

بررسی تأثیر میواینوزیتول بر زیست توده و میزان متابولیت‌های ثانویه ریشه نابجا گل‌راعی (*Hypericum perforatum* L.)

امیرمردی سراب‌شلی^۱، سید کمال کاظمی تبار^۱، مرتضی ابراهیمی*^۲، غفار کیانی^۱ و مرتضی خان‌احمدی^۲

^۱گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران،

^۲پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۰/۲۵)

چکیده

گل‌راعی یک گیاه دارویی سنتی است که برای درمان افسردگی و بهبود زخم استفاده می‌شود. وابستگی به منابع طبیعی و روش‌های کشت سنتی اغلب به ماه‌ها و سال‌ها زمان برای دستیابی به گیاهان دارویی نیاز دارد. ایجاد سیستم کشت سوسپانسیون ریشه نابجا می‌تواند تکثیر در مقیاس وسیع، بهبود نژاد و حفاظت از گونه را تسریع بخشد، اما بهینه‌سازی و تولید در مقیاس وسیع نیازمند افزایش زیست توده و متابولیت‌های ثانویه ریشه است. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول (۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰، ۲۲۵، ۲۵۰ و ۲۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی زیست توده، فنل، فلاونوئید، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و مقادیر متابولیت‌های ثانویه ریشه نابجا گل‌راعی در پژوهشکده متابولیت‌های ثانویه منطقه مرکزی کشور در سال ۱۳۹۸ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در بین تیمارهای اعمال شده نشان داد که تیمارهای ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقادیر وزن خشک، نرخ رشد و نسبت رشد بودند. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار هایپریسین و سودوهاپریسین بودند. از نظر تولید مقدار هایپرفورین، تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین میزان بود و غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم کمترین تأثیر را بر میزان هایپرفورین داشت. تفاوت معنی‌داری نیز بین تیمارها از نظر مقدار فنل و فلاونوئید وجود داشت بطوری‌که تیمارهای ۷۵ و ۲۲۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقدار فنل و تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقدار فلاونوئید در بین تیمارهای اعمال شده بودند. روند تغییرات درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در بین تیمارها متفاوت بود بطوری‌که مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای کمترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH بود، ولی بیشترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول مشاهده شد. از آنجایی که پتانسیل تحریک متابولیت ثانویه در میان انواع کشت‌ها، انواع الیستورها، شرایط اعمال تیمارهای مختلف و دیگر پارامترها متفاوت است، تحقیقات بیشتر برای بهینه‌سازی دستورالعمل‌های بهتر و کارآمدتر ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: الیستور، فنل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هایپریسین

مقدمه

(Zobaye et al., 2005). عصاره گل‌راعی حاوی ترکیبات

پیچیده‌ای از متابولیت‌های فعال است که عموماً شامل

نفتودی‌انترونها (هایپریسین و سودو هایپریسین)،

گل‌راعی (*Hypericum perforatum* L.) با سابقه‌ای بیش از

۲۰۰۰ سال تحت عنوان یک گیاه دارویی مطرح بوده است

نیازمند افزایش زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه ریشه است (Lee et al., 2006; Yu et al., 2001; Choi et al., 2000; Kim et al., 2004b). اشکال حلقوی پلی‌اول‌ها از جمله میواینوزیتول به صورت گسترده در گیاهان وجود دارد (Noiraud et al., 2001). این ماده یکی از اجزاء اصلی محیط کشت Murashige و Skoog (۱۹۶۲) می‌باشد که برای گونه‌های گیاهی زیادی استفاده می‌شود و بیان شده است که برای بسیاری از انواع کشت‌های بافت ضروری می‌باشد (Loewus and Dickinson, 1982). میواینوزیتول در انتقال ایندول-۳-استیک اسید و کنترل رشد و توسعه سلولی ناشی از ایندول-۳-استیک اسید نقش دارد (Loewus and Murthy, 2000). همچنین اینوزیتول در بیورژنر غشاء، انتقال پیام، فیزیولوژی کانال یونی و پویایی غشاء نقش دارد (Loewus and Murthy, 2000). در تحقیق که توسط Iqbal و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد نتایج نشان داد که بیان ژن میواینوزیتول-۱-فسفات سنتاز (MIPS) در گیاهان سویا تحت شرایط تنش و نرمال به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کرد. تحقیقات نشان داده است که ژن‌های درگیر در سنتز میواینوزیتول در مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن پرکسی‌زومال نقش دارند و پیشنهاد شد که این ترکیبات یک عامل کلیدی در تعیین این موضوع است که آیا تنش اکسیداتیو می‌تواند پاسخ‌های دفاعی را القاء یا سرکوب کند (Chaouch and Noctor, 2010). همچنین بیان شده است که میواینوزیتول نقش مهمی در تحریک متابولیت‌های فعال زیستی دارد. در مطالعه‌ای که توسط El Sharabasy و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد میواینوزیتول به مقدار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تأثیر را بر میزان آمینواسیدها و ایندول‌های گیاه خرما داشت. در کشت کالوس گیاه *Rheum ribes* میواینوزیتول با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش محتوی آنتراکینونین‌ها (Anthraquinones) شد (Sepehr and Ghorbanli, 2002). این تحقیق به منظور بررسی تأثیر میواینوزیتول بر زیست‌توده ریشه نابجا و نیز ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) و میزان متابولیت‌های ثانویه ریشه نابجا گل‌راعی انجام شد.

فلوروگلوکوسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) و فلاونوئیدها با طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیکی می‌باشد (Kirakosyan 2003; Butterweck 2003; Silva et al. 2005; et al., 2004). هایپرپرسین و هایپرفورین دارای خواص مهمی مانند خاصیت ضد افسردگی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی می‌باشند و در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارند (علی‌اکبری و کاظمی‌تبار، ۱۳۹۱ و قاضیان تفریسی و همکاران، ۱۳۹۳). امروزه گیاهان این گونه اساساً برای درمان اختلالات عصبی و افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tatsis et al., 2007). وابستگی به منابع طبیعی و روش‌های کشت سنتی اغلب به ماه‌ها و سال‌ها زمان برای دستیابی به گیاهان دارویی نیاز دارد. همچنین کشت زراعی گیاهان دارویی معایب مختلفی از جمله عملکرد پائین و نوسان در غلظت‌های متابولیت‌های ثانویه به علت عوامل جغرافیایی، فصلی و محیطی و نیز آلودگی بوسیله ذرات آلوده و حمله پاتوژن‌ها دارد (زمانی و همکاران، ۱۳۹۷ و Murch and Saxena, 2006). از طرفی ارقامی که برای افزایش تجمع محصولات ثانویه استفاده می‌شوند اساساً مقاوم به بیماری نیستند (Mccoy and Camper, 2002). کشت سلول، بافت و اندام گیاهی یک سیستم موثر برای مطالعه اهمیت بیولوژیکی متابولیت‌های فعال زیستی تحت شرایط درون شیشه و همچنین تولید محصولات طبیعی برای کاربردهای پردازش زیستی هستند (Paek et al., 2005; Saifullah et al., 2008). کشت‌های ریشه موین گل‌راعی بعد از تلقیح گیاهچه‌های جوانه‌زده با آگروباکتیوم بدست می‌آیند (Vinterhalter et al., 2006; Pavlik et al., 2007; bertoli et al., 2008; Koperdakova et al., 2009). کشت‌های ریشه تراریخت یک روش جایگزین امیدبخش برای کشت سلول هستند، اما معمولاً ریشه‌های موین نوعی مواد شبه اوپین تولید می‌کنند که منجر به مرگ پستانداران می‌شود (Yoshikawa and Furuya, 1987). همچنین موجودات زنده دست‌ورزی شده ژنتیکی در بسیاری از کشورها مورد قبول عام نیستند. ایجاد سیستم کشت سوسپانسیون ریشه نابجا می‌تواند تکثیر در مقیاس وسیع، بهبود نژاد و حفاظت از گونه را تسریع بخشد (Holobiuc and Blindu, 2006)، اما بهینه‌سازی و تولید در مقیاس وسیع

مواد و روش ها

بر لیتر میواینوزیتول مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی در پژوهشکده متابولیت های ثانویه منطقه مرکزی کشور انجام شد.

جهت تعیین وزن تازه و وزن خشک، ریشه ها را از محیط کشت جدا کرده و بعد از آب کشی ریشه ها با آب مقطر استریل و حذف آب سطحی، وزن تازه آن محاسبه گردید. سپس ریشه ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و وزن خشک ریشه ها ثبت گردید. نسبت رشد، درصد وزن خشک و نرخ رشد بر اساس فرمول های زیر محاسبه گردید (Cui et al., 2010):

رابطه (۱):

$$\text{نسبت رشد} = \frac{\text{وزن خشک اولیه (گرم)} - \text{وزن خشک نهایی (گرم)}}{\text{وزن خشک اولیه (گرم)}}$$

رابطه (۲):

$$\text{درصد وزن خشک} = \frac{\text{وزن خشک برداشت شده (گرم)}}{\text{وزن تازه برداشت شده (گرم)}} \times 100$$

$$\text{رابطه (۳)} \quad \text{نرخ رشد} = \frac{\text{نسبت رشد}}{\text{کشت دوره (روز)}}$$

به منظور استخراج عصاره متانولی، مقدار ۱۰۰ میلی گرم مواد گیاهی پودر شده در ویال های دو میلی لیتری ریخته و مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر متانول به آن اضافه گردید. سپس ویال ها در اولتراسونیک (Bandelin Sonorex, آلمان) به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و در این مدت دمای آب داخل اولتراسونیک با استفاده از قطعات یخ در زیر ۴۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. بعد از این مرحله ویال ها به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, آلمان) با دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (Beckman Coulter, آمریکا) شدند. مایع رویی به ویال های جدید منتقل و به رسوبات باقیمانده مجدداً ۵۰۰ میکرو لیتر متانول اضافه و به همان روش فوق پس از استقرار در ترموسایکلر با دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و انجام سانتریفوژ، مایع رویی برداشته و به ویال های قبلی اضافه شدند.

به منظور استریل کردن بذور گل راعی، بذور ابتدا با آب مقطر آب شویی و سپس سه مرتبه با اتانول ۷۰ درصد و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه شسته شدند. بعد از این مرحله مجدداً آب شویی با آب مقطر استریل انجام شد. سایر مراحل به منظور استریل کردن پوشش سطحی بذور در زیر هود لامینار صورت گرفت. بذور به مدت ۷-۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و مقداری توئین ۲۰ به منظور از بین بردن کشش سطحی شست و شو داده شدند. بعد از این مرحله، ۶-۵ بار آب شویی با آب مقطر استریل انجام گرفت و بعد از آخرین آب کشی بذور تا خشک شدن سطح آنها در زیر هود لامینار قرار گرفتند. کشت بذور در شیشه های مربا حاوی محیط MS با ۳ درصد ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگارز کشت شدند. به منظور تهیه ریشه نابجا، ریزنمونه های برگی بدست آمده از گیاهچه های چهار هفته ای به قطعات کوچک تقسیم شده و سپس به محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) با اسیدیته ۵/۷ که با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر ایندول ۳-استیک اسید (IAA) و ۳ درصد (وزنی/حجمی) ساکارز و ویتامین B₅ (Gambrog et al., 1968) غنی شده بود، منتقل شدند. محیط ها به مدت سه هفته در شرایط تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از تولید ریشه، ریشه های نابجا به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۷۰ میلی لیتر محیط یک دوم MS با ۳ درصد (وزنی/حجمی) ساکارز و یک میلی گرم بر لیتر ایندول ۳- بوتریک اسید (IBA) منتقل شدند. ارلن ها در شیکر انکوباتور در شرایط تاریکی و سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند و هر سه هفته یکبار عملیات واکشت ریشه ها انجام شد. در تمام مراحل آزمایش، محیط ها و وسایل مورد نیاز در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک بار به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (شرکت Tomy مدل SX-700 استریل شدند.

به منظور بررسی تأثیر میواینوزیتول بر زیست توده، فنل، فلاونوئید و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH و متابولیت های ثانویه ریشه نابجا گیاه گل راعی، غلظت های ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰، ۲۲۵، ۲۵۰ و ۲۷۵ میلی گرم

گرفت. نتایج بر حسب میلی گرم بر گرم گالیک اسید در اکی والان بر گرم ماده خشک بیان شد.

مقدار فلاونوئید کل بر اساس روش Wu و همکاران (۲۰۰۶) سنجیده شد. برای این منظور مقدار ۰/۱۵ میلی لیتر عصاره متانولی ریشه به همراه ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۰۷۵ میلی لیتر سدیم نیترات ۵ درصد در تیوب ۲ میلی لیتری به خوبی باهم مخلوط و سپس ۰/۱۵ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به آن محلول اضافه شدند و میزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تهیه نمونه خالی به جای عصاره متانولی در ترکیب فوق از متانول استفاده گردید. از ماده روتین (شرکت سیگما) به عنوان استاندارد و برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. نتایج بر حسب میلی گرم روتین در اکی والان بر گرم ماده خشک بیان شدند.

خاصیت آنتی اکسیدانی با آزمون به دام اندازی رادیکال DPPH که بر پایه احیای محلول متانولی رادیکال آزاد DPPH توسط ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله ترکیبات فنلی استوار است، انجام شد. بر اساس روش Cui و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت بازدارندگی رادیکال های آزاد توسط DPPH اندازه گیری شد. مقدار ۱/۶ میلی لیتر DPPH ۰/۲ میلی مولار به ۰/۴ میلی لیتر عصاره متانولی ریشه اضافه و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه قرائت میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. ضمناً ۱/۶ میلی لیتر DPPH ۰/۲ میلی مولار به همراه ۰/۴ میلی لیتر متانول به عنوان محلول شاهد در نظر گرفته شد (تمام مراحل کار در محیط تاریک انجام شد). میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب درصد DPPH با استفاده از فرمول زیر بیان شد.

رابطه (۴):

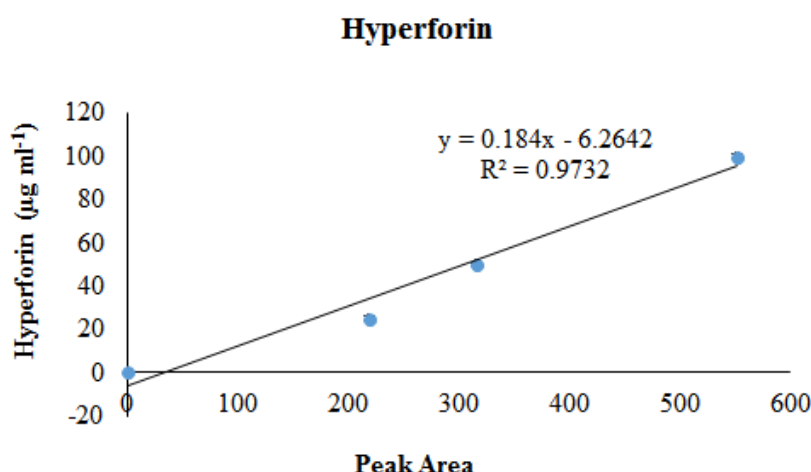
(میزان جذب عصاره) = [میزان فعالیت آنتی اکسیدانی × ۱۰۰] / (میزان جذب محلول شاهد) / (میزان جذب محلول شاهد) -

تجزیه و تحلیل آماری: سطح زیر پیک هر نمودار با استفاده از نرم افزار chromstar7 محاسبه و داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Excel مرتب گردید. تجزیه واریانس

برای قرائت هایپرپیرسین، سودوهایپرپیرسین و هایپرپورین، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC، مدل Sykam ساخت کشور آلمان)، شامل پمپ S5300 و فلورسنس مدل ۳۲۱۰ استفاده شد. فاز متحرک شامل اتیل استات (۳۹ میلی لیتر): بافر سدیم دی هیدروژن فسفات (۴۱ میلی لیتر): متانول (۱۶۰ میلی لیتر) بود. برای تهیه بافر مقدار ۱۵/۶ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات وزن و در یک لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. سپس pH آن با استفاده از اسید فسفریک یک نرمال بر روی ۲ تنظیم گردید. مقدار ۲۰ میکرو لیتر نمونه به دستگاه تزریق شد و با سرعت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه با استفاده از ستون C18 با قطر ذرات ۵ میکرون و ابعاد ۴/۶ × ۲۰۰ میلی متر عبور داده شدند. قرائت سودوهایپرپیرسین و هایپرپیرسین به ترتیب طی زمان ۳ و ۶ دقیقه و در طول موج ۵۹۰ نانومتر و قرائت هایپرپورین در طول موج ۲۷۰ نانومتر و زمان ۱۷ دقیقه انجام شد.

استاندارد هایپرپیرسین (شماره شناسایی ۹-۰۴-۵۴۸) و هایپرپورین (شماره شناسایی ۱-۵۳-۱۱۰۷۹) از شرکت سیگما (Sigma, Aldrich) تهیه گردید. بررسی میزان هایپرپیرسین و هایپرپورین با تهیه منحنی استاندارد و به صورت زیر انجام شد (شکل ۱).

برای اندازه گیری محتوی فنلی کل از عصاره متانولی ریشه ها توسط اسپکتروفتومتر مدل DU530 با روش تغییر یافته Folin و Ciocalteu (۱۹۲۷) استفاده شد. مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره متانولی به همراه ۱/۵۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر فولین-سیوکالتو ۲ نرمال (شرکت مرک آلمان) در تیوب ۲ میلی لیتری ریخته و به خوبی باهم مخلوط شدند. بعد از ۸ تا ۱۰ دقیقه مقدار ۰/۳ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به محلول اضافه و نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از این زمان میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. برای تهیه نمونه خالی به جای عصاره متانولی در ترکیب فوق از متانول استفاده گردید. در این روش گالیک اسید به عنوان استاندارد و برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار



شکل ۱- منحنی خط کالیبراسیون ترکیب هایپریرسین و هایپر فورین

نظر صفت درصد وزن خشک تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۲).

مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی در خصوص صفت هایپریرسین نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقدار هایپریرسین (۸۰/۸۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک) بود. تیمار ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول کمترین مقدار هایپریرسین (۱۰/۴۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) را نسبت به سایر تیمارهای مورد استفاده داشت. در خصوص تیمار سودوهایپریرسین، تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر دارای بیشترین مقدار (۷۴/۰۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در بین تیمارهای اعمال شده بود. همچنین تیمار ۲۷۵ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول کمترین میزان سودوهایپریرسین (۱۸/۶۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک) را در بین تیمارهای اعمال شده داشت (شکل ۳). از نظر مقادیر هایپر فورین، تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقدار (۱۶۶۵/۶۷۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و تیمار ۱۲۵ میلی گرم میواینوزیتول کمترین تأثیر را بر میزان هایپر فورین (۴۸۹/۳۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک) داشت (شکل ۴).

مقایسه میانگین فنل نشان داد که تیمار ۷۵ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول بیشترین مقدار فنل (۴۳/۳۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک) را داشت و بین غلظت های ۷۵ و ۲۲۵ میلی گرم بر لیتر

داده ها براساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده ها براساس آزمون دانکن (سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم افزار RStudio انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از آزمایش نشان داد که بین تیمارها از نظر صفات فنل، هایپریرسین، سودوهایپریرسین، هایپر فورین و DPPH اختلاف بسیار معنی داری وجود داشت (جدول ۱). از نظر میزان فلاونوئید، وزن خشک، نرخ رشد و نسبت رشد نیز بین تیمارها اختلاف معنی داری بدست آمد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها از نظر میزان درصد وزن خشک اختلاف معنی داری وجود ندارد. به طور کلی در بین تیمارهای اعمال شده در این پژوهش، تیمارهای ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقادیر وزن خشک (به ترتیب ۶۸۸ و ۶۸۵ میلی گرم)، نرخ رشد (به ترتیب ۰/۸۸۴ و ۰/۸۸۰) و نسبت رشد (به ترتیب ۲۶/۵ و ۲۶/۴) بودند. از طرفی تیمار ۲۷۵ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای کمترین مقدار از نظر صفات ذکر شده بود. می توان بیان داشت که افزایش میزان میواینوزیتول تا ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر موجب افزایش وزن خشک ریشه نابجا گل راعی شد اما غلظت های بالاتر میواینوزیتول تأثیر منفی بر وزن خشک ریشه نابجا گل راعی داشت. بین تیمارهای مختلف میواینوزیتول از

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات هایپرپیرسین، سودوهایپرپیرسین، هایپرفورین، فنل، فلاونوئید و DPPH و خصوصیات رشدی ریشه نابجا گل راعی

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
فلاونوئید	فنل	هایپرفورین	سودوهایپرپیرسین	هایپرپیرسین		
۰/۷۱۷*	۵۹/۳۸**	۳۱۶۹۵۷**	۴۴۸/۵**	۸۴۷/۸**	۹	تیمار
۰/۱۵۳	۲۹/۷۶	۴۶۳۷۹	۹	۱۱/۴	۱۰	خطا
۱۳/۹۳	۱۵/۳۳	۲۶/۲۷	۸/۴۹	۱۴/۲۶		ضریب تغییرات (%)
درصد وزن خشک					درجه آزادی	منابع تغییرات
نسبت رشد	نرخ رشد	درصد وزن خشک	وزن خشک	DPPH		
۴/۳۳۷*	۰/۰۰۴۸*	۰/۱۹۲ ^{ns}	۲۷۱۰/۶*	۱۰۷۳/۷۱**	۹	تیمار
۱/۱۳۵	۰/۰۰۱۲	۰/۶۵۲	۷۰۹/۷	۳۶/۲۶	۱۰	خطا
۴/۳۵	۴/۳۴	۲۰/۷۲	۴/۱۸	۱۵/۵۶		ضریب تغییرات (%)

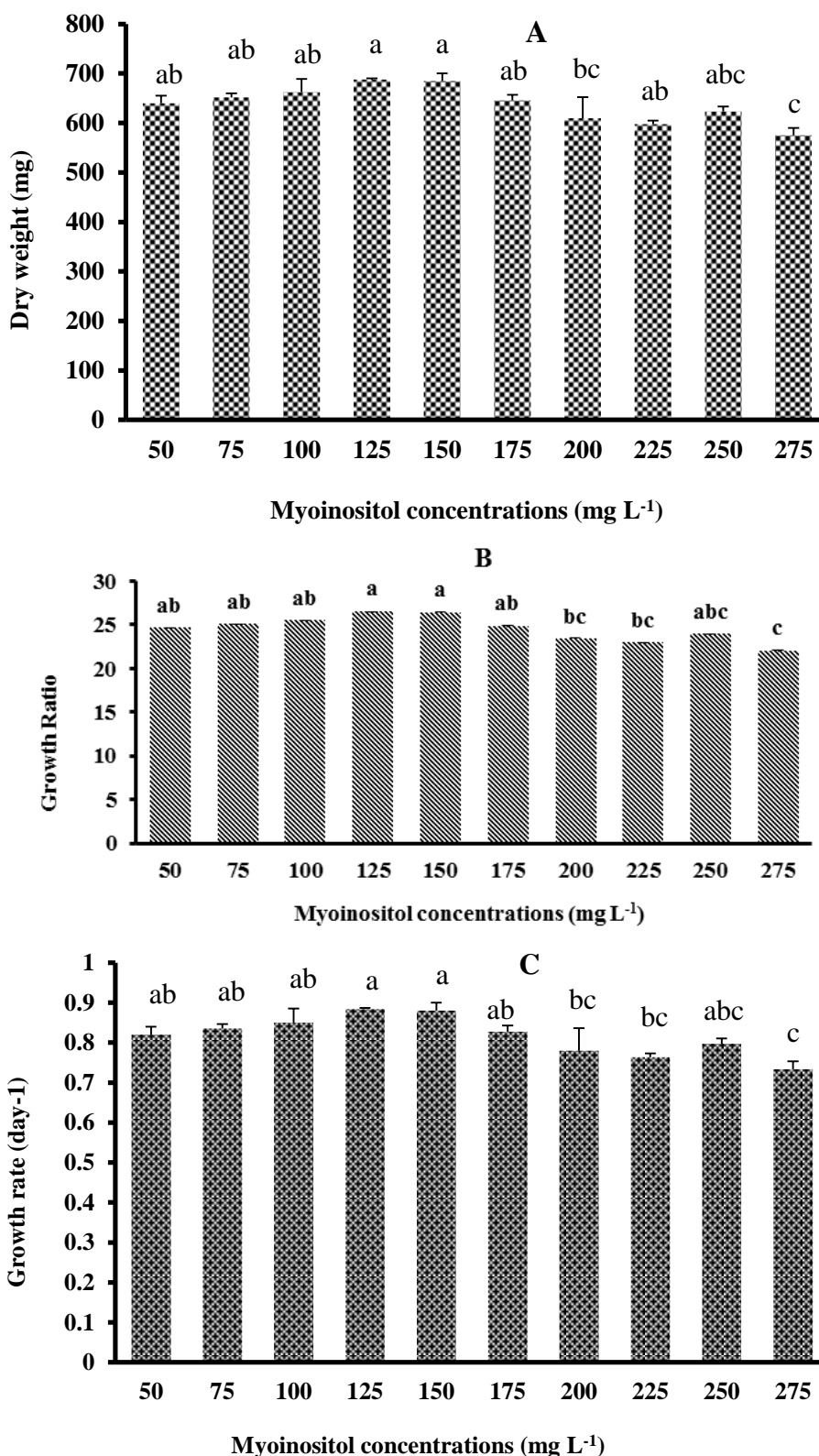
ns و ** و * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، یک درصد و عدم معنی داری.

انتقال سیگنال، تشکیل دیواره سلولی، تولید مولکول‌های مرتبط با تنش و بسیاری از فرآیندهای دیگر، برای رشد و نمو طبیعی گیاهان ضروری است (Anderson, 2003; Stevenson-Paulik, 2005; Zhai et al., 2016). Staudt (1984) تأثیر میواینوزیتول بر رشد کالوس گیاه *Vitis vinifera* را مطالعه کرده و عنوان نمود که غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول بر رشد کالوس تأثیر مثبت دارد اما غلظت‌های بالاتر میواینوزیتول موجب کاهش رشد کالوس شد. Sarropoulou و همکاران (2013) در تحقیق خود بر روی پایه‌های آلبالو بیان داشتند که میواینوزیتول درصد ریشه‌زایی را در پایه‌های CAB-6P و Gisela 6 محدود کرد. آنها همچنین بیان داشتند که پایه‌های مختلف (نمونه‌های مختلف) پاسخ‌های متفاوتی به تیمارهای میواینوزیتول از خود نشان داده‌اند. محققان نشان دادند که غلظت‌های مختلف میواینوزیتول تأثیرات متفاوتی بر خصوصیات ریشه‌دهی و متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارد (Sarropoulou et al., 2013). برای مثال Donnelly (1976) اعلام کرد که میواینوزیتول موجب کاهش درصد ریشه‌زایی در گیاه تمشک می‌شود درحالی‌که در گیاهان دیگر، میواینوزیتول موجب بهبود ریشه‌زایی شده است (Javis and Booth, 1981). در مطالعه انجام شده بوسیله Yildizli و همکاران (2018)

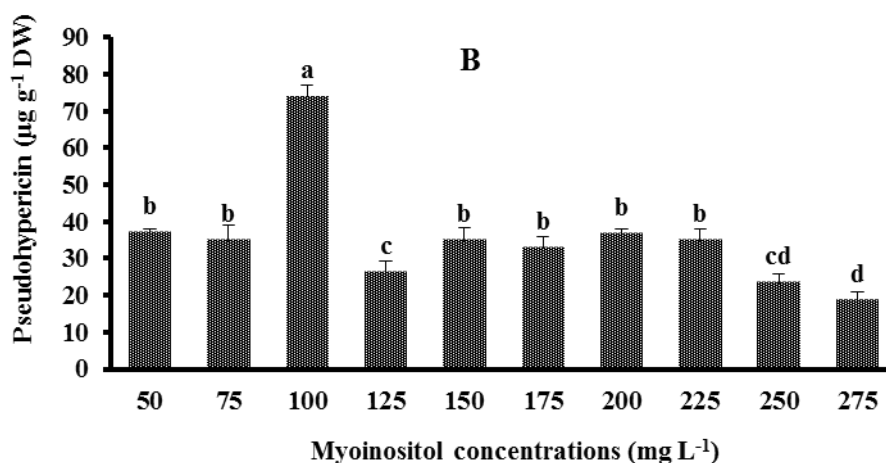
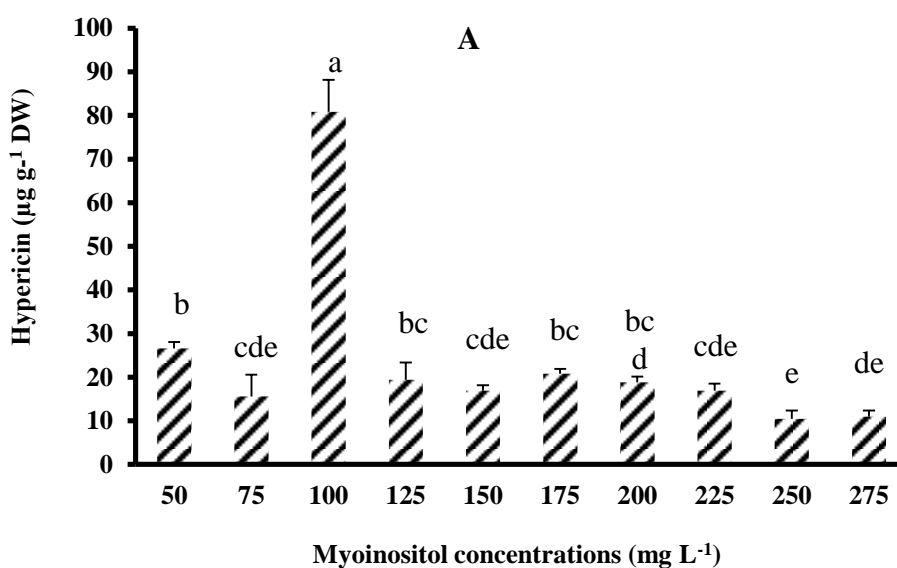
میواینوزیتول تفاوت معنی داری وجود نداشت. سایر غلظت‌های اعمال شده موجب کاهش میزان فنل شدند و کمترین مقدار (۲۷/۰۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول بود (شکل ۵). مقایسه اثر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول نشان داد که بین تیمارها از نظر مقدار فلاونوئید تفاوت معنی داری وجود داشت. تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای بیشترین مقدار فلاونوئید (۳/۵۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در بین تیمارهای اعمال شده بود. تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول نیز کمترین مقدار (۱/۳۹۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در بین سایر تیمارها را داشت (شکل ۵).

روند تغییر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در بین تیمارها متفاوت بود بطوریکه مقدار ۱۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای کمترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH بود. تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول بیشترین مقدار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH را داشت و با تیمار ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۶).

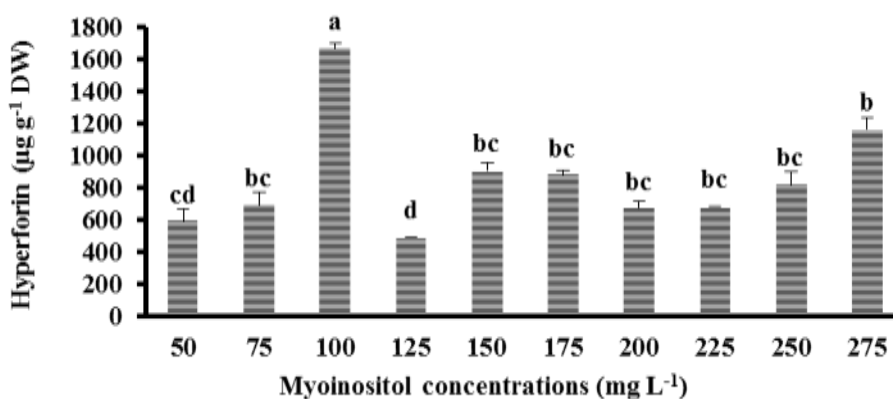
میواینوزیتول نوعی قند شبیه کربوهیدرات است که در بیشتر گیاهان عالی تولید می‌شود. این ترکیب بخاطر تأثیر در فرآیندهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل ذخیره فسفات،



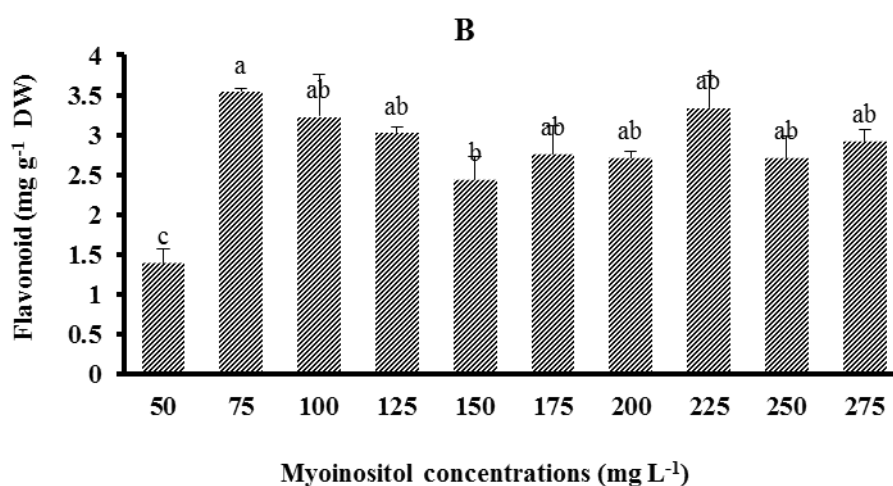
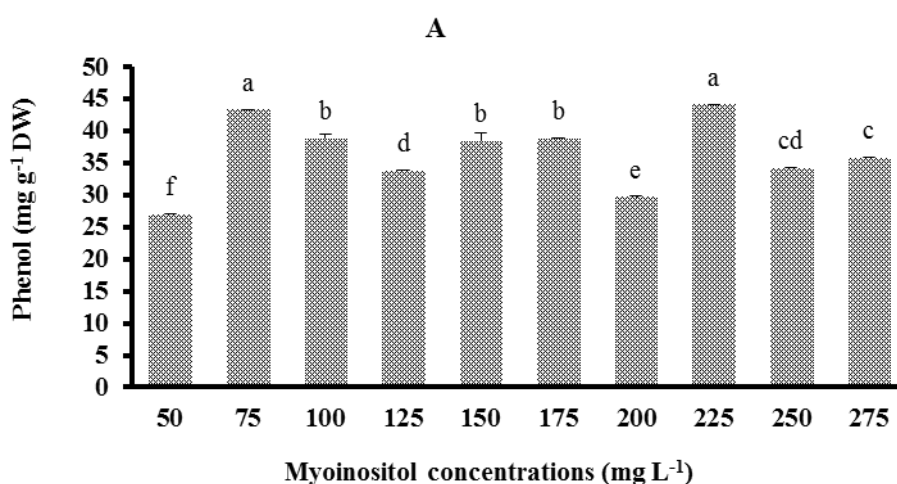
شکل ۲- تأثیر غلظت های مختلف میواینوزیتول بر صفات (A) وزن خشک، (B) نرخ رشد و (C) نسبت رشد ریشه نابجا گل راعی. هر ستون دارای حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می باشند.



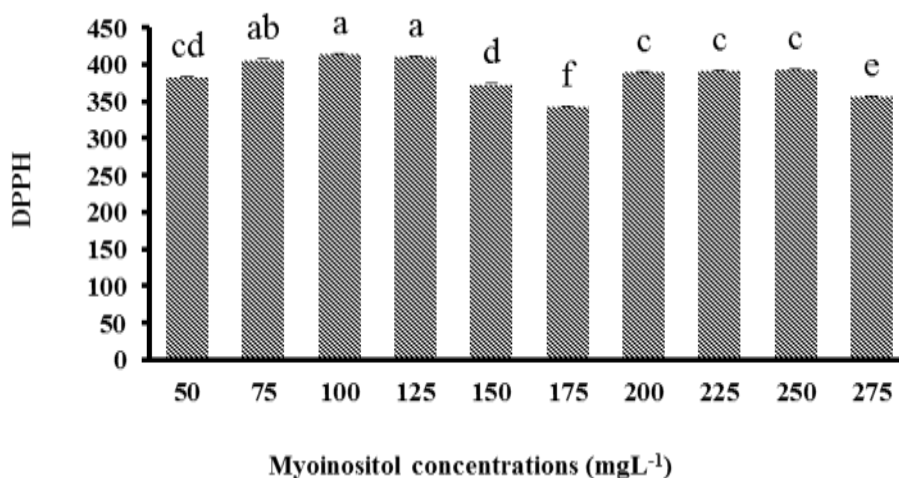
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول بر مقدار (A) هایپیرسین و (B) سودوهایپیرسین در ریشه نابجا گل‌راعی. هر ستون دارای حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشند.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول بر مقدار هایپرفورین در ریشه نابجا گل‌راعی. هر ستون دارای حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشند.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول بر میزان (A) فنل و (B) فلاونوئید در ریشه نابجا گل‌راعی. هر ستون دارای حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشند.



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در ریشه نابجا گیاه گل‌راعی. هر ستون دارای حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشند.

۷ و ۹ درصد)، در غلظت ۵ درصد بدست آمد. این محققان افزایش میزان فنل و فلاونوئید را به دلیل تنش اسمزی ناشی از غلظت‌های ساکارز اعلام کردند.

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیدانی از سیستم دفاعی مؤثری که شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، فعالیت مهار رادیکال DPPH، ترکیبات فنلی و تعداد دیگری از مواد آنتی اکسیدانی است، استفاده می‌کنند (Walker and Mckersie, 1993). غلظت این بیومولکول‌ها پس از مواجهه گیاه با تنش به سرعت افزایش یافته و هزینه‌های پاسخ به تنش را در گیاه تعدیل می‌کنند (Iqbal and Ashraf, 2006 & 2007; Iqbal et al., 2006). در تحقیق حاضر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول به بیشترین مقدار خود رسید. عشقی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) در تحقیق خود نشان دادند که بیشترین میزان درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در غلظت ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl بدست آمد. آنها اعلام کردند که کاهش محتوی آب برگ و افزایش پتانسیل اسمزی به همراه افزایش غلظت یون سدیم، پراکسیداسیون چربی‌ها و اختلال در کارکرد و ساختار غشاهای سلولی را در پی دارد (صالحی و همکاران، ۱۳۹۴ و Farooq and Azam, 2006). این وضعیت سبب افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول‌ها شده و به دنبال آن فعالیت مهار رادیکال DPPH نیز افزوده می‌شود (Hernández et al., 2001). کافی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش شوری در ژنوتیپ‌های نخود افزایش پیدا کرد البته در بعضی از ژنوتیپ‌ها با افزایش شوری در ابتدا افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH و در شوری شدید، کاهش فعالیت مهار رادیکال DPPH دیده شد. علت این امر می‌تواند به این دلیل باشد که تنش شوری بالا، اثر منفی روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Sidsel Fiskaa et al., 2009).

تحریک به عنوان یک راهبرد موثر برای افزایش تولید

مشخص شد که میواینوزیتول تأثیر مفیدی در کاهش اثرات منفی ناشی از تنش خشکی دارد. این محققان اعلام داشتند که میواینوزیتول مشابه با پرولین می‌تواند نقش مثبتی در انتقال سیگنال و تنظیم غلظت گونه‌های فعال اکسیژن و حفظ آماس سلولی داشته باشد. در تحقیق حاضر غلظت‌های مختلف میواینوزیتول تأثیرات متفاوتی بر خصوصیات رشدی ریشه گیاه گل‌راعی داشتند. به طور کلی در تیمار ۲۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول مقدار وزن خشک، نرخ رشد و نسبت رشد کاهش پیدا کرد. بنابراین می‌توان بیان داشت که غلظت‌های بیش از ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول دارای تأثیر منفی بر میزان خصوصیات رشدی ریشه نابجا گیاه گل‌راعی می‌باشند. از طرفی تفاوت معنی‌داری بین سایر غلظت‌ها مشاهده نشد بنابراین به نظر می‌رسد در شرایطی که فقط خصوصیات رشدی ریشه مدنظر باشد، از مقادیر کمتر میواینوزیتول می‌توان استفاده نمود.

بیشترین مقدار فنل در تیمارهای ۷۵ و ۲۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و مقدار فلاونوئید در تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول بدست آمد. ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنل‌های ساده، فنولیک اسیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلین‌ها، تانن‌های متراکم، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها تقسیم می‌شوند (Karaman et al., 2010). این ترکیبات به دلیل خصوصیات ردوکس خود می‌توانند به عنوان عامل کاهنده در پاکسازی اکسیژن یک‌تایی دخالت کرده و به دلیل ساختار شیمیایی متنوع، تفاوت‌هایی را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهند (Karaman et al., 2010; Parikka, 2007; Tawaha et al., 2007). فلاونوئیدها از ترکیبات پلی‌فنلی با وزن مولکولی کم و دارای اسکلت دی‌فنل پروپان، گروه بزرگی از این متابولیت‌های ثانویه هستند که تقریباً در همه گیاهان وجود دارند (Karaman et al., 2010). Cui و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیق خود در خصوص تأثیر ساکارز بر مقادیر متابولیت‌های ثانویه اعلام کردند که بیشترین میزان فلاونوئید و فنل در بین غلظت‌های مختلف آن (صفر، ۱، ۳، ۵،

که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول در مقایسه با دیگر غلظت های بکار رفته در این تحقیق توانست میزان این ترکیبات ثانویه را افزایش دهد. Asan و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیق خود بر روی تاثیر BAP بر روی میزان هایپرپسین اندام هوایی نتیجه گیری کردند که غلظت های مختلف BAP بر روی میزان هایپرپسین تأثیری ندارد. Montazeri و همکاران (۲۰۱۸) با تولید ریشه های موین توانستند در نهایت میزان ۰/۳ میلی گرم بر گرم هایپرپسین تولید کنند.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان بیان داشت که میواینوزیتول به عنوان یکی از اجزاء اصلی محیط کشت درون شیشه ای می تواند نقش مثبتی در تولید ترکیبات زیستی فعال و نیز متابولیت های ثانویه داشته باشد. غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول بیشترین تأثیر را بر تولید متابولیت هایی همچون هایپرپسین، سودوهایپرپسین و هایپرپورین داشت. از طرفی غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول توانست مقادیر فنل، فلاونوئید و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH را افزایش دهد. از آنجایی که پتانسیل تحریک متابولیت ثانویه در میان انواع کشت ها، الیسیتورها، شرایط اعمال و دیگر پارامترها متفاوت است، تحقیقات بیشتری برای درک مسیرهای متابولیکی که منجر به تولید متابولیت های ثانویه خاص و تنظیم آنها می شوند با بهینه سازی دستورالعمل های موثر و کارآمدتر ضروری می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) انجام شد.

متابولیت های ثانویه در گونه های گیاهی مانند گل راعی ذکر شده است، زیرا کاربرد ابزارهای مهندسی متابولیک یا زیست شناسی سنتزی به علت نبود روش های موفق تراریختی و اطلاعات ژنتیکی درباره مسیرهای بیوسنتزی، کار دشواری است (Hou et al., 2016). Liu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش نمودند که اضافه نمودن ال-فنیل آلانین (۷۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) موجب افزایش تولید هایپرپسین در کشت های مایع اندام هوایی گل راعی می شود. افزودن ال-تریپتوفان (۵۰ میلی گرم بر لیتر) با متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومول) موجب تحریک معنی دار تولید هایپرپورین (۱/۸ برابر) و افزایش زیست توده شد. سینامیک اسید (۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر) و امودین (۱ تا ۱۰ میلی گرم بر لیتر) هر کدام موجب افزایش تجمع هایپرپورین در گل راعی شدند اما مقدار هایپرپسین تحت تأثیر قرار نگرفت. نتایج مطالعه ای نشان داد که در کشت های تیمار شده گل راعی با ۱۰۰ ppb (در هر ۳۰ میلی لیتر محیط کشت) نانو اکسید روی افزایش در محتوی هایپرپسین (۷/۸۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و هایپرپورین (۲۱۷/۴۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. افزایش در محتوی هایپرپسین و هایپرپورین در کشت های تیمار شده با ۱۰۰ ppb نانو اکسید آهن نیز مشاهده گردید (Sharafi et al., 2013). نتایج مطالعه Ebadollahi و همکاران (۲۰۱۹) بر کشت کالوس گل راعی در معرض نانوذرات پرلیت و نانوکامپوزیت های TiO_2 /پرلیت نشان داد که نانوذرات پرلیت و نانوکامپوزیت های TiO_2 /پرلیت به عنوان یک الیسیتور موثر برای تولید ترکیباتی مانند هایپرپسین و سودوهایپرپسین در کشت کالوس گل راعی می توانند مورد استفاده قرار بگیرند. در تحقیق حاضر غلظت های مختلف میواینوزیتول به عنوان الیسیتور برای تولید هایپرپسین، سودوهایپرپسین و هایپرپورین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده حاکی از این بود

منابع

زمانی، م.، مرادی، ح.، چالوی، و. و کاظمی تبار، س.ک. (۱۳۹۷). اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر تولید هایپرپسین و هایپرپورین در کشت کالوس گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) رقم توپاز. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۹: ۹۲۳-۹۱۵.
 صالحی، م.، عشقی زاده، ح.ر. و کافی، م. (۱۳۹۴). کشاورزی شورش زیست: راهبردهای مدیریت گیاه، آب و خاک. انتشارات دانشگاه

فردوسی مشهد، مشهد.

- عشقی زاده، ح.ر.، کافی، م.، نظامی، ا. و خوشگفتارمنش، ا.ح. (۱۳۹۳) تأثیر شوری بر وضعیت آب برگ، غلظت پرولین، کل قندهای محلول و فعالیت آنٹی اکسیدانی گیاه ارزن پادزهری. مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای. ۵: ۲۵-۱۱.
- علی اکبری، ف. و کاظمی تبار، س.ک. (۱۳۹۱) انتخاب محیط کشت مناسب جهت کالوس زایی علف چای (*Hypericum perforatum* L.) با استفاده از نمونه های برگ و ساقه. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی).
- قاضیان تغریشی، گ.، عزیزی، م. و فارسی، م. (۱۳۸۵) بررسی کشت درون شیشه ای گل راعی بومی ایران (*Hypericum perforatum* L.). فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۲: ۱۷۹-۱۷۲.
- کافی، م.، باقری، ع.ا.، نباتی، ج.، زارع مهرجردی، م. و معصومی، ع. (۱۳۸۹) بررسی تأثیر تنش شوری بر برخی متغیرهای فیزیولوژیک ۱۱ ژنوتیپ نخود در محیط هیدروپونیک. مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای، ۱: ۷۰-۵۵.
- Andersen, C.P. (2003) Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *New Phytologist* 157: 213-228.
- Asan, H. S., Ozen, H. C., Onay, A. and Asan, N. (2015) Effect of BAP on total hypericin production in shoot cultures of *Hypericum scabroides*: An endemic species in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences* 9: 46-51.
- Bertoli, A., Giovannini, A., Ruffoni, B., Guardo, A. D., Spinelli, G., Mazzetti, M. and Pistelli, L. (2008) Bioactive constituent production in St. John's wort *in vitro* hairy roots. Regenerated plant lines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 5078-5082.
- Butterweck, V. (2003) Mechanism of action of St John's wort in depression. *CNS drugs* 17: 539-562.
- Chaouch, S. and Noctor, G. (2010) Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytologist* 188: 11-718.
- Choi, S. M., Son, S. H., Yun, S. R. and Paek, K. Y. (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 187-193.
- 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: 4708-4716.
- Donnelly, D. J. (1976) *In vitro* Culture of four Rubus species. Thesis, Macdonald College. McGill University, Vancouver.
- Ebadollahi, R., Jafarirad, S., Kosari-Nasab, M. and Mahjouri, S. (2019) Effect of explant source, perlite nanoparticles and TiO₂/perlite nanocomposites on phytochemical composition of metabolites in callus cultures of *Hypericum perforatum*. *Scientific reports* 9: pp.1-15.
- El Sharabasy, S. F., Bosila, H. A., Abdel-Aal, W. B., Bayome, M. M. and Abdel-Monem, A. B. (2019) Effect of Vitamins (pyridoxine and nicotinic acid), Thiamine-Hcl and Myo-Inositol at Different Concentrations on Free Amino Acids and Indoles Content of Embryogenic Callus of *in vitro* *Date Oalm* (Sakkoty and Bartamuda Cultivar). *Materials Research Proceedings* 11: 244-252.
- Farooq, S. and Azam, F. (2006) The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. *Journal of Plant Physiology* 163: 629-637.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biology and Chemistry* 27: 627-650.
- Gamborg, O. L., Miller, R. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* 50: 151-158.
- Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R. and Sevilla, F. (2001) Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* 127: 817-831.
- Holobiuc, I. and Blindu, R. (2006) *In vitro* culture introduction for ex situ conservation of some rare plant species. *Romany Journal of Biology and Plant Biology* 51: 13-23.
- Hou, W., Shakya, P. and Franklin, G. (2016) A perspective on *Hypericum perforatum* genetic transformation. *Frontiers in plant science*, 7, p. 879.
- Iqbal, M. and Ashraf, M. (2006) Wheat seed priming in relation to salt tolerance: Growth, yield and levels of free salicylic acid and polyamines. *Annales Botanici Fennici* 43: 250-259.
- Iqbal, M. Ashraf, M. (2007) Seed preconditioning modulates growth, ionic relations, and photosynthetic capacity in adult plants of hexaploid wheat under salt stress. *Journal of Plant Nature* 30: 381-396.
- Iqbal, M., Afzal, A., Yaegashi, S., Ruben, E., Triwitayakorn, K., Njiti, V., Ahsan, R., Wood, A. and Lightfoot, D.

- (2002) A pyramid of loci for partial resistance to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* maintains Myo-inositol-1-phosphate synthase expression in soybean roots. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1115-1123.
- Iqbal, M., Ashraf, M., Rehman, S. and Rha, E.S. (2006) Does polyamine seed pretreatment modulate growth and levels of some plant growth regulators in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) plants under salt stress? *Bot Stud* 47: 239-250.
- Jarvis, B. C. and Booth, A. (1981) Influence of indole-butyric acid, boron, myo-inositol, vitamin D2 and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus aureus*. *Journal of Physiology Plant* 53: 213-218.
- Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K.S. and Apak, R. (2010) Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry* 120: 1201-1209.
- Kim, Y.S., Hahn, E.J., Murthy, H.N. and Paek, K.Y. (2004) Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. *Journal of Plant Biology* 147: 356-360.
- Kirakosyan, A., Sirvent, T. M., Gibson, D. M. and Kaufman, P. B. (2004) The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biotechnology Apply Biochemistry* 39: 71-81.
- Koperdákóvá, J., Komarovská, H., Košuth, J., Giovannini, A. and Čellárová, E. (2009) Characterization of hairy root-phenotype in transgenic *Hypericum perforatum* L. clones. *Acta physiologiae plantarum* 31: 351-358.
- Lee, E.J., Mobin, M.E., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2006) Effects of sucrose, inoculums density, auxins and aerator volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. *Journal of Plant Biology* 49: 427-431.
- Liu, X. N., Zhang, X. Q., Zhang, S. X. and Sun, J. S., (2007) Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 1-7.
- Loewus, F.A. and Dickinson, D. B. (1982) Cylitol. - In: *Encyclopedia of Plant Physiology* (Ed. Loewus, F. A. and Tanner W.). New Series 13: 201-207.
- Loewus, F. A. and Murthy, P. P. N. (2000) Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150: 1-19.
- McCoy, J. A. and Camper, N. D. (2002) Development of a micropropagation protocol for St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Horticulture Science* 37: 978-980.
- Montazeri, M., Azadbakht, M., Najafi Zarrini, H., Nematzadeh, G., Pakdin Parizi, A. and Davoodi, A. (2018) Hairy root cultures of *Hypericum perforatum* L.; A promising method for the high scale production of hypericin. *Journal of Medicinal Plants* 17: 55-67.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2006) St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): challenges and strategies for production of chemically-consistent plants. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 765-771.
- Noiraud, N., Maurousset, L. and Lemoine, R. (2001) Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology Biochemistry* 39: 717-728.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. (2005) Application of bioreactor system for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 287-300.
- Parikka, K. (2007) Antioxidative long chain alkylresorcinols: synthesis and deuterium labeling of bioactive compounds present in whole grains. Academic dissertation. Thesis presented in Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Helsinki, Finland.
- Pavlik, M., Vacek, J., Klejdus, B. and Kubáň, V. (2007) Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of sucrose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6147-6153.
- Saifullah, A., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2008) Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. *Journal of Plant Biology* 51: 209-212.
- Sepehr, M.F. and Ghorbanli, M. (2002) Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(2): 171-175.
- Sharafi, E., Khayam Nekoei, S. M., Fotokian, M. H., Davoodi, D., Hadavand Mirzaei, H. and Hasanloo, T. (2013) Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-products* 2: 177-184.
- Sidsel Fiskaa, H., Grethe, I., Borge, A, Knut A. and Gunnar, B. (2009) Effect of cold storage and harvest data on bioactive compound in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Postharvest Biology and Technology* 51: 36-42.
- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O. and Dias, A.C. (2005) Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry* 90: 157-167.
- Staudt, G. (1984) The effect of myo-inositol on the growth of callus tissue in *Vitis*. *Journal of plant physiology* 116(2): 161-166.
- Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R. J., Chiou, S. T., Frye, R. A. and York, J. D. (2005) Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences 102: 12612-12617.
- Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A. N., Vervoort, J. and Gerothanassis, I. P. (2007) Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68: 383-393.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 104: 1372-1378.
- Vinterhalter, B., Ninković, S., Cingel, A. and Vinterhalter, D. (2006) Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia plantarum* 50: 767-770.
- Walker, M. A. and McKersie, B. D. (1993) Role of the ascorbate glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology* 141: 234-239.
- Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J. and Paek, K.Y. (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49: 193-199.
- Yildizli, A., Çevik, S. and Ünyayar, S. (2018) Effects of exogenous myo-inositol on leaf water status and oxidative stress of *Capsicum annuum* under drought stress. *Acta physiologiae plantarum* 40: 122.
- Yoshikawa, T. and Furuya, T. (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Report* 6: 449-453.
- Yu, K. W., Gao, W. Y., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2001) Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Journal of Plant Biology* 44: 179-184.
- Zhai, H., Wang, F., Si, Z., Huo, J., Xing, L., An, Y., He, S. and Liu, Q. (2016) A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, Ib MIPS 1, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. *Plant biotechnology journal*, 14(2): 592-602.
- Zobayed, S. M. A., Afreen, F. and Kozai, T. (2005) Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiology Biochemical* 43: 977-984.

The study of effect of myo-inositol on biomass and secondary metabolites value in adventitious roots of st. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)

Amir Moradi Sarabshelli¹, Sayed Kamal Kazemitabar¹, Morteza Ebrahimi^{*2}, Ghafar Kiani¹ and Morteza Khanahmadi²

¹Department of Biotechnology and Plant Breeding, college of agricultural science, Sari agricultural sciences and natural resources university (SANRU), Sari, Iran

²Agricultural biotechnology research institute, central region of Iran, Isfahan, Iran, Email:, Tel: 09133291457
(Received: 25/11/2019, Accepted: 15/01/2020)

Abstract

St. John's wort is a traditional herbal medicine used to treat depression and wound healing. Natural resource dependency and traditional cultivation methods often require months and years of time to reach medicinal plants. Establishing a hairy root suspension culture system can accelerate proliferation on a large scale, improve breeding and protect the species, but optimization and production on a large scale require an increase in the biomass and secondary metabolites of the root. In this study, the effect of different concentrations of myo-inositol (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, and 275 mg / l) were evaluated on biomass, phenol, flavonoid, DPPH activity and secondary metabolites in St. John's wort adventitious root in Agricultural Biotechnology Research Institute-Central Region of Iran. The results showed that 125 and 150 mg L⁻¹ myo-inositol concentration had the highest dry weight, growth rate and growth ratio. The concentrations of 100 and 250 mg L⁻¹ myo-inositol showed the highest and lowest amount of hypericin and pseudohypericin, respectively. From the viewpoint of production of hyperforin, the treatment with 100 mg L⁻¹ myo-inositol was highest and the concentration of 125 mg L⁻¹ had the least effect on the level of hyperforin in St. John's wort adventitious root culture. There was a significant difference between treatments in terms of phenol and flavonoid content, so the concentration of 75 and 225 mg L⁻¹ and 75 mg L⁻¹ myo-inositol had the highest amount of phenol and flavonoids. The DPPH activity changes were different between treatments, and the 50 mg L⁻¹ showed the lowest amount of DPPH activity. However, the DPPH activity was highest in treatment with 75 mg L⁻¹ myo-inositol concentration. Since the potential for stimulating secondary metabolites varies among cultures, elicitors, conditions for applying different treatments and other parameters, further research is needed to optimize better and more efficient guidelines.

Keywords: Antioxidant activity, Elicitor, Hypericin, Phenol.

Corresponding author, Email: o_m_abrahimi@yahoo.com