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

فیروزه علیرضایی[۱]، خدیجه کیارستمی[۲]*، منیر حسین زاده نمین[۳]

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 وغنی 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 ۱،۲،۴و۶mg/l نیترات نقره به کالوسهای یک ماهه رشد کرده در محیط MS دارای هورمون های نفتالن استیک اسید 2 mg/l (NAA) وبنزیل آمینوپورین (BAP)mg/l***

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)

4اضافه 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 ۴mg/l سبب افزایش میزان رزمارینیک اسید ،ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی شد، اما درغلظت های بالاتر از ۴mg/l اثرات سمی یونهای نقره آشکار شد و باعث کاهش میزان رزمارینیک اسید ،ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی شد.

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

مقدمه

اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula angustifolia* Mill گیاهی است متعلق به خانواده نعنا عیان و منشاء این گیاه مناطق مدیترانه ای و جنوب اروپا و اسپانیا است. تاکنون ٤٨ 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). همه 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 وکاهش 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

دارد و بـه طـور ویـژه در واکوئـل انباشـته مـی شـود. رزمارینیـک اسـید از مسـیر فنیـل پروپانوئیـد سـنتز مـی شـود Peterson (1994);Hausler et al.,(1993). رزمارینیـک اسـید دارای اثـرات ضـد التهـاب و ضد افسـردگی اسـت (Lee et al., (2008 . فعالیت آنتـی اکسـیدانی رزمارینیـک اسـید از ویتامیـن E بیشـتر اسـت (Cuvelier et al.,(1996. بخـش مهمـی از سیسـتم دفاعـی گیـاه بـه رزمارینیـک اسـید مربـوط مـی شـود (Peterson, (1994. تولیـد متابولیـت هـای ثانـوی بـا خاصیـت آنتـی اکسـیدانی بـالا بـا روشـهای زیسـت فنـاوری همانند کشـت سـلول و بافـت ارزش فـراوان دارد (شـریفی و همـکاران ۱۳۹۲) .یکـی از روشـهایی کـه امـروزه بیـش از هـر موضـوع دیگـری در زمینـه بررسـی متابولیـت هـای گیاهـی مـورد توجـه قـرار گرفتـه اسـت روش کشـت انـدام، بافـت و سـلول‌های گیاهـی اسـت. بـا ایـن روش مـی تـوان مقادیـر بیشـتری از ترکیبـات ثانـوی را بـا اسـتفاده از کشـت بافـت نسـبت بـه حالـت طبیعـی بـه دسـت آورد. از مزایـای روش کشـت سـلول و بافـت ،مسـتقل بـودن از تغییـرات آب و هوایـی ، تنش‌هـای محیطـی و سـرعت بـالای رشـد اسـت. در ایـن روش ممکن اسـت ترکیبـات جدیـدی تولیـد شـوند کـه در حالـت عـادی در گیـاه مـادری وجـود ندارنـد. عـلاوه بـر ایـن کشـت و تکثیـر گیاهـان بـا روش کشـت درشیشـه ضمـن غلبـه بـر محدودیـت هـای آب و هوایـی، فصلـی و دسترسـی بـه آب و مـواد غذایـی بسـتری مناسـب بـرای تهیـه کالـوس در شـرایط یکسـان را فراهـم مـی کنـد (Begum and Tamaki .,(1994. اسـتخراج و خالص‌سـازی آسـان،تولید ترکیبـات در مقادیـری کـه در طبیعت پیدا نمی‌شـوند، وابسـته نبـودن بـه عوامـل آب و هوایی و فصلـی وکنترل بیشـتر مسـیرهای بیوسـنتزی بـرای دسـتیابی بـه ترکیبـات شـیمیایی در مقادیـر مطلـوب از دیگـر مزایـای تولیـد متابولیـت هـای ثانـوی در شـرایط کشـت درون شیشـه اسـت Misawa et al., (1994) . در کشـت بافـت و سـلول از الیسـیتور بـرای بهبـود تولیـد متابولیـت هـای ثانـوی اسـتفاده مـی شـود. الیسـیتورها تولیـد متابولیت‌هـای ثانـوی را تحـت تأثیـر قـرار می‌دهنـد(Furden et al.,(2005. الیسـیتورها ترکیبـات زیسـتی یـا غیـر زیسـتی هسـتند کـه بـرای افزایـش تولیـد متابولیـت هـای ثانـوی و افزایـش میـزان رشـد مـورد اسـتفاده قـرار مـی گیرنـد .Ramachandra and Srinivasa (2008).

در ایـن بررسـی از نیتـرات نقـره بـه عنـوان الیسـیتور غیـر زیسـتی اسـتفاده شـد. نیتـرات نقـره ترکیبـی بی‌رنـگ، بسـیار محلـول و سـمی اسـت و بـه سـادگی بـه یـون نقـره تبدیـل می‌شـود . از آن در تهیـه ترکیبـات دیگر نقـره اسـتفاده مـی کننـد. ویژگی‌هـای نیتـرات نقـره مثـل دسترسـی آسـان، حلالیـت در آب ایـن مـاده را بـرای کاربـرد در تنظیـم خارجـی رشـد گیـاه مناسـب کـرده اسـت. ثابـت شـده

کـه نیتـرات نقـره بازدارنـده قـوی فعالیـت اتیلـن بـوده و بـه صـورت گسـترده در کشـت بافـت گیاهـی کاربـرد دارد. همچنیـن از جملـه عملکردهـای نیتـرات نقـره اثـر بـر آنزیم‌هـای مختلـف داخـل سـلول اسـت کـه از ایـن طریـق می‌توانـد بیـان ژنهـا را تغییـر و تغییراتـی در تولیـد متابولیت‌هـای ثانـوی در گیـاه ایجـاد کنـد (اصغـری و همـکاران، ۱۳۹۰) .

تـا کنـون مطالعاتـی نظیـر بررسـی اثـر نیترات نقـره بـر ریزازدیـادی گیـاه *Vitex negundo* (Steephen et al ., (2010, ممانعـت از فعالیـت اتیلـن در *Arabidopsis thaliana* (Kathleen.,(2012،میـزان محصـول در *Ocimum basilicum* (Nejatzade et al ., (2014) ، تولیـد تیمـول در *Thymus Vulgaris* (Moses and Mukundan, (2013 ، تولیـد تاکسـول در *Taxus bacata* (اصغـری و همـکاران،۱۳۹۰(، فعالیـت آنزیـم هـای آنتـی اکسـیدانی در chick pea Lakshmi et al., (2013) کالـوس زایـی و فعالیـت آنزیـم هـای آنتـی اکسـیدانی در *Triticuma astivum* (Liao et al ., (2012 میـزان برخـی ترکیبـات ثانـوی در *Oroxylum indicu* Gokhale and Bansal (2010)،فعالیـت آنزیـم هـای تولیـد کننـده رزمارینیـک اسـید در *Salvia miltiorrhiza Yan* et al.,(2006) انجـام شـده ،امـا تاکنـون مطالعـه ای در مـورد بررسـی اثـر نیتـرات نقـره بـر فعالیـت آنتـی اکسـیدانی و ترکیبـات آنتـی اکسـیدانی مـورد بررسـی در ایـن پژوهـش گـزارش نشـده اسـت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

بـرای کشـت بافـت از گیـاه اسـطوخودوس رشـد کـرده در محوطـه دانشـگاه الزهـرا در تهـران و قبـل از مرحلـه گلدهـی اسـتفاده شـد.

سـترون کـردن وامـاده سـازی نمونـه برای کشـت بافت

بـرای کشـت بافـت بـرگ هـای ناحیه ۵ سـانتی متـری راس گیـاه اسـطوخودوس مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. بـرگ هـا بـه طـور کامـل از سـاقه جـدا شـدند ، بـرای حـذف گـرد و غبـار روی بـرگ هـا نمونـه هـا ابتـدا بـا آب جـاری و مـاده شـوینده شسـت و شـو داده شـدند. سـپس ۳ مرتبـه بـا آب مقطـر اسـتریل شسـته شـدند. قطعـات بـرگ ۳ دقیقـه در الـکل ۷۰ درصـد قـرار گرفتنـد، سـپس الـکل خـارج و نمونـه هـا بـا آب مقطـر اسـتریل شسـت و شـو شـدند سـپس نمونـه هـا بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در هیپوکلریـت سـدیم ۳۰ درصـد قـرار گرفتنـد و پـس از آن ۳ مرتبـه بـا آب مقطـر اسـتریل شسـت و شـو شـدند . تمـام مراحـل در زیـر هـود لامینـار اسـتریل انجـام شـد.

امـاده سـازی محیـط کشـت و افـزودن الیسـیتور

در مرحلـه اول بـرای کشـت نمونـه هـا از

محیط MS(1962 Murashing and Skooge ,) با pH ۵/۷-۵/۸ به همراه هورمون های ۲mg/l NAA و ٤mg/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 درمحیط کشت جدید با همان ترکیبات محیط اولیه به همراه غلظت های ۱،۲،٤و٦ mg/l نیترات نقره قرار گرفتند.پس از یک ماه کالوسها برداشت شدند وآنالیزها انجام شد.

تهیه عصاره متانولی

برای تهیه عصاره از روش Conde و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات استفاده شد. ۰/۲گرم 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 شد Lopez-Arnaldos et al., (1995) .

سنجش ترکیبات فنلی

۰/۲ میلی لیتر ازعصاره 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 متانلی 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 ٤١٤ نانومتر توسط دستگاه

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 ۲و۲ 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 picryl-۱-diphenyl-۲,۲ hydrazyl (DPPH) بررسی شد.

آماده کردن معرف: مقدار ۰/۰۰٤ گرم DPPHبا 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 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.

= (۱۰۰ × Ablank – Asample) / Ablank

درصد بازداری رادیکال آزاد (IC%)

در این فرمول Ablank جذب نوری نمونه کنترل فاقد عصاره است و Asample 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 IC۵۰ استفاده شد. IC۵۰ 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 کاهشی یا Reducing power(RP)

۰/۲ میلی لیتر عصاره رقیق شده به همراه ۰/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲مولار (٦pH/٦=) 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

و سپس سانتریفوژ شد (g۱۰۰۰، ۱۰ دقیقه ، ٤ درجه سانتی گراد). به ۰/۵ میلی لیتر از روشناور، ۰/۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و۰/۱ میلی لیتر فریک کلرید۱ 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

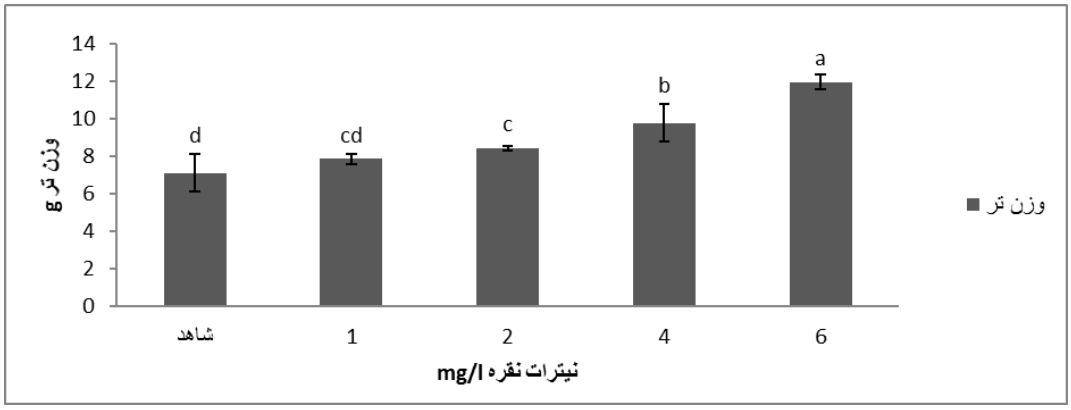
برای سنجش رادیکال آنیون سوپراکسید، رادیکال های آزاد آنیون سوپراکسید با سیستم خود اکسایش پیروگالل تعین شدند . ۹ میلی لیتر بافر تریس- HCl (PH/۲ , ۸mmol/L= ۵۰) در لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار داده شد. ٤۰ میکرولیترمحلول پیروگالل (٤۵ میلی مولار پیروگالل در ۱۰ میلی مولار HCl) 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 ٤۹۰ نانومتر خوانده شد. این مقدار بعنوان A۰ در نظر گرفته شد. در لوله دیگر عصاره گیاهی ریخته شد و جذب آن بعد از ۵ دقیقه در٤۹۰ نانومتر خوانده شد که عدد خوانده شده معادل A۱ است. در A۲ به جای عصاره آب مقطر ریخته شد که بعنوان شاهد بود. درصد جاروب کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(Jiao and Wang, 2005)

درصد جاروب کنندگی رادیکال آزاد = (A۰ / ۱۰۰ × ((A۲ –A۱) – A۰

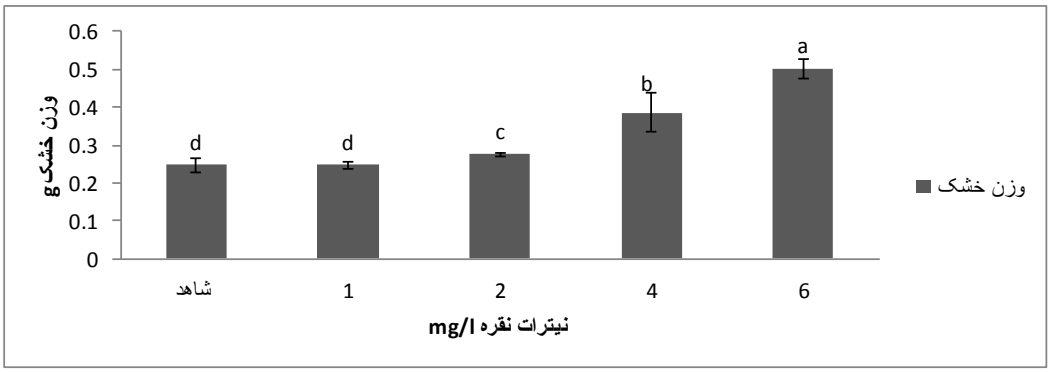
نتایج وبحث

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 تروخشک کالوسها در تمام تیمارها نسبت به شاهد شد به نحوی که بیشترین وزن تر کالوسها در۶ mg/l نیترات نقره به میزان g ۱۱/۹۳ و کمترین درتیمار شاهدبه میزان g ۷/۱ مشاهده شد. بیشترین وزن خشک کالوسها درتیمار ۶ mg/l نیترات نقره به میزان g ۰/۵۰ و کمترین وزن خشک کالوسها مربوط به تیمار شاهد به میزان g۲٤/۰ بود(شکل های ۱و۲) .

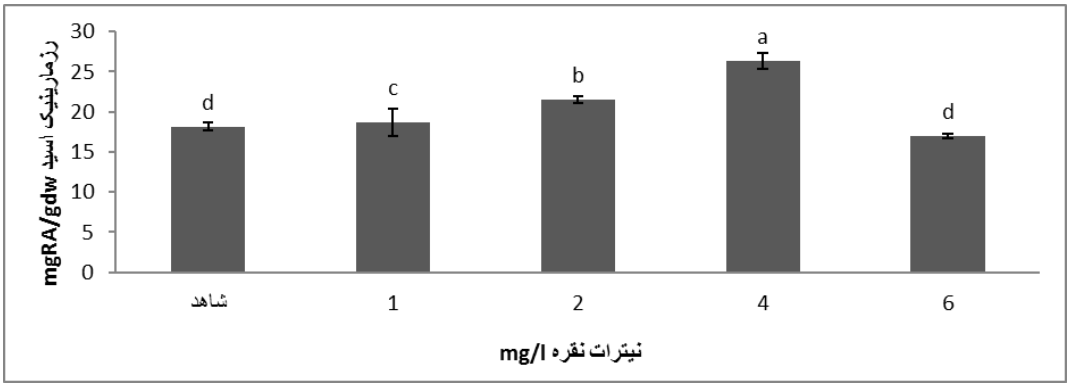
افزودن نیترات نقره به محیط کشت سبب تغییر قابل ملاحظه در محتوای رزمارینیک اسید شد و افزایش غلظت نیترات نقره در محیط کشت، در تمام غلظت ها به جز در ۶ mg/l سبب افزایش رزمارینیک اسید شد . بیشترین میزان رزمارینیک اسید در ٤mg/l نیترات نقره به میزان (mgRA/ gdw ۲٦/۳۲) و کمترین میزان در ۶ mg/l



شکل۱: 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 $p\leq0/05$



شکل۲: .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 $p\leq0/05$



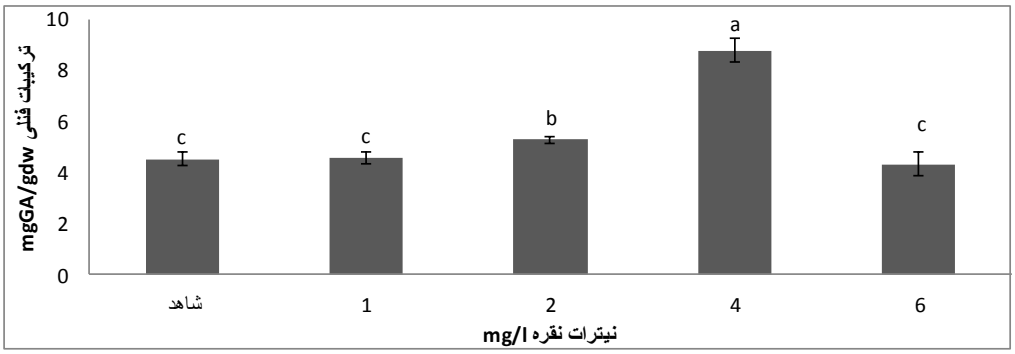
شکل۳: مقایسه میزان رزمارینیک اسید در کالوسها درحضورغلظت های مختلف نیترات نقره . حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$

نیترات نقره (۱۶/۹۸ mgRA/gdw) مشاهده شد (شکل۳). افزودن نیترات نقره به محیط کشت باعث افزایش چشمگیر در میزان ترکیبات

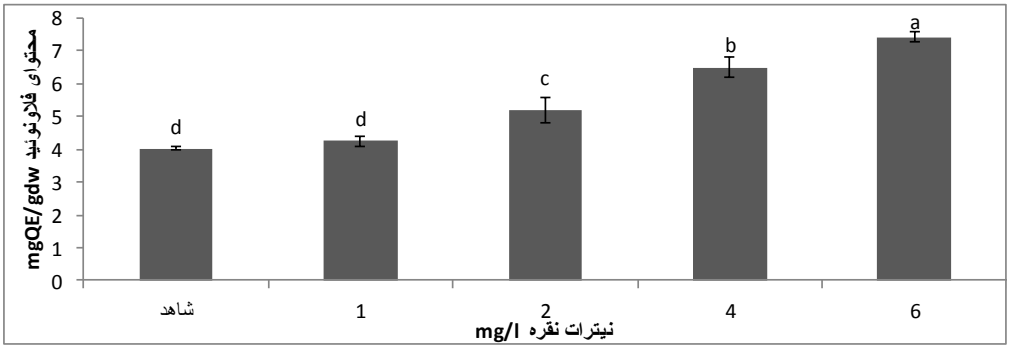
فنلی شد و همانند رزمارینیک اسید میزان ترکیبات فنلی نیز در حضور نیترات نقره تا غلظت ۴ mg/l افزایش یافت و پس از آن اثر کاهشی مشاهده شد به نحوی که بیشترین میزان ترکیبات فنلی در ۴ mg/l نیترات نقره به میزان (۷۷/۸ mgGA/gdw) و کمترین میزان ترکیبات فنلی در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره (۳۱/۴ mgGA/gdw) مشاهده شد(شکل ٤).

نیترات نقره به عنوان الیسیتور غیر زیستی تولید فلاونوئید ها را تحریک کرد و این اثر در غلظت ٦ 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 (mgQE/gdw ۷/٥٤) و کمترین محتوای فلاونوئید در تیمار شاهد به میزان(۴/۰۱ mgQE/gdw) مشاهده شد (شکل ٥).

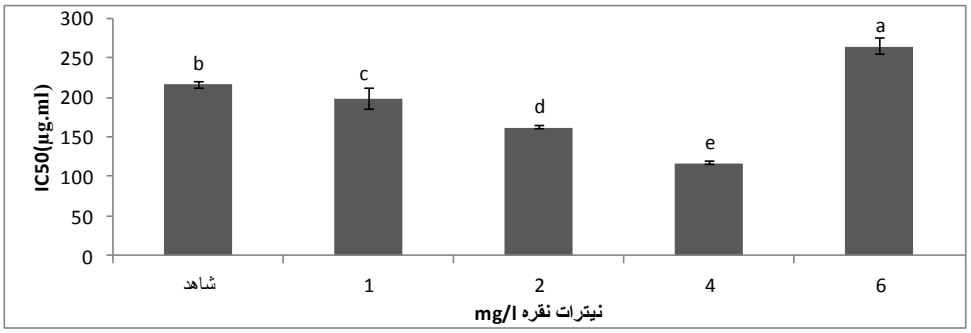
با توجه به شکل های ٦،٧و٨ از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش جاروب کنندگی رادیکالDPPH و قدرت کاهشی و فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید نتایج مشابهی به دست آمد. بیشترین



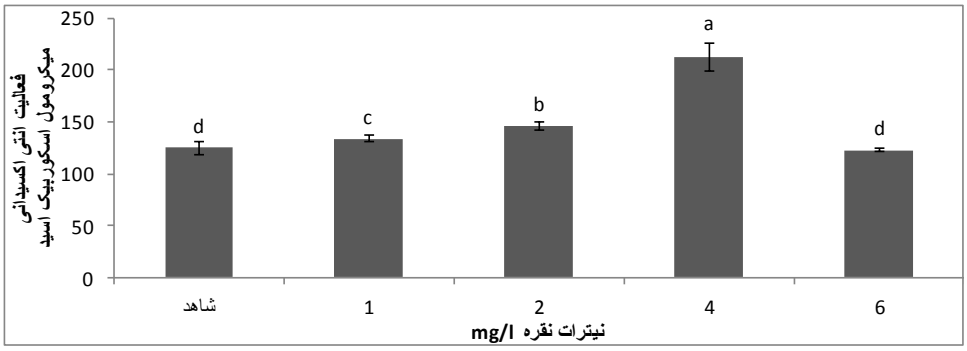
شکل٤: مقایسه محتوای ترکیبات فنلی در کالوسها درحضورغلظت های مختلف نیترات نقره. .حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$



شکل٥: مقایسه محتوای فلاونوئید کالوسها درحضورغلظت های مختلف نیترات نقره. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$



شکل٦: مقایسه فعالیت انتی اکسیدانی(IC50) کالوس ها درحضور غلظت های مختلف نیترات نقره حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$



شکل۷.مقایسه قدرت کاهشی RP درکالوسها درحضور غلظت های مختلف نیترات نقره . حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$

فعالیت آنتی اکسیدانی با هر ۳ روش در تیمار ۴ mg/l نیترات نقره و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی با هر ۳ روش در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره مشاهده شد. قرار گیری در معرض نیترات نقره به صورت قابل ملاحظه ای دربالاترین غلظت سبب کاهش قدرت جاروب کنندگی رادیکال DPPH شد به نحوی که کمترین قدرت حذف رادیکالهای آزادDPPH در ۶ mg/l نیترات نقره مشاهده شد . بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۴ mg/l نیترات نقره به میزان (۱۱۷ µg/ml) و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره به میزان (۲٦٤ g/mlµ) مشاهده شد (شکل٦).

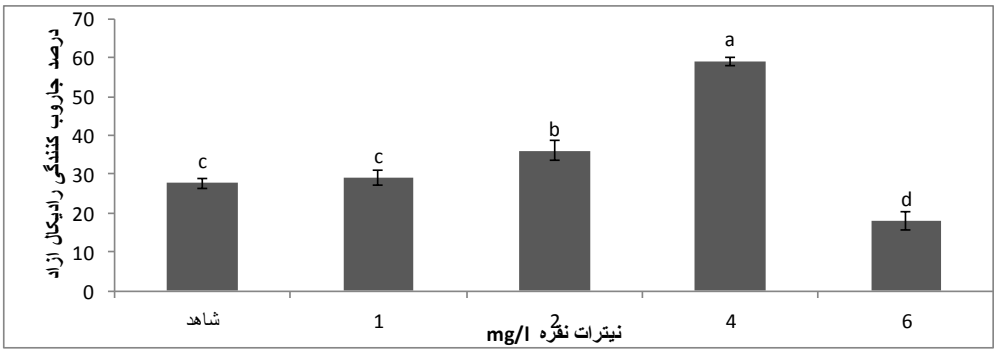
نتایج نشان داد با افزایش غلظت نیترات نقره تا ۴ mg/l قدرت کاهشی افزایش یافت و پس از این غلظت اثر کاهشی مشاهده شد. بیشترین قدرت کاهشی در ۴ mg/l نیترات نقره (۲۱۲/۴۵میکرومول اسکوربیک اسید) و کمترین قدرت کاهشی در۶ mg/l نیترات نقره به میزان (۹۵/ ۱۲۲میکرومول اسکوربیک اسید) مشاهده شد (شکل۷).

همانند سایر روشهای سنجش فعالیت

آنتی اکسیدانی در این بررسی با افزایش غلظت نیترات نقره تا ٤ mg/l افزایش قدرت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید مشاهده شد. پس از آن کاهش فعالیت اتفاق افتاد . نیترات نقره در تمام غلظت ها به جز ۶ mg/l سبب افزایش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید شد به نحوی که بیشترین فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در تیمار ۴ mg/l نیترات نقره به میزان ۵۹%/۲ و کمترین فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در تیمار ۶ mg/l نیترات نقره ۱۸%/۰۵ مشاهده شد. غلظت بهینه نیترات نقره برای فعالیت آنتی اکسیدانی با هر ۳ روش غلظت ۴ mg/l نیترات نقره بود(شکل۸).

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 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 درسال ۱۹۷٦ مطرح شد که نیترات نقره قادر به جلوگیری از فعالیت اتیلن مصنوعی در واکنش‌هایی مانند ریزش، پیری و کاهش رشد می باشد (1976,



شکل۸:مقایسه فعالیت جاروب کنندگی انیون سوپراکسید در کالوسها درحضورغلظت های مختلف نیترات نقره. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p\leq0/05$

Beyer). سنتز اتیلن در شرایط پیری و تنش در گیاه تحریک می‌شود به طور کلی سنتز اتیلن از طریق سیگنال‌های داخلی یا خارجی تحریک می‌شود و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد Wang and Ecker (2002). مکانیسم اثر نیترات نقره در افزایش رشد به این صورت بیان می‌شود که یون نقره می‌تواند 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 می‌کند و به این صورت از فعالیت اتیلن جلوگیری و باعث افزایش رشد می‌شود 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 اثرنیترات نقره بر رشد گیاه سیب‌زمینی در محیط MS نشان داد مصرف AgNo۳ در محیط کشت سبب افزایش رشد نسبت به کنترل می شود Turhan (2004). نتایج ما با نتایج Radhakrishnanو همکاران (۲۰۱۴) دربررسی اثرنیترات نقره در کشت بافت گیاه بادام‌زمینی ، شاخه زایی گیاه *Echinacea angustifolia* Chen Chae et al., (2012) و نتایج Park و همکاران (2008) در بررسی اثر نیترات نقره در کشت بافت گیاه *Echinacea angostifolia* مطابقت داشت.

در این بررسی میزان رزمارینیک اسید وترکیبات 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 تنش‌زا عمل می‌کنند و باعث می‌شوند 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 الیسیتور بستگی به گونه گیاهی دارد. برخی گونه‌های 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 سیگنال‌های داخلی مهار کننده آنزیم PAL توسط عوامل خارجی باشد

.Creasy, (1976)

از سوی دیگر افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله نقره در بافت‌های 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 می‌شوند و به علت گروههای آروماتیک که در ساختار خود دارند واکنش‌پذیری بالا با فلزات سنگین نشان می‌دهند و با اتصال به فلزات سنگین میزان ترکیبات فنلی کاهش می یابد

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

فلاونوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات پلی فنلی هستند. با ایجاد شرایطی همانند تنش‌های اکسید اتیو حاصل از افزایش فلزات سنگین مانند نقره ،مسیر فنیل پروپانوئید به ویژه مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها افزایش می‌یابد 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 کشت ریشه‌های موئی *Salvia Milthoriza* پرداختند و افزایش میزان رزمارینیک اسید و ترکیبات فنلی در غلظت های متوسط وکاهش این متابولیت ها را در غلظت های بالای نیترات نقره مشاهده کردند و نتایج Ghokhale و Bansal(2010) که اثرنیترات نقره را بر میزان فلاونوئیددر کشت بافت گیاه *Orxylum indicum* بررسی کردند مطابقت داشت.

نیترات نقره توانایی تغییر بسیاری از ژنها را دارد. در بررسی که روی *Arabidopsis thaliana* صورت گرفت مشخص شد که نقره در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های مختلف دخالت می‌کند و ژنهایی را تنظیم می‌کند که در پاسخ گیاه نسبت به فلزات سنگین و تنش‌های اکسیداتیو دخالت دارند مثل ژنهای دخیل در عملکرد واکوئل و ژنهای جابه‌جا کننده پروتون، سوپراکسید دیسموتاز، اکسیداز مربوط به سیتوکروم p-٤٥٠، و پراکسیداز، هم‌چنین توانایی تغییر در ژنهای تنظیم کننده فعالیت اکسین در تنظیم اندازه ارگان‌ها (ARGOS = auxin Regulatedgene involue in organ size)و ژنهای مسیر علامت دهی اتیلن و هم‌چنین مقاومت سیستمیک (SAR= Systemic acquired resistance) را تغییر می‌دهد Kaveh et al., (2013) و همین امر نشان دهنده این است که نیترات نقره توانایی تغییر در میزان پروتئین‌های گیاهی و به

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

در این بررسی نیترات نقره در غلظت‌های پایین و متوسط سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق جاروب کنندگی رادیکال DPPH و فعالیت جاروب کنندگی رادیکال سوپراکسید (SO) و قدرت کاهشی (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 فعالت 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 گونه های فعال اکسیژنReactive =(ROS Oxygen Species) را دارند.

غلظت های پایین نقره با افزایش گونه های فعال اکسیژن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه را فعال می کنند و با عث 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 مانندگونه 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

به عنوان الیسیتور برای افزایش تولید ترکیبات ثانویه و تغییر مسیر بیوسنتز آنها دلالت دارد. افزودن نیترات نقره به محیط کشت سبب تغییر ترکیبات آنتی اکسیدانی و فعالیت آنتی اکسیدانی 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 Phytochemistry15: 673–675.

Conde,E.,Cadahfa, E and .GarciaVallego ,M.C. (1995) HPLC analysis of Flavonoids and phenolic acid and aldehydes in *Eucalyptus* spp Chromatogaraphia 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 ,EK., Prasad ,TN., Kambala ,V.,Nagajyothi, PC 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 Reports12: 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., Luhova ,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) Deferal of senescence and abscission by chemical inhibition of ehtylene 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, SU; (2008) Rosmarinic acid production in hairy root cultures of (Agastache rugose) Kuntze World Journal of Microbiology and Biotechnology24: 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) Spectropho-ometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe2+ 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 Straberry callus plant physiology113:315-322

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 Acess)

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 ad micropropagationof *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 Dobaria ,J. R.(2014) Hight Fequency regeneration protocol for callus culture of peanut leaves using ethylene modulator as culture medium Aaditive. The Bioscan 9(2): 599-604.

Ramachandra,CT and SrinivasaRao, 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.

Steephen ,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.