تاثیر نانو ذره تیتانیوم دی اکسید به عنوان الیسیتور کارآمد در تولید ترکیبات فنولی با ارزش در کشت ریشه‌های موئین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*)

الناز نوروزی پاکزاد[۱]، بهمن حسینی[۲*] رامین ملکی[۳]، بابک عبدالهی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

[۳] استادیار گروه شیمی تجزیه، جهاد دانشگاهی ، ، ارومیه

[۴] دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

چکیده

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschyi*، یکی از گونه‌های مهم و در معرض انقراض خانواده نعناعیان می‌باشد. رزمارینیک اسید و متوکسی فلاونوئیدهایی نظیر زانتومیکرول و سیرسیمارتین، موجود در این گیاه دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشند. در حال حاضر تکنیک‌های مختلف بیوتکنولوژی از جمله تحریک‌زایی، به منظور افزایش بیوسنتز متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئین استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف نانو تیتانیوم دی اکسید (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بر میزان تولید رزمارینیک اسید و بیان ژن‌های *pal* و *ras* در مسیر تولید آن و سایر ترکیبات فنولی با ارزش در کشت ریشه‌های موئین زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان رزمارینیک اسید (۵۳۰/۵۰ میکرو گرم بر گرم وزن تر) با ۴/۳۰ برابر افزایش در مقایسه با تیمار شاهد، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت حاصل گردید که در نتیجه افزایش میزان بیان ژن‌های *pal* و *ras* در این تیمار می‌باشد. برخی اسیدهای فنولی و متوکسی فلاونوئیدها نیز با افزایش قابل توجهی در مقایسه با ریشه‌های شاهد شناسایی گردید. زانتومیکرول، سیرسیماریتین و ایزوکامفرید از مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در زرین گیاه بشمار می‌روند.

کلمات کلیدی: زرین گیاه، بیان ژن، ریشه موئین، رزمارینیک اسید، نانو تیتانیوم دی اکسید

مقدمه

جنس *Dracocephalum* از جمله مهمترین جنس‌های خانواده نعناعیان بوده و در قسمت‌هایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود. ترکیبات موجود در زرین گیاه از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و گلیکوزیدهای مونو ترپن است (Fattahi, 2013). رزمارینیک اسید دارای فعالیت‌های زیستی قابل توجهی از جمله اثرات ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد فساد پذیری و آنتی اکسیدانی می‌باشد (Xiao *et al*., 2009). تحقیقات نشان داده است که زانتومیکرول، کالیکوپترین و پندولوتین دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشند. مسیر بوسنتزی رزمارینیک اسید از دو اسید آمینه L- فنیل آلانین و L- تیروزین و توسط چندین واکنش آنزیمی شروع می‌شود. نقش آنزیم‌های PAL (Phenylalanine ammonia lyase) و RAS (*Rosmarinic* acid synthase) در تنظیم تولید رزمارینیک اسید در چندین تحقیق به اثبات رسیده است (Petersen, 2013). تکنیک القای ریشه‌های موئین توسط باکتری گرم منفی خاکزی، آگروباکتریوم رایزوژنز به منظور تولید ترکیبات با ارزش دارویی به صورت گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. استفاده از انواع محرک‌ها به منظور افزایش تولید ترکیبات فعال گیاهی از جمله راهکارهای موثر می‌باشد.

IrHC2019

همبستگی نزدیکی بین تولید متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان وجود دارد. اخیرا" نانو ذرات به عنوان محرک-های کارآمد به منظور تحریک تولید ترکیبات با ارزش دارویی از طریق القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تحقیق حاضر اولین بررسی در مورد اثر نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید به منظور تولید رزمارینیک اسید، متوکسی فلاونوئیدها و میزان بیان ژن‌های *pal* و *ras* در مسیر تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های موئین زرین گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه گیاهی و القاء ریشه‌های موئین

بذور زرین گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور رفع خواب بذر، بذور به مدت ۱۰ دقیقه در اسید سولفوریک ۹۸ درصد خیسانده شدند و پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، در محیط کشت MS کشت شدند و به منظور جوانه زنی و تهیه ریز نمونه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ریزنمونه برگ ۴ هفته‌ای و سویه ATCC15834 اگروباکتریوم رایزوژنز به منظور القای ریشه موئین مود استفاده قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها پس از غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه، جهت هم کشتی به محیط MS و شرایط تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت به منظور حذف باکتری، از محیط کشت MS ½ حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم استفاده شد. بعد از گذشت چهار هفته، ریشه‌های موئین از محل زخم بر روی ریزنمونه‌ها ظاهر گردید. ریشه‌های موئین از محل رویش قطع و به محیط کشت مایع MS ½ فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انتقال یافته و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و ۱۴۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. واکشت ریشه‌های موئین هر دو هفته یکبار صورت گرفت.

تائید تراریختی ریشه‌های موئین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB انجام شد و اثبات تراریخته بودن ریشه‌های موئین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* (F: 5´-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3´ و R: 5´-TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3´) صورت گرفت. واکنش در ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام و بوسیله دستگاه ژل داک عکسبردار شدند.

اعمال محرک

نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد-ایران) تهیه گردید. نانو ذرات به شکل کریستالی با اندازه ۲۰ نانومتر بود. رنگ نانو ذرات سیلیکون سفید و به لحاظ مورفولوژی کروی بوده و مساحت سطح ویژه آن ۴۵-۱۰ m^2/g و درصد خلوص این نانو ذره ۹۹ درصد بود. غلظت‌های مختلف نانو ذره تیتانیوم دی اکسید (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در انتهای فاز رشد لگاریتمی (کشت‌های ۲۱ روزه) به محیط کشت ریشه‌های موئین (MS ½ حاوی ۳۰ گرم ساکارز و pH =۵/۷) اضافه گردید. ریشه‌های موئین در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت توسط نانوذرات تیمار شدند.

استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری میزان رزمارینیک اسید، فلاونوئیدها و برخی اسیدهای فنولی

حدود ۵۰۰ میلی‌گرم ریشه موئین فریز شده توسط ازت مایع، پودر شده و در ۵ میلی‌لیتر متانول HPLC ۸۰ درصد عصاره گیری شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولترا سونیک Euroconic 4D-

IrHC2019

Euronda Company-Italy قرار گرفتند. عصاره متانولی حاصل پس از سانتریفیوژ با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) آماده گردید.

آنالیز HPLC

جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار کمی ترکیبات فنولی مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از دستگاه HPLC مدل سری ۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادیانی چهار حلالی و آشکار ساز آرایه دیودی صورت گرفت. جداسازی بر روی ستون اکتا دسیل سیلان (به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرو متر (ZORBAX Eclipse XDB) ساخت کمپانی Dr. Mainsch آلمان انجام شد.

استخراج ریبونوکلئیک اسید (RNA) و آنالیز بیان ژن به روش Real time-PCR

استخراج ریبونوکلئیک اسید کل با استفاده از کیت RNX plus™ شرکت سیناژن (ایران) انجام شد. به منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ قرائت شد. RNAهای رقیق شده با غلظت‌های یکسان در واکنش Real time-PCR به عنوان الگو قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز شرکت فرمنتاز (آلمان) صورت گرفت. طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *pal* و *ras* و همچنین ژن *18s* به عنوان ژن رفرنس با استفاده از برنامه الیگو صورت گرفت. این واکنش در سه تکرار و با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و توسط برنامه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و چهل چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد.

آنالیز آماری

آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS 9.1 و مقایسات میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

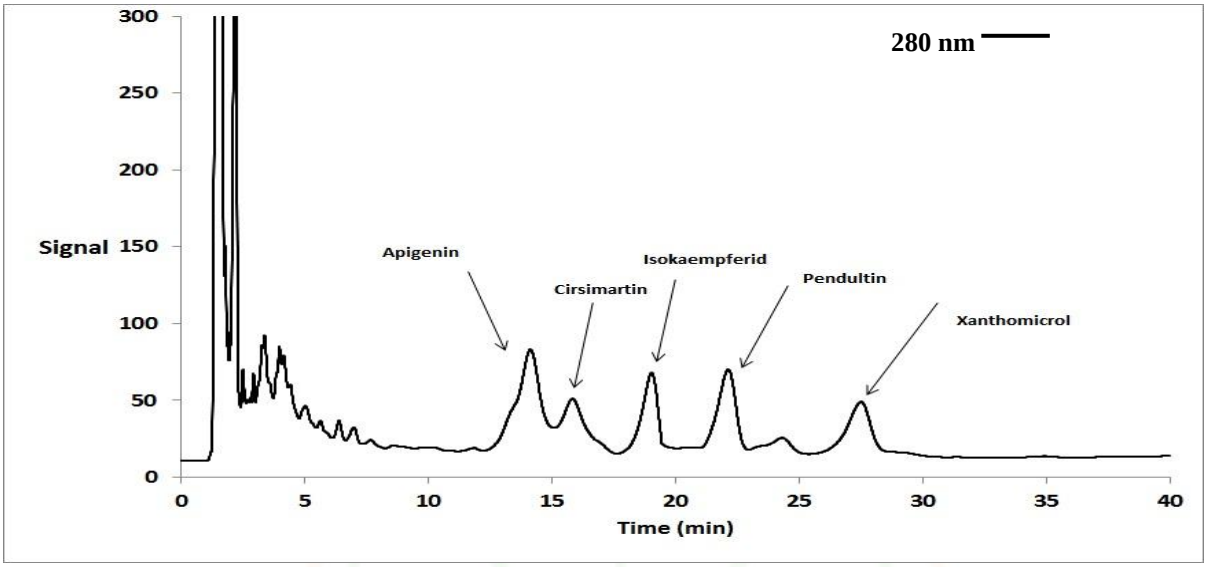
نتایج و بحث:

گونه‌های *Dracocephalum* حاوی دامنه‌ای از متابولیت‌های ثانویه شامل ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، هیدروکسی پرویک و هیدروکسی سینامید اسیدها هستند (Omidbeigi *et al*., 2010). در عصاره گیاه دارویی زرین گیاه ترکیبات فنولی از جمله رزمارینیک اسید و متوکسی فلاونوئیدها وجود دارد. غلظت این ترکیبات در ریشه‌های موئین تیمار شده توسط غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی اکسید در مقایسه با نمونه‌های شاهد توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تعیین گردید (جدول ۱).

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین تیمار شده با نانوذره در مقایسه با ریشه‌های موئین شاهد به طور قابل توجهی افزایش یافت. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوتیتانیوم دی اکسید در مدت ۲۴ ساعت بیشترین میزان تولید رزمارینیک اسید (۵۳۰/۵ میکرو گرم بر گرم وزن تر) را نشان داد که این میزان ۴/۳۰ برابر بیشتر از تیمار شاهد بود. کمترین میزان رزمارینیک اسید (۱۲۲/۶ میکرو گرم بر گرم وزن تر) نیز در تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر تیتانیوم دی اکسید و در مدت ۴۸ ساعت مشاهده گردید. سایر ترکیبات فنولی شناسایی شده در ریشه‌های موئین زرین گیاه شامل گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کوماریک اسید، سینامیک اسید، روتین و کوئرستین می‌باشند که مقادیر هر یک در ریشه‌های موئین تحت تاثیر تیمار با نانوذره تیتانیوم دی اکسید در جدول ۱ نشان داده شده است. کروماتوگرام مربوط به پیک‌های ترکیبات متوکسی فلاونوئیدی مهم در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین میزان اپی‌ژنین در ریشه‌های موئین شاهد بدست آمد. بالاترین میزان تولید سیرسیماریتین (۲/۴۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم دی اکسید و در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت بدست آمد که نسبت به شاهد افزایش ۳۵/۵۷ برابری داشت. میزان ایزوکامفرید افزایش ۷/۸۱ برابری در ریشه‌های موئین تیمار شده در مقایسه با ریشه‌های شاهد نشان داد. پندولوتین تنها در

IrHC2019

ریشه‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم دی اکسید در مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت، همچنین تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۴۸ ساعت شناسایی گردید. بیشترین میزان زانتو میکرول (۵/۶ میکرو گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم دی اکسید و در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت حاصل گردید.



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به استاندارد ترکیبات اپی‌ژنین، سیرسیماریتین، ایزوکامفرید، پندولوتین و زانتو میکرول

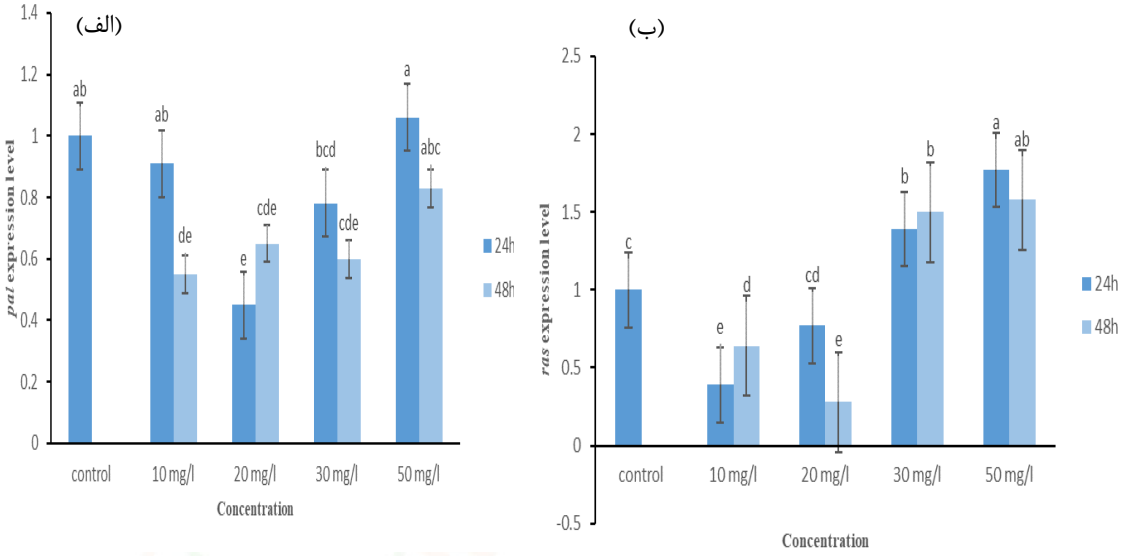
ترکیبات فنولی گروه بزرگی از آنتی‌اکسیدان‌ها با ویژگی مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد هستند (Palmieri *et al.*, 2012). مکانیسم حفاظتی ترکیبات فنولی تحت شرایط مختلف محیطی و فاکتورهای تنشی متفاوت می‌باشد (Sakihama *et al.*, 2002). تحریک سلول‌ها و اندام‌های گیاهی منجر به بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با تجمع ترکیبات فنولی در مسیر فنیل پروپانوئید می‌گردد.

جدول ۱. میزان رزمارینیک اسید، اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها در ریشه های موئین زرین گیاه تیمارشده توسط غلظت های مختلف نانو تیتانیوم دی اکسید

Exposure time	Tio_2 NPconcentration (mg/L)	RA	Phenolic acids							Methoxylated flavonoids				
			Gal	Caf	Chl	Rut	Cou	Que	Cin	Api	Cir	Iso	Pen	Xan
24 h	Control	123^{f}	-	95.5^{a}	5.58^{a}	2^{cd}	12.06^{a}	7.82^{a}	-	193.12^{a}	0.07^{e}	0.11^{d}	-	0.08^{d}
	10	489.2^{b}	7.99^{g}	55.31^{c}	2.82^{d}	1.77^{de}	6.71^{d}	2.20^{c}	-	23.36^{f}	0.21^{cd}	0.21^{bc}	-	0.14^{d}
	20	128.8^{f}	18.64^{d}	21.61^{h}	1.47^{e}	1.58^{e}	7.34^{c}	1.98^{c}	0.24^{d}	23.79^{f}	2.49^{a}	0.86^{a}	0.84^{a}	5.6^{a}
	30	257.7^{c}	75.07^{a}	26.92^{g}	3.85^{c}	2.59^{a}	4.40^{f}	-	0.76^{b}	40.01^{c}	0.11^{e}	0.23^{b}	-	-
	50	530.5^{a}	11.57^{f}	64.84^{b}	4.20^{bc}	-	6.50^{d}	-	-	2.61^{g}	0.23^{c}	0.16^{cd}	-	0.1^{d}
48 h	Control	123^{f}	-	95.5^{a}	5.58^{a}	2^{cd}	12.06^{a}	7.82^{a}	-	193.12^{a}	0.07^{e}	0.11^{d}	-	0.08^{d}
	10	153.4^{e}	13.48^{e}	35.85^{e}	4.79^{b}	2.57^{a}	10.01^{b}	-	0.39^{c}	36.61^{d}	0.2^{cd}	-	-	-
	20	222.4^{d}	63.91^{b}	39.35^{d}	2.58^{d}	2.38^{ab}	7.63^{c}	2.58^{bc}	2.68^{a}	59.44^{b}	1.29^{b}	0.14^{cd}	0.24^{b}	0.5^{b}
	30	122.6^{f}	5.03^{h}	23.38^{h}	3.02^{d}	1.76^{de}	6.85^{cd}	-	0.26^{d}	31.7^{e}	0.14^{de}	0.16^{cd}	-	0.11^{d}
	50	261.8^{c}	25.13^{c}	30.95^{f}	2.98^{d}	2.21^{bc}	5.35^{e}	3^{b}	-	4.81^{g}	0.08^{e}	0.15^{cd}	0.11^{c}	0.42^{c}

Tio_2NP, titanium dioxide nanoparticle; RA, rosmarinic acid; Gal, gallic acid; Caf, caffeic acid; Chl, chlorogenic acid; Rut, rutin; Cou, coumaric acid; Que, quercetin; Cin, cinnamic acid; Api, apigenin; Cir, cirsimaritin; Iso, isokaempferid; Pen, penduletin; Xan, xanthomicrol; -, not detected.

با افزایش غلظت نانو ذره تیتانیوم دی اکسید در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت میزان بیان ژن *pal* در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۲- الف). در مقابل بیان ژن *ras* با افزایش غلظت نانو ذره تیتانیوم دی اکسید در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت افزایش یافت و بیشترین میزان بیان در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم دی اکسید مشاهده گردید (شکل ۲-ب). همبستگی مثبتی بین میزان بیان ژن *pal* و تولید رزمارینیک اسید در ریشه‌های تیمار شده با نانو تیتانیوم دی اکسید مشاهده گردید. بررسی مطالعات گذشته نشان داد که نانو تتانیوم دی اکسید باعث افزایش متابولیسم نیتروژن در سلول‌های گیاهی و تحریک بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید متابولیت‌های با ارزش گیاهی می‌گردد (Yang *et al*., 2007).



شکل ۲. میزان بیان ژن‌های الف: *pal* و *ras* در کشت ریشه‌های موئین زرین گیاه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانو تیتانیوم دی اکسید

منابع

Fattahi, M., Nazeri., V., Torras-Claveria, L, Sefidkon, F, Cusido R., Zamani Z., Palazon J. 2013. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Industrial Crops and Products, 50: 256-263.

Xiao, Y., Di, P., Chen, J., Liu, Y., Chen, W. and Zhang, L. 2009. Characterization and expression profiling of 4-hydroxy phenyl pyruvate dioxygenase gene from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. Molecular Biology Reports, 36, 2019-2029.

Petersen, M. 2013. Rosmarinic acid: new aspects. Phytochemistry Reviews, 12(1), 207-227.

Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E., Yavari, S. 2010. Induction of autotetraploidy in Dragohead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1), 23-35.

Palmieri, D., Aliakbarian, B., Casazza, A .A., Ferrari, N., Spinella, G., Pane, B., Cafueri, G., Perego, P., Palombo, D. 2012. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. Microvascular Research, 83, 281–289.

Sakihama, Y., Cohen, M. F., Gace, S. C., Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology, 17, 67–80.

Yang, H., Sun, C. H., Zhang, Qiao., Zou, J., Liu, G., Smith, S. C. 2007. Anatase TiO_2 single crystals with a large percentage of reactive facets. Nature, 453, 638-641.

Effect of Nano Titanium Dioxide as Reliable Elicitor in Production of Valuable Phenolic Compounds in *Dracocephalum kotschyi* Hairy Roots Cultures

Elnaz Nourozi [1]. Bahman Hosseini [1, *]
Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
** Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract

Dracocephalum kotschyi Boiss. is one of the important threatened traditional species of labiatae family. Rosmarinic acid (RA) and methoxylated flavonoids, particularly, xanthomicrol and cirsimaritin of this plant have anti-cancer properties. Lately, nanoparticles widely used as new efficient elicitors in the biotechnology thread to stimulate the producing of valuable substance by induction of defense response. In this work, effect of various concentrations of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2 NPs) in two elicitation time exposure (24 and 48 h) on RA accumulation, the expression rate of phenylalanine ammonia-lyase (*pal*) and rosmarinic acid synthase (*ras*) genes in RA biosynthetic pathway and content of some phenolic compounds were investigated. The high amount of RA (530.50 µg/g FW) with 4.30-fold increase compared to control, was observed in hairy roots culture elicited with TiO_2 NPs (50 mg/L) after 24 h of elicitation ,which was because of notable rise in the expression rate of *pal* and *ras* genes in this elicitor concentration and exposure time. Stimulation of *D. kotschyi* hairy roots by TiO_2 NPs caused huge increase in induction and production of some important phenolic compounds such as xanthomicrol, cirsimaritin and isokaempferide in comparison with control treatments.

***Keywords*:** *Dracocephalum kotschyi*, Gene expression, Hairy root, Rosmarinic acid, Nano titanium dioxide

IrHC2019