اثر محرک‌های زیستی کلشی‌سین و کیتوسان در افزایش متابولیت‌های ثانویه زرین گیاه

بهمن حسینی[۱*]، فاطمه ناصری[۲]، نسرین ایوبی[۳]، محمد فتاحی[۴]

[۱*]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

[۳]دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۴]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

چکیده

زرین گیاه به علت دارا بودن آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی، دارای خواصی از قبیل خاصیت ضد باکتریایی، ضد سرطانی و آنتی تومور می‌باشد. استفاده از شیوه‌های مختلف القا ریشه‌های موئین در زرین گیاه می‌تواند به تولید ترکیبات دارویی کمک کند. به‌کارگیری محرک‌ها یکی از موفق‌ترین استراتژی‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. طی این مطالعه تأثیر محرک‌های زیستی کلشی‌سین و کیتوسان در دو آزمایش مستقل بر میزان تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدها، فنل کل و اسید رزمارینیک موردبررسی قرار گرفت. در این آزمایش از ریز نمونه‌های برگ یک‌هفته‌ای زرین گیاه برای تولید ریشه‌های موئین استفاده شد. از روش تلقیح غوطه‌وری جهت القا تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ۱۵۸۳۴ استفاده گردید و از محیط کشت۱/۴ غلظت MS مایع به‌منظور نگهداری ریشه موئین و تیمار آن‌ها استفاده شد. هر دو آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و شامل پنج تیمار (۳ تیمار حاوی غلظت‌های متفاوت محرک‌ها و دو تیمار شاهد تراریخت و شاهد غیرتراریخت) بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین تا مقدار ۰/۰۵ درصد میزان متابولیت‌های ثانویه در ریشه های موئین افزایش یافت. همچنین با افزایش غلظت کیتوسان به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان متابولیت‌های ثانویه و وزن تر ریشه‌های موئین افزایش یافت. کمترین مقدار این متابولیت‌ها نیز طی همه‌ی آزمایش‌ها در ریشه‌های موئین غیرتراریخت مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: **اسید رزمارینیک، آگروباکتریوم، آنتی‌اکسیدان، ریشه‌های موئین، فلاونوئید، فنل کل**

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschyi* Boiss یکی از مهم‌ترین گیاهان تیره نعناعیان[۱]می‌باشد. زرین گیاه دارای ترکیبات ارزشمند دارویی از قبیل اسانس، فلاونوئید، اسید رزمارینیک[۲]و گلیکوزیدهای مونوترپن می‌باشد (Fattahi., 2012) که سبب شده‌اند این گیاه دارای خاصیت با ارزش ضد سرطانی باشد (Moghadam *et al*., 2012).کشت سلول گیاهی و تولید ریشه‌های موئین یک منبع مناسب و باارزش برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Behabadi and Sharifi., 2013). یکی از روش‌های مؤثر برای القا ریشه‌های موئین استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز[۳] می‌باشد. القا ریشه موئین به پارامترهای مختلفی همچون: گونه گیاهی، سن و بافت گیاهی، سویه باکتری و تراکم آن نیز وابسته است (Park and Facchini., 2000; Sevon and Oksman-Caldentey., 2002).

۱Dracocephalum
۲Rosmarinic acid
۳*Agrobacterium rhizogenes*

افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه، با استفاده از محرک‌ها در کشت سلولی گیاه، زمینه‌های مطالعاتی جدیدی را ایجاد کرده که می‌تواند منافع اقتصادی ارزشمندی برای صنایع زیستی داشته باشد (Angelov *et al*., 2009). محرک‌های زیستی شامل: پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و یا قطعات دیواره سلولی قارچ‌ها، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Vasconsuelo and Boland., 2007). Zhou و همکاران (2007) نشان دادند که استفاده از محرک‌های زیستی در غلظت‌های بالا تأثیر بسزایی دارد. الیگوساکاریدهای به‌دست آمده از قارچ *Colletotrichum*، عصاره مخمر و کیتوسان به ترتیب منجر به افزایش ۱/۵، ۳ و ۶ برابری مقدار آرتمیزین (ترکیب ضد مالاریا) در *Artemisia annua* گردید (Putalun *et al*., 2007; Wang *et al*., 2006).

کلشی‌سین آلکالوئیدی است که مانع از تشکیل دوک، هنگام تقسیم سلولی شده و بنابراین تعداد کروموزوم‌ها در سلول گیاهی دو برابر می‌شود، در نتیجه سطح پلوئیدی افزایش می‌یابد (Tambong *et al*., 1998; Gupta., 2002). تحقیقات نشان داده که افزایش سطح پلوئیدی سبب افزایش تولید و یا بهبود کیفیت بیوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Dhawan and Lavania., 1996). با توجه به اینکه تحقیقات جامع و گسترده‌ای در رابطه با فاکتورهای مؤثر بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در زرین گیاه انجام نگرفته است، لذا هدف این مطالعه بررسی اثرات محرک‌های زیستی کلشی‌سین و کیتوسان بر مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه و تغییرات بیوشیمیایی در این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی بذرها و محیط کشت‌ها

بذور زرین گیاه از شرکت پاکان بذر (اصفهان) خریداری شده و به‌منظور برطرف کردن سختی پوسته بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ غوطه‌ور گردیدند. ضدعفونی بذور با اتانول ۷۰٪، هیپوکلریت سدیم و آب مقطر انجام گرفته و سپس در محیط‌کشت آماده MS[1] (شرکت Dutchefa هلند) حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد آزمایشگاه نگهداری گردیدند. جهت کشت آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ۱۵۸۳۴ (NIGEB-TEHRAN) از محیط‌کشت LB[2] جامد حاوی ۱۵ گرم آگار، دارای pH برابر با ۷/۵-۷، و به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتری جهت تلقیح از محیط‌کشت LB مایع استفاده گردید (Bertani., 1952). به‌منظور نگهداری و تکثیر نمونه‌های ریشه موئین از محیط‌کشت آماده ۱/۴MS حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد.

بررسی اثر محرک‌ها بر میزان تغییر متابولیت‌های ثانویه

طی این آزمایش‌ها ۰/۱ گرم ریشه موئین به ۳۰ میلی‌لیتر محیط مایع ۱/۴MS در زیر هود لامینار انتقال داده شد. تیمارهای کلشی‌سین در ۳ غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد و کیتوسان در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر با ۳ تکرار به مدت ۴۸ ساعت اعمال شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و به محیط‌کشت ۱/۴ MS مایع منتقل گردیدند. این محیط‌ها در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه، در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ۳ هفته درصد آنتی‌اکسیدان، فنل کل و فلاونوئید محاسبه گردید.

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار آنتی‌اکسیدان، فنل کل و فلاونوئید، عصاره‌گیری متانولی انجام گرفت (Fattahi *et al*., 2013; Vieira *et al*., 2001). میزان آنتی‌اکسیدان با روش Chiou و همکاران (2007)، میزان فنل کل به روش Slinkard and Singleton (1977) و مقدار فلاونوئید کل توسط روش Shin و همکاران (2007) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین مقدار اسید رزمارینیک در ریشه‌های موئین از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (مدل Agilent 1100)،

۱Murashige and skoog

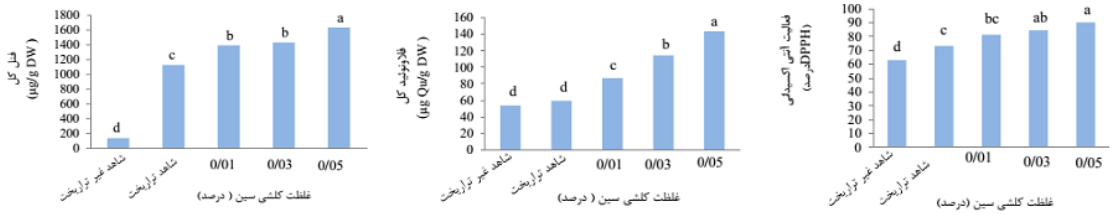
۲Lurica-Bertani

دستگاه اولتراسونیک (یوروندا ایتالیا) و ترازوی آنالیتیکال با دقت ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۱ گرم (مدل ED1245 شرکت Sartorius) استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر کلشی‌سین بر مقدار مواد مؤثره ریشه‌های موئین

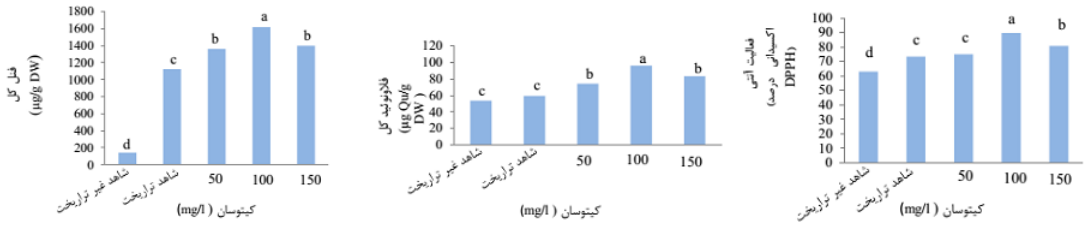
آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح (P<0/01) وجود دارد. همچنین بیشترین میزان هر سه ماده مؤثره مربوط به غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین و کمترین مقدار این مواد مؤثره مربوط به ریشه‌های غیرتراریخت بود. با توجه به تحلیل این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که افزایش رشد ریشه‌های موئین در تیمار با کلشی‌سین به علت افزایش سطح پلوئیدی و مضاعف شدگی مستقیم ژنومیک می‌باشد. در این حالت مواد ژنتیکی مشابه باقی‌مانده و تنها دُز ژنی افزایش می‌یابد. بنابراین میزان تولید متابولیت‌ها در اتوتتراپلوئیدها افزایش می‌یابد. مدل رایج Levin (1983)، علت به‌دست آمدن این نتایج را، کاهش نسبت غشا هسته به مقدار کروماتین سلول می‌داند.



مقایسه میانگین اثرات کلشی‌سین بر مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و درصد آنتی‌اکسیدان ریشه‌های موئین زرین گیاه (به ترتیب از چپ به راست). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن می‌باشد.

تأثیر کیتوسان بر میزان مواد مؤثره ریشه‌های موئین

طبق بررسی‌های انجام شده روی میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که در هر سه اندازه‌گیری، اختلاف معنی‌دار در سطح (P<0/01) بین تیمارها وجود داشت. همچنین مشاهده شد که بیشترین میزان هر سه ماده مؤثره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار این مواد مؤثره در ریشه های غیرتراریخت به‌دست آمده است. مکانیسم اثر محرک‌های زیستی در گیاهان به‌خوبی مشخص نشده اما به نظر می رسد که محرک‌های زیستی از قبیل کیتوسان به ترکیبات دیواره سلولی حمله می‌کنند و در پی پاسخ به پیام محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و بیان ژن دفاعی مانند PAL[1] سبب تولید فیتوآلکسین‌هایی ازقبیل فنل‌ها می‌شود (Zhao *et al.*, 2005). یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیقات Esmaeilzade و همکاران (2012) در *Linum album* مطابقت دارد.



مقایسه میانگین اثرات کیتوسان بر مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و درصد آنتی‌اکسیدان ریشه‌های موئین زرین گیاه (به ترتیب از چپ به راست). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن می‌باشد.

\Phenylalanine ammonia-lyase

میزان اسید رزمارینیک

مقدار اسید رزمارینیک در انواع ریشه‌های این آزمایش توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. کمترین مقدار اسید رزمارینیک مربوط به ریشه‌های غیرتراریخت و بیشترین مقدار آن در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با کلشی‌سین مربوط به غلظت ۰/۰۵ درصد و در ریشه‌های تیمار شده با کیتوسان مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود.در کل میزان اسید رزمارینیک در ریشه‌های تیمار شده با محرک‌ها خیلی بیشتر از ریشه‌های تیمار نشده بود. با توجه به تحقیقات Gandi و همکاران (2012) به نظر می‌رسد تجمع اسید رزمارینیک در ریشه‌های موئین در آزمایش انجام گرفته به دلیل برخی تغییرات بیوشیمیایی در متابولیسم گیاه - آگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد.

منابع

Angelov, Z., Georgiev., S. and Roos, W. 2006. Elicitation of plants. Biotechnology and Biotechnology; 20:2.

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

Dhawan, O.P. and Lavania, U.C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy. A Review. Euphytica, 87: 81-89.

Fattahi, M. 2012. Assessment of Morphological variety, Phytochemical variety and hairy root production on *Dracocephalum kotschyi* Boiss. PhD thesis. Tehran University; 220p. (in Persian)

Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R.M., Zamani, Z. and Palazon, J. 2013. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS. Food Chemistry; 141: 139-146.

Gandi, S. and Giri, A. 2012. Genetic transformation of *Centella asiatica* by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Pharmacognosy; 3(2): 82-84.

Gupta, P. K. 2002. Cytology Genetics and Evolution. Rastogi Publications. India; 864pp.

Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist; 122: 1-25.

Moghaddam, G., Ebrahimi, S.A., Rahbar-Roshandel, N. and Foroumadi, A. 2012. Antiproliferative activity of flavonoids: Influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. Phytotherapy Research; 26: 1023–1028.

Park, S.U. and Facchini, P.J. 2000. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L. and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. Journal of Experimental Botany; 347: 1005-1016.

Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. and Shoyama, Y. 2007. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnology Letters; 29:1143–1146.

Sevon, N. and Oksman-Caldentey, K.M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica; 68: 859–868.

Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., 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: 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.

Tambong, J. T., Sapra, V.T. and Garton, S. 1998. In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. Euphytica; 104: 191-197.

Vasconsuelo, A, and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science; 172: 861-875.

Wang, W., Yu, L. and Zhou, P. 2006. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthopyllomyces dendrohous*. Biology Resource Technology; 97: 26-31.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances; 23: 283-333.

Zhou, L., Cao, X., Zhang, R., Peng, Y., Zhao, S. and Wu, J. 2007. Stimulation of saponin production in *Panax ginseng* hairy roots by two oligosaccharides from *Paris polyphylla* var. yunnanensis. Biotechnology Letters. 29:631-634.

Effect of Colchicine and Chitosan Elicitors to Increasing Secondary Metabolites of *Dracocephalum kotschyi* Boiss

Bahman hosseini[1*], Fatemeh naseri[2], Nasrin ayubi[3], Mohammad fattahi[4]
[1*]Associate professor, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
[2]MSc student, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
[3]MSc graduated, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
[4]Assistant professor, horticulture science group, Agriculture College, Urmia University, Urmia
Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir

Abstract

***Dracocephalum kotschyi* Boiss due to antioxidants, flavonoids and phenolic compounds have some properties such as, antibacterial, anticancer and antitumor. Using different methods of hairy roots induction in *Dracocephalum kotschyi* Boiss can be used to produce medicinal compounds. Elicitor's usage is one of the most successful strategies to increase secondary metabolites production. In this study, the effect of both biological elicitor's, colchicine and chitosan in two independent experiments on production of antioxidant compounds, flavonoids, total phenols and rosmarinic acid were studied. In this experiment, one week old leaf explants of the *Dracocephalum kotschyi* plantlets was used to produce hairy roots. Immersion inoculation method was used to induce transformation using *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834. ¼ MS liquid medium for incubation and treatment of hairy root were used. Both experiments were done based on CRD and include 5 treatments (3 treatments with different concentrations of elicitors, 2 treatments of transgenic control and non - transgenic control). Results revealed that with increasing colchicine concentration till 0.05%, the amount of secondary metabolites in hairy roots were enhanced. Also, with increasing chitosan concentration at 100 mg/l of secondary metabolites contents and fresh weight of hairy roots were enhanced. In all experiments, the minimum amount of these metabolites was observed in non - transgenic hairy roots.**

Key words: **Agrobacterium, Antioxidant, Flavonoid, Hairy roots, Rosmarinic acid, Total phenol**