی در

گونه های فعال اکسیژن (ROS) = Reactive Oxygen Species) را دارند.

غلظت های پایین نقره با افزایش گونه های فعال اکسیژن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه را فعال می کنند و باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می شوند اما در غلظت های بالا باعث ایجاد سمیت برای گیاه می شوند. یکی از علائم سمیت در گیاه عدم تعادل بین گونه های فعال اکسیژن و دفاع آنتی اکسیدانی است وقتی این تعادل از بین برود عامل تنش زا باعث آسیب به بافت ها و ملکولهای زیستی و پروتئین ها و باعث کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی در نهایت باعث مرگ سلولی می شود. اثر سمی ذرات به عواملی مانند گونه گیاه، اندازه ذرات و نوع سلول بستگی دارد (Jiravova et al., 2016).

نتایج این بررسی نشان داد نیترات نقره در غلظت های پایین و متوسط با ایجاد گونه های فعال اکسیژن باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و افزایش ترکیبات آنتی اکسیدان مثل رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی شد و در بالاترین غلظت باعث ایجاد عدم تعادل بین دفاع آنتی اکسیدانی و گونه های فعال اکسیژن شد و نتیجه این فرایند ایجاد سمیت می باشد و متناسب با آن محتوای ترکیبات آنتی اکسیدانی و فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. نتایج حاضر در این بررسی بر توانایی نیترات نقره

دنبال آن آنزیم ها و تغییر میزان ترکیبات ثانوی را دارد.

در این بررسی نیترات نقره در غلظت های پایین و متوسط سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق جاروب کنندگی رادیکال DPPH و فعالیت جاروب کنندگی رادیکال سوپراکسید (SO) و قدرت کاهش (RP) شد و در بیشترین غلظت نیترات نقره فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. در بررسی ما تعادل میان فعالیت آنتی اکسیدانی و تولید رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی تحت تاثیر تیمار نیترات نقره مشاهده شد. نقش ترکیبات ثانوی گیاهی مانند ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید با فعالیت آنتی اکسیدانی مشخص است (Perron and Bru-maghim 2009 ; Soobratte et al (2005) می توان تغییر فعالیت آنتی اکسیدانی را به تغییر میزان این ترکیبات تحت تاثیر نیترات نقره نسبت داد.

ذرات نقره توانایی تغییر مسیر متابولیسمی سنتز ترکیبات ثانویه را دارند و می توانند ترکیبات ثانوی شناخت شده را کاهش داده و تولید ترکیبات ثانوی کمتر شناخته شده را القا کنند (Ghanati et al., 2014). مطالعاتی در رابطه با میانکنش گیاه با نیترات نقره انجام شده است مشاهده شده که نقره در غلظت های بالا با ایجاد تنش اکسیداتیو باعث ایجاد سمیت برای گیاه می شود. یونهای نقره توانایی افزایش

به عنوان الیسیاتور برای افزایش تولید ترکیبات ثانویه و تغییر مسیر بیوسنتز آنها دلالت دارد. افزودن نیترات نقره به محیط کشت سبب تغییر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد اما غلظت بهینه در بررسی ما غلظت های متوسط این ترکیب بود و بررسی سازو کار دقیق اثر نیترات نقره بر سنتز متابولیت های ثانویه و مسیر علامت دهی آنها نیازمند پژوهش های بیشتری است.



## منابع

- اصغری، غ.، مستاجران، ا.، نخعی، ا. (۱۳۹۰). تأثیر نیترات نقره و سالیسیلیک اسید بر تولید تاکسول در گیاه *Taxus baccata* L. فصلنامه گیاهان دارویی شماره هشت، ۷۴-۸۲
- شریفی، م.، اسماعیل زاده بهبهانی، ص. (۱۳۹۲). افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت، ۱۱۹-۱۲۸.
- Begum, A.A. Tamaki, M. Kako, S. (1994) Formation of protocorm-like bodies (PLBs) and shoot development through in vitro culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 63(3):663-673.
- Beyer, E.M. (1976) Silver ion: a potent anti-ethylene agent in cucumber and tomato Horticulture Science 11(3):175-196.
- Boudet, A.M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds Phytochemistry 68: 2722-2735.
- Cheon Chae, S and Park, S. (2012) Improved shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC treated with ethylene inhibitors Life Science Journal 9(4):1725-1728.
- Creasy, L.L. (1976) Phenylalanine ammonium lyase-inactivating system in sunflower system in sunflower leaves Phytochemistry 15: 673-675.
- Conde, E., Cadahfa, E and GarciaVallego, M.C. (1995) HPLC analysis of Flavonoids and phenolic acid and aldehydes in *Eucalyptus* spp Chromatographia 41: 657-660.
- Cuvelier, M. E., Richard, H and Berset, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary Journal of American oil Chemist Society 73:645-652.
- Diplock, A. T., Charleux, G.L., Crozier, Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M and Vina -Ribes, J. (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species British Journal of Nutrition 80:77-112.
- Elumalai, E.K., Prasad, T.N., Kambala, V., Nagajyothi, P.C and David, E. (2010) Green synthesis of silver nanoparticle using *Euphorbia hirta* L. and their

- antifungal activities. *Applied Science Research* 2(6): 76-81.
- Elzaawely , A and Tawata, S. (2007) Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. Leaves exposed to copper sulphate. *Environmental and Experimental Botany* 59: 347-353.
- Furden, B., Humburg, A and Fuss, E. (2005) Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 24: 312-317.
- Ghanati , F ., Bakhtiarian, S., Mohammadparast ,B and Keyhani, M. (2014) Production of New Active Phytocompounds by (*Achillea millefolium* L.) after Elicitation with Silver Nanoparticles and Methyl Jasmonate *Journal of Bioscience Biotechnology Research Asia* 11(2):391-399.
- Gokhale, M and Bansal Y.K; S.(2010) Assessment of Secondary Metabolites in In vitro Regenerated Plantlets of *Oroxylum indicum* L. *Vent. Plant Tissue Culture & Biotechnology*. 20(1): 21-28.
- Hausler, E., Petersen , M and Alfermann ,A. (1993) Isolation of protoplasts and vacuoles from suspension cultures of (*Coleus blumei Benth*). *Plant Cell Reports* 12: 51-59.
- Jiao, Z., Liu ,J and Wang ,S. (2005) Antioxidant activities of total pigment extract from Blackberries *Food Technology and Biotechnology* 43: 97-102
- Jiravova .J., Tomankova, K.B., Harvanova, M., Malina, L., Malohlava ,4., Luho-va ,L., Panacek ,A., Manisova, B and Kolarova H.(2016). The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and chemical toxicology* 96:50-61.
- Kathleen ,B ;(2012) Elucidating the Effect of Silver on Ethylene Signaling in *Arabidopsis thaliana* Masters Theses. University of Tennessee, Knoxville.
- Kaveh R., Li ,YS., Ranjbar ,S., Tehrani .R., Brueck ,C.L and Van Aken, B.(2013) Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene Expression in Response to Silver Nanoparticles and Silver Ions. *Environmental Science & Technology* 47(18): 10637-10644
- Kulisic ,T., Dragovic-Uzelac ,V., Milos ,M.(2006) Antioxidant activity of aqueous

- tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme Food Technology Biotechnology 44: 485-492.
- Kushad, M.M., Poovaiah, B.W. (1984) Deferral of senescence and abscission by chemical inhibition of ethylene synthesis and action in bean explants Plant Physiology 76(2):293-296.
- Lakshmi, V., Devlina, D., Nilanjana, D and Vimala, R. (2013) Studies on Toxicity of Ag (I) on Plants and Microbes Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 4(4):176-188.
- Lee, S.Y., Xu, H., Kim, Y.K and Park, S.U; (2008) Rosmarinic acid production in hairy root cultures of (*Agastache rugose*) Kuntze World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 969-972.
- Liao, X., Tang, L and Zhang, F. (2012) Effect of silver nitrate on callus regeneration and activity of some enzymes during tissue culture of wheat immature inflorescence Journal of sciences paper online 1-14
- 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<sup>2+</sup> ions Fresenius Journal of Analytical Chemistry 351: 311-314.
- López Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M.A and Calderón, A.A. (2001) Change in phenol content during Strawberry callus plant physiology 113:315-322
- Misawa, N., Truesdale, M.R., Sandmann, G., Fraser, P.D., Bird, C., Schuch, W and Bramley, P.M. (1994) Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoen formation in vivo and in vitro and functional analysis of the various truncated gene products The Journal of Biochemistry 116:980-985
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakrin Journal of Science and Technology 26: 211-219.
- Moses, T and Mukundan, U. (2013) Elicitation of Thymol in *Thymus Vulgaris*, A Medicinally Important Plant International Journal of Drug Discovery

- and Herbal Research 3:590-595.
- Moure , A., Cruz , J.M., Franco , D., Domínguez , J.M., Sineiro , J., Domínguez , H., José, Núñez , M and Parajó , J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry 72(2): 145-171.
- Murashige, T and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15 (3): 473-497.
- Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F and Aminkhani, A. (2014) Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.) Organic and Medicinal Chemistry Letters 4:11( open Access)
- Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic, S., Stojkovic, A and Pavlovic-Muratspahic, D. (2010) Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. Food and Chemical Toxicology 48:3125-30.
- Nobre , J. (1996) In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field grown plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 46:151- 155.
- Park, S ., Uddin, M., KimYong, K and Lee ,S. (2008) Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. African Journal of Biotechnology 7 (25):4959-4965
- Pereira, D.M., Valentão , P., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2009) Phenolics compounds From chemistry to biology Molecules 14(6): 2202-2211.
- Perron, N and Brumaghim, J. A. (2009) Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochemistry and Biophysics 53:75-100.
- Petersen ,M. (1994) Coleus spp. In vitro culture and the production of forskolin and rosmarinic acid. Medical and Aromatic Plants 26: 69-93.
- Radhakrishnan, T. O., Jithesh, A and Dobaría ,J. R. (2014) High Frequency regeneration protocol for callus culture of peanut leaves using ethylene modulator as culture medium additive. The Bioscan 9(2): 599-604.
- Ramachandra, C.T and Srinivasa Rao, P. (2008) Processing of Aloe vera leaf gel.

- American Journal of Agricultural and Biological Sciences 3(2):502-510.
- Ravishankar, G.A and Rao, S.R. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20 (2):101-153.
- Rice-Evans ,C. A., Miller ,J. M and Paganga ,G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids *Free Radical. Biology and Medicine* 20:933-956.
- Soobrattee, M., Neergheen ,V ., Luximon-Ramma , A., Aruoma , O and Bahorun , T.(2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents Mechanism and actions. *Mutation Research* 579: 200-213.
- Stephen ,M., Nagarajan ,S and Ganesh ,D. (2010) Phloroglucinol and silver nitrate enhances axillary shoot proliferation in nodal explants of *Vitex negundo* L. –an aromatic medicinal plant. *Iranian Journal of Biotechnology* 8(2):82-89.
- Szabo, E., Thelen, A and Petersen, M.(1999) Fungal elicitor preparations and methyljasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports* 18 : 485–489
- Tognoni , F and Panizza, M.(1988) Clonal propagation, callus Formation and plant Regeneration of Lavandin *Scientia. Horticulturae* 37: 157 163.
- Turhan, H .(2004) Effect of silver nitrate (ethylene inhibitor) in in vitro tissue culture of potato (*Solanum tubersum*) *Bioechnology* 20(4);72-74.
- Vogt,T.(2010) Phenylpropanoid biosynthesis in plants. *Molecular Plant* 3(1):2-20.
- Wang ,K.L., Hai , C.L and Ecker , J.R.(2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* 14:131-151.
- Yan, Q., Shi ,M., Neg ,J and Wu ,J.(2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science* 170: 853–858.

