تأثیر نانوذرات نقره بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) در شرایط کشت درون شیشه ای

سمیه طایفه*[۱]، سید کمال کاظمی تبار[۲]، ناصر مهنا[۳]، ولی اله قاسمی عمران[۴]

[۱]مدرس گروه گیاهان زراعی، آموزشکده کشاورزی ساری، دانشگاه فنی و حرفه‌ای استان مازندران، ایران

[۲]دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

[۳]دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

[۴]استادیار، پژوهشکده ژنتیک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

*نویسنده مسئول: somaye.tayefeh@ut.ac.ir

چکیده

ترکیبات فنولی به ویژه آن‌هایی که منشاء گیاهی دارند به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، بخش اساسی رژیم غذایی انسان را تشکیل می دهند. زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) گیاهی علفی، چندساله، متعلق به تیره نعناعیان است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر چهار غلظت نانوذره نقره (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) بر ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین این گیاه انجام گرفت. برای تلقیح از سویه ATCC15834 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد. نتایج نشان داد که اثر محرک نانوذره نقره بر صفات مورد آزمایش (فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی) در گیاه زوفا در سطح یک درصد معنی‌دار است. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زوفای باریک برگ (۹۰/۸۱ درصد) به دست آمد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره حاصل شد. در این مطالعه مشاهده شد که ارتباط مناسبی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاه وجود دارد. به طور کلی نانوذره نقره در تسریع رشد ریشه مویین و افزایش ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی گیاه زوفا نقش بسزایی داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ریشه مویین، زوفا، نانو ذره نقره

مقدمه

زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) گیاهی علفی و چندساله، متعلق به تیره نعناعیان و بومی ایران می‌باشد (این گونه در برخی منابع به عنوان زیر گونه *H. officinalis* بیان شده است) (Dzhumaev, 1986). ترکیبات گوناگونی به عنوان ترکیبات اصلی زوفا توسط محققین مختلف شناسایی شده است: میتلیوگنول، ۱و ۸- سینئول، پینوکامفون، ایزوپینوکامفون، پینوکارووول، ایزوپینوکارووول، بتا-پینن، لیمونن، پینو-کامفون، بتاپینن، ، سیس- پینوکامفن، پینوکامفن، ایزوپینوکامفون و بتا- پینن شناسایی شده است (Gorunovic *et al*, 1995؛ Vallejo *et al*., 1995؛ Kizil *et al*, 2010؛ Said-Al *et al*, 2015؛ Shun *et al*, 2003). از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ترکیبات فنولی (شامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و فلاونوئیدها) در این گیاه وجود دارند که ویژگی‌های ضدجهشی، ضدسرطانی و هم‌چنین کاهش قند خون را دارند. ریشه‌های مویین مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی و حتی سایر اندام‌های گیاهی را تقلید می‌نمایند. چنین ریشه‌هایی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه به خصوص متابولیت‌هایی با خاصیت دارویی، به دلیل پایداری و بالا بودن میزان تولید آن‌ها در محیط‌های کشت مورد توجه است. این ریشه‌ها توسط باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز با انتقال T-DNA از پلاسمید Ti به کروموزوم سلول گیاه، ایجاد می‌شود. حاصل این انتقال تولید ریشه مویین از سلول تراریخت می‌باشد. ریشه‌های مویین به سرعت رشد می‌کنند و در محیط بدون هورمون های گیاهی به خوبی تکثیر شده، تولید انشعابات فرعی می‌نمایند (Brijwal and Tamta, 2015).

واژه محرک در گیاهان به عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و در نهایت تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود (Angelova *et al*, 2006). امروزه، از نانوذرات به عنوان محرک‌های غیرزیستی استفاده

می‌گردد. ترکیبات نقره در جنگ جهانی اول به طور گسترده‌ای به عنوان ضدعفونی‌کننده به کار رفته‌اند و امروزه نیز این ترکیبات استفاده زیاد دارند (Mahna *et al*, 2013).

بر اساس گزارش Yousefzaie و همکاران (۲۰۱۵) روی گیاه ریحان، مشخص گردید که نانوذرات نقره و مس میزان قند و پرولین را در این گیاه افزایش داد و هم‌چنین موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و کاتالاز گردید. احتمال می رود نانوذرات روی افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نیز نقش بسزایی داشته باشد (Yousefzaie *et al*, 2015). هدف از تحقیق حاضر، مطالعه اثر محرک نانوذره نقره بر میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه مویین این گیاه، در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی

بذر زوفای باریک برگ ایران از طبیعت (بخش دو دانگه از توابع ساری، ۸۰ کیلومتری جنوب ساری، کد هرباریومی: ۱۲۵) جمع‌آوری شد، به منظور تهیه گیاهچه استریل، بذور زوفای باریک برگ در محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962)با غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، جیبرلین اسید کشت شدند. ظروف کشت (شیشه‌های مربای ده سانتی‌متری) در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و گیاهچه‌های به دست آمده برای تهیه ریزنمونه برگ به منظور تلقیح با آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی و تلقیح ریز نمونه‌ها

جهت تلقیح ریز نمونه‌ها با باکتری، از برگ‌ها و ساقه‌های جوان گیاهچه‌های چهار هفته‌ای گونه زوفا استفاده شد. ریزنمونه‌ها با استفاده از اسکالپل به قطعات دو سانتی‌متری تقسیم شدند. کشت‌های باکتریایی آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC15834 (از پژوهشکده ژنتیک طبرستان) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر دوار با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۴ تا ۱۸ ساعت نگهداری شد. پس از اینکه تراکم نوری محیط کشت باکتریایی به ۰/۴ تا ۰/۸ رسید، محیط کشت باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت، سپس رسوب سلول‌های باکتری در محیط کشت مایع MS که حاوی ۳ درصد ساکارز است، حل گردید و از سوسپانسیون باکتری حاصل برای تلقیح ریز نمونه‌ها استفاده شد.

القای ریشه مویین

کشت باکتریایی آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC15834 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت 5000 rpm رسوب داده شد و پلیت باکتری در محیط کشت MS حاوی استوسرینگون به آرامی حل شد. ریز نمونه‌ها در سوسپانسیون تلقیح به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی استریل، بر روی محیط کشت مناسب با pH=۵/۷ کشت شدند. پلیت های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۴۸ ساعت پس از انجام تلقیح، به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (ppm) منتقل شد. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری تکرار گردید. بعد از یک هفته ریشه مویین ظاهر شد، در مرحله بعد ریشه‌هایی با طول ۳-۲ سانتی‌متر به طور جداگانه از ریزنمونه‌ها جدا شدند و جهت کشت در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۷۰ سی‌سی محیط کشت MS 2/1 دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (ppm) سفوتاکسیم قرار گرفتند. این ارلن‌ها در تاریکی و روی شیکر با سرعت 90 rpm قرار داده شدند و پس از یک ماه یک کلون پر رشد انتخاب شد و در غلظت‌های (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) نانوذره نقره با سه تکرار واکشت گردید. پس از گذشت یک هفته ریشه‌های مویین رشد یافته با همدیگر مقایسه شدند درصد آنتی‌اکسیدان و فنل کل ریشه‌های مویین تیمار شده با نانوذرات نقره، ریشه معمولی و شاخساره گونه زوفا مورد ارزیابی قرار گرفت.

تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های مویین

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد منفی) به روش دویل و دویل انجام پذیرفت (Doyle, 1987). به منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش‌های متداول استفاده شد (Sambrook and Russell, 2001) سپس، DNA به دست آمده، به همراه دو جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر قطعه‌ای از ژن rol C (430bp) و دو پرایمر برای تکثیر قطعه‌ای از ژن vir D (438 bp) وارد واکنش PCR شد. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ ٪ به مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه الکتروفورز شدند. ژل پس از رنگ‌آمیزی در حمام اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro مشاهده شد.

روش عصاره‌گیری اولتراسونیک

به منظور عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی خشک شده (شاخساره گیاه، ریشه معمولی، ریشه مویین بدون تیمار و ریشه‌های مویین با تیمار نانوذره نقره) در هاون چینی کاملاً پودر شده سپس ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه پودر شده توزین و داخل لوله آزمایش ریخته شد و به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. لوله‌ها در حمام اولتراسونیک (فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز) به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شده و مایع صاف شده به منظور جداسازی حلال با روتاری تبخیر شد و عصاره خشک حاصل دوباره در متانول گرید HPLC حل شد و برای اندازه‌گیری فنول و آنتی‌اکسیدان استفاده شد.

تعیین ترکیبات فنولی

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی با روش (Waterhouse, 1999) انجام شد، بدین صورت که به ۴۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۳/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر، ۳۰۰ میکرولیتر از واکنش‌گر فولین فنول (۱ نرمال) و ۶۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات اضافه شد و بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80, PG Instruments, UK) در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد.

جهت رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. بدین منظور ابتدا محلول پایه‌ای از گالیک اسید آماده و غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) تهیه و منحنی استاندارد بر مبنای جذب در برابر غلظت رسم گردید. میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل گالیک اسید و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH

توانایی هیدروژن‌دهندگی عصاره‌ها، به واسطه بی‌رنگ نمودن محلول متانولی ارغوانی رنگ DPPH طبق روش گزارش شده توسط (Burits and Bucar, 2000) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۵۰ میکرولیتر از عصاره به ۵ میلی لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH افزوده شده و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH بر اساس درصد به صورت زیر محاسبه می گردد:

$$I\%=(Ablank-Asample/Ablank)^{x}100$$

محاسبات آماری داده‌ها

بررسی القای ریشه مویین به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند.

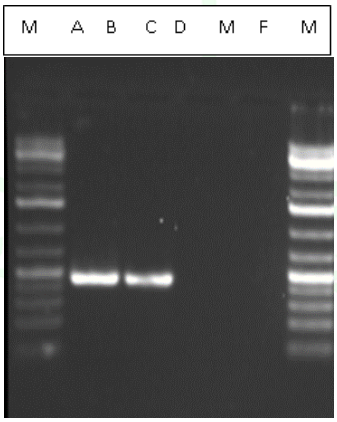
نتایج

امروزه بهره‌گیری از کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشه مویین توسط سویه‌های مختلف (*A. rhizogenes*) متفاوت می‌باشد. در این آزمایش، حدود یک هفته پس از انتقال ریشه‌ها به محیط مایع MS 2/1 و غلظت‌های مختلف نانوذره نقره، در شرایط تاریکی و شیکر، صفات مورد آزمایش اندازه‌گیری شدند.

ریشه‌های مویین به دست آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن rol C مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR با DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین تراریخت شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۴۳۰ جفت باز شد، ولی این ژن در DNA به دست آمده از ریشه غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد. هم‌چنین، محصولات PCR حاوی DNA استخراج شده از پلاسمید سویه باکتری با اندازه یکسان ایجاد شد که حضور T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین را تأیید می‌کند. PCR توالی ژنی vir D سبب تکثیر قطعات در DNA ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های غیرتراریخت نگردید که نشان‌دهنده عدم حضور بقایای ژن‌های باکتری در روی ریشه‌های مویین تراریخت می‌باشد (شکل ۱).

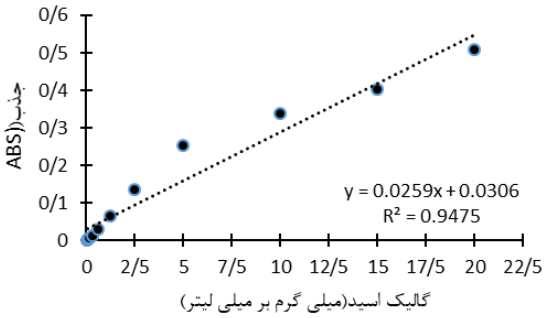
در این آزمایش اثر نانوذرات نقره بر رشد ریشه مویین در چهار سطح (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم) مورد بررسی قرار گرفت و در پایان میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین تحت تیمار نانوذره، ریشه‌های غیر تراریخت و قسمت‌های هوایی گیاه (شاخساره) اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل گالیک اسید و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره بیان شد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نیز به روش DPPH محاسبه گردید (شکل ۲).

در این آزمایش میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه غیرتراریخت و شاخساره گیاه علاوه بر ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در ۰/۱ میلی‌گرم نانوذره نقره و به میزان ۹۰/۸۱ درصد مشاهده شد، میزان این ترکیبات با افزایش غلظت نانوذره کاهش یافت. نکته قابل‌توجه این است که در این گیاه زوفای، میزان فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در شاخساره گیاه بیشتر از ریشه مویین شاهد است که احتمالاً به علت گونه و ژنوتیپ زوفا می‌باشد. میزان ترکیبات فتلی نیز در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم نانونقره بیشترین مقدار و به میزان ۰/۰۳۱۸۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گالیک اسید بود و کمترین مقدار نیز در ریشه غیرتراریخت مشاهده شد (جدول ۱).



شکل۱- تحلیل PCR با پرایمر اختصاصی ژن rol C.

M: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp DNA Marker
A: ریشه ی تراریخت زوفای باریک برگ
B: پلاسمید سویه ی باکتری ATCC5834 (کنترل مثبت)
C: ریشه غیر تراریخت
D: ویر دی (کنترل منفی)



شکل۲- منحنی استاندارد گالیک اسید.

جدول (۱): مقایسه میانگین برهم‌کنش ریزنمونه و تیمار نانونقره از نظر صفات ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی.

ریز نمونه	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	ترکیبات فنلی
شاخساره گیاه	۸۶/۹۸^{b}	۰/۰۳۰۸۴^{c}
ریشه غیر تراریخت	۳۳/۳۳۷ ^{e}	۰/۰۳۰۷۷^{e}
ریشه تراریخت (شاهد)	۷۹/۱۴۰^{d}	۰/۰۳۰۸۱^{d}
۰/۱ میلی‌گرم	۹۰/۸۱۳ ^{a}	۰/۰۳۱۸۵ ^{a}
۰/۲ میلی‌گرم	۸۰/۵۲۷ ^{c}	۰/۰۳۰۹۳^{b}
۰/۳ میلی‌گرم	۸۰/۲۵۷^{c}	۰/۰۳۰۷۳ ^{f}

میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

بحث

در بررسی‌های انجام شده توسط Kabirnataj و همکاران (۲۰۱۳) در بین کلون‌های ریشه‌های مویین کاسنی حاصل از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، مقدار ترکیب‌های فنلی تغییرات معنی‌داری نشان دادند. دلیل این تفاوت را می‌توان به علت حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخت اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف دانست. از مهم‌ترین دلایل اهمیت ترکیب‌های فنلی، عملکرد آن‌ها در مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد. تنش‌هایی مانند جراحت و آلودگی میکروبی سبب افزایش بیوسنتز ترکیب‌های فنلی می‌شود، بنابراین فاکتورهای محیطی تأثیر به سزایی در محتوای فنل‌ها دارند.

جدول مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریبا متناسب با پلی‌فنل‌های موجود در نمونه‌های مورد بررسی بوده است. نتایج این بررسی همانند سایر مطالعات نشان داده است که گیاهانی که ترکیبات فنلی بالاتری دارند، فعالیت ضدرادیکال‌های آزاد بالاتری را نیز نشان می‌دهند (Arumugam *et al*, 2010). نقش کلیدی ترکیب‌های فنلی به عنوان حذف‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد در چندین مقاله گزارش شده است (Katalinic *et al*, 2006).

طی تحقیقی که Yousofzaye و همکاران (۲۰۱۳) روی سنتز نانوذرات و تأثیر نانوذرات فلزی روی فاکتورهای رویشی گیاه ریحان انجام دادند، مشخص گردید که نانوذرات نقره و مس میزان قند و پرولین را در گیاه افزایش داده و همچنین موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و کاتالاز می‌گردند و احتمال می‌رود که نانوذرات روی افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نقش بسزایی داشته باشد.

مطالعه حاضر روی ریشه مویین زوفا، تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره رشد ریشه تضعیف می‌شود و میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی کاهش نشان می‌دهد؛ که این نتیجه با نتایج حاصل از تحقیقات انجام گرفته بر روی علایم ظاهری در گیاه ریحان هم‌سویی نشان می‌دهد. مطالعات نشان داده است که تاثیر نانوذرات بر روی گیاهان می‌تواند مفید (برای رشد گیاهان و توسعه آن‌ها) و یا غیرمفید (جلوگیری از رشد ریشه) باشد (Zhu et al, 2008). یین و همکاران (۲۰۱۱) کاهش طول و وزن خشک ریشه با افزایش غلظت نانوذرات نقره را در گیاه *Lolium multiflorum* مشاهده نمودند. تجمع نانوذرات نقره در سلول‌های گیاهی موجب کاهش عملکرد آن‌ها می‌شود (Haverkamp and Marshall, 2009). یین و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که سلول‌های کلاهک ریشه گیاه *L. Multiflorum* تحت تیمار نانوذرات نقره آسیب دیده و بر این باورند که سلول‌ها، غیرطبیعی شده و موجب کاهش رشد ریشه می شود. مهار رشد ریشه تا حد زیادی میان نانوذرات و بین گیاهان متفاوت است و با غلظت نانوذرات در ارتباط است.

به طور کلی نانو ذره نقره در این آزمایش، اثر مطلوبی بر میزان تولید مواد فنلی و آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های مورد آزمایش داشته است.

منابع

Angelova, Z., Georgiev, S. and Roos, W. 2006. Elicitation of plants. Biotechnol Biotechnol Equip, 20: 72-83.

Arumugam, P., Ramamurthy, P. and Ramesh, A. 2010. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Lipophilic and Hydrophilic Fractions of (*Mentha Spicata* L.) (Lamiaceae). Inter. J. Food Properties, 13(1): 23 – 31.

Brijwal, L. and Tamta, S. 2015. Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in endangered (*Berberis aristata*) DC. Springer Plus, 4: 443-453.

Burits, M. and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of (Nigella sativa) essential oil. Phytother Res, 14: 323-328.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull, 19: 11-15.

Dzhumaev, Kh.K. 1986. Dynamics of essential oil accumulation in (Hyssopus seravschanicus). Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal, 6: 31–33.

Gorunovic, M., Bogavac, P., Chalchat, J. and Chabardi, J. 1995. Essential oil of (*Hyssopus officinalis* L.) Lamiaceae of montenegro original. Journal. Essential. Oil Research,7: 39-43.

Haverkamp, R. and Marshall, A. 2009. The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. Journal of Nanoparticle Research, 11(6): 1453-1463.

Kabirnataj, S., Zolala, J., Nematzadeh, GA. and Shokri, E. 2013. Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (Cichorium intybus) through inoculation by Agrobacterium rhizogenes. Crop Biotechnol, 4: 61-75.

Katalinic, V., MIlos, M., Kulisic, T. and Jukic, M. 2006. Sceerning of 70 medical plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem, 94: 550-577.

Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilin, E. and Karatas, H. 2010. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(3): 99- 103.

Mahna, N., Vahed, SZ. and Khani, S. 2013. Plant in vitro Culture goes Nano: Nanosilver-Mediated Decontamination of ex vitro Explants. J Nanomed Nanotechol, 4: 161.

Matkowski, A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants "a review ". Biotechnol Adv, 26(6): 548-560.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.

Said-Al, Ahl, H., Abbas, Z., Sabra, A. and Tkachenko, K. 2015. Essential oil composition of (Hyssopus officinalis) cultivated in Egypt. International Journal of Plant Research, 1(2): 49-53.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2344 pp).

Shun, Y.M., Wen, Y.H., Yong, C. and Jian, G.S. 2003. Two benzyl dihydroflavones from phellinus igniarius. Chin. J. Chem, 14(8): 810-13.

Vallejo, M., Herraiz, J., Perez-Alonso, M. and Velasco-Negueruela, A. 1995. Volatile oil of (*Hyssopus officinalis* L) from Spain. Journal. Essential Oil Research, 7: 567-568.

Waterhouse, A. 1999. Folin-Ciocalteau micro method for total phenol in wine. no date, http://waterhouse. ucdavis. edu/phenol/folinmicro. htm (Accessed: May, 2005).

Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B P., Auffan, M. and Wiesner, M. 2011. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on (Lolium multiflorum). Environmental science and technology, 45(6): 2360-236.

Yousefzaie, F., Pour, Akbar, L. and Farhadi, K. 2015. The Effect of Silver Nanoparticles on Some Morphological and Physiological Indices of Basil (*Ocimum basilicum* L.). Iran Plant Physiol Biochem, 19(1): 208-9.

Zhu, H., Han, J., Xiao, J Q. and Jin, Y. 2008. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. Journal of Environmental Monitoring, 10(6): 713-717.

The effect of silver nanoparticles on hairy roots phenolic and antioxidant Content in Hyssop (Hyssopus angustifolius) in In Vitro condition

Somaye Tayefeh [*1], SKamal Kazemitabar[2], Naser Mahna[3] and Vali ollah Ghasemi-Omran[4]
[1]Lecturer, Department of Crops, Sari Agricultural College, Mazandaran Technical and Vocational University, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Agriculture, Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
[3]Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Iran
[4]Assistant Professor, Genetics Research Center, Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
[*]*Corresponding Author: somaye.tayefeh@ut.ac.ir*

Abstract

Phenolic compounds, produceds, constitute an essential part of the human diet due to their antioxidant properties. Hyssopus angustifolius is herbaceous and perennial plants, belonging to the Lamiaceae family. The present study was conducted to investigate the effect of silver nanoparticles (0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l) on hairy roots phenolic and antioxidant content in H. angustifolius. So, in this treatment Agrobacterium rhizogenes ATCC15834 strain were used for genetic transformation. The result showed that silver nanoparticles as elicitor have significant effects on the measured traits (phenolic and antioxidant Content). The amount of activity of total antioxidants in H. angustifolius was 90.81%, which at a concentration of 0.1 mg/l of silver nanoparticles. In this study, it was found that there is a relationship between antioxidant activity and plant phenolic Content. In general, we concluded that silver nanoparticles played a significant role in accelerating hairy root growth and increasing phenolics and antioxidants content.

***Keywords*:** Agrobacterium rhizogenes, Antioxidant content, Hyssopus, Silver nanoparticles