اثر نانو ذرات اکسید مس بر میزان تولید ترکیبات بیوشیمیایی در ریشه‌های مویین زرین گیاه (*Dracocephalumkotschyi*Boiss)

فاطمه ناصری[۱]، بهمن حسینی[۲*]، راحله طهماسبی[۳]، لطفعلی ناصری[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۲*] دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۳] استادیار جهاد دانشگاهی واحد ارومیه، ارومیه

*نویسنده مسئول: b.hosseini@urmia.ac.ir

چکیده

زرین‌گیاه با نام علمی *Dracocephalumkotschyi*Boiss متعلق به تیره‌ی Lamiaceae گیاهی علفی، چندساله و در معرض انقراض است که امروزه به‌دلیل تولید ترکیبات دارویی با ارزش و به‌ویژه تولید ترکیبات ضدسرطانی از قبیل اسید رزمارینیک، مورد توجه بسیاری از محققان در صنعت داروسازی و پزشکی قرار گرفته است. از این‌رو روش‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله کشت ریشه‌های مویین و تحریک با محرک‌ها به‌منظور تولید متابولیت‌های با ارزش این گیاه استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر جهت افزایش تولید ترکیبات فنولیک زرین‌گیاه و به‌ویژه افزایش اسید رزمارینیک از محرک غیرزیستی نانو اکسیدمس (صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به‌منظور تحریک ریشه‌های مویین تراریخت شده با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ۱۵۸۳۴، در مدت زمان‌های مختلف تیماری (۲۴ و ۴۸ ساعت) استفاده شد. باتوجه به آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری خواص بیوشیمیایی ریشه‌های مویین تحریک شده با نانوذرات اکسیدمس، مشاهده گردید که حداکثر میزان محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار با غلظت ۵ Mμ در مدت زمان‌های ۲۴ یا ۴۸ ساعت حاصل شد. همچنین حداکثر میزان وزن تر و خشک زیست‌توده نیز در تیمار ۵ Mμ نانو اکسیدمس حاصل گردید. باتوجه به نتایج ارائه شده می‌توان بدین‌گونه استنباط کرد که نانومحرک اکسیدمس با ازبین بردن سدهای مهار آنزیمی یا دستکاری مسیر آنزیم‌ها، سبب تغییر در سطح تولید متابولیت‌های ثانویه همچون اسید رزمارینیک می‌شود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، فلاونوئید کل، متابولیت ثانویه، محرک غیرزیستی

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalumkotschyi*Boiss از گیاهان دارویی بسیار مؤثر تیره نعناعیان با خاصیت ضد سرطانی است کهبه‌واسطه‌ی برداشت بی‌رویه‌ی آن در مرحله‌ی گل‌دهی توسط افراد بومی، بذر کافی تولید نمی‌شود، اسید رزمارینیک یکی از ترکیبات اصلی زرین گیاه است از طریق تأثیر به‌وسیله‌ی ترکیب ضدسرطانی دوکسوروبیسین[۱]، القای آسیب به DNA/کروموزوم را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Khojastehet *al.*, 2014).تولید ریشه مویین و تهییج از مؤثرترین روش‌هایی است که در حال حاضر برای بهبود تولید زیست‌فن‌آوری متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. تحقیقاتی توسط Zaka و Abbasi (۲۰۱۷) به منظور بررسی ظرفیت آلیاژهای نانوذرات مس در نسبت‌های مختلف برای ارزیابی تأثیر آن‌ها بر گیاه دارویی مهم شابانک[۲] انجام گرفت. طی مطالعات درون شیشه‌ای[۳] *E.sativa* از تیمار نانوذرات مس در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید و پارامترهای بیوشیمیایی نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه‌ی انجام‌شده، نتایج نشان داد که گیاهان در پاسخ به نانوذرات کوچک‌تر و با اثر سمیت بالاتر، متابولیت‌های ثانویه‌ی بیشتری همچون محتوای پروتئین کل، فلاونوئید و فنول کل را از خود آزاد کردند. بنابراین در پژوهش حاضر به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه زرین گیاه از محرک غیرزیستی نانواکسید مس در ریشه‌های مویین استفاده شده است.

1 Doxorubicin

2 *Eraca sativa*

3 In vitro

IrHC2019

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه،تهیه سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریز نمونه ها

بذرهایزرین گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداریو پس از ضدعفونی در محیط کشت MS[۴] کشت و در دمای ۲۴±۲°C و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند.از سوسپانسیون باکتری*A. rhizogenes* سویه ۱۵۸۳۴، جهت تلقیح کوتیلدون‌های دو هفته‌ای استفاده شد.پس ازدوروزهم‌کشتی[۵]، شستشو انجام شده و نمونه‌ها به محیط کشت ½MS جامد حاوی ۲۵۰mg/L سفوتاکسیم منتقل شدند.واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجامگردید.جهت تایید مولکولی انتقال ژن به ریشه‌های مویین از واکنشزنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تایید حضور ژنrolB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید.

استقرار ریشه های مویین در محیط کشت مایع و تهییجبامحرکنانوذراتاکسیدمس

نانواکسید مس مورد استفاده در این پژوهش با اندازه‌ی ۴۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه و در غلظت‌های مختلف (صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) استفاده گردید. مقدار ۸ میلی‌لیتر از هر یک از انواع محیط‌کشت‌های حاوی نانو اکسید مس به ریشه‌های مویین ۲۱ روزه‌ی موجود در ارلن‌ها افزوده شد (در ۳ تکرار) .ارلن‌ها به شیکر انکوباتور با دمای ۲۶°C و ۱۸۰ دور در دقیقه منتقل و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های مویین از محیط‌کشت ½MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف محرک نانو اکسید مس خارج و پس از شستشو به محیط‌کشت ½MS عاری از هرگونه محرک منتقل گردیدند. پس از گذشت یکهفته، ریشه‌های مویین برداشت شده و اندازه‌گیری‌ها انجام گرفت.

شاخص های اندازه گیری

میزان رشد زیست‌توده با استفاده از اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌ها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ g و خواص فیتوشیمیایی با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر Dynamica (HALO DB-20) در طول موج مربوطهسنجیده و محاسبه شد. عصاره‌گیری متانولی به روش Hajimahdipour و همکاران (۲۰۰۹) به منظور اندازه‌گیری فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری فنول کل از روشSlinkard و Singleton (۱۹۷۷)، برایفلاونوئید کل از روش Shin و همکاران (۲۰۰۷)و به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از DPPH از روش Chiouو همکاران(۲۰۰۷) استفاده گردید.استخراج عصاره‌ی گیاهی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از روش Sudhakar و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت.سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روشBergmeyer(۱۹۷۴)، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۵)و آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روشNakano و Asada (۱۹۸۱)انجام گرفت.

نتایج و بحث

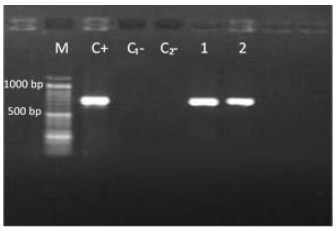
تأیید تراریختی ریشه‌های مویین

تأییدماهیت تراریختی ریشه‌های مویین توسط PCR انجام گردید. پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، نوار مورد انتظار حدود۷۸۰bp مربوط به تکثیر ژن *rolB* در ریشه‌های مویین احتمالی مشاهده شد که با نوار حاصل از شاهد مثبت هم‌اندازه بود.

4 Murashige and Skoog (1962)

5 Co-culture

IrHC2019



شکل۱- آنالیز PCR ژن rolB در ریشه‌های مویین زرین گیاه. M: مارکر مولکولی ۱ Kb (Fermentase). C+: A. rhizogenes کنترل مثبت. C-: واکنش PCR فاقد DNA کنترل منفی. -C: ریشه‌ی غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی. ۱ و ۲: ریشه‌های مویین تراریخت زرین گیاه.

تاثیر محرک نانو اکسیدمس بر رشد ریشه‌های مویین زرین گیاه

نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت‌های مختلف نانو اکسیدمس و زمان تیمار آن‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در وزن تر ریشه‌های مویین زرین گیاه بود اما اثرات ساده‌ی غلظت‌های مختلف و تیمارهای زمانی متفاوت، هر یک به‌طور جداگانه اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد از خود نشان دادند. مقایسات میانگین وزن تر ریشه‌های مویین نشان داد که بیشترین میزان وزن تر در میان غلظت‌های مختلف نانو اکسیدمس مربوط به تیمار ۱۰ میکرومولار (۵/۵ g) و کم‌ترین میزان وزن تر مربوط به نمونه‌های شاهد (۴/۷۱ g) بود (جدول ۱). از سوی دیگر تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت‌های مختلف نانو اکسیدمس و زمان تیمار آن‌ها، اختلاف معنی‌داری را در وزن خشک ریشه‌های مویین زرین گیاه نشان نداد. همچنین بین تیمارهای زمانی نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. اما اثرات غلظت‌های مختلف در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را از خود نشان دادند. بدین صورت که بیشترین میزان وزن خشک (۳۸۰ mg) در غلظت ۵ میکرومولار نانو اکسیدمس و کمترین میزان وزن خشک (۳۱۰ mg) در ریشه‌هایی مشاهده‌گردید که با غلظت ۱۵ میکرومولار نانو اکسیدمس تحریک شده بودند.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر محرک نانو اکسیدمس بر وزن تر، وزن خشک، فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین زرین گیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		وزن تر	وزن خشک	فنول کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی-اکسیدانی	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز
زمان تیمار(a)	۱	۱/۶۲**	۰/۰۰۰۰۵۷^{ns}	۰/۳۵*	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۵۶۱^{ns}	۰/۹۲**	۰/۰۱۵^{ns}	۰/۰۳۳**
غلظت تیمار (b)	۳	۱/۹۲**	۰/۰۰۶**	۳/۱۴۹**	۰/۹۲۱**	۱۰/۱۹۸**	۱۵۷/۷۸**	۰/۰۹**	۰/۰۹۳**
اثر متقابل (a×b)	۳	۰/۲۱^{ns}	۰/۰۰۰۲۱^{ns}	۵/۶۵۱**	۱/۲۰۸**	۷/۸۶۶**	۱/۲۴**	۰/۰۴۵**	۰/۰۴۲**
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۰۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۶۷	۰/۰۰۴	۰/۱۳۹	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۵/۶۳۶	۵/۷۶۱	۱۳/۷۴۶	۱/۱۴۸	۱/۰۵۶	۱/۱۳۲	۲۴/۶۸	۵/۳۴۵

تأثیر محرک نانو اکسیدمس بر میزان فنول و فلاونوئید کل ریشه‌های مویین زرین گیاه

نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت‌های مختلف نانو اکسیدمس و زمان تیمار آن‌ها، نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار محتوای فنول کل ریشه‌های مویین زرین گیاه در سطح احتمال یک درصد بود.مقایسات میانگین محتوای فنول کل ریشه‌های مویین نشان داد که بیشترین میزان فنول کل (۳/۲۷ g/g FWμ) مربوط به تیمار ۵ میکرومولار نانو اکسیدمس، در مدت زمان ۴۸ ساعت و کم‌ترین میزان فنول کل مربوط به تیمار ۱۵ میکرومولار در مدت زمان ۴۸ ساعت (۰/۲۶ g/g FWμ) بود (جدول ۱). از سوی دیگر نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به محتوای فلانوئید کل، نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار اثرات متقابل زمان تیمار و غلظت تیمار با نانو اکسیدمس در سطح یک درصد بود. نتایج مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که

IrHC2019

حداقل میزان محتوای فلاونوئید کل (۴/۹۵ g/g FWµ) در تیمار ۴۸ ساعته‌ی ۱۵ میکرومولار و حداکثر میزان نیز (g/g FWµ ۶/۳۱) مربوط به تیمار ۴۸ ساعته‌ی ۵ میکرومولار بود.

تاثیر محرک نانو اکسیدمس بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل ریشه‌های مویین زرین گیاه

نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت‌های نانو اکسیدمس و زمان تیمار آن‌ها نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در سطح یک درصد بود. براساس مقایسات میانگین انجام گرفته، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به تیمارهای ۴۸ ساعته‌ی ۵ میکرومولار (۳۷/۷۰ درصد) و تیمار ۲۴ ساعته‌ی ۱۰ میکرومولار (۳۷/۴۶ درصد) بود. این در حالتی است که کم‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ۴۸ ساعته و ۲۴ ساعته با غلظت ۱۵ میکرومولار (۳۳/۳۰ و ۳۳/۶۷ درصد) بود. متوسط میزان آنتی‌اکسیدان کل در تیمار ۲۴ ساعته‌ی ۵ میکرومولار و نمونه‌های شاهد مشاهده گردید (جدول ۱).

تاثیر محرک نانو اکسیدمس بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین زرین گیاه

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار در سطح احتمال پنج درصد در آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود. این درحالی است که اثرات ساده‌ی تیمار زمان بی‌معنی و اثرات ساده غلظت‌های مختلف در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۴۸ ساعته‌ی ۵ میکرومولار نانو اکسیدمس (۰/۷۸ µmol/min) و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۴۸ ساعته‌ی ۱۵ میکرومولار (۰/۳۱ µmol/min) مشاهده گردید (جدول ۱). آنالیز واریانس اثر متقابل زمان و غلظت محرک نانو اکسیدمس بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز وگایاکول پراکسیداز نیز نشان دادند که اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها وجود دارد.

منابع

Bergmeyer, H. U. 1974.Methods of enzymatic analysis. Verlagchemie, Weinheim, New York, Pp: 674-684.

Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K. 2007. Currants (*Vitisvinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry. 102: 516-522.

Hajimahdipour, H., Khanavi, M., SHekarchi, M., Abedi, Z. and PiraliHamedani, M. 2009. Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plants, 4(8): 145-152.

Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Hidalgo, D., Corchete, P. and Palazon, J. 2014. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. Biotechnology letters, 36(12): 2393-2406.

Nakano, Y. and Asada, K. 1981.Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22(5): 867-880.

Shin, Y., Liu, R. H., Nock, J. F., Holliday, D. and Watkins, C. B. 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45(3): 349-357.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture, 28(1): 49-55.

Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morusalba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.

Zaka, M. and Abbasi, B. H. 2016. Effects of bimetallic nanoparticles on seed germination frequency and biochemical characterisation of *Eruca sativa*. IET nanobiotechnology, 11(3): 255-260.

Zhang, J., Liu, H., Sun, Y., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y. 2005.Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassiusauratus*, exposed to 2, 4-dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19(1): 185-190.

IrHC2019

Effect of copper oxide nanoparticles on production of biochemical compounds in *Dracocephalum kotschyi* Boiss hairy roots

Fatemeh Naseri[1], Bahman Hosseini[2*], Rahele Tahmasbi[3], Lotfali Naseri[2]
[1]MSc student, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
[2*]Associate professor, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
[3] assistance professor, Jahad daneshgahi, Urmia- Iran
[*]*Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract
Dracocephalum kotschyi Boiss belongs to Lamiaceae family is a perennial herbaceous and endangered plant that nowadays attracts many pharmaceutical and medicine industry researchers due to the production of valuable drug compounds, especially anti-cancer compounds, such as rosmarinic acid (RA).Therefore, various biotechnology methods such as, hairy root cultures can be used to produce valuable metabolites of this plant. Also, using elicitors can induce the production of secondary metabolites on *in vitro* conditions. In the present study, abiotic copper oxide elicitor (0, 5, 10 and 15 µM) was used to stimulate the transgenic hairy roots induced with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834, in different durations (24 and 48 hours) to increase the production of phenolic compounds and in particular increase of RA in hairy roots of *D. kotschyi* Boiss. Considering the analysis of the data obtained from biochemical measurement properties in stimulated hairy roots with copper oxide nanoparticles, the maximum total of phenol content, total flavonoids, antioxidant activity and the activity of the catalase and ascorbate peroxidase enzymes in treatment with the concentration of 5 µM in 24 or 48 hours treatments was observed. Also, the maximum fresh and dry weight of biomass was reached in the treatment of 5 µM copper oxide nanoparticles treatments. According to the results, it can be deduced that the nano copper oxide elicitor by eliminating the enzymatic inhibitors or manipulating the pathway of the enzymes, cause alter levels of secondary metabolites production, such as rosmarinic acid.

***Keywords*:** Abiotic elicitor, Antioxidant, Secondary metabolites, Total flavonoids

IrHC2019