

تولید درون شیشه‌ای تانشینون‌ها در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمبل (*Kar. abrotanoides Perovskia*) با استفاده از نیترات نقره و عصاره مخمر

بهناز بایسته^۱، پروانه ابریشم چی^{۱*}، جواد اصیلی^۲ و آرزو ذاکر^۳

^۱ ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه فرهنگیان، گروه آموزش زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۵



چکیده

گیاه برازمبل (*Perovskia abrotanoides* Kar.)، گونه‌ای چندساله از تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که به خاطر غنی بودن ریشه‌ها از ترکیبات ترپنوئیدی به نام تانشینون‌ها، ویژگی‌های دارویی متعددی نظیر خاصیت ضد میکروبی، ضد دیابت، ضد التهاب و ضد سرطان دارد. در پژوهش حاضر، اثر تیمارهای انفرادی و ترکیبی نیترات نقره (Ag^+) و عصاره مخمر (YE) بر رشد و تولید تانشینون‌ها در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمبل بررسی شد. ریشه‌های نوپدید، در محیط کشت MS جامد حاوی mg/L NAA ۲، از ریزنمونه‌های برگ القاء و برای رشد بیش‌تر و تیمار با تازن‌ها، به محیط MS مایع منتقل شدند. در بخش اول پژوهش، پس از تیمار ریشه‌ها با Ag^+ ($25 \mu M$)، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت، تیمار یک هفته‌ای با این تازن، به‌عنوان بهترین تیمار برای رشد و تولید تانشینون‌ها انتخاب شد. در تیمارهای ترکیبی، افزودن YE ($200 mg/L$) به محیط، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پیش تیمار با Ag^+ انجام شد و ریشه‌ها یک هفته پس از تیمار با اولین تازن، برداشت شدند. کاربرد انفرادی تازن‌ها رشد ریشه‌ها را بهبود بخشید و محتوای تانشینون کل را حدود ۶ برابر کنترل افزایش داد. نقره با افزایش ۱۲ برابری در تجمع تانشینون II-A، بهترین تیمار برای تولید این متابولیت بود. تیمارهای ترکیبی، بسته به مدت زمان حضور YE ، تأثیر متفاوتی بر محتوای تانشینون‌ها داشتند، اما در بهترین حالت (کاربرد YE دوازده ساعت بعد از Ag^+)، مقدار کل تانشینون‌ها به ۲ برابر تیمارهای انفرادی ارتقاء یافت که ناشی از افزایش چشمگیر تانشینون I بود. هیچ‌کدام از تیمارها تأثیر معنی‌دار بر مقدار کریپتوتانشینون نداشتند.

واژه‌های کلیدی: *Perovskia abrotanoides*، تانشینون، ریشه نوپدید، نیترات نقره، عصاره مخمر.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۵۱۲۴۶۷۲۶، پست الکترونیک: abrisham@um.ac.ir

مقدمه

قرقیزستان، تبت و هیمالیا پراکنده شده است (۱). این گونه، گیاهی معطر، بوته‌ای-درختچه‌ای و چند ساله متعلق به زیرتیره Nepetoideae از تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که در سال ۲۰۱۷، براساس مطالعات فیلوژنتیک مولکولی، به عنوان گونه‌ای از جنس مریم گلی (*Salvia*) و با نام

کشور ایران به علت تنوع اقلیمی و جغرافیایی خاص خود، رویش‌گاه بسیاری از گیاهان دارویی است که بخش بزرگی از آنان، بومی ایران هستند. برازمبل (*Perovskia abrotanoides* Kar.)، گیاه دارویی باارزشی است که در ایران (استان‌های گلستان، مازندران، اصفهان، خراسان و سیستان و بلوچستان)، افغانستان، پاکستان، ترکمنستان،

علمی *Salvia abrotanoides* (مریم گلی روسی) معرفی شده است (۱۲).

گیاه برازمبل در ایران و سایر کشورهای آسیایی، به طور سنتی برای درمان مالاریا، سالک، بیماری‌های انگلی، تیفوس، تهوع، تصلب شرائین، بیماری‌های قلبی و عروقی، فیروز کبدی، سرفه، عفونت ادراری و به عنوان ضد عفونی کننده آرام‌بخش، تب‌بر و مسکن درد و التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹، ۳۳ و ۴۵). بخش عمده‌ای از خواص بیولوژیکی و دارویی این گونه را، به حضور ترکیبات فنلی و ترپنوییدی مختلف در آن، نسبت داده‌اند (۳۸ و ۵۰).

تانشینون‌ها، دی‌ترین‌های کینونی هستند که در گیاهان زیرتیره *Nepetoideae* از تیره نعنائیان و برخی از گیاهان متعلق به تیره گاوزبان (*Boraginaceae*) یافت می‌شوند و اولین بار از ریشه گیاه مریم گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) جداسازی شدند. گونه فوق که تاکنون به عنوان غنی‌ترین منبع تانشینون در نظر گرفته شده است، حاوی بیش از ۴۰ نوع مختلف از این متابولیت‌ها از جمله کریپتوتانشینون (CT)، تانشینون I (T-I) و تانشینون II-A (T-IIA) می‌باشد (۲۲). مقدار تانشینون در ریشه گونه‌های مریم گلی چینی رشد یافته در طبیعت، در گزارش‌های مختلف، تا حدی متفاوت است. در گزارش ژونگ و همکاران (۲۰۰۹)، مجموع مقدار سه تانشینون ذکر شده در بالا، در ۷۴ نمونه از ریشه‌های این گونه که از مناطق مختلف چین جمع‌آوری شده بودند، بین ۰/۰۳۷ تا ۱/۴۱ درصد وزن خشک ریشه متغیر بود (۶۲). در حالی که در دو بررسی دیگر، این مقدار، معادل ۰/۵۱ (۸) و ۰/۴۳ (۵۲) درصد وزن خشک برآورد شد. وجود CT، T-I، T-IIA و انواع دیگری همانند هیدروکسی کریپتوتانشینون، اسکوکریپتوتانشینون و اسکومیلتریون در ریشه گیاه برازمبل نیز تأیید شده است (۳۹ و ۵۵). در گزارش ذاکر و همکاران (۲۰۱۵)، مجموع مقدار CT و T-IIA در ریشه گیاهان خودروی برازمبل، معادل ۰/۰۸ درصد وزن خشک ریشه بود (۵۴).

تانشینون‌ها تأثیر محافظت‌کننده بر سیستم قلب و عروق دارند (۱۵)، ضد دیابت (۲۵)، ضد میکروب، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان (۱۴ و ۶۰) هستند و موجب سمیت سلولی و القای آپوپتوز در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی می‌شوند (۵۴ و ۵۸).

مراحل بیوسنتز تانشینون‌ها را می‌توان در سه بخش معرفی نمود. در ابتدا پیش‌سازهای سازنده اسکلت ترپنوییدی یعنی ایزوپنتیل‌پیروفسفات (IPP) یا دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMAPP) از طریق مسیر مولونات (MVA) در سیتوسل و یا از مسیر متیل‌اریتریتول‌فسفات (MEP) در پلاستیدها ساخته می‌شوند. در پائین دست مسیر MVA و MEP، این پیش‌سازها ابتدا تبدیل به میلیترادیان (*miltiradiene*) شده و سپس، به دنبال واکنش‌های هیدروکسیلی شدن، دکربوکسیلی شدن و اکسیداسیون-احیای متوالی، به ترتیب CT، T-IIA، تانشینون T-IIB (T-IIB) و T-I به وجود می‌آیند (۲۲).

تولید متابولیت‌های ثانوی مختلف نظیر ترکیبات فنلی و ترپنویدها، در مقیاس تجاری، از طریق کشت ریشه‌های نوپدید گیاهان دارویی، انجام شده است (۱۱ و ۱۶). ریشه‌های نوپدید، یکنواختی ژنتیکی دارند و هنگامی که در معرض تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب قرار گیرند، به‌خوبی رشد می‌کنند. استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی که تحت نام تازن (*elicitor*) نیز معرفی می‌شوند، تولید متابولیت‌های ثانوی را در ریشه‌های نوپدید تحریک می‌کند (۳۱ و ۴۱).

پژوهش‌های انجام شده با هدف تولید تانشینون‌ها در ریشه‌های نوپدید و موئین گیاه برازمبل بسیار اندک و محدود به دو گزارش است. ذاکر و همکاران (۲۰۱۵)، با استفاده از تازن‌های زیستی و غیرزیستی مختلف از جمله عصاره مخمر (YE) و نیترات نقره (Ag^+) تولید CT و T-IIA را در ریشه‌های نوپدید برازمبل افزایش دادند (۵۵). بنابر گزارش فرج تبار (۱۳۹۶)، تیمار ریشه‌های موئین

جامد (۳۰) فاقد هورمون، حاوی ۰/۵ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز استفاده شد. ریزنمونه‌های برگ از گیاهچه-های سترون ۶۰-۵۰ روزه، در اندازه ۱×۱ cm، جدا شدند و پس از کشت بر روی محیط‌کشت MS جامد حاوی ۰/۷ درصد آگار، ۳ درصد ساکارز و ۲ mg/L NAA، در تاریکی و دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ قرار گرفتند. پس از ظهور ریشه-های نوپدید (۱۶-۱۴ روز پس از کشت)، قطعاتی به اندازه تقریبی ۳ mm از ریشه‌ها جدا و به محیط‌کشت MS مایع، حاوی ۲ mg/L NAA و ۳ درصد ساکارز منتقل شدند. نمونه‌ها بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۸۰ rpm، دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و تاریکی قرار گرفتند و هر سه هفته یک بار واگشت شدند.

تیمار ریشه‌های نوپدید با تازن‌ها: برای استفاده از نقره به عنوان تازن، محلول پایه ۲/۵ mM نیترات نقره (Merck, K41210612) در آب بدون یون، تهیه شد. بخش کربوهیدراتی عصاره مخمر (Sigma, Y4250) از رسوب آن در اتانل به روش هان و آلبرشیم (۱۹۷۸) به دست آمد (۲۱).

براساس نتایج حاصل از پژوهش قبلی (۵۵)، غلظت μM ۲۵ از نیترات نقره و ۲۰۰ mg/L از عصاره مخمر، به عنوان بهترین غلظت از این تازن‌ها، برای تحریک تولید تانیشینون-ها در ریشه‌های نوپدید انتخاب شدند. برای تیمار با تازن-ها، دو آزمایش طراحی شد. در آزمایش اول، ریشه‌های نوپدید ۲۱ روزه، با Ag^+ تیمار و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت (یک هفته)، برداشت شدند تا رشد و محتوای تانیشینون آن‌ها اندازه‌گیری شود. پس از آنالیز داده‌ها، بهترین مدت زمان تیمار با Ag^+ (۱۶۸ ساعت یا یک هفته) تعیین شد و برای آزمایش دوم مورد استفاده قرار گرفت.

در آزمایش دوم، تیمار ترکیبی از این دو تازن انجام شد. ابتدا ریشه‌های ۲۱ روزه با Ag^+ تیمار شدند. سپس ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از افزودن Ag^+ ، YE به محیط کشت وارد شد. در این تیمارها، ریشه‌ها به ترتیب به مدت ۶/۵ روز

برازمبل با غلظت مناسبی از IAA و NAA، منجر به افزایش معنی‌دار CT شد، در حالی که مقادیر T-I و T-IIا تغییر معنی‌دار نداشتند یا نسبت به کنترل کاهش یافتند (۳). لازم به ذکر است که اغلب بررسی‌های انجام شده برای بهینه‌سازی تولید تانیشینون‌ها در شرایط درون شیشه، مربوط به گیاه *S. miltiorrhiza* است و تأثیر مثبت تازن‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید این متابولیت‌ها در کشت‌های سلول (۶۱) و ریشه مویین (۲۰، ۲۷، ۴۸ و ۵۱) آن گزارش شده است.

باتوجه به این که ایران، به‌ویژه استان‌های خراسان، از رویشگاه‌های اصلی گیاه برازمبل در جهان هستند و این گونه یکی از معدود گیاهانی است که مقادیر قابل توجهی از تانیشینون‌ها را در ریشه‌های خود ذخیره می‌کند، پژوهش حاضر، ضمن پایدارسازی کشت ریشه‌های نوپدید این گیاه در شرایط درون شیشه، برای اولین بار تأثیر کاربرد هم‌زمان دو تازن Ag^+ و YE را جهت ارتقای کمی و کیفی تانیشینون‌ها مورد بررسی قرار داد. بدیهی است که این نوع از تحقیقات پایه، با بررسی شرایط لازم برای تولید بهینه تانیشینون‌ها در مقیاس تجاری، نه‌تنها امکان بهره‌برداری از آن‌ها را بدون آسیب رساندن به محیط زیست فراهم می‌کند، بلکه زمینه‌ساز توسعه و گسترش صنعت گیاهان دارویی، به‌عنوان یک منبع درآمد ملی خواهد بود.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه گیاهی: بذرهاي رسیده گیاه برازمبل از منطقه کلات در استان خراسان رضوی، با طول جغرافیایی $36^\circ 38' 3/22''$ عرض جغرافیایی $52^\circ 52' 7/98''$ ارتفاع ۱۷۴۸ متر از سطح دریا جمع‌آوری شدند. یک نمونه از گیاه نیز پس از شناسایی، در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد با شماره ۹۰۱۲۳ FUMH نگهداری شد.

تولید گیاهچه‌ی سترون و القای ریشه نوپدید از ریزنمونه برگ: برای تولید گیاهچه سترون، از محیط کشت MS ۱/۲

آزمون T-Student و در آزمایش دوم، با آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح احتمال ۰/۰۵ توسط نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۵) انجام شد. میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) با سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

القا و رشد ریشه‌های نوپدید: تشکیل ریشه‌های نوپدید از ریزنمونه برگ، در محیط کشت MS جامد حاوی NAA ۲ mg/L، دو هفته بعد از کشت آغاز گردید و پس از ۴۰ روز، بر روی ۶۰ درصد از ریزنمونه‌ها، ریشه‌های نوپدید تشکیل شدند (شکل ۱).

آزمایش اول

تأثیر مدت زمان تیمار با تازن غیرزیستی Ag^+ بر رشد و محتوای تانن‌ها در ریشه‌های نوپدید: براساس آزمون تی (t-student)، مدت زمان تیمار با غلظت ثابتی (۲۵ μM) از Ag^+ بر رشد و محتوای ریشه‌های نوپدید تأثیر معنی‌دار ($P < 0/05$) داشت (جدول ۱). اگرچه تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته با Ag^+ اثر مثبتی بر وزن ریشه‌ها در مقایسه با شاهد نداشتند، تیمار یک هفته‌ای با تازن، موجب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه‌ها، نسبت به کنترل شد. بیشترین وزن تر (۱۱/۷۷۲ g) و وزن خشک (۰/۶۵۷ g) برای ریشه‌ها در تیمار اخیر مشاهده شد، در حالی‌که کمترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۶/۳۲۶ و ۰/۴۴ گرم) مربوط به ریشه‌هایی بود که ۴۸ ساعت با تازن تیمار شدند (جدول ۱).

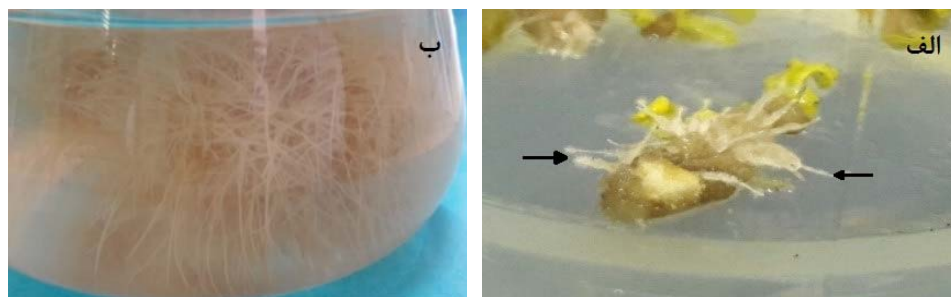
با افزایش زمان حضور تازن در محیط کشت، محتوای CT در ریشه‌ها افزایش یافت، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار CT (۵/۵۶ $\mu g/g$ DW)، متعلق به ریشه‌هایی بود که یک هفته در معرض تازن بودند. حضور Ag^+ در محیط کشت ریشه‌های نوپدید، به مدت ۴۸ و ۱۶۸ ساعت، منجر به افزایش معنی‌دار مقدار T-I در مقایسه با کشت‌های کنترل شد. بیشترین (۲۶/۹۷۳ $\mu g/g$ DW) و کمترین (۲/۶۱۷۵ $\mu g/g$ DW) مقدار T-IIA، (محدوده غلظت ۳۰-۱۰) و CT (محدوده غلظت ۸۰-۲۰ $\mu g/ml$) در اتانل مطلق، و تزریق آن‌ها به دستگاه، منحنی‌های استاندارد براساس سطح زیر قله کروماتوگرام در برابر غلظت رسم شدند. سپس، مقدار سه تانن مورد بررسی در نمونه‌ها، به ترتیب با استفاده از معادلات خط $Y=106175X$ ، $Y=22523X$ و $Y=109103X$ محاسبه شدند.

(Ag7d+YE6.5d)، ۶ روز (Ag7d+YE6d) و ۵ روز (Ag7d+YE5d) در معرض YE بودند، ولی مدت زمان تیمار با Ag^+ همان هفت روز بود. در یک تیمار هم، Ag^+ و YE هم‌زمان به محیط کشت افزوده شدند، یعنی ریشه‌ها به مدت یک هفته، از ابتدا در معرض هر دو تازن بودند (Ag7d+YE7d). در تمام تیمارها، ریشه‌ها یک هفته بعد از اعمال اولین تازن (Ag^+) برداشت شدند.

جداسازی و تعیین مقدار ترکیبات تانن‌ها در ریشه‌های نوپدید: جداسازی تانن‌ها با حلال متانل به روش فراصوت انجام شد (۵۵). شناسایی تانن‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Kenuer Smartline, Germany) مجهز به پمپ‌های چهارگانه و ستون فاز معکوس Eurospher-100 C18 (۱۲۵ mm \times ۴ mm) و آشکارساز UV-VIS (D14163) در طول موج ۲۷۰ nm انجام شد. استونیتریل و آب اسیدی شده با اسید استیک ۰/۱ درصد با زمان-بندی گرادینتی، به عنوان فاز متحرک انتخاب شدند. میزان جریان، ۱ mL در دقیقه و حجم تزریق، ۲۰ μL بود. تزریق نمونه‌ها به دستگاه، در دمای محیط انجام شد و سه با تکرار گردید. پس از تهیه غلظت‌های مختلف از سه استاندارد مورد استفاده شامل T-I (محدوده غلظت ۳۰-۱۰ $\mu g/ml$) و T-IIA (۲۰-۸۰ $\mu g/ml$)، (محدوده غلظت ۸۰-۲۰ $\mu g/ml$) در اتانل مطلق، و تزریق آن‌ها به دستگاه، منحنی‌های استاندارد براساس سطح زیر قله کروماتوگرام در برابر غلظت رسم شدند. سپس، مقدار سه تانن مورد بررسی در نمونه‌ها، به ترتیب با استفاده از معادلات خط $Y=106175X$ ، $Y=22523X$ و $Y=109103X$ محاسبه شدند.

طرح آزمایش و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش اول در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و آزمایش دوم در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شدند. تحلیل آماری داده‌ها در آزمایش اول با استفاده از

نبودند. مطابق جدول ۱، با افزایش مدت زمان تیمار با Ag^+ ، مجموع مقدار سه نوع تانیشینون مورد بررسی در ریشه‌های نوپدید افزایش یافت و این افزایش مقدار، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از تیمار، نسبت به کنترل، معنی‌دار بود. مقدار کل تانیشینون‌ها، پس از یک هفته تیمار، به حداکثر ($47/103 \mu\text{g/g DW}$) رسید.



شکل ۱- ریشه‌های نوپدید باززایی شده از ریزنمونه برگ گیاه *P. abrotanoides*. الف: ۳۰ روز پس از کشت در محیط MS جامد حاوی 2 mg/L NAA (بزرگ‌نمایی $\times 1/3$)، فلش نشان‌دهنده ریشه‌های نوپدید است. ب: ۵۰ روز پس از واكشت در محیط MS مایع حاوی 2 mg/L NAA (بزرگ‌نمایی $\times 1/4$)، فلش نشان‌دهنده ریشه‌های نوپدید است.

جدول ۱- نتایج آزمون تی داده‌های حاصل از بررسی تأثیر زمان تیمار با تازن غیرزیستی نیترات نقره ($25 \mu\text{M}$)، بر رشد و مقدار تانیشینون ریشه‌های

نوپدید *P. abrotanoides*

مقادیر تی						
مجموع سه تانیشینون ($\mu\text{g/g DW}$)	تانیشینون IIA ($\mu\text{g/g DW}$)	تانیشینون I ($\mu\text{g/g DW}$)	کریپتوتانیشینون ($\mu\text{g/g DW}$)	وزن خشک (g)	وزن تر (g)	تیمار
۳۰/۸۶	۲/۴	۲۶/۶۹	۱/۷۷	۰/۵۴	۸/۰۵	Control 24h
۲۸/۶۶ ^{ns}	۲/۹۸ ^{ns}	۲۳/۵۷ ^{ns}	۲/۱۱ ^{ns}	۰/۴۷ ^{ns}	۷/۱۱ ^{ns}	AgNO ₃ 24h
۲۱/۸۰	۶/۶۶	۱۱/۷۸	۳/۳۷	۰/۴۹	۶/۶۱	Control 48h
۳۹/۵۹*	۱۰/۰۳ ^{ns}	۲۶/۹۷*	۲/۵۷ ^{ns}	۰/۴۴ ^{ns}	۶/۳۳*	AgNO ₃ 48h
۶/۹۸	۱/۴۹	۱/۴۳	۴/۰۶	۰/۵۱	۷/۶۶	Control 168h
۴۷/۱۰*	۱۸/۲۲*	۲۳/۳۱*	۵/۵۶ ^{ns}	۰/۶۶*	۱۱/۷۷*	AgNO ₃ 168h

ns و * به ترتیب، بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

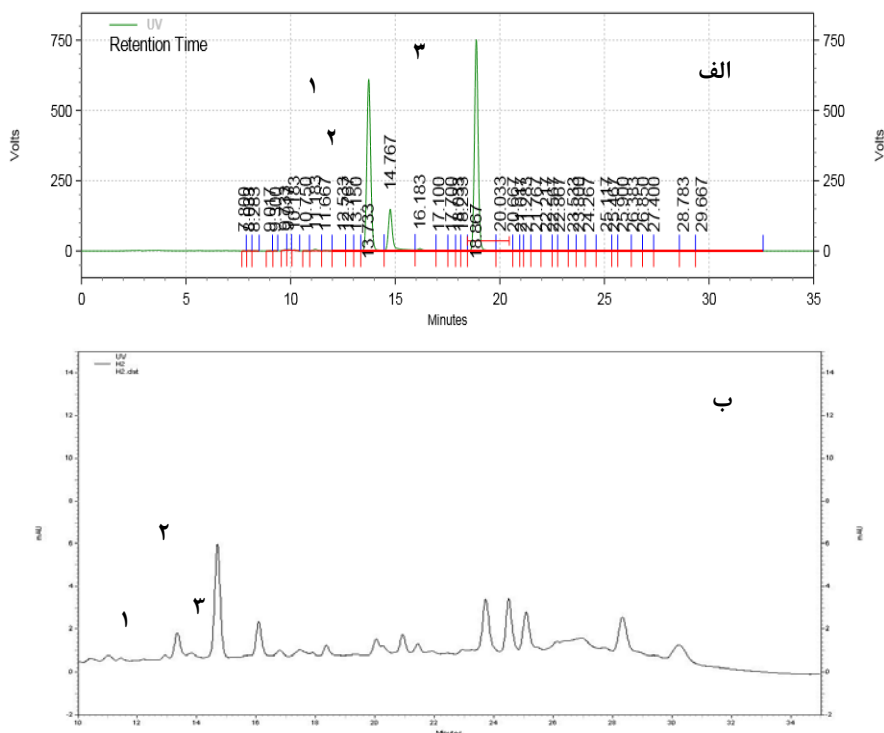
آزمایش دوم

تأثیر تیمار ترکیبی $YE+Ag^+$ و مدت زمان تیمار با YE بر رشد و محتوای تانیشینون ریشه‌های نوپدید: تیمار ترکیبی $YE+Ag^+$ و مدت زمان حضور (200 mg/L) YE در محیط کشت، تأثیر معنی‌داری ($P < 0/05$) بر رشد و محتوای تانیشینون ریشه‌ها داشت.

در مجموع، آزمایش اول نشان داد که تیمار ریشه‌ها با غلظت $25 \mu\text{M}$ از Ag^+ ، به مدت یک هفته، بهترین شرایط از نظر رشد ریشه و محتوای تانیشینون بود. در ادامه کار، این شرایط برای انجام آزمایش دوم انتخاب شد تا تأثیر تیمار ترکیبی $YE+Ag^+$ که در آن YE با فواصل زمانی متفاوت به کشت‌های حاوی Ag^+ اضافه می‌شد، بر رشد و محتوای تانیشینون ریشه‌ها بررسی شود.

بهبترین تیمار از نظر رشد و تولید تانن‌ها در ریشه) در شکل ۲ نشان داده شده است.

کروماتوگرام HPLC تانن‌ها را استاندارد و عصاره متانلی ریشه‌های نوپدید در حضور Ag^+ ($25 \mu M$) و $Ag7d+YE6.5d$ ($200 mg/L$) مربوط به تیمار ترکیبی

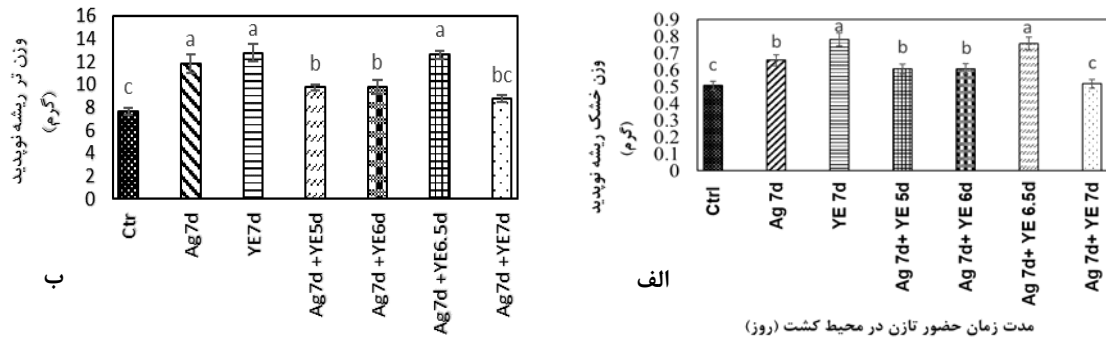


شکل ۲- الف: کروماتوگرام HPLC متعلق به تانن‌ها استاندارد و ب: کروماتوگرام HPLC عصاره متانلی ریشه‌های نوپدید گیاه *P. abrotanoides* متعلق به تیمار ترکیبی $Ag7d+YE6.5d$ ، Ag : نترات نقره با غلظت $25 \mu M$ ، YE : عصاره مخمر با غلظت $200 mg/L$ ؛ مدت زمان حضور تازن در محیط کشت (روز)، قله شماره ۱: کریپتوتانن‌ها، قله شماره ۲: تانن‌ها I و قله شماره ۳: تانن‌ها HIA

این دو تازن در محیط کشت نیز نتوانست افزایش معنی‌داری در مقدار این متابولیت ایجاد کند (شکل ۴ الف). به‌طور کلی، YE به‌صورت انفرادی و توأم با Ag^+ ، اثر تحریکی بر تولید T-I داشت (به استثنای تیمار $Ag7d+YE5d$) و این تأثیر با افزایش زمان تیمار از ۵ تا ۶/۵ روز، چشمگیرتر شد، اگرچه در پایان هفتمین روز (تیمار $Ag7d+YE7d$) مقدار آن تا حدی کاهش یافت. بنابراین بیشینه تراز T-I ($82/55 \mu g/g DW$) در تیمار $Ag7d+YE6.5d$) و کمینه تراز آن ($1/763 \mu g/g DW$) در کشت‌های کنترل فاقد تازن سنجش شد (شکل ۴ ب).

در حضور Ag^+ ، با طولانی شدن زمان تیمار با YE از ۵ روز تا ۶/۵ روز، وزن تر و خشک ریشه‌ها نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار داشت، اما پس از هفت روز، مجدداً وزن ریشه‌ها کاهش یافت. بیشترین وزن تر و خشک ریشه (به ترتیب $12/727$ و $0/781$ گرم) مربوط به کشت‌های حاوی YE به تنهایی ($YE7d$) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ترکیبی $Ag7d+YE6.5d$ نداشت. کم‌ترین وزن تر و خشک (به ترتیب $7/661$ و $0/506$ گرم) در کشت‌های کنترل فاقد تازن اندازه‌گیری شد (شکل ۳ الف و ب).

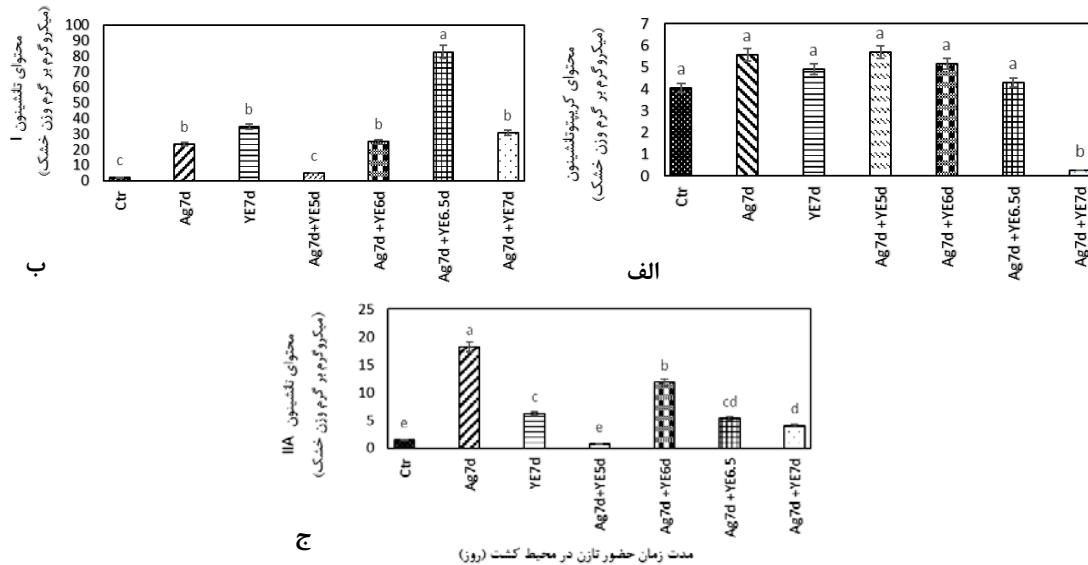
تیمارهای انفرادی Ag^+ و YE ، تأثیر معنی‌داری بر محتوای CT در ریشه‌های نوپدید نداشتند. حضور هم‌زمان



شکل ۳- تأثیر تیمارهای انفرادی و ترکیبی نیترات نقره و عصاره مخمر بر وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) ریشه‌های نوپدید *P. abrotanoides*. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. براساس آزمون دانکن، حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار ($P > 0.05$) می‌باشند. Ag: نیترات نقره با غلظت $25 \mu\text{M}$; YE: عصاره مخمر با غلظت 200 mg/L ; d: مدت زمان حضور تازن در محیط کشت (روز)

این ترتیب، بیشترین مقدار این متابولیت ($\mu\text{g/g DW}$) (۱۸/۲۲۳) مربوط به ریشه‌هایی بود که به مدت یک هفته فقط با Ag^+ تیمار شده بودند (شکل ۴ ج).

حضور توأم YE و Ag^+ ، در مقایسه با تیمار انفرادی Ag^+ ، موجب کاهش معنی‌دار در محتوای T-IIA شد. به علاوه، با افزایش زمان حضور YE در محیط (از ۶ تا ۷ روز)، کاهش معنی‌داری در مقدار این تانیشینون مشاهده شد. به



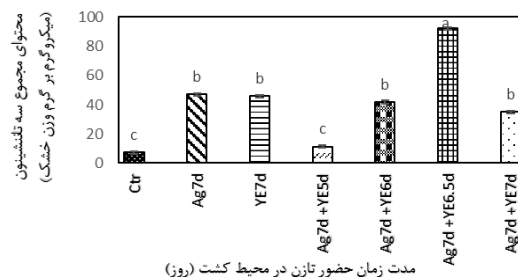
شکل ۴- تأثیر تیمارهای انفرادی و ترکیبی نیترات نقره و عصاره مخمر بر محتوای کریپتوتانیشینون (الف)، تانیشینون I (ب) و تانیشینون III (ج) در ریشه‌های نوپدید *P. abrotanoides*. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. براساس آزمون دانکن، حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار ($P > 0.05$) می‌باشند. Ag: نیترات نقره با غلظت $25 \mu\text{M}$; YE: عصاره مخمر با غلظت 200 mg/L ; d: مدت زمان حضور تازن در محیط کشت (روز)

تازن) فقط در تیمار Ag7d+YE6.5d مشاهده شد که در آن، بیشینه تراز تانیشینون‌ها معادل $92/133 \mu\text{g/g DW}$ بود. حداقل مقدار تانیشینون کل ($7/309 \mu\text{g/g DW}$) متعلق به کشت‌های کنترل فاقد تازن بود (شکل ۵).

اگرچه Ag^+ و YE به تنهایی تأثیر مثبت و معنی‌داری بر مجموع مقدار سه تانیشینون مورد بررسی داشتند (در مقایسه با کنترل فاقد تازن)، اما افزایش قابل ملاحظه در مقدار کل این ترکیبات (نسبت به تیمارهای انفرادی و کنترل فاقد

یون نقره به علت شباهتی که از نظر اندازه و حالت اکسیداسیون با یون مس دارد، برای اتصال به پذیرنده‌های هورمون اتیلن، با مس، که نقش کوفاکتور را در اتصال هورمون/پذیرنده دارد، رقابت می‌کند و به عنوان پادکردار (آنتاگونیست) با عملکرد اتیلن، موجب عدم حساسیت سلول‌ها و فروتنظیمی پاسخ به این هورمون می‌شود (۲۶ و ۴۴). به علاوه، تحریک بیوستتزی پلی‌آمین‌ها در سلول (۷ و ۲۹) و کنترل برون‌شارش و حرکت قطبی اکسین در بافت‌ها (۴۳) نیز، به عنوان مکانیسم‌های احتمالی تأثیر مثبت نیترات نقره بر باززایی و رشد اندام‌های گیاهی گزارش شده‌اند.

مطالعه تأثیر Ag^+ به عنوان یک تازن غیرزیستی، و YE به عنوان یک تازن زیستی، بر رشد و تولید تانن‌تینون در ریشه‌های نوپدید گیاه برازامل، محدود به گزارش‌ها و همکاران (۲۰۱۵) و نتایج پژوهش حاضر است. این محققان، تأثیر معنی‌داری از کاربرد انفرادی این دو تازن را بر رشد ریشه‌ها گزارش نکردند (۵۵)، اما بررسی پیش رو نشان داد که Ag^+ و YE، هرکدام به تنهایی، رشد ریشه‌ها را به طرز معنی‌داری بهبود بخشیدند و کاربرد توأم این دو تازن نیز، بسته به مدت زمان حضور YE در محیط کشت، تأثیر مثبتی بر رشد ریشه‌های نوپدید داشت و در بهترین حالت، (تیمار $Ag7d+YE6.5d$) وزن خشک ریشه‌ها $1/5$ برابر ریشه‌های کنترل بود. سایر گزارش‌ها نیز، حاکی از نتایج متفاوت در مورد تأثیر این دو تازن بر رشد ریشه‌های نوپدید یا ریشه‌های موئین می‌باشند. برای مثال، طبق گزارش ژانگ و همکاران (۲۰۰۴)، تیمار ریشه‌های موئین گیاه *S. miltiorrhiza* با Ag^+ ($15-40 \mu M$)، به صورت وابسته به غلظت، رشد ریشه‌ها را کاهش داد (۵۶). به طور مشابه، کاهش زیتوده ریشه‌های موئین *S. castanea* Diels f. *tomentosa* Stib نیز در غلظت‌های $15-45 \mu M$ از این تازن گزارش شد (۲۷). در مقابل، طبق یافته‌های یانگ و همکاران (۲۰۱۸)، تیمار با Ag^+ ($15 \mu M$) اثر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه موئین *S. miltiorrhiza* نداشت، اما



مدت زمان حضور تازن در محیط کشت (روز)

شکل ۵- تأثیر تیمارهای انفرادی و ترکیبی نیترات نقره و عصاره مخمر بر مجموع محتوای سه نوع تانن‌تینون در ریشه‌های نوپدید *P. abrotanoides*. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. براساس آزمون دانکن، حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P > 0.05$). Ag: نیترات نقره با غلظت $25 \mu M$; YE: عصاره مخمر با غلظت $200 mg/L$; d: مدت زمان حضور تازن در محیط کشت (روز)

بحث

فلزات سنگین، تولید ROS را تحریک می‌کنند و موجب القای تنش اکسیداتیو می‌شوند و این امر در شرایط کنترل شده، می‌تواند راهبرد موثری برای تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی باشد (۲). نیترات نقره به دلیل جلوگیری از عملکرد اتیلن تولید شده در بافت‌ها و ممانعت از بروز پاسخ‌های وابسته به آن (نظیر به تأخیر انداختن یا کند کردن رشد، تسریع پیری)، در کشت بافت و اندام‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یون نقره با تداخل در عملکرد اتیلن، بیوستتزی متابولیت‌های ثانوی را نیز، با یک روش وابسته به غلظت، تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴). در دسترس بودن، حلالیت در آب، پایداری و فقدان سمیت در غلظت‌های موثر بر باززایی گیاهان، موجب شده است که این ماده به طور گسترده توسط بسیاری از محققان برای تحریک رشد، ریخت‌زایی و باززایی گیاهان به کار گرفته شود (۴ و ۲۶). تأثیر مثبت نیترات نقره، بر باززایی و رشد ریشه‌های نوپدید، در کشت‌های درون شیشه‌ای گیاهان مختلف، گزارش شده و در این رابطه، غلظت بهینه نیترات نقره و گستردگی و شدت پاسخ گونه‌های گیاهی مختلف، متفاوت بوده است (۱۳، ۲۹، ۳۴ و ۴۲).

توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۰)، محتوای تانیشون (مجموع CT، T-I و T-IIA) را در کشت‌های سلولی این گونه، تا ۱۱/۵ برابر مقدار کشت‌های کنترل ارتقا دادند (۶۱). به گزارش کای و همکاران (۲۰۱۲) نیز، غلظت $30 \mu\text{M}$ از Ag^+ ، پس از ۹ روز، مقدار کل تانیشون (CT+T-IIA) ریشه‌های موئین را تا ۲/۲ برابر کنترل افزایش داد، در حالی که غلظت 100 mg/L از YE در مدت زمان کوتاه‌تر (۶ روز) تأثیر بیشتری (۳/۹ برابر کنترل)، بر انباشت تانیشون داشت (۲۳). در یک بررسی دیگر، 100 mg/L YE، تأثیر قوی‌تری بر مجموع مقدار CT، T-I و T-IIA در کشت ریشه موئین داشت و محتوای تانیشون کل را تا ۳/۱ برابر کنترل افزایش داد، اما در حضور $30 \mu\text{M}$ Ag^+ ، مقدار کل تانیشون به ۱/۲ برابر ریشه‌های کنترل رسید (۱۸). اخیراً در یک تحقیق مشابه، افزایش ۲/۳ و ۲/۵ برابری در تراز تانیشون کل (مجموع CT، T-I، T-II و D-TI)، به ترتیب در حضور 100 mg/L YE و $30 \mu\text{M}$ Ag^+ گزارش شده است (۴۷). در مقابل، در گزارش زینگ و همکاران (۲۰۱۵)، بالاترین تراز برای مجموع تانیشون‌های فوق، در غلظت کمتری از $15 \mu\text{M}$ Ag^+ به دست آمد (۴۸).

در بررسی حاضر، تأثیر Ag^+ بر T-IIA (۱۲/۳۱ برابر کنترل)، بسیار بیشتر از تأثیر YE (۴/۲ برابر کنترل) بود. در حالی که، هر دو تازن تأثیر افزایشدهنده مشابهی بر محتوای T-I داشتند. مقادیر مربوط به CT به‌طور مشخصی کمتر از دو تانیشون دیگر بود و تیمارها، تأثیر معنی‌داری بر تولید آن نداشتند. تأثیر بهتر Ag^+ بر تجمع T-IIA و YE بر انباشت CT در ریشه‌های نوپدید برازمبل (۵۵)، ریشه‌های موئین *S. castanea* (۲۷) و ریشه‌های موئین *S. miltiorrhiza* (۵۱) نیز گزارش شده است. یافته‌های پژوهش پیش رو، مشابه با نتایج گزارش یانگ و همکاران (۲۰۱۸) در گونه *S. miltiorrhiza* (۵۱) نشان داد که T-I به یک میزان تحت تأثیر Ag^+ و YE قرار می‌گیرد. در مقابل، به گزارش جی و وو (۲۰۰۵)، 100 mg/L YE، در مقایسه با $30 \mu\text{M}$

یک روز بعد از تیمار، باعث افزایش وزن خشک ریشه‌های موئین در گونه *S. castanea* شد (۵۱). به گزارش چن و همکاران (۲۰۰۱)، اثر تحریکی YE بر رشد ریشه موئین *S. miltiorrhiza* موجب شد که تولید زیتوده از $3/9 \text{ g/L}$ به $7/3 \text{ g/L}$ بهبود یابد (۹). بهبود رشد ریشه موئین *S. castanea* و *miltiorrhiza* در تیمار 200 mg/L از این تازن نیز گزارش شده است (۵۱). برخلاف موارد فوق، شی و همکاران (۲۰۰۷)، کاهش وزن تر و خشک ریشه‌های موئین *S. miltiorrhiza* را در غلظت 100 mg/L از YE گزارش کردند (۴۰). کاهش رشد ریشه‌های موئین این گونه، تحت تأثیر تیمارهای انفرادی و یا ترکیبی از 100 mg/L YE و $30 \mu\text{M}$ Ag^+ توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (۱۸ و ۴۷).

بررسی منابع نشان می‌دهد که استفاده از انواع تازن‌های زیستی نظیر YE و تازن‌های غیرزیستی مانند Ag^+ موجب بهبود تولید تانیشون در برخی گونه‌های *Salvia* می‌شود و بسته به نوع و غلظت تازن، دوره زمانی تیمار با تازن و همچنین حضور انفرادی یا توأم آن‌ها، درجات متفاوتی از افزایش تولید برای انواع مختلف تانیشون گزارش شده است (۲۷، ۵۱ و ۶۱). در پژوهش حاضر، محتوای انواع تانیشون در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمبل، تحت تأثیر تیمارهای انفرادی و ترکیبی YE و Ag^+ به‌طور متفاوتی تغییر کرد. در کاربرد انفرادی تازن‌ها، Ag^+ محتوای تانیشون کل (مجموع CT، T-I و T-IIA) را تا ۶/۴ و YE تا ۶/۲ برابر ریشه‌های کنترل افزایش داد. ذاکر و همکاران (۲۰۱۵) نیز، در حضور غلظت‌های مشابه از Ag^+ و YE، دریافتند که مجموع مقدار CT و T-IIA در ریشه‌های نوپدید برازمبل، به ترتیب تا حدود ۳ و ۳/۵ برابر کشت‌های کنترل بهبود می‌یابد (۵۵). بخش اعظم تحقیقات انجام شده در مورد تأثیر تازن‌ها بر کمیت و کیفیت تانیشون‌ها، مربوط به گونه *S. miltiorrhiza* می‌باشد که جهت مقایسه با نتایج مطالعه حاضر، در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود. تیمارهای انفرادی $25 \mu\text{M}$ Ag^+ و 100 mg/L YE،

حضور آنان در محیط کشت است (۲۷ و ۳۲). بررسی منابع نشان داد که در اغلب موارد، هنگام کاربرد ترکیبی تازن‌ها، این مواد به‌طور هم‌زمان به کشت‌های ریشه افزوده شده‌اند. در تحقیق حاضر، تأثیر فاصله زمانی بین تیمار با دو نوع تازن مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که هم‌زمان یا غیر هم‌زمان بودن تیمارهای ترکیبی، اثر متفاوتی بر پروفایل تانیشینون‌ها دارد. استفاده از YE، ۱۲ ساعت پس از کاربرد Ag^+ (Ag7d+YE6.5d)، مقدار T-I را بشدت افزایش داد اما موجب کاهش T-IIA شد. طبق گزارش جی و وو (۲۰۰۵)، افزودن Ag^+ (۱۰۰ $\mu g/ml$) YE به کشت ریشه‌های مویین *S. miltiorrhiza* پس از پیش تیمار با Ag^+ (۳۰ μM)، تولید CT، T-I و T-IIA را بهبود بخشید و با افزایش فاصله زمانی بین کاربرد دو تازن، (از ۱۲ تا ۴۸ ساعت) محتوای تانیشینون‌ها به‌طرز پیش‌رونده‌ای افزایش یافت. به عقیده آنان، پیش تیمار با Ag^+ که مانند یک تنش غیرزیستی عمل می‌کند، سلول‌ها را برای پاسخ به YE، به عنوان یک عامل تنش‌زای زیستی، حساس‌تر کرده، پاسخ متابولیکی قوی‌تری را به راه می‌اندازد (۱۸).

تفاوت در پاسخ‌های متابولیکی داده شده به تازن‌ها، آن‌چنان که در نتایج پژوهش حاضر نیز مشاهده شد، احتمالاً ناشی از تأثیر متفاوت این عوامل بر بیان ژن آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوستز تانیشینون‌ها می‌باشد. براساس تحقیقات متعدد، ژن‌هایی از مسیر که تحت تأثیر تازن غیرزیستی Ag^+ قرار می‌گیرند، لزوماً همان ژن‌های پاسخ دهنده به تازن زیستی YE نیستند و شدت تأثیر پذیری آن‌ها نیز در مواجهه با این دو نوع محرک متفاوت، یکسان نمی‌باشد (۲۳، ۲۴ و ۵۱). برای مثال، به گزارش جی و وو در سال ۲۰۰۵، پیش تیمار ریشه‌های مویین *S. miltiorrhiza* با Ag^+ موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر MVA شد و افزودن YE یک و دو روز پس از تیمار Ag^+ (تیمار ترکیبی)، با القای فعالیت آنزیم‌های مسیر MEP، محتوای تانیشینون ریشه‌ها را بهبود بخشید (۱۸). مطابق با یافته‌های ژائو و همکاران (۲۰۱۴)، تحت تیمار ترکیبی Ag^+ + YE،

Ag^+ ، تأثیر قوی‌تری بر تجمع CT، T-I و T-IIA در ریشه‌های مویین *S. miltiorrhiza* داشت (۱۸).

برتری تیمارهای ترکیبی از تازن‌ها، به‌ویژه ترکیب تازن‌های زیستی با انواع غیرزیستی، نسبت به تیمارهای انفرادی، در جهت بهبود تولید تانیشینون‌ها در منابع مطرح شده است و در اغلب موارد، کاربرد YE به عنوان تازن زیستی در کنار یک تازن غیرزیستی نظیر نقره، کبالت یا کادمیم، اثر هم‌کرداری (سینرژسم) بر تولید تانیشینون‌ها دارد (۳۲ و ۶۱). برای مثال، در کشت‌های ریشه مویین *S. miltiorrhiza*، تیمار ترکیبی Ag^+ + YE با ثابت سینرژسم ۳، بیشترین تأثیر را بر T-I داشت و ترکیب YE+Co، با ثابت سینرژسم ۲/۱، موجب تقویت تولید T-IIA شد (۵۰). در یک بررسی دیگر، تیمار ترکیبی Ag^+ + YE، مجموع مقدار CT و T-IIA در ریشه‌های مویین همین گیاه را تا حدود ۶ برابر تیمار Ag^+ به تنهایی و بیش از ۳ برابر تیمار انفرادی YE، ارتقا داد (۲۳). قابل ذکر است که در این نوع مطالعات، همه ترکیب‌های ممکن از تازن‌ها، لزوماً اثر تحریک کننده بر تجمع تانیشینون ندارند. به‌کارگیری ترکیب‌های دوتایی و سه‌تایی از Ag^+ ، YE و متیل‌جاسمونات (MeJA) در کشت ریشه مویین *S. miltiorrhiza*، توسط چنگ و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که فقط تیمارهای ترکیبی واجد Ag^+ ، به صورت هم‌کردار انباشت تانیشینون را افزایش می‌دهند. به علاوه، در برخی تیمارهای ترکیبی، در مقایسه با تیمارهای انفرادی، تولید انواعی از تانیشینون‌ها ممانعت شد (۱۰). در بررسی پیش رو، هنگامی که YE، ۱۲ ساعت پس از Ag^+ (Ag7d+YE6.5d) به کشت ریشه‌های نوپدید برازمل اضافه شد، مقدار تانیشینون کل به ۲ برابر تیمارهای انفرادی این دو تازن ارتقا یافت که ناشی از افزایش قابل‌توجه T-I (۳/۵ برابر تیمار Ag^+ و ۲/۴ برابر تیمار YE) بود اما، هیچ‌کدام از تیمارهای ترکیبی، تیمار بهینه برای انباشت CT و T-IIA نبودند.

تأثیر تازن‌ها بر تولید تانیشینون در ریشه‌ها، تابع زمان

(۳۷) که پاسخ‌های دفاعی را در گیاهان القا می‌نمایند. تیمار ریشه‌های موئین *S. multiorrhiza* با YE، تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) را به‌عنوان مولکول‌های علامتی تحریک می‌کند. نقش نیتريت اکسید در تحریک بیان ژن‌های مسیر MVA و MEP و انباشت تانن‌ها به‌ویژه CT و T-IIA (۲۸) و میانجی‌گری H_2O_2 و آنیون سوپراکسید به‌عنوان مولکول‌های علامتی در تجمع تانن‌ها اثبات شده است (۵۳). طبق گزارش وانگ و همکاران (۲۰۱۶)، ۳ تا ۵ دقیقه پس از اعمال تیمار ترکیبی $YE+Ag^+$ ، غلظت کلسیم سیتوپلاسمی در ریشه‌های موئین *S. multiorrhiza* بشدت زیاد شد و با القای مسیر علامت‌رسانی وابسته به کلسیم و کالمودولین و تحریک تولید ROS، سنتز تانن‌ها و اسیدهای فنلی بهبود یافت (۴۶). بررسی مکانیسم تأثیر Ag^+ و YE بر تولید متابولیت‌های ثانوی، مسیرهای علامت‌دهی وابسته به ROS، کلسیم و آبشارهای پروتئین‌کینازی (MAPKs) را به‌عنوان اصلی‌ترین وقایع مولکولی در پاسخ به تازن معرفی کرده است (۳۶). از طرف دیگر، مسیرهای علامتی به‌راه افتاده توسط این دو تازن، با ترارسانی علامت هورمون‌های گیاهی، نظیر جاسمونیک اسید و اتیلن، نیز برهم‌کنش دارند (۳۵، ۳۶). بنابراین، ترارسانی علامت‌دهی شده توسط تازن‌ها، شبکه‌ای چندجزیی از مسیرهای متعدد موازی و متقاطع است که با اثرات هم‌کردار و یا پادکردار خود، بیان ژن‌ها و پاسخ‌های متابولیکی متنوعی را هدف‌گیری و تنظیم می‌کند. این احتمال وجود دارد که تحریک تولید تانن‌ها توسط YE و Ag^+ ، در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمل نیز، از طریق القای مسیرهای علامت‌دهی و بیان ژن‌های بیوسنتزی، مشابه با آن چه برای گیاه *S. multiorrhiza* شناخته شده است، میانجی‌گری شود.

نتیجه‌گیری

استفاده از نترات نقره به مدت یک هفته بدون ایجاد علائم سمیت، توانست رشد و زیتوده ریشه‌های نوپدید برازمل

ابتدا یک فراتنظیمی اولیه ولی موقتی در ژن‌های مسیر MVA و به دنبال آن، افزایش تدریجی اما پایدار ژن‌های مسیر MEP، و آنزیم‌های پائین دست مسیر که بعد از تولید GGPP عمل می‌کنند، روی داد که با افزایش محتوای تانن‌ها در ریشه‌های موئین *S. multiorrhiza*، منطبق بود (۱۷). افزایش محتوای CT توسط YE، در مقایسه با انباشت T-IIA تحت تأثیر Ag^+ ، در ریشه‌های موئین *S. castanea*، به تفاوت در نحوه تأثیر این دو تازن بر بیان دو ژن متوالی مسئول سنتز GGPP نسبت داده شد (۲۷).

تغییر محتوای تانن‌ها (افزایش یا حتی کاهش) تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی طبیعی یا القاء شده توسط تازن‌ها، نتیجه فراتنظیمی (یا فروتنظیمی) هماهنگ ژن‌های خاصی در مسیر است که با دخالت عوامل رونویسی (TFs) انجام می‌شود. در سال‌های اخیر، TFs مرتبط با مسیر بیوسنتز تانن‌ها تا حد زیادی در *S. multiorrhiza* و *S. castanea* شناسایی شده و رابطه میان طرح بیان آن‌ها با بیوسنتز تانن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. این مطالعات نشان داده‌اند که در پاسخ به نقره و عصاره مخمر، فراتنظیمی یا فروتنظیمی TFs متعلق به خانواده‌های WRKY (۱۷)، bZIP (۵۹)، MYB و bHLH (۴۹، ۵۷)، بیان ژن‌های کلیدی مسیر و محتوای انواع تانن‌ها را در ریشه‌های موئین تحت تأثیر قرار می‌دهد.

تازن‌های زیستی و غیرزیستی در حقیقت از تنش‌های محیطی واقعی تقلید می‌کنند و کاربرد هم‌زمان آن‌ها در کشت‌های درون شیشه گیاهان، به‌صورتی مشابه با عوامل محیطی زنده و غیرزنده، مسیرهای علامتی متعدد و متفاوتی را به‌راه می‌اندازد (۳۶). تأثیر تحریکی YE بر تولید متابولیت‌های ثانوی، ناشی از حضور اجزای پپتیدی و پلی‌ساکاریدی مختلف از جمله کیتین، الیگومرهای N-استیل گلوکزآمین، بتاگلوگان‌ها، گلیکوپپتیدها، ارگوسترول و کاتیون‌هایی مانند کلسیم، کبالت و روی در آن است (۶)

متناسب با اهداف پژوهشی و کاربردی تغییر داد و تراز نوع (انواع) خاصی از تان‌شینون را به‌طور ویژه بهبود بخشید.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر، در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد و اعتبار آن از محل طرح ۳/۴۰۴۳۲ تأمین گردید. شناسایی تان‌شینون‌ها توسط دستگاه HPLC در آزمایشگاه شیمی دانشکده علوم دانشگاه شاهد انجام شد.

را بهبود بخشید و افزودن عصاره مخمر به محیط کشت، ۱۲ ساعت پس از شروع تیمار با نقره، این تأثیر را تقویت نمود و مقدار T-I و مجموع محتوای سه نوع تان‌شینون مورد بررسی را به حداکثر رساند. نتایج پژوهش حاضر، ضمن تأیید تأثیر مثبت تازن غیرزیستی نیترات نقره و تازن زیستی عصاره مخمر، بر تولید تان‌شینون در گیاه برازمل، نشان داد که با به‌کارگیری روشی مشابه با پرابمینگ بذر، یعنی پیش تیمار ریشه‌ها با تازن غیرزیستی و به‌دنبال آن افزودن تازن زیستی، با فواصل زمانی متفاوت، می‌توان علاوه بر افزایش محتوای کل تان‌شینون‌ها، پروفایل تان‌شینونی ریشه‌ها را نیز

منابع

- ۱- جم‌زاد، ز.، ۱۳۹۱. فلور ایران، شماره ۷۶ تیره نعناع، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، چاپ اول، صفحات ۲۷۹-۲۸۹.
- ۲- شبانی، ل.، و صغیرزاده، ب.، ۱۳۹۶. بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در کشت ساقه (*Artemisia annua* L.) تحت تنش نیترات نقره، مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۰، شماره ۱، صفحات ۱۳۱-۱۱۹.
- ۳- فرج تبار، ف.، ۱۳۹۶. القای ریشه‌های موین در گیاه دارویی برازمل (*Perovskia abrotanoides* (Karel.) و بررسی
- ۵- Ashraf, S. N., Zubair, M., Rizwan, k., Bakhsh Tareen, R., Rasool, N., Zia-Ul-Haq, M., and Ercisli, S., 2014. Compositional studies and biological activities of *Perovskia abrotanoides* Kar. oils. *Biological Research*, 47 (1), PP: 12, doi: 10.1186/0717-6287-47-12.
- ۶- Baenas, N., García-Viguera, C., and Moreno, D. A., 2014. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods, *Molecules*, 19 (9), PP: 13541-13563.
- ۷- Batista, D. S., Dias, L. L. C., Macedo, A. F., Rego, M. M., Rego, E. R., Floh, E. I. S., and Otoni, W. C., 2013. Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.), *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49 (6), PP: 759-764.
- ۸- Buchwald, W., and Mrozikiewics, P. M., 2007. Influence of development stage on the content of biologically active compounds of *Salvia miltiorrhiza* Bunge roots, *Herba Polonica*, 53 (4), PP: 15-19.
- ۹- Chen, H., Chena, F., Chiu, F. C., and Lo, C. M., 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*, *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (1), PP: 100-105.
- ۱۰- Cheng, Q., He, Y., Li, G., Liu, Y., Gao, W., and Huang, L., 2013. Effects of combined elicitors on tanshinone metabolite profiling and SmCPS expression in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Molecules*, 18 (7), PP: 7473-7485.
- ۱۱- Cui, X. H., Chakrabarty, D., Lee, E. J., and Paek, K. Y., 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L., in a bioreactor, *Bioresource Technology*, 101 (12), PP: 4708-4716.
- ۱۲- Drew, B. T., Gonzales-Gallegos, J. G., G., Xiang, C. L., Kriebel, R., Drummond, C. P., Walked, J. B., and Sytsma, K. J., 2017. *Salvia* united: The greatest good for the greatest number, *Taxon*, 66 (1), PP: 133-145.
- ۱۳- El-Ashry, A. A., Gabr, A. M. M., Girgis, N. D., and El-Bahr, M. K., 2018. Influence of silver

- nitrate on enhancing *in vitro* rooting of *Gardenia jasminoides* Ellis. Journal of Environmental Science and Technology, 11 (5), PP: 238–245.
- 14- Fan, G. W., Gau, X. M., Wang, H., Zhu, Y., Zhang, J., Hu, L. M., Su, Y. F., Kang, L. Y., and Zhang, B. L., 2009. The anti-inflammatory activities of tanshinone IIA, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of Inos, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 113(3–5), PP: 275–280.
- 15- Fang, J., Xu, S. W., Wang, P., Tang, F. T., Zhou, S. G., Gao, J., Chen, J. W., Huang, H. Q., and Liu, P. Q., 2010. Tanshinone II-A attenuates cardiac fibrosis and modulates collagen metabolism in rats with renovascular hypertension. Phytomedicine, 18 (1), PP: 58–64.
- 16- Fazal, H., Abbasi, B. H., and Ahmad, N., 2014. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. Applied Biochemistry and Biotechnology, 174 (6), PP: 2086–2095.
- 17- Gao, W., Sun, H. X., Xiao, H., Cui, G., Hillwig, M. L., Jackson, A., Wang, X., Shen, Y., Zhao, N., Zhang, L., Wang, X. J., Peters, R. J., and Huang, L., 2014. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. BMC Genomics, 15: 73 p. doi: 10.1186/1471-2164-15-73.
- 18- Ge, X., and Wu, J., 2005. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor, Plant Science, 168 (2), PP: 487–491.
- 19- Ghafourian, M., and Mazandarani, M., 2017. Ethnopharmacology, ecological requirements, antioxidant and antimicrobial activities of *Perovskia abrotanoides* Karel. extract for vaginal infections from Semnan province. International Journal of Womens Health and Reproduction Sciences, 5 (4), PP: 295–300.
- 20- Gupta, S. K., Liu, R. B., Liaw, S. Y., Chan, H. S., and Tsay, H. S., 2011. Enhanced tanshinone production in hairy roots of '*Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture. Botanical Studies, 52 (4), PP: 435–443.
- 21- Hahn, M. G., and Albersheim, P., 1978. Host-Pathogen Interactions XIV., Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract, Plant Physiology, 62 (1), PP: 107–111.
- 22- Jiang, Z., Gao, W., and Huang, L., 2019. Tanshinones, critical pharmacological components in *Salvia miltiorrhiza*, Frontiers in Pharmacology, 10, article 202, doi: 10.3389/fphar.2019.00202.
- 23- Kai, G. Y., Liao, P., Xu, H., Wang, J., Zhou, C. C., Zhou, W., Qi, Y. P., Xiao, J. B., Wang, Y. L., and Zhang, L., 2012. Molecular mechanism of elicitor-induced tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures, Acta Physiologiae Plantarum, 34 (4), PP: 1421–1433.
- 24- Kai, G., Xu, H., Zhou, C., Liao, P., Xiao, J., Luo, X., You, L., and Zhang, L., 2011. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures, Metabolic Engineering, 13 (3), PP: 319–327.
- 25- Kim, E. J., Jung, S. N., Son, K. H., Kim, S. R., Ha, T. Y., Park, M. G., Jo, I. G., Park, J. G., Choe, W., Kim, S. S., and Ha, J., 2007. Antidiabetes and antiobesity effect of cryptotanshinone via activation of AMP-activated protein kinase, Molecular Pharmacology, 72 (1), PP: 62–72.
- 26- Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G.A. (2009) AgNO₃-A potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic Journal of Biotechnology, 12 (2), doi: 10.2225/vol12-issue2-fulltext-1.
- 27- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, M., Yan, X., Zhu, Y., 2016. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag⁺, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation, Protoplasma, 253 (1), PP: 87–100.
- 28- Liang, Z. S., Yang, D. F., Liang, X., Zhang, Y. J., Liu, Y., and Liu, F. H., 2012. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, Plant Cell Reports, 31 (5), PP: 873–883.
- 29- Mahmoud, O., and Kosar, M., 2014. *In vitro* achievement of strawberry roots formation using Ag (NO₃), American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 14 (11), PP: 1281–1286.
- 30- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3), PP: 473–479.

- 31- Murthy, H. N., Hahn, E. J., and Paek, K. Y., 2008. Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24 (5), PP: 711–716.
- 32- Naik, M., and Al-Khayri, J. M., 2016. Abiotic and biotic elicitors—Role in secondary metabolites production through *in vitro* cultures of medicinal plants. In: *Abiotic and Biotic Stress in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*, Editors Shanker, A. and Shanker, C., Publisher BoD—Books on Demand, PP: 247–278.
- 33- Nassiri-Asl, M., Parvardeh, S., Niapour, M., and Hosseinzadeh, H., 2002. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Perovskia abrotanoides* aerial part extracts in mice and rats, *Journal of Medicinal Plants*, 1 (3), PP: 294–295.
- 34- Petrova, M., Zayova, E., and Vitkova, A., 2011. Effect of silver nitrate on *in vitro* root formation of *Gentiana lutea*. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (6), PP: 53–58.
- 35- Rahimi, S., Devi, B. S. R., Khorolragchaa, A., Kim, Y. J., Kim, J. H., Jung, S. K., and Yang, D. C., 2014. Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 61 (6), PP: 811–817.
- 36- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioski, M., Cusidó, R. M., and Palazon, K., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21 (2), PP: 182, doi: 10.3390/molecules21020182.
- 37- Rhee, H. S., Cho, H. Y., Son, S. Y., Yoon, S. Y. H., and Park, J. M., 2010. Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101 (3), PP: 295–302.
- 38- Safaei-Ghomi, J., and Batooli, H., 2010. Determination of bioactive molecules from flowers, leaves, stems and roots of *Perovskia abrotanoides* Karel growing in central Iran by nano scale injection, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5 (2), PP: 551–556.
- 39- Sairafianpour, M., Christensen, J., Staerk, D., Budnik, B. A., Kharazmi, A., Bagherzadeh, K., and Jaroszewski, G. W., 2001. Lishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. *Journal of Natural Products*, 64 (11), PP: 1398–1403.
- 40- Shi, M., Kwok, K. W., and Wu, J. Y., 2007. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 46 (4), PP: 191–196.
- 41- Shilpa, K., Varun, K., and Lakshmi, B. S., 2010. An alternate method of natural drug production, eliciting secondary metabolite production using plant cell culture, *Journal of Plant Sciences*, 5 (3), PP: 222–247.
- 42- Steinitz, B., Barr, N., Tabib, Y., Vaknin, Y., and Bernstein, N., 2010. Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. *Plant Cell Reports*, 29 (11), PP: 1315–1323.
- 43- Strader, L. C., Beisner, E. R., and Bartel, B., 2009. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *The Plant Cell*, 21(11), PP: 3585–3590.
- 44- Taha, R. A., and Hassan, S. A. M., 2016. Studies on silver nitrate impact on jojoba *in vitro* culture, *International Journal of PharmTech Research* 9 (8), PP: 77–83.
- 45- Tareen, R. B., Bib, T., Khan, M. A., Ahmad, M., and Zafar, M., 2010. Indigenous knowledge of folk medicine by the women of Kalat and Khuzdar Regions of Balochistan, Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*, 42 (3), PP: 1465–1485.
- 46- Wang, Y., Shen, Y., Shen, Z., Zhao, L., Ning, D., Jiang, C., Zhao, R., and Huang, L., 2016. Comparative proteomic analysis of the response to silver ions and yeast extract in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures, *Plant Physiology and Biochemistry* 107, PP: 364–373.
- 47- Wei, T., Gao, Y., Deng, K., Zhang, L., Yang, M., Liu, X., Qi, C., Wang, C., Song, W., Zhang, Y., and Chen, C., 2019. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures by metabolic engineering, *Plant Methods*, 15, article 53, doi: 10.1186/s13007-019-0439-3.
- 48- Xing, B., Yang, D., Guo, W., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., and Liu, Y., 2015. Ag⁺ as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Molecules*, 20 (1), PP: 309–324.

- 49- Xing, B., Yang, D., Yua, H., Zhang, B., Yan, K., Zhang, X., Hana, R., and Liang, Z., 2018. Overexpression of SmbHLH10 enhances tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, *Plant Science*, 276, PP: 229–238.
- 50- Yan, Q., Hu, Z. D., and Wu, J. Y., 2006. Synergistic effects of biotic and abiotic elicitors on the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 31 (3), PP: 188–191.
- 51- Yang, D., Fang, Y., Xia, P., Zhang, X., and Liang, Z., 2018. Diverse responses of tanshinone biosynthesis to biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa*, *Gene*, 643, PP: 61–67.
- 52- Yang, D., Ma, P., Liang, X., Liang, Z., Zhang, M., Shen, S., Liu, H., and Liu, Y., 2012. Metabolic profiles and cDNA-AFLP analysis of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* Diel f. *tomentosa* Stib. *PLOS ONE*, 7 (1) e29678, doi: 10.1371/journal.pone.0029678.
- 53- Yang, D., Sheng, D., Duan, Q., Liang, X., Liang, Z., and Liu, Y., 2012. PEG and ABA trigger the burst of reactive oxygen species to increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31 (4), PP: 579–587.
- 54- Zaker, A., Asili, J., Abrishamchi, P., Tyarani-Najaran, Z., and Mousavi, S. H., 2017. Cytotoxic and apoptotic effects of root extract and tanshinones isolated from *Perovskia abrotanoides* kar, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20 (12), PP: 1377–1384.
- 55- Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, H., and Wawrosch, C. H., 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel, *Industrial Crops and Product*, 67, PP: 97–102.
- 56- Zhang, C. H., Yan, Q., Cheuk, W. K., and Wu, j., 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. *Planta Medica*, 70 (2), PP: 147–151.
- 57- Zhang, J., Zhou, L., Zheng, X., Zhang, J., Yang, L., Tan, R., and Zhao, S., 2017. Overexpression of SmMYB9b enhances tanshinone concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Reports*, 36 (8), PP: 1297–1309.
- 58- Zhang, Y., Jiang, P., Ye, M., Kim, S. H., Jiang, C., and Lu, J., 2012. Tanshinones: Sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (10), PP: 13621–13666.
- 59- Zhang, Y., Xu, Z., Ji, A., Luo, H., Song, J., 2018. Genomic survey of bZIP transcription factor genes related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8 (2), PP: 295–305.
- 60- Zhao, J., Lou, J., Mou, Y., Li, P., Wu, J., and Zhou, L., 2011. Diterpenoid tanshinone and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activities. *Molecules*, 16 (3), PP: 2259–2267.
- 61- Zhao, J. L., Zhou, L. G., and Wu, J. Y., 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (1), PP: 137–144.
- 62- Zhong, G. X., Li, P., Zeng, L. J., Guan, J., Li, D. Q., and Li, S. P., 2009. Chemical characteristics of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) collected from different locations in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), PP: 6879–6887.

***In vitro* production of tanshinones in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Kar. under Ag⁺ ion and yeast extract elicitation**

Bayesteh B.¹, Abrishamchi P.¹, Asili J.² and Zaker A.³

¹ Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

² Dept. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I. R. of Iran.

³ Dept. of Biology Education, Farhangian University, Tehran, I. R. of Iran.

Abstract

Perovskia abrotanoides Kar. is a perennial species, which belongs to Lamiaceae family, some pharmaceutical properties (antimicrobial, anti-diabetes, anti-inflammatory and anti-cancer activities) attributed to this plant roots are related to the presence of diterpenoid tanshinones. This study was aimed to investigate the effect of single and combination treatments of AgNO₃ (Ag⁺) and yeast extract (YE) on growth and tanshinone production in adventitious root cultures of *P. abrotanoides*. Leaf explants were induced to form adventitious roots on a solid MS medium containing 2 mg/L NAA. Regenerated roots were subsequently transferred to a liquid MS medium, for multiplication. In the first experiment, adventitious roots were treated with 25 μM Ag⁺ for 24, 48 and 168 hours (one week), and the one-week treatment was chosen as the best condition to promote root growth and tanshinone production. In combination treatments, 12, 24 and 48 hours after Ag⁺ pre-treatment, 200 mg/L YE was added to the cultures, and roots were harvested one week after the first elicitation. Single treatments improved root growth and tanshinone production (six-fold increase compared with the control). Maximum amount of tanshinone-IIA (12 times higher than control) was obtained after a one-week treatment with Ag⁺. Under the combination treatments, amount of different tanshinones varied depending the time period of YE elicitation. In the best case, two-fold increase in total tanshinone content (over the single treatments) was found 12 hours after addition of YE to Ag⁺-pre-treated cultures, which was due to the remarkable increase in tanshinone-I. No significant changes were measured in cryptotanshinone levels.

Key words: *Perovskia abrotanoides*, adventitious root, tanshinone, yeast extract, AgNO₃.