

تأثیر فنولوژی بر فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های بیوسنتزی اسیدهای فنلی در *Salvia leriifolia* Benth.

نفسه نعمت‌شاهی^۱، پروانه ابریشم‌چی^{۲*}، طیبه رجیبان^۳ و سید علیرضا سلامی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، پست الکترونیک: abrisham@um.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۹

چکیده

مریم‌گلی با نام علمی *Salvia leriifolia* Benth. از گیاهان دارویی بومی ایران است که خواص دارویی آن به حضور ترکیب‌های فنلی، به‌ویژه اسیدهای فنلی نسبت داده شده است. این پژوهش، تأثیر سن (فنولوژی) را بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی اسیدهای فنلی مورد بررسی قرار داد. بذرها از شهرستان تربت‌حیدریه (خراسان رضوی) جمع‌آوری و در گلخانه کاشته شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها، در مراحل ۸، ۱۶ و ۲۴ برگی از دوره رشد انجام شد. محتوای فنل، فلاونوئید و اسید فنلی تام به روش اسپکتروفتومتری و پروفایل اسیدهای فنلی، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد. فعالیت فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) و تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) به روش اسپکتروفتومتری و رزمارینیک اسید سنتاز (RAS) با HPLC اندازه‌گیری شد. بیان نسبی ژن‌های ذکر شده، با روش RT-PCR کمی بررسی شد. نتایج حکایت از افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) محتوای انواع ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌ژن‌های TAT و RAS همراه با افزایش سن داشت. در مرحله ۲۴ برگی، مقدار کل فنل، فلاونوئید و اسید فنلی به ترتیب ۳/۴۷، ۲/۸۰ و ۷/۷۸ برابر مرحله ۸ برگی بود. محتوای رزمارینیک اسید و کافئیک اسید (به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۳۶ mg/g DW در مرحله ۸ برگی)، طی رشد رویشی به ترتیب ۳/۴۱ و ۴/۰۵ برابر شد. لیتوسیرمیک اسید و سالونیلک اسیدها (۰/۰۶-۰/۰۱ mg/g DW در مرحله ۸ برگی)، سهم کمتری از کل اسیدهای فنلی را داشتند. مقدار آنها نیز با افزایش سن، بین ۲ تا ۱۰ برابر افزایش یافت. همچنین، یک همبستگی مثبت و قوی میان سن گیاه با تجمع اسیدهای فنلی و میان سن و فعالیت آنزیم‌ژن‌های TAT و RAS مشاهده شد. این امکان وجود دارد که آنزیم TAT (در مقایسه با PAL) نقش اصلی را در بیوسنتز RA داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تیروزین آمینوترانسفراز، رزمارینیک اسید، رزمارینیک اسید سنتاز، رشد رویشی، فنیل‌آلانین آمونیلایز، مریم‌گلی (*Salvia leriifolia* Benth.).

مقدمه

مریم‌گلی (*Salvia L.*)، به‌عنوان بزرگترین سرده از تیره نعناعیان (*Lamiaceae*)، با داشتن حدود ۱۰۰۰ گونه، پراکنش جهانی دارد (Moridi Farimani et al., 2019). مریم‌گلی مشهدی یا کابلی (*Salvia lerifolia Benth.*) که یکی از گونه‌های دارویی این سرده است، بومی کشور ایران و افغانستان می‌باشد و پراکنش آن در ایران از استان‌های خراسان جنوبی، خراسان رضوی و سمنان گزارش شده است (Mozaffarian, 2007; Reching, 1996). از این گیاه دارویی، در طب سنتی برای پیشگیری و درمان دیابت و تنظیم عادت ماهانه بانوان استفاده می‌شود (Kamatou et al., 2005; Topcu, 2006; Amiri & Joharchi, 2013). گونه ذکرشده، به‌دلیل دارا بودن خواص دارویی مختلف مانند پایین آورنده قند و فشار خون، خواب‌آور، آنتی‌اکسیدان، ضد درد، ضد التهاب، ضد تشنج، ضد زخم (زخم معده) (Hosseinzadeh et al., 2009)، آرام‌بخش، کاهش‌دهنده وابستگی به مورفین (Hosseinzadeh & Lari, 2000)، تخفیف علائم آلزایمر (Loizzo et al., 2010)، بهبود حافظه فضایی (Erish et al., 2018)، ضد ایسکمی مغزی (Khouei et al., 2003)، ضد باکتری (Abrishamchi et al., 2016) و ضد جهش (Fazly-Bazzaz & Izadyar, 2002)، در طب مدرن نیز مورد توجه قرار گرفته است.

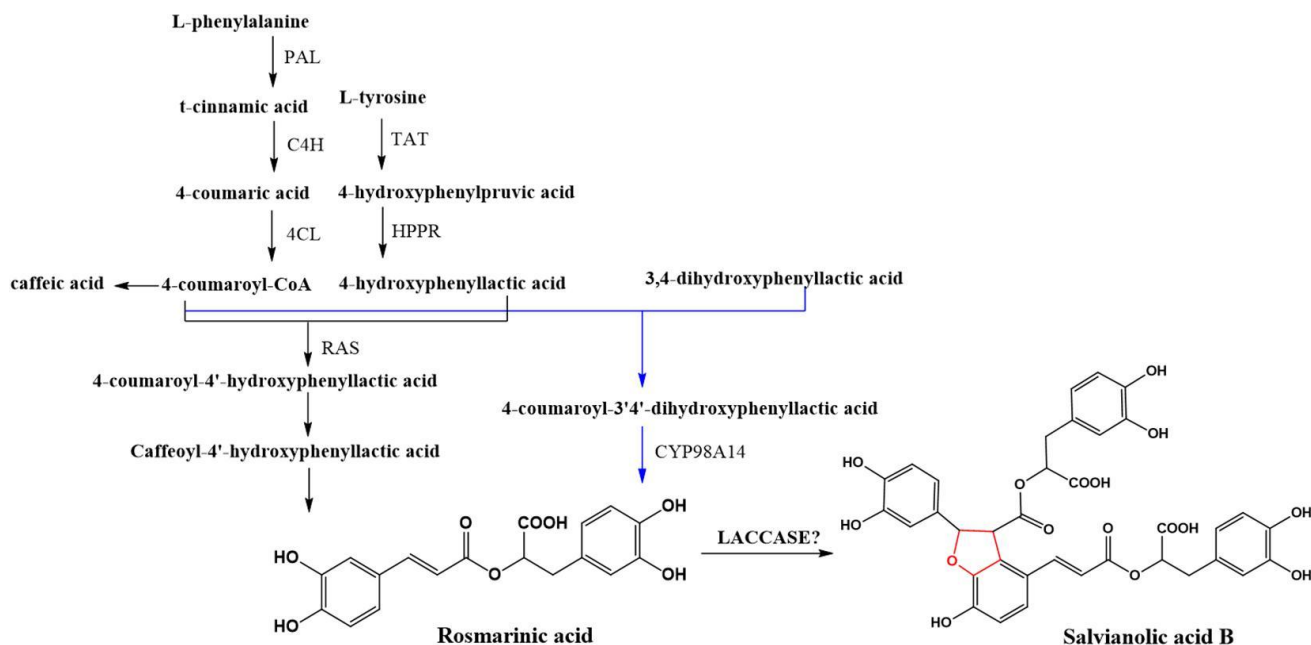
بخش مهمی از ارزش دارویی گونه‌های مریم‌گلی، وابسته به حضور متابولیت‌های ثانویه فنلی، به‌ویژه اسیدهای فنلی در آن است (Lu & Foo, 2002; Li et al., 2013). حضور کافئیک اسید (CA)، رزمارینیک اسید (RA)، سالویانولیک اسید A (Sal A) و سالویانولیک اسید B (Sal B) در برگ و ریشه اغلب گونه‌های مریم‌گلی از جمله مریم‌گلی مشهدی گزارش شده است (Hao et al., 2015; Jami et al., 2018; Fotovvat et al., 2019). رزمارینیک اسید، رایج‌ترین اسید فنلی در سرده مریم‌گلی است که اولین بار در سال ۱۹۸۵ از گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) استخراج شد (Scarpati & Oriente, 1985). این ترکیب پلی‌فنلی، از

استری شدن CA با دانشنسو (۳ و ۴ دی هیدروکسی فنیل‌لاکتیک اسید) به‌وجود می‌آید (Jiang et al., 2005; Hou et al., 2011). رزمارینیک اسید، واحد ساختاری مرکزی برای تولید اسیدهای فنلی پیچیده مانند سالویانولیک اسیدها و لیتوسپرمیک اسید (LA) است. سالویانولیک اسید A، از یک مولکول دانشنسو و دو مولکول CA و سالویانولیک اسید B، از سه مولکول دانشنسو و یک مولکول CA تشکیل شده است. لیتوسپرمیک اسید نیز استری از RA و CA می‌باشد (Petersen, 2013; Habtemariam, 2018; Ma et al., 2019).

بیوسنتز RA با مترکم شدن دو ترکیب ۴-کوماریل کوآ و دی‌هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک اسید که به‌ترتیب از پیش‌سازهای اولیه فنیل‌آلانین و تیروزین تولید می‌شوند، آغاز می‌گردد. فنیل‌آلانین از طریق مسیر فنیل پروپانوئید، به CA و بعد به ۴-کوماریل کوآ تبدیل می‌شود. واکنش آغازی در این مسیر، توسط آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL: Phenylalanine ammonia lyase) کاتالیز می‌شود. تیروزین نیز در مسیر مشتق از تیروزین تبدیل به دی‌هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک اسید می‌شود. آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز (TAT: Tyrosine aminotransferase)، مرحله آغازی را در این مسیر کاتالیز می‌کند. بنابراین آنزیم‌های PAL و TAT نقش مهمی در تولید RA ایفاء می‌کنند. مرحله کلیدی بعدی در مسیر بیوسنتز RA، ترانس استریفیکاسیون دو ترکیب ۴-کوماریل کوآ و دی‌هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک اسید، توسط آنزیم رزمارینیک اسید سنتاز (RAS: Rosmarinic acid synthase) در محل تلاقی دو مسیر فنیل‌پروپانوئید و مشتق از تیروزین می‌باشد. به‌دنبال آن، ترکیب حاصل هیدروکسیله و به RA تبدیل می‌شود (شکل ۱). جزئیات بیوسنتز لیتوسپرمیک اسید و سالویانولیک اسیدها از RA هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است، اما در ارتباط با Sal B به‌نظر می‌رسد که یک آنزیم لاکاز (Lacase)، با اکسیداسیون RA به دو رادیکال فنوکسیل و پیوستن خود به خودی این رادیکال‌ها در تولید این ترکیب نقش داشته باشد (شکل ۱) (Ma et al., 2015; Wang et al., 2019). همچنین

را به وجود آورد (Di et al., 2013; Wang et al., 2019).

ممکن است که RA از طریق تبدیل شدن به سالیانولیک اسید E، سایر سالیانولیک اسیدها مانند Sal A و Sal B



شکل ۱- مسیر بیوسنتز اسیدهای فنلی

PAL: فنیل آلانین آمونیا لیااز، C4H (Cinnamate 4-hydroxylase): سینامات ۴- هیدروکسیلاز، 4CL (Coumarate coenzyme A ligase-۴): ۴-کومارات کوآنزیم آ لیگاز، TAT: تیروزین آمینوترانسفراز، HPPR (Hydroxyphenylpyruvate reductase): هیدروکسی فنیل پیرووات ردوکتاز، CYP98A14 (Cytochrome p450 monooxygenase): مونوآکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450، RAS: رزمارینیک اسید سنتاز، LACCASE: آنزیم لاکاز (برگرفته از: Li et al., 2019)

در برابر آلزایمر و دمانس مغزی (Habtemariam, 2018; Espindola et al., 2019) می‌باشند.

اسیدهای فنلی به دلیل خواص دارویی شناخته شده‌شان، کاندیداهای بسیار خوبی برای تولید داروهای جدید هستند. کیفیت و کیفیت این ترکیب‌ها در گیاهان و در نتیجه خواص بیولوژیکی و دارویی آنها، تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله سن، فصل و مراحل رشد و نمو قرار می‌گیرد (Mutalib, 2015; Vagiri et al., 2015; Soltanabad et al., 2018). محققان مختلف مقدار و نوع متابولیت‌های ثانویه فنلی را ضمن رشد و نمو گیاهان دارویی بررسی کرده‌اند تا بتوانند بهترین زمان برداشت را برای استفاده بهینه از مواد مؤثره گیاهی تعیین کنند (Chen et al., 2012; Suwa et al., 2018).

مطالعات در زیوه (*in vivo*) و در شیشه (*in vitro*) طیف بسیار گسترده‌ای از خواص بیولوژیکی را برای CA و مشتقات آن مانند RA و سالیانولیک اسیدها معرفی کرده‌اند (Hao et al., 2015). این متابولیت‌ها آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری، ضد ویروس و عوامل ضد التهابی قوی هستند (Wang, 2010; Adomako-Bonsu et al., 2017; Espindola et al., 2019). تأثیر محافظت‌کننده بر قلب (Wang, 2010; Ho & Hong, 2011)، کبد و کلیه (Lu & Foo, 2002; Alagawany et al., 2017) دارند، از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کنند، ضد سرطان (Ma et al., 2019)، ضد دیابت (Ngo & Chua, 2018)، ضد آتروسکلروزیس، تحریک‌کننده سیستم ایمنی و محافظت‌کننده سیستم عصبی

۴ برگ متقابل، به گلدان‌های پلاستیکی ۸ کیلوگرمی حاوی خاک زراعی، ماسه و کوکوپیت-پرلیت با نسبت وزنی مساوی منتقل گردیدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت شرایط نور طبیعی (۱۴ ساعت روشنایی/۱۰ ساعت تاریکی) قرار گرفتند و آبیاری نهال‌ها، براساس ظرفیت زراعی گلدان‌ها انجام گردید. برداشت برگ‌های گیاهان در سن ۲، ۴ و ۷ ماهگی (به ترتیب برابر مراحل ۸، ۱۶ و ۲۴ برگی) انجام شد.

استخراج ترکیب‌های فنلی

عصاره‌گیری برای ترکیب‌های فنلی برگ به روش Shokrollahi و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد. یک گرم پودر برگ خشک شده، با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪، با روش خیس کردن (Maceration) عصاره‌گیری شد. مخلوط نمونه‌ها و حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و تاریکی، بر روی شیکر چرخشی (سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه) خیس شد. همگنای حاصل ابتدا با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف و بعد تبخیر حلال و خشک شدن عصاره‌ها توسط جریان گاز ازت انجام شد. عصاره‌های خشک شده پس از توزین، در دمای 8°C نگهداری شدند.

شناسایی و سنجش مقدار اسیدهای فنلی برگ به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شناسایی و سنجش مقدار اسیدهای فنلی (LA, RA, CA, Sal A و Sal B) در نمونه‌های برگ، به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. به این منظور، از دستگاه HPLC (Smartline, Kenuer, Germany) مجهز به پمپ‌های چهارگانه و ستون فاز معکوس (Eurosphere-100 C18, Kenuer, Germany) 4×250 میلی‌متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر) و یک آشکارساز UV-VIS (مدل D14163 Chrom Gate استفاده شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار Chrom Gate (ویرایش ۳/۱) پردازش شدند. تمام حلال‌های مورد استفاده ویژه HPLC بودند. آب اسیدی شده با اسید فسفریک ۰/۱٪

غلظت متابولیت‌های فنلی در اندام‌های گیاهی، ضمن مراحل مختلف رشد و نمو، تابع فعالیت و سطح بیان آنزیم‌های بیوسنتزی می‌باشد (Holander-Czytko *et al.*, 2005). ارتباط میان سطح بیان ژن و میزان فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی اسیدهای فنلی (به‌ویژه PAL, TAT و RAS) با تولید و تجمع این ترکیب‌ها در گیاهان تیره نعناع از جمله مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) بررسی شده (Hao *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2009; Sahu *et al.*, 2014)، اما اغلب مطالعات با هدف بهینه‌سازی تولید اسیدهای فنلی در کشت‌های درون شیشه‌ای انجام شده است (Norouzi *et al.*, 2016; Ru *et al.*, 2016; Ogata *et al.*, 2004). پژوهش‌های اندکی در این رابطه بر روی گیاهان رشد کرده در گلخانه یا مزرعه (در زیوه) وجود دارد (Hu *et al.*, 2009; Kamalizadeh *et al.*, 2014).

اگرچه گزارش‌های قبلی، حضور Sal A, RA, CA و Sal B را در مریم‌گلی مشهدی اعلام کرده‌اند (Jami *et al.*, 2018; Fotovvat *et al.*, 2019)، اما این پژوهش برای اولین بار تأثیر سن را بر پروفایل اسیدهای فنلی، بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی مربوطه در شرایط گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار داد. با توجه به ارزش کاربردی ترکیب‌های پلی‌فنلی در صنایع مختلف، به‌ویژه صنایع دارویی، شناخت ارتباط میان مراحل رشد و نمو گیاه با تولید و تجمع اسیدهای فنلی و تعیین سهم مسیرها و آنزیم‌های تنظیمی مسئول تولید این ترکیب‌ها، امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذر و شرایط کاشت گیاه

بذرهای رسیده گیاه از ارتفاعات ۱۳۳۱ متری شهرستان تربت‌حیدریه، در استان خراسان رضوی ($35^{\circ} 11' 30''/80^{\circ}$ N، $59^{\circ} 17' 8''/20^{\circ}$ E) جمع‌آوری شدند. خواب بذرها با استفاده از تیمار سرما (دمای 4°C به مدت یک هفته) شکسته شد و پس از خراش دادن پوسته با اسکالپل، بذرها در ظروف حاوی کوکوپیت کاشته شدند. نهال‌های ۳۰ روزه حامل

۲۰ میکرولیتر از آن با سه تکرار به دستگاه تزریق شد. منحنی استاندارد برای هر یک از اسیدهای فنلی براساس نسبت سطح زیر قله کروماتوگرام در برابر غلظت رسم و معادله خط مربوطه تعیین شد (جدول ۱). غلظت اسیدهای فنلی با استفاده از معادلات خط محاسبه و براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد.

(حجمی/حجمی) (حلال A) و استونیتریل (حلال B) به‌عنوان فاز متحرک با زمان‌بندی گرادینتی و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفتند. آشکارسازی طیف اسیدهای فنلی، در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه، با فیلتر سرسرنگی استات سلولز (با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر) تصفیه و

جدول ۱- معادلات خط حاصل از منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر سطح زیر منحنی استاندارد اسیدهای فنلی در HPLC

ضریب رگرسیون (r^2)	معادله خط	محدوده غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد خلوص	اسید فنلی
۰/۹۹۷۷	$y = ۷۱۴۹/۳x$	۰-۲۰۰	$\geq ۹۸\%$	کافئیک اسید
۰/۹۹۶۲	$y = ۴۱۶۰۶x$	۰-۱۲۰	۹۶%	رزمارینیک اسید
۰/۹۹۸۱	$y = ۱۵۰۲۴x$	۰-۲۵۰	$\geq ۹۸\%$	لیتوسپرمیک اسید
۰/۹۹۶۵	$y = ۱۹۴۹۷x$	۰-۱۰۰	$\geq ۹۵\%$	سالویانولیک اسید A
۰/۹۹۵۴	$y = ۳۴۸۲۲x$	۰-۱۲۰۰	$\geq ۹۴\%$	سالویانولیک اسید B

استاندارد گالیک اسید ($y = ۰/۰۰۴۶x$, $r^2 = ۰/۹۹۸۳$) که در محدوده غلظت صفر تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رسم شده بود، محاسبه و در نهایت براساس میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گزارش شد.

سنجش محتوای فلاونوئید تام

محتوای فلاونوئید تام در عصاره‌های استخراج شده، به کمک معرف کلرید آلومینیوم و با استفاده از روش رنگ‌سنجی (Colorimetric Method) در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Pourmorad et al., 2006). منحنی استاندارد کوئرستین در محدوده غلظت صفر تا ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسم شد و براساس معادله خط بدست آمده ($y = ۰/۰۰۷۶x + ۰/۰۱۶۴$, $r^2 = ۰/۹۹۶۱$)، مقدار کل فلاونوئیدها براساس میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گزارش شد.

سنجش محتوای فنل تام

سنجش محتوای کل ترکیب‌های فنلی، با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) و به روش Alizadeh و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد. ابتدا ۱ میلی‌گرم عصاره خشک در ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ حل شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از این عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو ۱۰٪ (حجمی/حجمی)، در یک لوله آزمایش مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند و در ادامه پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ (وزنی/حجمی)، به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی و دمای محیط قرار گرفتند. جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۷۶۵ نانومتر به روش اسپکتروفوتومتری (SPEKOL1500, Analytik Jena, Germany) تعیین شد. غلظت ترکیب‌های فنلی تام در عصاره‌ها، با استفاده از رابطه خط حاصل از منحنی

سنجش محتوای اسید فنلی تام مقدار کل اسیدهای فنلی، با استفاده از معرف آرنو (Arnow)، براساس روش Matkowski و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL1500, Analytik Jena, Germany) اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های صفر تا ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RA در متانول ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفتند و براساس معادله خط ($y = ۲/۹۰۳۱ x$, $r^2 = ۰/۹۹۴۴$) حاصل از منحنی، مقدار کل اسیدهای فنلی براساس میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک تعیین شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز

فعالیت آنزیم PAL براساس اندازه‌گیری تولید سینامیک اسید به‌عنوان فرآورده واکنش و براساس روش Yan و همکاران (۲۰۰۶) بررسی شد. به این منظور، ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، با ۱ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۰/۰۲ مولار (محلول در بافر بورات ۰/۰۱ مولار با $\text{pH} = ۸/۸$)، ۲ میلی‌لیتر بافر بورات ۰/۰۱ مولار با $\text{pH} = ۸/۸$ و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰°C نگهداری شد. تغییر میزان جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر، بین زمان شروع (زمان صفر) و پایان واکنش (دقیقه ۲۰ ام) به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی سینامیک اسید (۱۰۹۰۰ لیتر بر مول بر سانتی‌متر) محاسبه و بر حسب نانوکاتال بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز

فعالیت آنزیم TAT با استفاده از روش Zhang و همکاران (۲۰۱۴) ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار ($\text{pH} = ۷/۳$)، حاوی ۱۹/۲ میکرومول ال- تیروزین، ۰/۱ میلی‌لیتر آلفا-کتوگلوکوتارات و ۰/۱ میلی‌لیتر پیریدوکسال فسفات بود. حجم ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش اضافه شد و هیدروکسید سدیم ۱۰ نرمال، برای توقف واکنش مورد استفاده قرار گرفت. جذب نمونه‌ها، ۳۰ دقیقه پس از توقف واکنش در طول موج ۳۳۱ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم، براساس

سنجش محتوای اسید فنلی تام

مقدار کل اسیدهای فنلی، با استفاده از معرف آرنو (Arnow)، براساس روش Matkowski و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL1500, Analytik Jena, Germany) اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های صفر تا ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RA در متانول ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفتند و براساس معادله خط ($y = ۲/۹۰۳۱ x$, $r^2 = ۰/۹۹۴۴$) حاصل از منحنی، مقدار کل اسیدهای فنلی براساس میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک تعیین شد.

استخراج پروتئین‌های محلول

بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم ($\text{pH} = ۶$) حاوی ۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک اسید، ۴ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول (DTT) و پلی‌وینیل‌پیرولیدون ۲٪ (وزنی/وزنی) برای استخراج پروتئین‌های محلول (نسبت استخراج ۱:۴) مورد استفاده قرار گرفت. استخراج پروتئین‌های محلول از برگ‌های منجمد شده، به روش Yan و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات انجام شد. مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم بافت برگ، با نیتروژن مایع پودر گردید و بعد با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج سرد به مدت ۵ دقیقه کاملاً همگن شد. تمام مراحل استخراج در اطاق سرد (دمای 4°C) و بر روی یخ انجام گردید. همگنای حاصل، پس از سانتریفیوژ (۲۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و دمای 4°C) برای سنجش غلظت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. سنجش غلظت پروتئین براساس روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. به این منظور، ۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلو برلیانت G250، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک و ۸۵۰ میلی‌لیتر آب مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه، جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL 1500,)

ضریب خاموشی ۴-هیدروکسی بنزآلدئید (۱۹۹۰۰ لیتر بر مول بر سانتی متر) سنجش و بر حسب نانوکاتال بر میلی گرم پروتئین گزارش شد.

سنجش فعالیت آنزیم رزمارینیک اسید سنتاز فعالیت آنزیم RAS به روش Petersen و Weitzel (۲۰۱۱)، براساس میزان تولید RA به عنوان فرآورده واکنش تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۲۵ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷)، ۱۲۵ نانومول آسکوربات، ۲/۵ میکرومول DTT، ۵۰ نانومول ۴-کوماریل کوآ، ۱۰۰ نانومول دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید و ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به منظور توقف واکنش، از کلریدریک اسید ۶ نرمال استفاده شد. رزمارینیک اسید تولید شده در واکنش، توسط دستگاه HPLC و در طول موج ۳۳۰ نانومتر اندازه گیری و فعالیت ویژه آنزیم، بر حسب نانوکاتال بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

آنالیز بیان نسبی ژن های کلیدی بیوستنز اسیدهای فنلی استخراج RNA کل از بافت گیاهی براساس دستورالعمل کیت تجاری pBIOZOL (Bioer, China)

جدول ۲- آغازگرهای مربوط به تکثیر ژن های PAL، TAT، RAS و RbcL (کنترل داخلی)

آغازگرها	توالی	دمای ذوب (°C)
SI PAL-F	5'-AGCAGCACAATCAGGATGTCA-3'	۵۹/۵
SI PAL-R	5'-GCTTCAAGTTCTCCTCCAGAT-3'	۵۹/۵
SmTAT-F	5'-ATGGGAGGTTGATCTCGATG-3'	۵۸/۵
SmTAT-R	5'-TCTTTAGGTGCTGATATGAGTAGA-3'	۶۰
SmRAS-F	5'-ATCGCCTACTCCAAGTTCAAG-3'	۵۹/۵
SmRAS-R	5'-AAGAAGATGGCGTTACCGAAG-3'	۵۹/۵
SmRbcL-F	5'-CTACTGGTACATGGACAACCTG-3'	۵۹/۵
SmRbcL-R	5'-AATTGATTTTCTTCTCCAGCAACG-3'	۶۰

PAL: فنیل آلانین آمونیاک، TAT: تیروزین آمینوترانسفراز، RAS: رزمارینیک اسید سنتاز

RbcL: زیر واحد بزرگ روبیسکو، F: آغازگر رفت، R: آغازگر برگشت

SI: *Salvia multiorrhiza*; Sm: *Salvia leriifolia*

شدند. میانگین‌ها براساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۵٪ مقایسه گردیدند. برای نشان دادن ارتباط میان پارامترهای مورد بررسی (سن، محتوای اسیدهای فنلی و بیان ژن و فعالیت آنزیم‌ها) با یکدیگر، براساس ضرایب همبستگی پیرسون (r)، نقشه حرارتی (Heat map) با استفاده از نرم‌افزار R (ویرایش ۳/۲/۲) و RStudio (ویرایش ۳/۶/۳) رسم شد. نقشه حرارتی - دندروگرام (Heat map-dendrogram) نیز براساس فاصله Minkowski و الگوریتم خوشه‌بندی Ward به‌وسیله نرم‌افزار MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) تهیه شد.

نتایج

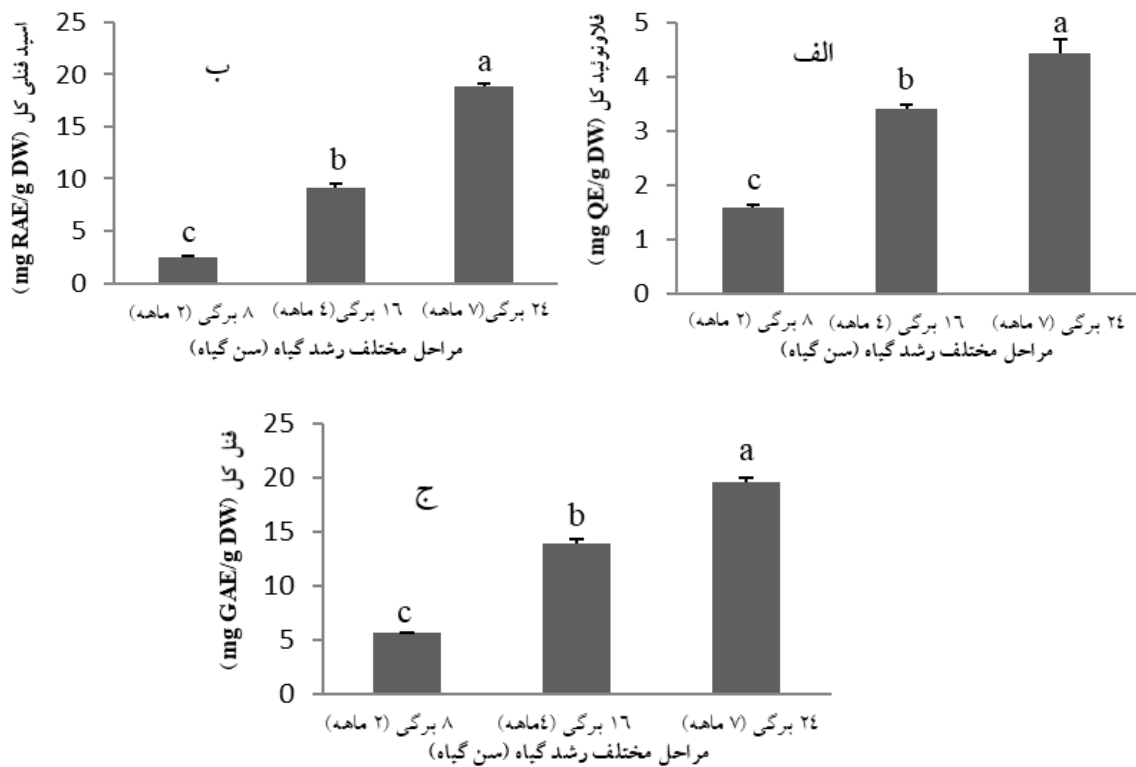
محتوای فلاونوئید، اسید فنلی و فنل تام

اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید، اسید فنلی و فنل تام در برگ مریم‌گلی مشهدی، در سه مرحله مختلف از رشد رویشی، یعنی مراحل ۸، ۱۶ و ۲۴ برگی (به ترتیب ۲، ۴ و ۷ ماه پس از کاشت) حکایت از تأثیر معنی‌دار ($P \leq 0.05$) سن گیاه بر محتوای این ترکیب‌ها و افزایش تجمع آنها در برگ با افزایش سن داشت (شکل ۲). بیشترین مقدار فلاونوئید ($4/43 \pm 0/53$) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک)، اسید فنلی ($18/83 \pm 0/50$) میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک) و ترکیب‌های فنلی کل ($19/57 \pm 0/77$) میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در برگ‌ها، ۷ ماه پس از کاشت زمانی که گیاه در مرحله ۲۴ برگی بود، بدست آمد. کمترین مقدار تعیین شده برای فلاونوئید ($1/58 \pm 0/10$) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک)، اسید فنلی ($2/42 \pm 0/49$) میلی‌گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک) و فنل کل ($5/64 \pm 0/10$) میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) نیز ۲ ماه پس از کاشت، در مرحله ۸ برگی از دوره رشد مشاهده شد (شکل ۲). به‌علاوه، مشخص شد که با بالا رفتن سن گیاه، افزایش مشاهده شده در مقدار کل اسیدهای فنلی بیشتر از افزایش اندازه‌گیری شده برای مقادیر فلاونوئید کل و فنل کل است.

برای طراحی آغازگر اختصاصی ژن PAL، با استفاده از انطباق تمام توالی‌های این ژن موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، چندین آغازگر طراحی شده روی cDNA مریم‌گلی مشهدی آزمون شدند و یک جفت آغازگر که منجر به تکثیر قطعه صحیح شد، انتخاب گردید. با توجه به اینکه طول قطعه تکثیری بزرگتر از محدوده ۸۰-۲۰۰ نوکلئوتیدی مناسب آغازگرهای Real-Time PCR بود، قطعه مورد نظر تعیین توالی شد و براساس شاخص‌های طراحی آغازگر اختصاصی برای Real-Time PCR و با استفاده از نرم‌افزارهای ذکرشده، آغازگر اختصاصی PAL طراحی شد. ژن زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو (RbcL) به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). واکنش qRT-PCR مطابق دستورالعمل کیت تجاری (Thermo SYBR Green/ROX qPCR (Fisher Scientific, US Master Mix (2x) Maxima انجام شد. برنامه زمانی و دمایی، شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۹۰۰ ثانیه در دمای 95°C (۱ سیکل) و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی به مدت ۱۵ ثانیه در دمای 95°C ، اتصال آغازگرها در دمای 60°C به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. شاخص‌های اختصاصی صحت‌سنجی داده‌ها، براساس سیگموئیدی بودن منحنی‌های تکثیر و همچنین با استفاده از آنالیز منحنی ذوب، همراه با ظهور پیک مشخص در دمای معین بالاتر از 75°C انجام و مورد تأیید قرار گرفت. سپس داده‌های خام حاصل از سنجش بیان نسبی ژنها با ۳ تکرار تکنیکی به نرم‌افزار Excel انتقال یافتند و سطوح بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه به‌وسیله روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مستقل انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۳) انجام گردید. داده‌ها توسط تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) تجزیه و تحلیل



شکل ۲- تأثیر مراحل مختلف رشد (سن گیاه) بر

محتوای فلاونوئید (الف)، اسید فنلی (ب) و فنل تام (ج) در برگ گیاه *S. lerifolia*

نتایج به صورت میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد گزارش شد.

حروف متفاوت بالای نمودارها، معنی دار بودن نتایج را در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD نشان می دهد. mg RAE/g DW میلی گرم رزمارینیک اسید بر گرم وزن خشک، mg QE/g DW میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک، mg GAE/g DW میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک

رزمارینیک اسید، اسید فنلی غالب در برگ گیاه بود، در حالی که Sal B کمترین سهم را از میان پنج اسید فنلی مورد مطالعه به خود اختصاص داد (جدول ۳). مقدار RA در برگ بین 0.02 ± 0.69 میلی گرم بر گرم وزن خشک در مرحله ۸ برگگی تا 0.23 ± 2.35 میلی گرم بر گرم وزن خشک در مرحله ۲۴ برگگی متغیر بود. پس از RA، کافئیک اسید دومین اسید فنلی از لحاظ مقدار در برگ بود و محتوای آن از 0.20 ± 0.36 میلی گرم بر گرم وزن خشک در مرحله ۸ برگگی تا 0.42 ± 1.46 میلی گرم بر گرم وزن خشک در مرحله ۲۴ برگگی افزایش یافت. این پژوهش برای اولین بار LA را در برگ های گیاه مریم گلی مشهدی شناسایی کرد. مقدار این اسید فنلی در برگ ها، کمتر از RA و CA بود.

محتوای انواع اسیدهای فنلی

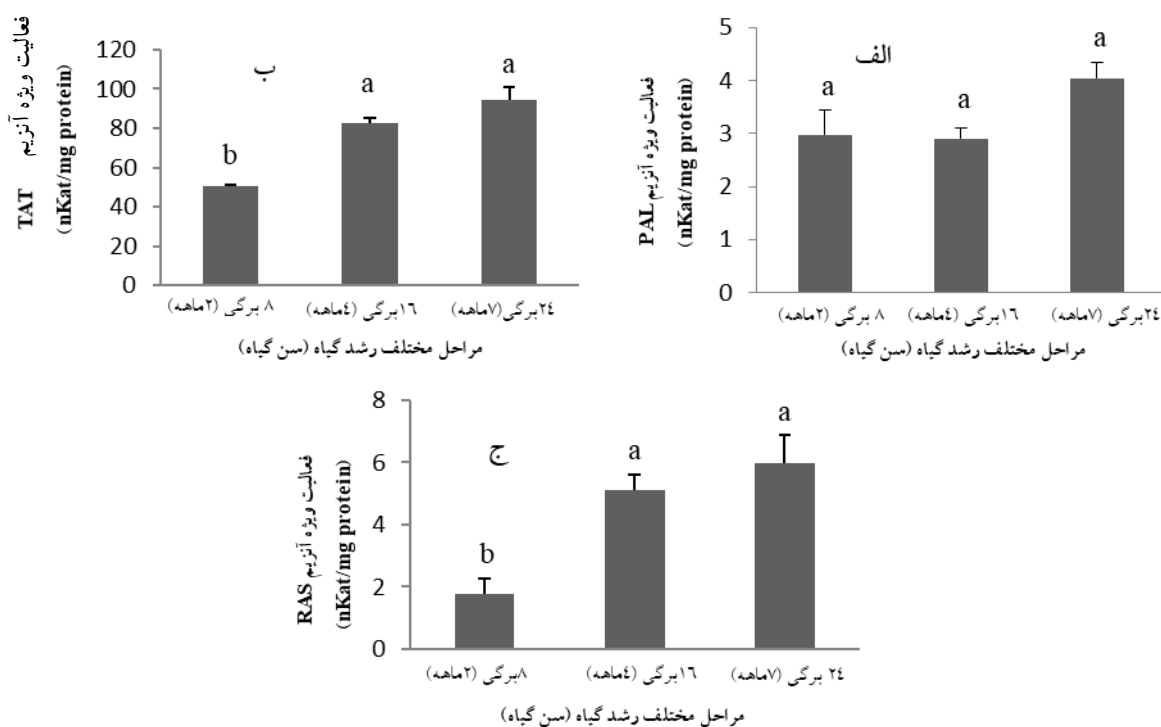
نتایج سنجش غلظت پنج نوع اسید فنلی مختلف (CA، RA، LA، Sal A و Sal B) نشان داد که با پیشرفت دوره رشد رویشی، از مرحله ۸ برگگی به ۱۶ و بعد به ۲۴ برگگی، مقدار این متابولیت ها در برگ به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) ارتقاء می یابد (جدول ۳). بیشترین مقدار CA (0.42 ± 1.46 میلی گرم بر گرم وزن خشک)، RA (0.23 ± 2.35 میلی گرم بر گرم وزن خشک)، LA (0.11 ± 0.13 میلی گرم بر گرم وزن خشک)، Sal A (0.11 ± 0.14 میلی گرم بر گرم وزن خشک) و Sal B (0.11 ± 0.10 میلی گرم بر گرم وزن خشک) ۷ ماه پس از کاشت، در مرحله ۲۴ برگگی اندازه گیری شد.

تجمع LA در گیاهان ۸ برگی (0.06 ± 0.01) میلی گرم بر گرم وزن خشک) بیشتر از سایر سالویانولیک اسیدها بود، اما در مراحل ۱۶ (0.12 ± 0.02) میلی گرم بر گرم وزن خشک) و ۲۴ برگی (0.13 ± 0.01) میلی گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) با سالویانولیک اسیدها نداشت (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر مراحل مختلف رشد (سن گیاه) بر محتوای اسیدهای فنلی در برگ گیاه *S. leriifolia*

مقدار اسیدهای فنلی (میلی گرم بر گرم وزن خشک)					مراحل رشد گیاه (سن گیاه)
کافئیک اسید	سالویانولیک اسید B	سالویانولیک اسید A	لیتوسپرمیک اسید	رزمارینیک اسید	
0.36 ± 0.20 c	0.11 ± 0.00 b	0.04 ± 0.01 b	0.06 ± 0.01 b	0.69 ± 0.02 c	۸ برگی (۲ ماهه)
0.94 ± 0.09 b	0.09 ± 0.01 a	0.13 ± 0.00 a	0.12 ± 0.02 a	1.26 ± 0.14 b	۱۶ برگی (۴ ماهه)
1.46 ± 0.42 a	0.10 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 a	0.13 ± 0.01 a	2.35 ± 0.23 a	۲۴ برگی (۷ ماهه)

نتایج به صورت میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار گزارش شد. در هر ستون، حروف متفاوت معنی دار بودن نتایج را در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD نشان می دهد.



شکل ۳- تأثیر مراحل مختلف رشد (سن گیاه) بر فعالیت ویژه آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) (الف)، تیروزین آمینوترانسفراز (TAT)

(ب) و رزمارینیک اسید سنتاز (RAS) (ج) در برگ گیاه *S. leriifolia*

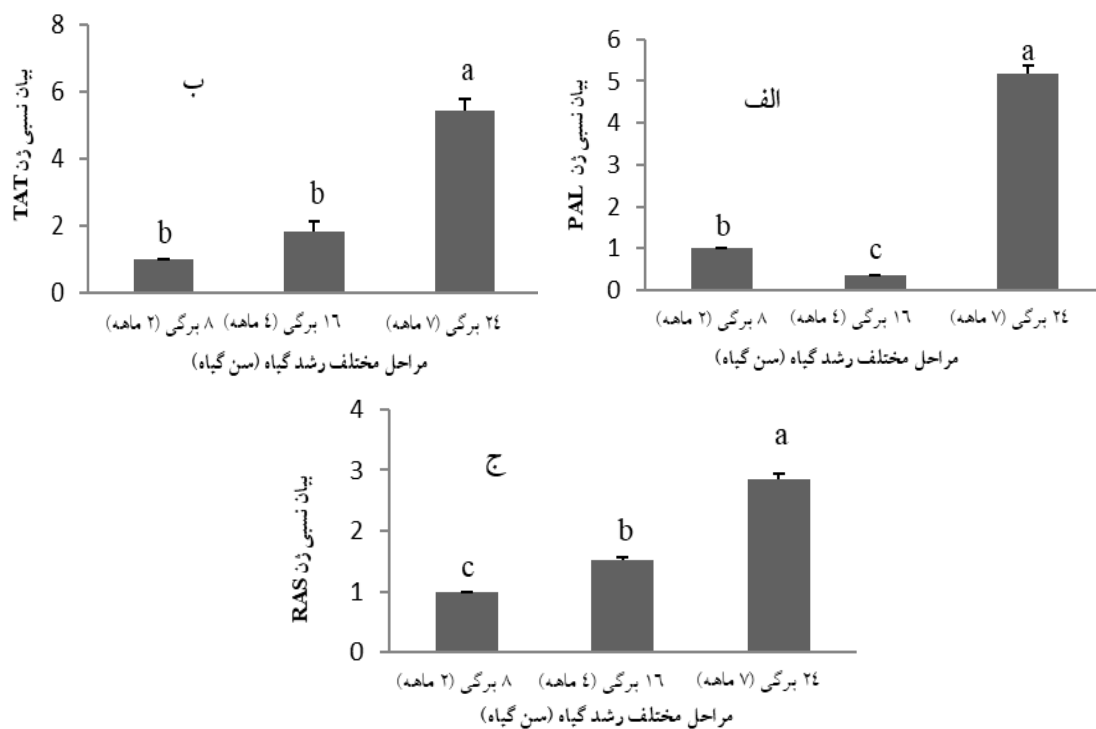
نتایج به صورت میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد گزارش شد. حروف متفاوت بالای نمودارها، معنی دار بودن نتایج را در سطح ۵٪

براساس آزمون LSD نشان می دهد. nKat/mg protein: نانوکاتال بر میلی گرم پروتئین

فعالیت آنزیم‌های مسئول بیوسنتز اسیدهای فنلی

فعالیت سه آنزیم PAL، TAT و RAS در فاصله زمانی بین ۲ تا ۷ ماه پس از کاشت بذرها، در سه مرحله ۸، ۱۶ و ۲۴ برگی از رشد رویشی گیاهان بررسی شد. نوسانهای مشاهده شده در فعالیت آنزیم PAL که به صورت یک کاهش ناچیز در مرحله ۱۶ برگی و افزایش در مرحله ۲۴ برگی مشاهده شد، معنی‌دار نبود. بیشترین میزان از فعالیت این آنزیم (0.54 ± 0.04 نانوکاتال بر میلی‌گرم پروتئین) مربوط به مرحله ۲۴ برگی بود (شکل ۳- الف). فعالیت ویژه آنزیم‌های TAT و RAS طی دوره مورد بررسی، یک روند رو به افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) را نشان داد. به این ترتیب، کمترین میزان فعالیت TAT

($1/18 \pm 0.42/50$ نانوکاتال بر میلی‌گرم پروتئین) و RAS ($1/75 \pm 0.86$) نانوکاتال بر میلی‌گرم پروتئین) در مرحله ۸ برگی و بیشترین فعالیت (به ترتیب $12/30 \pm 94/43$ و $5/97 \pm 1/57$ نانوکاتال بر میلی‌گرم پروتئین) پس از تشکیل ۲۴ برگ ثبت شد (شکل ۳- ب و ج). مقایسه گیاهان حامل ۲۴ برگ با گیاهان ۸ برگی، حکایت از افزایش $1/87$ و $3/41$ برابری به ترتیب برای TAT و RAS داشت. میزان فعالیت آنزیم TAT در تمام دوره مورد بررسی، به طور چشمگیری بیشتر از دو آنزیم دیگر بود. به عنوان مثال، در مرحله ۲۴ برگی فعالیت آنزیم ذکر شده به ترتیب $23/37$ و $15/82$ برابر PAL و RAS برآورد شد.



شکل ۴- تأثیر مراحل مختلف رشد بر بیان نسبی ژن‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) (الف)،

تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) (ب) و رزمارینیک اسید سنتاز (RAS) (ج) در برگ گیاه *S. lerifolia*

نتایج به صورت میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد گزارش شد. حروف متفاوت بالای نمودارها، معنی‌دار بودن نتایج را در سطح ۵٪

براساس آزمون LSD نشان می‌دهد.

(شکل ۵-الف)، دال بر آن بود که محتوای اسیدهای فنلی در برگ به شدت تحت تأثیر سن گیاه قرار داشت و وجود یک همبستگی مثبت قوی ($r_{.1} < 0.97$) را میان سن و مقدار تمام اسیدهای فنلی مورد مطالعه آشکار نمود. از میان اسیدهای فنلی، RA بیشترین همبستگی ($r_{.1} = 0.97$) را با سن گیاه نشان داد.

از میان آنزیم‌های بیوسنتزی، همبستگی قوی‌تری میان سن و بیان ژن/فعالیت ($r_{.1} < 0.93$) و بیان ژن/فعالیت ($r_{.1} < 0.87$) در مقایسه با فعالیت ($r_{.1} = 0.65$) و بیان ($r_{.1} = 0.79$) PAL وجود داشت. به‌طور مشابه، تجمع اسیدهای فنلی در برگ نیز با بیان ژن/فعالیت TAT و RAS ارتباط قوی‌تری داشت تا با آنزیم PAL (جزئیات بیشتر در شکل ۵-الف).

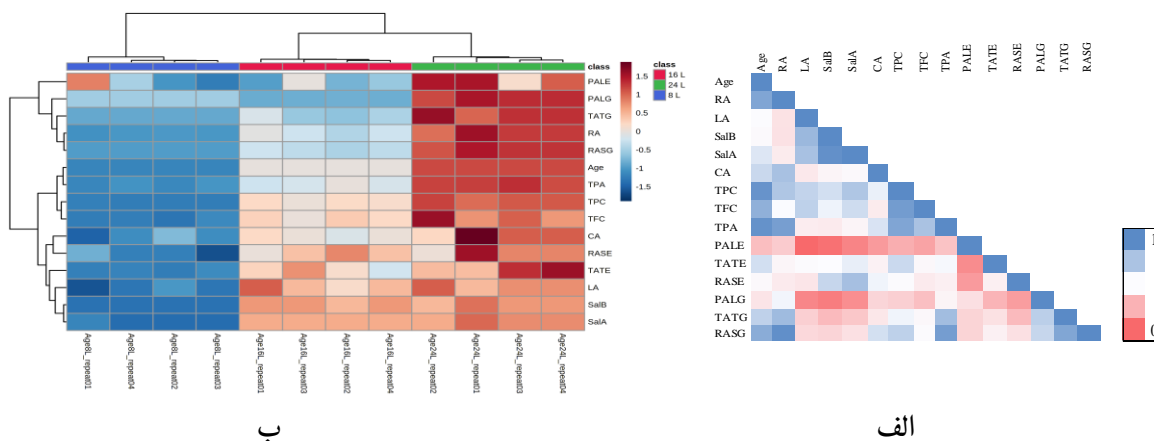
در نقشه حرارتی - دندروگرام رسم شده براساس ارتباط میان مراحل رشد با بیوسنتز و تجمع ترکیب‌های فنلی (شکل ۵-ب)، مراحل ۱۶ و ۲۴ برگی از دوره رشد، به خوبی از مرحله ۸ برگی تفکیک شد.

بیان نسبی ژن‌های PAL، TAT و RAS

تغییرات بیان ژن‌های PAL، TAT و RAS در مراحل ۸، ۱۶ و ۲۴ برگی از رشد رویشی بررسی شد (شکل ۴). الگوی تغییرات بیان ژن TAT و RAS با یکدیگر مشابه، اما با نحوه تغییر الگوی بیان ژن PAL متفاوت بود. تراز رونوشت ژن PAL که در مرحله ۱۶ برگی کمتر از ۸ برگی بود، دوباره در مرحله ۲۴ برگی، با یک افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) برابر بود به بیشترین مقدار خود رسید (شکل ۴-الف). حداقل سطح بیان ژن‌های TAT و RAS که در مرحله ۸ برگی مشاهده شد، در مراحل بعدی رشد به شدت افزایش یافت و در نهایت در مرحله ۲۴ برگی به حداکثر رسید (شکل ۴-ب و ج).

نتایج تجزیه و تحلیل همبستگی

تجزیه و تحلیل همبستگی بین داده‌های مربوط به سن گیاه، محتوای اسیدهای فنلی، فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌ها



شکل ۵-الف: نقشه حرارتی (Heat map) ضریب همبستگی پیرسون، ب: نقشه حرارتی - دندروگرام (Heat map-dendrogram)

بین شاخص‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد مطالعه در گیاه *S. lerifolia*

Age: سن، PALE: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، PALG: بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، TATE: فعالیت آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز، TATG: بیان ژن تیروزین آمینوترانسفراز، RASE: فعالیت آنزیم رزمارینیک اسید سنتاز، RASG: بیان ژن رزمارینیک اسید سنتاز، TPA: اسید فنلی تام، TPC: فنل کل، TFC: فلاونوئید کل، RA: رزمارینیک اسید، LA: لیتوسیرمیک اسید، Sal A: سالیوانولیک اسید A، Sal B: سالیوانولیک اسید B، CA: کافئیک اسید، Age24L: مرحله ۲۴ برگی، Age16L: مرحله ۱۶ برگی، Age8L: مرحله ۸ برگی، repeat01-04: تکرار یک تا چهار

گیاهی تعیین نماید، به طوری که بیشترین مقدار از ترکیب‌های فنلی و حداکثر فعالیت یا خواص بیولوژیکی مرتبط با این ترکیب‌ها، قابل دستیابی باشد (Brasileiro et al., 2015).

در این پژوهش، با پیشرفت دوره رشد رویشی گیاه مریم‌گلی مشهدی، در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای، از مرحله ۸ برگی تا ۲۴ برگی (۲ تا ۷ ماه پس از جوانه‌زنی)، مقدار کل فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و فنل تام برگ‌ها افزایش یافت و پس از تشکیل ۲۴ برگ به حداکثر رسید. همچنین همبستگی نزدیک میان محتوای فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی با سن گیاه نشان‌دهنده اهمیت بیوسنتز و تجمع ترکیب‌های فنلی از اواسط تا اواخر دوره رشد رویشی بود. در یک تحقیق انجام شده بر روی گونه‌هایی مانند زرشک (*Berberis vulgaris*)، زیتون تلخ (*Melia azedarach*)، خرزهره (*Nerium oleander*) و خرزهره هندی (*Rhododendron sp.*) مشخص شد که برگ‌های گیاهان مسن در مقایسه با گیاهان جوان، محتوای فنل تام بیشتری دارند (Achakzai et al., 2009). در اندام‌های مختلف گیاه زنجبیل (*Zingiber L.*) نیز بالارفتن سن، موجب ارتقای محتوای فلاونوئیدها و فنل کل شد (Ghasemzadeh et al., 2016). پژوهش‌های مشابه بر روی گیاه مرزنگوش (*Origanum L.*)، زیتون (*Baâtour et al., 2012*)، زیتون (*Olea europaea L.*) (Brahmi et al., 2015) و بارهنگ (*Plantago major L.*) (Mutalib, 2015) نیز حکایت از افزایش این ترکیب‌ها در اواخر دوره رشد رویشی داشت.

به عقیده محققان، پایین بودن مقدار ترکیب‌های فنلی در گیاهان جوان، نشانه آن است که متابولیت‌های پیش‌ساز این ترکیب‌ها، به سمت متابولیسم اولیه کانال‌کشی شده‌اند تا رشد سریع این گیاهان حمایت شود (Fritz et al., 2001; Pasko et al., 2009). در مقابل، مشاهده افزایش محتوای ترکیب‌های فنلی، همزمان با چوبی شدن بافت‌ها و کُند شدن یا پایان رشد رویشی (Baâtour et al., 2012) می‌تواند با سهم‌بندی پیش‌سازها به سمت بیوسنتز لیگنین و سوبرین برای تأمین استحکام و یکپارچگی بخش هوایی، قبل از

تفاوت رنگ مشاهده شده بین سه مرحله رشد در این طرح، حکایت از وجود ارتباط مثبت و قوی میان بیان ژن‌های بیوسنتزی اسیدهای فنلی با آخرین مرحله از رشد رویشی گیاه (مرحله ۲۴ برگی) داشت. در این دندروگرام، RA نیز به صورت مجزا از سایر اسیدهای فنلی قرار گرفت و ارتباط نزدیکی میان مقدار آن با بیان ژن‌های RAS و TAT مشاهده شد. در مقابل LA و سالویانولیک اسیدها، در یک خوشه مجزا جای گرفتند و تجمع آنها با فعالیت آنزیم TAT ارتباط نزدیکی داشت. البته بیان ژن/فعالیت PAL، ارتباط نزدیک‌تری با محتوای RA داشت، در حالیکه با فاصله زیادی از مقدار LA و سالویانولیک اسیدها تفکیک شد (شکل ۵-ب).

بحث

ترکیب‌های فنلی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد و نمو گیاهان مانند تقسیم سلولی، جوانه‌زنی دانه، جذب مواد غذایی، رشد و انباشت زی‌توده، تنظیم هورمون‌ها، تولید مثل و سازگاری با شرایط متغیر محیطی نقش کلیدی دارند (Sharma et al., 2019). توانایی گیاهان برای تولید این متابولیت‌ها، علاوه بر آنکه تابع شرایط محیطی است، تحت تأثیر سن، اونتوژنی و فنولوژی نیز قرار می‌گیرد (Mutalib, 2015; Vagiri et al., 2015). پژوهش‌های انجام شده در زیوه و در شیشه، ارتباط نزدیک میان فنولوژی و کمیّت و کیفیت ترکیب‌های فنلی را آشکار نموده است (Achakzai; Reis et al., 2008; Cirak et al., 2007; et al., 2009). در بسیاری از گیاهان، محتوای ترکیب‌های فنلی از جمله فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی در پایان رشد رویشی، مرحله گلدهی و حتی میوه‌دهی افزایش می‌یابد (Naghiloo et al., 2012; Verma & Kasera, 2007; Suwa et al., 2018). در حالیکه در برخی دیگر ممکن است پس از یک افزایش سریع در اوایل رشد رویشی، در مراحل بعدی ثابت بماند (Ishikura, 1976). نتایج این نوع مطالعات، می‌تواند زمان مناسب را برای برداشت اندام‌های

Salvia و *Salvia paramiltiorrhiza*, Dunn *dabieshanensis* می‌باشد (Li et al., 2008). در این پژوهش، برای اولین بار حضور لیتوسیرمیک اسید در گیاه مریم‌گلی مشهودی گزارش شد اما مقدار آن در این گونه بسیار کمتر از مقادیر اعلام شده برای سه گونه مریم‌گلی بومی چین بود که در بالا به آنها اشاره شد. اگرچه مقدار LA در مریم‌گلی مشهودی کمتر از RA و CA بود، اما با افزایش سن، همانند سایر اسیدهای فنلی مورد بررسی افزایش یافت.

کانال‌کشی کربن تازه تثبیت شده در فتوسنتز، به سمت بیوسنتز ترکیب‌های فنلی، متأثر از عوامل محیطی زنده و غیرزنده (به‌ویژه شرایط تنش‌زا) (Lavola et al., 2000) و عوامل درونی مانند سن یا فنولوژی است (Wam et al., 2017). هنگامی که گیاهان جوان و در حال رشد سریع هستند، بخش اعظم همانندهای (assimilates) حاصل از فتوسنتز، به سمت متابولیسم اولیه کانال‌کشی می‌شوند تا پشتیبان رشد سریع گیاه باشند. از سوی دیگر، با افزایش سن، ضمن پیشروی در مراحل فنولوژی و مقارن با پایان رشد رویشی، سهم بیشتری از اسکلت کربن تازه تثبیت شده، به متابولیسم ثانوی اختصاص می‌یابد (Truong et al., 2010). در این تحقیق نیز این احتمال وجود دارد که ضمن افزایش سن گیاه و کُند شدن رشد، سهم بیشتری از کربن تازه تثبیت شده به جای اختصاص یافتن به متابولیسم اولیه و فرایند رشد، صرف تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه افزایش متابولیت‌های فنلی شده باشد.

تغییر محتوای ترکیب‌های فنلی ضمن رشد و نمو گیاهان، تابع تغییر الگوی فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی است که به نوبه خود با تنظیم نموی بیان ژن‌های مربوطه در سطح رونویسی و پس از رونویسی ارتباط دارد (Ziaei et al., 2012)؛ در دوره رشد رویشی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) (Ziaei et al., 2012) و شنبلیله (*Trigonella foenum graecum*) (Imtiyaz et al., 2013) افزایش فعالیت/بیان ژن آنزیم PAL در دوره رشد رویشی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) (Ziaei et al., 2012) و شنبلیله (*Trigonella foenum graecum*) (Imtiyaz et al., 2013) کشت شده در شرایط گلخانه و همبستگی میان فعالیت آنزیم و محتوای ترکیب‌های

تشکیل گل‌ها و میوه‌ها ارتباط داشته باشد (Fletcher et al., 2010).

در این مطالعه، همبستگی مثبت معنی‌داری ($P \leq 0/05$) میان مقدار پنج نوع اسید فنلی (Sal A, LA, RA, CA) و Sal B) با سن گیاه مشاهده شد. هفت ماه پس از جوانه‌زنی، در مرحله ۲۴ برگی از رشد رویشی، غلظت این متابولیت‌ها در برگ نسبت به گیاهان ۸ برگی (۲ ماه پس از جوانه‌زنی) افزایش مشخصی یافت و به بیشترین مقدار خود رسید. در گیاه رزماری و مریم‌گلی یونانی (*Salvia fruticosa* Miller) نیز بیشترین مقدار فنل کل، RA و CA در مرحله رویشی مشاهده شد و ورود گیاه به مرحله گلدهی، محتوای این ترکیب‌ها را کاهش داد (Papageorgiou et al., 2008). به‌طور مشابه، Fletcher و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که سن فیزیولوژیکی به شدت بر محتوای RA در نعنای دشتی (*Mentha spicata* L.) و مقدار RA و CA در گیاه مرزنگوش (Baâtour et al., 2012) تأثیر می‌گذارد و مقدار این اسیدهای فنلی که در اواخر رشد رویشی به حداکثر رسیده است، با ورود به مرحله گلدهی به شدت کم می‌شود. ارتقای محتوای RA و Sal B ضمن رشد رویشی تا رسیدن به مرحله گلدهی، در برگ و ریشه مریم‌گلی چینی (Song & Li, 2015) و افزایش وابسته به سن در مقدار RA، کلروژنیک اسید و فرولیک اسید برگ‌های گیاه جینسنگ سیبری (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et maxim.) maxim.) (Bączek et al., 2017) نیز گزارش شده است. همچنین Zeng و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اسیدهای فنلی اندام‌های مختلف گیاه مریم‌گلی چینی در دوره‌های مختلف از رشد، نشان دادند که مقدار سالویانولیک اسیدها در تابستان، زمان رشد سریع بخش‌های هوایی به حداکثر می‌رسد و بهترین زمان برای بهره‌برداری از این ترکیب‌ها تابستان می‌باشد. تأثیر سن یا مراحل رشد و نمو بر مقدار LA در گیاهان، تا به حال بررسی نشده است و گزارش‌ها محدود به شناسایی و تعیین محتوای این ترکیب در گیاه مریم‌گلی چینی (Wu & Wang, 2012) و سایر گونه‌های مریم‌گلی بومی چین از جمله *Salvia bowleyana*

با سن و مراحل فنولوژی تا به حال بررسی نشده است. در این پژوهش، میان سن گیاه با فعالیت آنزیم و بیان ژن RAS یک همبستگی مثبت قوی وجود داشت. تجمع RA و سالویانولیک اسیدها نیز تحت تأثیر این آنزیم بود و وجود همبستگی میان آنها آشکار شد.

نقش مسیر مشتق از تیروزین و مسیر فنیل پروپانویید در بیوسنتز RA و سایر اسیدهای فنلی در کشت‌های سلولی و ریشه موئین مریم‌گلی چینی مطالعه شده است. برخی از این مطالعات، به سهم عمده مسیر مشتق از تیروزین اشاره کرده‌اند (Zhang *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2006)، در حالیکه برخی دیگر بر نقش مؤثر مسیر فنیل پروپانویید تأکید نموده‌اند (Song & Jiao *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2010). نتایج این پژوهش نیز به سهم عمده مسیر مشتق از تیروزین، آنزیم TAT و RAS اشاره می‌کند. براساس تجزیه و تحلیل همبستگی، تولید RA وابستگی زیادی به بیان ژن‌های TAT و RAS و تا اندازه کمی بیان ژن PAL داشت. این احتمال وجود دارد که تولید و انباشت RA، در سطح رونویسی از ژن‌های فوق کنترل شود. از سوی دیگر، تولید LA و سالویانولیک اسیدها وابسته به فعالیت آنزیم TAT و تا حدی RAS بود اما هیچ ارتباط معنی‌داری با فعالیت PAL نداشت و کنترل تولید آنها احتمالاً بیشتر در سطوح پس از رونویسی انجام می‌شود.

مشخص شده است که فرآورده حاصل از فعالیت آنزیم PAL در مسیر فنیل پروپانویید، قبل از کانال‌کشی به سمت بیوسنتز RA می‌تواند وارد مسیرهای بیوسنتزی متنوعی مانند بیوسنتز فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها، لیگنین، آنتوسیانین‌ها، کومارین‌ها، استیلین‌ها و تانن‌ها شود (Voght, 2010). در مقابل، فرآورده آنزیم TAT در مسیر مشتق از تیروزین، به سمت تولید متابولیت‌های محدودتری مانند توکوفرول و پلاستوکوئینون‌ها کانال‌کشی می‌شود (Ru *et al.*, 2017). البته این احتمال وجود دارد که در گیاه مریم‌گلی مشهدی نیز به دلیل مصرف شدن متابولیت‌های حدوسط مسیر فنیل پروپانویید برای تولید سایر ترکیبات فنلی این مسیر در مقایسه با مسیر مشتق از تیروزین سهم کمتری

فنلی گزارش شده است. در این بررسی، تغییر فعالیت PAL طی دوره رشد رویشی معنی‌دار ($P \leq 0.05$) نبود اما میان بیان نسبی ژن و سن گیاه همبستگی وجود داشت که ممکن است بر تنظیم نمودی بیان ژن در سطح رونویسی دلالت داشته باشد. به علاوه اینکه احتمال دارد سایر آنزیم‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانویید که در این بررسی مطالعه نشده‌اند، مانند سینامات ۴-هیدروکسیلاز در افزایش محتوای RA نقش برجسته‌تری نسبت به PAL داشته باشند (Song & Li, 2015; Xiao *et al.*, 2009).

در بررسی پیش‌رو، با بالا رفتن سن گیاه، فعالیت آنزیم و بیان ژن نسبی ژن TAT افزایش یافت و یک همبستگی معنی‌دار ($P \leq 0.05$) قوی میان سن و این آنزیم تعیین شد. از سوی دیگر، میان بیان نسبی ژن و فعالیت آنزیم TAT با محتوای RA و سایر اسیدهای فنلی مورد مطالعه نیز همبستگی مثبت معنی‌دار ($P \leq 0.05$) مشاهده شد. همبستگی مثبت میان فعالیت/بیان ژن این آنزیم با تجمع RA در کشت‌های درون شیشه‌ای *Anchusa officinalis* (Mizukami & Ellis, 1991)، مریم‌گلی چینی (Yan *et al.*, 2006) و حسن‌یوسف (*Solenostemon scutellarioides*) (Sahu *et al.*, 2012) و با انباشتگی لیتوسپرمیک اسید B در ریشه‌های موئین مریم‌گلی چینی (Xiao *et al.*, 2009) نیز گزارش شده است. ارتباط میان سن گیاهان با فعالیت و بیان ژن آنزیم TAT در شرایط غیر آزمایشگاهی (در زیوه)، فقط در آراییدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) (Holander-Czytko *et al.*, 2005) و مریم‌گلی چینی (Song & Li, 2015) اثبات و افزایش تراز رونوشت و فعالیت آن ضمن مسن شدن گیاه، به تأمین پیش‌ماده فنلی (۴-هیدروکسی فنیل پیروات) لازم برای سنتز آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نسبت داده شده است.

اگرچه گزارش‌هایی در مورد تأثیر عوامل مختلف بر بیان ژن و فعالیت آنزیم RAS وجود دارد (Sahu *et al.*, 2012; Kamalizadeh *et al.*, 2014; Döring *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016)، اما ارتباط آنزیم

امکانات آنالیزهای فیتوشیمیایی و مولکولی در پیشبرد این طرح سهم بسیاری داشتند، قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abrishamchi, P., Khaje Karamadini, M., Houshyar Sarjami, R., Zaker, A., Asili, J., Porsa H. and Zarif, R., 2016. Antibacterial effect of essential oils from *Salvia leriifolia* Benth. against some oral pathogens. *Journal of Microbial World*, 9(3): 215-225.
- Achakzai, A.K.K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S.A. and Bakhsh Tareen, R., 2009. Response of plants parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5): 2129-2135.
- Adomako-Bonsu, A.G., Chan, S.L., Pratten, M. and Fry, J.R., 2017. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in vitro*, 40(1): 248-255.
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Farag, M.R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y.S. and Dhama, K., 2017. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*, 18(2): 167-176.
- Alizadeh, A., Alizadeh, O., Amari, G. and Zare, M., 2013. Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. as influenced by ontogenetical variation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1): 59-70.
- Amiri, M.S. and Joharchi, M.R., 2013. Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(3): 254-271.
- Baâtour, O., Tarchoun, I., Nasri, N., Kaddour, R., Harrathi, J., Drawi, E., Ben Nasri-Ayachi, M., Marzouk, B. and Lachaâl, M., 2012. Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(99): 16486-16493.
- Bączek, K., Przybył, J.L., Kosakowska, O. and Węglarz, Z., 2017. Accumulation of phenolics in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.) as affected by plant development. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(4): 89-99.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

را در بیوسنتز RA و سالویانولیک اسیدهای مشتق از آن داشته باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که با افزایش سن گیاه مریم‌گلی مشهدی در دوره رشد رویشی، محتوای اسیدهای فنلی در برگ‌ها افزایش یافت. در اواخر رشد رویشی (مرحله ۲۴ برگی)، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید فراوان‌ترین اسیدهای فنلی در برگ بودند و لیتوسپرمیک اسید و سالویانولیک اسیدها در مقادیر کمتری حضور داشتند. بین سن گیاه و بیان ژن‌های RAS و TAT و همچنین بین بیان این دو ژن با تجمع رزمارینیک اسید همبستگی مثبت قوی وجود داشت. تولید لیتوسپرمیک اسید و سالویانولیک اسیدها نیز ارتباط نزدیک با فعالیت TAT داشت. به نظر می‌رسد که در این مرحله از فنولوژی، افزایش رزمارینیک اسید، به‌طور عمده ناشی از افزایش فعالیت TAT در مسیر مشتق از تیروزین باشد (در مقایسه با فعالیت PAL در مسیر فنیل‌پروپانویید). از این رو پیشنهاد می‌شود که در صورت کشت و پرورش گیاه، برای بهره‌برداری از خواص اسیدهای فنلی موجود در آن، اواخر دوره رشد رویشی به‌عنوان بهترین زمان برداشت در نظر گرفته شود. به‌علاوه، استفاده از تازن‌های زیستی (عصاره مخمر) و غیرزیستی (متیل جاسمونات و نقره) که مسیر مشتق از تیروزین را تحریک می‌کنند و یا بیش‌بیانی ژن‌های TAT و RAS می‌توانند به‌عنوان راهکارهای مناسب برای بهینه‌سازی تولید رزمارینیک اسید و مشتقات آن در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات و هزینه لازم را برای اجرای طرح ذکر شده با شماره ۳۸۸۴۱ فراهم نمودند تشکر می‌گردد. همچنین از دست‌اندرکاران آزمایشگاه‌های شیمی و فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شاهد و آزمایشگاه تحقیقاتی گروه تخصصی OMICS دکتر سلامی که با فراهم‌سازی

- and peppermint (*Mentha piperita* L.). The Open Agriculture Journal, 4(1): 10-16.
- Fotovvat, M., Radjabian, T. and Saboora, A., 2019. HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran. Records of Natural Products, 13(1): 37-49.
 - Fritz, R.S., Hochwender, C.G., Lewkiewicz, D.A., Bothwell, S. and Orians, C.M., 2001. Seedling herbivory by slugs in a willow hybrid system: Developmental changes in damage, chemical defense and plant performance. Oecologia, 129(1): 87-97.
 - Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Ashkani, S., Rahmat, A., Juraimi, A.S., Puteh, A. and Muda Mohamed, M.T., 2016. Variation in secondary metabolite production as well as antioxidant and antibacterial activities of *Zingiber zerumbet* (L.) at different stages of growth. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1): 1-10.
 - Habtemariam, S., 2018. Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: Potential seeds for alzheimer's and vascular dementia drugs. International Journal of Molecular Sciences, 19(2): 1-25.
 - Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y. and Dong, J., 2014. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. The Scientific World Journal, 2014: 1-7.
 - Hao, D.C., Gu, X.J. and Xiao, P.G., 2015. Medicinal Plants: Chemistry, Biology and Omics. Cambridge, UK, Woodhead Publishing, 664p.
 - Ho, J.H.C. and Hong, C.Y., 2011. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. Journal of Biomedical Science, 18(30): 1-5.
 - Holander-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K. and Weiler, E. W., 2005. Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cysteine lyase in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. Journal of Plant Physiology, 162(7): 767-770.
 - Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Imenshahidi, M. and Fazly Bazzaz, B.S., 2009. Review of the pharmacological and toxicological effects of *Salvia lerifolia*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 12(1): 1-8.
 - Hosseinzadeh, H. and Lari, P., 2000. Effect of *Salvia lerifolia* extract on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research, 14(5): 384-387.
 - Hou, J., Fu, J., Zhang, Z.M. and Zhu, H.L., 2011. Biological activities and chemical modifications of caffeic acid derivatives. Fudan University Journal of Medical Science, 38(6): 546-552.
 - Hu, Y.S., Zhang, L., Di, P. and Chen, W.S., 2009. Cloning and induction of phenylalanine ammonia-
 - Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. and Hammami, M., 2015. Effect of growth stage and solvent extract on the antioxidant potential of olive leaves. Journal of Plant Sciences, 3(3-1): 1-7.
 - Brasileiro, B.G., Leite, J.P.V., Casali, V.W.D., Pizzolo, V.R. and Coelho, O.G.L., 2015. The influence of planting and harvesting times on the total phenolic content and antioxidant activity of *Talinum triangulare* Jacq. wild. Acta Scientiarum, 37(2): 249-255.
 - Chen, Y., Zhu, Z., Guo, Q., Zhang, L. and Zhang, X., 2012. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. Biological Research, 45(2): 171-175.
 - Cirak, C., Radusiene, J., Janulis, V. and Ivanauskas, L., 2007. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. Botanica Helvetica, 117(1): 29-36.
 - Di, P., Zhang, L., Chen, J., Tan, H., Xiao, Y., Dong, X., Zhou, X. and Chen, W., 2013. ¹³C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. ACS Chemical Biology, 8(7): 1537-1548.
 - Dong, J., Wan, G. and Liang, Z., 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology, 148(2-3): 99-104.
 - Döring, A.S., Pellegrini, E., Della Batola, M., Nali, C., Lorenzini, G. and Petersen M., 2014. How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? Journal of Plant Physiology, 171(5): 35-41.
 - Erish, S., Mohammadzadeh, M., Ilkhanipour, M. and Babaei, F., 2018. The effect of hydroalcoholic extract of *Salvia lerifolia* root and flvoxamine on the spatial memory in male rats under immobilization stress. Qom University Medical Sciences Journal, 11(11): 22-32.
 - Espindola, K.M.M., Ferreira, R.G., Narvaez, L.E.M., Silva Rosario, A.C.R., da Silva, A.H.M, Silva, A. G.B., Vieira, A.P.O. and Monteiro, M.C., 2019. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. Frontiers in Oncology, 9: 1-10.
 - Fazly-Bazzaz, B.S. and Izadyar, A.R., 2002. Antimutagenic activity of different fractions of *Salvia lerifolia* extract. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 4(4/12): 241-250.
 - Fletcher, R.S., Slimmon, T. and Kott, L.S., 2010. Environmental factors affecting the accumulation of rosmarinic acid in spearmint (*Mentha spicata* L.)

- carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum*, 109(3): 260-267.
- Li, M.H., Chen, J.M., Peng, Y. and Xiao, P.G., 2008. Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. *Word Science and Technology*, 10(5): 46-52.
 - Li, M.H., Li, Q.Q., Liu, Y.Z., Cui, Z.H., Zhang, N., Huang, L.Q. and Xiao, P.G., 2013. Pharmacophylogenetic study on plants of genus *Salvia* L. from China. *Chinese Herbal Medicines*, 5(3): 164-181.
 - Li, Q., Feng, J., Chen, L., Xu, Z., Zhu, Y., Wang, Y., Xiao, Y., Chen, J., Zhou, Y., Tan, H., Zhang, L. and Chen, W., 2019. Genome-wide identification and characterization of *Salvia miltiorrhiza* laccases reveal potential targets for salvianolic acid B biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-15.
 - Loizzo, M.R., Tundis, R., Conforti, F., Menichini, F., Bonesi, M., Nadjafi, F., Giuseppe Frega, N. and Menichini, F., 2010. *Salvia leriifolia* Benth. (Lamiaceae) extract demonstrates *in vitro* antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. *Nutrition Research*. 30(12): 823-830.
 - Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry*, 59(2): 117-140.
 - Ma, X.H., Ma, Y., Tang, J.F., He, Y.L., Liu, Y.C., Ma, X.J., Shen, Y., Cui, G.H., Lin, H.X., Rong, Q.X., Guo, J. and Huang, L.Q., 2015. The Biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecules*, 20(9): 16235-16254.
 - Ma, L., Tang, L. and Yi, Q., 2019. Salvianolic acids: Potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 1-13.
 - Matkowski, A., Zielinska, S., Oszmianski, J. and Lamer-Zarawska, E., 2008. Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Bioresource Technology*, 99(16): 7892-7896.
 - Mizukami, H. and Ellis, B.E., 1991. Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 10(6-7): 321-324.
 - Moridi Farimani, M., Miran, M. and Nejad Ebrahimi, S., 2019. New diterpenoids from the aerial parts of *Salvia reuterana*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(1): 406-411.
 - Mozaffarian, V., 2007. *A Dictionary of Iranian Plant Names, Latin-English-Persian*. Tehran, Iran, Farhang Mo'aser, 740p.
 - Mutalib, L.Y., 2015. Effect of growth age period on biochemical composition of *Plantago major* plant. *International Journal of Current Research and Review*, 7(19): 6-10.
 - lyase gene from *Salvia miltiorrhiza* and its effect on hydrophilic phenolic acids levels. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(6): 0449-0457.
 - Imtiyaz, M., Omi Laila, M., Abidin, M.Z., Parveen, K., Raja, T., Abid Ali, S. and Sharma, G., 2013. Maximum phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity at mid stage of growth imparts highest hypoglycemic property to fenugreek. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(4): 837-846.
 - Ishikura, N., 1976. Seasonal changes in contents of phenolic compounds and sugar in *Rhus*, *Euonymus* and *Acer* leaves with special reference to anthocyanin formation in autumn. *The Botanical Magazine Tokyo*, 89(1016): 251-257.
 - Jami, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Modarres, M., 2018. Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(3): 710-725.
 - Jiang, R.W., Lau, K.M., Hon, P.M., Mak, T., Woo, K.S. and Fung, K.P., 2005. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry*, 12(2): 237-246.
 - Jiang, X., Liu, Y., Li, W., Zhao, L., Meng, F., Wang, Y., Tan, H., Yang, H., Wei, C., Wan, X., Gao, L. and Xia, T., 2013. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant (*Camellia Sinensis*). *PLOS One*, 8(4): 1-14.
 - Jiao, M., Cao, R., Chen, H., Hao, W. and Dong, J., 2012. Effects of salicylic acid on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in the suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 28(3): 320-328.
 - Kamalizadeh, M., Bihamta, M., Peyghambari, S.A. and Hadian, J., 2014. Expression of genes involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway in dragonhead affected by nanoparticles. *Genetics in the Third Millennium*, 12(1): 3428-3437.
 - Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Gono-Bwalya, A.B., van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F., Lourens, A.C. U., Baser, K.H.C., Demirci, B., Lindsey, K.L. Van Staden, J. and Steenkamp, P., 2005. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3): 382-390.
 - Khoei, A.R., Hosseinzadeh, H. and Imanshahidi, M., 2003. Pathologic evaluation of anti-ischemic effect of *Salvia leriifolia* Benth. seed and leaf extracts in rats after global cerebral ischemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 5(4): 200-205.
 - Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., De La Rosa, T.M., Lehto, T. and Aphalo, P.J., 2000. Allocation of

- Sahu, R., Gangopadhyay, M. and Dewanjee, S., 2012. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5): 1473-1481.
- Scarpati, M.L. and Oriente, G., 1958. Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. *La Ricerca Scientifica*, 28(11): 2329-2333.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Marco Landi, M. and Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13): 1-22.
- Shokrollahi, S.H., Heshmatii, G.H.A. and Yosefzadeh, H., 2018. Study the phenolic compounds and antioxidant activity of the extract lily (*Lilium ledebourii* (Baker) Boiss.). *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 8(2): 727-734.
- Soltanabad, M.H., Bagherieh-Najjar, M.B. and Mianabadi, M., 2018. Seasonal variations in carnosic acid content of rosemary correlates with anthocyanins and soluble sugars. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 163-171.
- Song, J., Ji, Y.Y., Xu, K. and Wang, Z.Z., 2012. An integrated analysis of the rosmarinic acid-biosynthetic genes to uncover the regulation of rosmarinic acid pathway in *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiologia Plantarum*, 34(4): 1501-1511.
- Song, Z. and Li, X., 2015. Expression profiles of rosmarinic acid biosynthesis genes in two *Salvia miltiorrhiza* lines with differing water-soluble phenolic contents. *Industrial Crops and Products*, 71: 24-30.
- Suwa, R., Tajima, H., Gima, S., Uehara, N., Kenta Watanabe, K., Yabuta, S., Tominaga, J. and Kawamitsu, Y., 2018. Polyphenol production in *Peucedanum japonicum* Thunb. varies with soil type and growth stage. *The Horticulture Journal*, 87(3): 382-388.
- Topcu, G., 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural products*, 69: 482-487.
- Truong, D.M., Thu, N.T.B. and Nghi, L.T., 2010. Accumulation and variation of rosmarinic acid content in *Orthosiphon stamineus* Benth. based on phenological stages. *Academia Journal of Biology*, 32(3): 65-71.
- Vagiri, M., Conner, S., Stewart, D., Andersson, S.C., Verrall, S., Johansson, E. and Rumpunen, K., 2015. Phenolic compounds in black currant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chemistry*, 172: 135-142.
- Verma, V. and Kasera, P., 2007. Variations in secondary metabolites in some Arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian Journal of Plant Physiology*, 12(2): 203-206.
- Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S. and Dadpour, M.R., 2012. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *BioImpacts*, 2(2): 105-109.
- Ngo, Y.L. and Chua, L.S., 2018. Anti-diabetic activity of rosmarinic acid rich fractions from *Orthosiphon stamineus*. *Current Enzyme Inhibition*, 14(2): 97-103.
- Norouzi, E., Hosseini, B., Maleki, R. and Abdollahi Mandoulakani, B., 2019. Iron oxide nanoparticle a novel elicitor to enhancing anticancer flavonoid production and gene expression in *Dracocephalum kotschyi* hairy root cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14): 6418-6430.
- Ogata, A., Tsuruga, A., Matsuno, M. and Mizukami, H., 2004. Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. *Plant Biotechnology*, 21(5): 393-396.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M. and Komaitis, M., 2008. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16): 7254-7264.
- Pasko, P., Barto, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fota, M. and Zachwieja, Z., 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115(3): 994-998.
- Petersen, M., 2013. Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12(1): 207-227.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11): 1142-1145.
- Reching, K.H., 1996. *Flora Iranica*. Graz, Austria, Akademische Druck-und Verlagsanstalt, 234p.
- Reis, E., Batista, M.T. and Canhoto, J.M., 2008. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*, 232(3-4): 193-202.
- Ru, M., An, Y., Wang, K., Peng, L., Li, B., Bai, Z., Wang, B. and Liang, Z., 2016. *Prunella vulgaris* L. hairy roots: Culture, growth, and elicitation by ethephon and salicylic acid. *Engineering in Life Sciences*, 16(5): 494-502.
- Ru, M., Wang, K., Bai, Z., Peng, L., He, S., Wang, Y. and Liang, Z., 2017. A tyrosine aminotransferase involved in rosmarinic acid biosynthesis in *Prunella vulgaris* L. *Scientific Reports*, 7(1): 1-16.

- acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Molecules*, 20(1): 309-324.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Wu, J.Y., 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170(4): 853-858.
 - Yang, D., Huang, Z., Xing, B., Jin, W., Yan, X., Guo, Z. and Liang, Z., 2016. Regulation of folic acid on phenolic acids production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 127(1): 175-185.
 - Zeng, H., Su, S., Xiang, X., Sha, X., Zhu, Z., Wang, Y., Guo, S., Yan, H., Qian, D. and Duan, J., 2017. Comparative analysis of the major chemical constituents in *Salvia miltiorrhiza* roots, stems, leaves and flowers during different growth periods by UPLC-TQ-MS/MS and HPLC-ELSD methods. *Molecules*, 22(5): 1-16.
 - Zhang, S., Yan, Y., Wang, B., Liang, Z., Liu, Y., Liu, F. and Qi, Z., 2014. Selective responses of enzymes in two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(5): 645-651.
 - Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. and Razavi, K., 2012. Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(1): 32-39.
 - Voght, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1): 2-20.
 - Wam, H.K., Stolter, C. and Nybakken, L., 2017. Compositional changes in foliage phenolics with plant age, a natural experiment in Boreal forests. *Journal of Chemical Ecology*, 43(9): 920-928.
 - Wang, B.Q., 2010. *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25): 2813-2820.
 - Wang, J., Xu, J., Gong, X., Yang, M., Zhang, C. and Li, M., 2019. Biosynthesis, chemistry, and pharmacology of polyphenols from Chinese *Salvia* species: A review. *Molecules*, 24(1): 132-155.
 - Weitzel, C. and Petersen, M., 2011. Cloning and characterization of rosmarini acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry*, 72: 572-578.
 - Wu, W.Y. and Wang, Y.P., 2012. Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* depside salt and its active components, *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9): 1119-1130.
 - Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W. and Zhang, L., 2009. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiologia Plantarum*, 137(1): 1-9.
 - 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

Effects of phenology on the activity and gene expression of phenolic acid -biosynthetic enzymes in *Salvia leriifolia* Benth.

N. Nematshahi¹, P. Abrishamchi^{2*}, T. Radjabian³ and S.A. Salami⁴

1- Ph.D. student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

E-mail: abrisham@um.ac.ir

3- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

4- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: March 2020

Revised: July 2020

Accepted: August 2020

Abstract

Salvia leriifolia Benth. is one of the native Iranian medicinal plants which has been received attention in recent years due to its numerous therapeutic properties. The pharmaceutical properties of this species have been attributed to the presence of phenolic compounds, especially phenolic acids. The present study investigated the effect of plant age (phenology) on the gene expression and activity of phenolic acid-biosynthetic enzymes. Plant seeds were collected from Torbat-e-Heydariyeh (Khorasan Razavi province, Iran) and planted under greenhouse conditions. Leaves were sampled at 8-, 16- and 24-leaf stages of the growth period. Total contents of phenols, flavonoids, and phenolic acids were measured using spectrophotometry, and the phenolic acid profile was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine aminotransferase (TAT) were measured by spectrophotometry, and the activity of rosmarinic acid synthase (RAS) was evaluated by HPLC. The relative expression of the corresponding genes was quantified by RT-PCR. The results showed that the content of all phenolic compounds and the activities of TAT and RAS enzymes/genes increased significantly ($P \leq 0.05$) with increasing plant age. At the 24-leaf stage, the total content of phenols, flavonoids, and phenolic acids were 3.47-, 2.80-, and 7.78-fold of those measured at the 8-leaf stage, respectively. The concentration of rosmarinic acid and caffeic acid (0.69 and 0.36 mg/g DW at the 8-leaf stage, respectively) increased by 3.41- and 4.05-fold during the vegetative growth, respectively. Lithospermic acid and salvianolic acids had a smaller share of total phenolic acids (0.01-0.06 mg/g DW at the 8-leaf stage), and their contents increased 2- to 10-fold with increasing plant age. Also, a strong positive correlation was observed between plant age and phenolic acid accumulation and between plant age and the activity and gene expression of TAT and RAS. TAT enzyme might play the main role in the biosynthesis of rosmarinic acid compared to PAL.

Keywords: Tyrosine aminotransferase, rosmarinic acid, rosmarinic acid synthase, vegetative growth, phenylalanine ammonia lyase, *Salvia leriifolia* Benth.