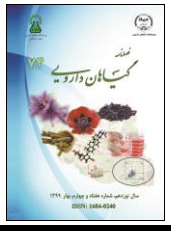
پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir



مقاله تحقیقاتی

تأثیر نانوذرات نقره بر رشد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ریشه مویین تراریخت در دو گونه زوفا (*Hyssopus officinalis* و *H. angustifolius*)

سمیه طایفه[۱]، ناصر مهنا[۱،*]، سیدکمال کاظمی‌تبار[۲]، ولی‌اله قاسمی عمران[۳]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲] گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
[۳] گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ساری، مازندران، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
آنتی‌اکسیدان
ریشه مویین
زوفا
نانو ذرات نقره

چکیده

مقدمه: امروزه روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت ریشه مویین و استفاده از محرک‌ها، پتانسیل قابل توجهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. زوفا، گیاهی با مواد مؤثره دارویی وآنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ترکیبات فنلی است که ویژگی‌های ضدجهشی، ضدسرطانی و همچنین کاهش قند خون را دارد. **هدف:** مطالعه اثر محرک نانوذرات نقره بر رشد و میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین تراریخت در دو گونه زوفای باریک برگ و دارویی، در شرایط کشت بافت می‌باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه از چهار غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره و همچنین از سویه‌ی ATCC15834 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* برای اlقای ریشه مویین تراریخت استفاده شد. عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش اولتراسونیک انجام گرفت. سپس سنجش میزان فنل کل به روش اسپکتروفتومتری و در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲' – دی فنیل ۱– پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. **نتایج:** اثر تحریکی نانوذرات نقره بر صفات مورد آزمایش در دو گونه زوفا در سطح یک درصد معنی‌دار است. بیشترین میزان وزن خشک و وزن تر ریشه مویین به ترتیب با مقدار ۳/۸ و ۱۶ گرم بر لیتر در گونه باریک برگ (*H. angustifolius*) و ۳/۲ و ۱۴ گرم بر لیتر در گونه دارویی (*Hyssopus officinalis*) مشاهده شد، که همگی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره حاصل شدند. بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان در زوفای باریک برگ و زوفای دارویی به ترتیب ۹۰/۸۱ و ۸۹/۸۴ درصد به دست آمد. **نتیجه‌گیری:** به طور کلی نانوذرات نقره در این آزمایش اثر مطلوبی بر رشد ریشه مویین گیاه زوفا داشت و همچنین، در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم، میزان تولید مواد فنلی و آنتی‌اکسیدان را افزایش داد.

۱. مقدمه

زوفا (*Hyssopus officinalis*) گیاهی علفی و چند ساله، متعلق به تیره نعناعیان با منشأ آسیا می‌باشد. گونه‌ی دیگر زوفا (*H. angustifolius*) (که این گونه در برخی منابع به عنوان زیر گونه *H. officinalis* بیان شده است) بومی ایران می‌باشد [۲، ۱].

مخففها: OD، جذب نوری؛ TPC، تعیین ترکیبات فنلی؛ DPPH، دی فنیل ۱– پیکریل هیدرازیل؛ Rpm، دور در دقیقه؛ PPM، میلی‌گرم بر لیتر؛ Bp، جفت باز؛ PCR، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* نویسنده مسؤول: mahna@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۱ اسفند ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۷ اسفند ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.129

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

ترکیبات گوناگونی به عنوان ترکیبات اصلی زوفا توسط محققین مختلف شناسایی شده است: میتلیوگنول (۳۸ درصد) [۴، ۳] ۱ و ۸ - سینئول (۵۳ درصد) [۵]، پینوکامفون (۴۹/۱ درصد) [۶]، ایزوپینوکامفون [۷]، پینوکارووِل (۳۶/۳ درصد) [۸]، ایزوپینوکارووِل (۵۷/۲۷ درصد) [۹]، بتا - پینن، لیمونن، پینو - کامفون، بتاپینن [۱۰]، سیس- پینوکامفن (۲۶/۸۵ درصد) [۱۱]، پینوکامفن، ایزوپینوکامفون و بتا- پینن [۱۲] شناسایی شده است. از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ترکیبات فنلی (ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و فلاونوئیدها) در این گیاه وجود دارند که ویژگی‌های ضدجهشی، ضدسرطانی و همچنین کاهش قند خون را دارند [۱۳، ۸]. اسانس زوفا به عنوان طعم‌دهنده در بسیاری از محصولات غذایی و لوازم آرایشی به کار می‌رود [۱۴]. اسانس این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی و تانن تشکیل شده است که به عنوان مقوی و ضدعفونی‌کننده در کاهش اختلالات گوارشی، درمان التهاب حنجره و سرعت بخشیدن به بهبود زخم در طب سنتی استفاده می‌شود. همچنین به عنوان خلط‌آور، ضدنفخ، ضدالتهاب و ضداسپاسم [۱۰] در رفع عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی و همچنین برای سرماخوردگی، سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده می‌شود و نیز مسکن دندان درد در بسیاری از نقاط جهان می‌باشد [۱۴].

ریشه‌های مویین مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی و حتی سایر اندام‌های گیاهی را تقلید می‌نمایند. چنین ریشه‌هایی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بخصوص متابولیت‌ها با خاصیت دارویی به دلیل پایداری و بالا بودن میزان تولید آنها در محیط‌های کشت مورد توجه هستند. 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، در محیط بدون هورمون‌های گیاهی به خوبی تکثیر شده و تولید انشعابات فرعی می‌نمایند [۱۵].

واژه محرک در گیاهان به عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و درنهایت تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود. واضح است که تیمار گیاهان با محرک و یا یک پاتوژن غیررقیب موجب بروز پاسخ‌های دفاعی مانند تجمع متابولیت‌های ثانویه، در گیاهان و یا کشت‌های سلولی می‌شود. محرک‌ها بر اساس طبیعتشان به محرک‌های زیستی و محرک‌های غیرزیستی و بر اساس منشأشان به محرک‌های بیرونی و محرک‌های درونی طبقه‌بندی می‌شوند [۱۶]. محرک‌ها ممکن است با تغییر و تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و یا تبادل مواد ذخیره شده در واکوئل‌ها، تبدیل و یا تجزیه متابولیت‌های ثانویه، آنها را تحت تأثیر یک یا تعداد بیشتری از این ساز و کارها تغییر دهند [۱۷]. امروزه، از نانوذرات به عنوان محرک‌های غیرزیستی استفاده می‌شود. نانوذرات که هزار برابر کوچکتر از یک سلول هستند، کاربردهای بسیاری در علوم مختلف دارند. ترکیبات نقره در جنگ جهانی اول به طور گسترده‌ای به عنوان ضدعفونی کننده به کار رفته‌اند و امروزه نیز این ترکیبات استفاده زیاد دارند [۱۸].

طی تحقیقی که روی سنتز نانوذرات و تأثیر نانوذرات فلزی روی فاکتورهای رویشی گیاه ریحان انجام گرفت، مشخص شد که نانوذرات نقره و مس میزان قند و پرولین را در گیاه افزایش داده و همچنین موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و کاتالاز شدند. احتمال می‌رود نانوذرات روی افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نیز نقش بسزایی داشته باشد [۱۹]. مطالعه تأثیر نانوذرات نقره بر برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه بومادران نشان داد که که در گیاه بومادران هزار برگ تحت تأثیر نانو ذرات نقره با حفظ تمامیت غشا، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش

یافته و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز تحت تأثیر قرار گرفته است. نانوذرات نقره با ایجاد تغییر در ترکیبات اسانس روغنی و عصاره گیاه، خواص آنتی‌باکتریایی اسانس گیاه را دو چندان افزایش داده و عصاره آن نیز موجب افزایش سمیت سلولی و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شده است [۲۰].

با توجه به این که اثر محرک‌ها بر میزان تولید برخی مواد آنتی‌اکسیدانی و فنلی برخی گیاهان از جمله خشخاش [۲۱]، فندق [۲۲]، بذرالبنج [۲۳]، بادرنجبویه [۲۴] و نعناع فلفلی [۲۵] بررسی شده و نتایج مطلوبی به دست آمده است، ولی تاکنون این چنین تحقیقاتی بر روی گیاه زوفا انجام نشده است، لذا هدف از تحقیق حاضر، مطالعه اثر محرک نانوذرات نقره بر رشد ریشه مویین و میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی در دو گونه گیاه دارویی زوفا در شرایط کشت بافت می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. *مواد گیاهی*

در این تحقیق در فصل برداشت (اواخر تابستان)، بذر زوفای باریک برگ ایران از طبیعت (بخش دو دانگه از توابع ساری، ۸۰ کیلومتری جنوب ساری، کد هرباریومی: ۱۲۵) جمع‌آوری شد و بوسیله آقای محمد اکبرزاده، از اعضای هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران شناسایی شد، همچنین بذر زوفای دارویی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تهیه گیاهچه استریل، بذور زوفای باریک برگ و دارویی در محیط کشت جامد MS [۲۶] بدون هورمون 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 تهیه‌ی ریزنمونه برگ به منظور تلقیح با آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفتند.

۲.۲. *آماده‌سازی و تلقیح ریزنمونه‌ها*

جهت تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از برگ‌ها و ساقه‌های جوان گیاهچه‌های چهار هفته‌ای دو گونه زوفا استفاده شد. ریزنمونه‌ها با استفاده از اسکالپل به قطعات دو سانتی‌متری تقسیم شدند. کشت‌های باکتریایی آگروباکتریوم رایزوژنز سویه‌ی ATCC15834 (از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر، با چرخش و 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 بود، حل شد و از سوسپانسیون باکتری حاصل برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد [۲۷].

۲.۳. *القای ریشه مویین*

کشت باکتریایی آگروباکتریوم رایزوژنز سویه‌ی ATCC15834 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۵۰۰۰ rpm رسوب داده شد و پلیت باکتری در محیط کشت MS حاوی استوسرینگون به آرامی حل شد. ریزنمونه‌ها 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. پلیت‌های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. 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 شد. 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 ml ۲۵۰ حاوی ۷۰ سی‌سی محیط کشت ms ۱/۲ دارای ppm ۵۰ سفوتاکسیم قرار گرفتند. این ارلن‌ها در تاریکی و روی شیکر با سرعت (rpm ۹۰) 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) نانوذرات نقریباً با اندازه ۲۰ نانومتر که در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان تهیه شد، (این غلظت‌ها پس از چند بار آزمون و خطا انتخاب شدند) با سه تکرار واکشت شدند [۲۷]. پس از گذشت یک هفته ریشه‌های مویین رشد یافته با همدیگر مقایسه شدند و وزن خشک و وزن تر ریشه‌ها اندازه‌گیری شد و همچنین درصد آنتی‌اکسیدان و فنل کل ریشه‌های مویین تیمار شده با نانوذرات نقره ریشه دارویی و شاخساره دو گونه زوفا مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴.۲. *تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های مویین*

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه‌های غیرتراریخت (شاهد منفی) به روش دویل و دویل انجام پذیرفت [۲۸]. به منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش‌های متداول استفاده شد [۲۹]. سپس، DNA به دست آمده، به همراه دو جفت آغازگر اختصاصی با توالی‌های 5-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3 و 5-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3 برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol C* (۴۳۰ bp) (استفاده از رول سی به علت اثبات ورود باکتری به داخل سلول‌های گیاهی می‌باشد) و توالی‌های 5-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCGA-3 و 5-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3 برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *vir D* (۴۳۸ bp) وارد واکنش PCR شد (استفاده از ویردی برای اثبات حذف باکتری از گیاه می‌باشد). سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد به مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه (با اندازه‌ی ۵۰ باز تولید شرکت Fermentas) الکتروفورز شدند. ژل پس از رنگ‌آمیزی در حمام اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro (شرکت biorad) مشاهده شد.

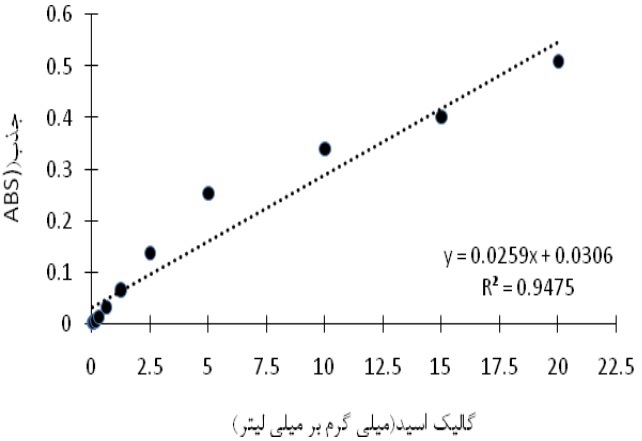
۵.۲. *روش عصاره‌گیری اولتراسونیک*

به منظور عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی خشک شده (شاخساره گیاه، ریشه غیرتراریخت، ریشه مویین شاهد و ریشه‌های مویین با تیمار نانو ذرات 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 کیلو هرتز) 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 HPLC گرید حل شد و از آنها برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی استفاده شد [۳۰].

۶.۲. *تعیین ترکیبات فنلی (TPC)*

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی با روش فولین فنول، انجام شد، بدین‌صورت که ۴۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۳/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطرو ۳۰۰ میکرولیتر از واکنش‌گر فولین فنول (۱ نرمال) و ۶۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات اضافه شد و بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط 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 میلی‌لیتر) تهیه و منحنی استاندارد بر مبنای جذب در برابر غلظت رسم شد. میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد (شکل ۱) [۳۱].



شکل ۱. منحنی استاندارد گالیک اسید. میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌گرم عصاره بیان شد.

۲.۷. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH

توانایی هیدروژن دهندگی عصاره‌ها، بواسطه بی‌رنگ نمودن محلول متانولی ارغوانی رنگ DPPH طبق روش گزارش شده (۱۷)، اندازه‌گیری شد. بدین‌صورت که ۵۰ میکرولیتر از عصاره به ۵ میلی‌لیتر 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 شد [۳۲]:

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample}/A_{blank}) \times 100$$

۲.۸. محاسبات آماری داده‌ها

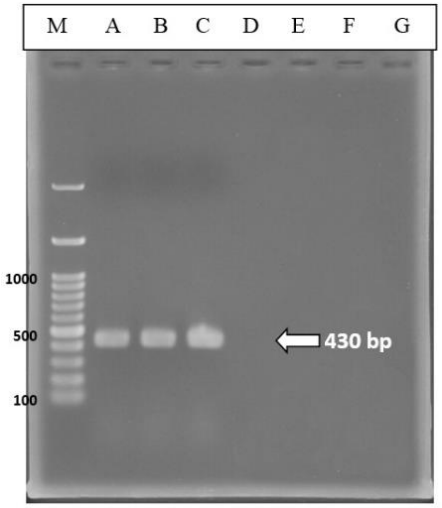
بررسی القای ریشه‌ی مویین به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تأثیر نانوذرات نقره با چهار غلظت (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) بر دو گونه زوفا و دو نوع ریزنمونه در محیط MS ۱/۲ مایع با اندازه‌گیری وزن خشک و وزن تر و ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان کل ریشه‌های مویین انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند.

۳. نتایج

امروزه بهره‌گیری از کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشه‌ی مویین توسط سویه‌های مختلف (*A. rhizogenes*) متفاوت می‌باشد. در این آزمایش حدود یک هفته پس از انتقال ریشه‌ها به محیط مایع MS ۱/۲ و غلظت‌های مختلف نانوذرات 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* 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 ریشه‌ی غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد. همچنین، محصولات PCR حاوی DNA استخراج شده از پلاسمید سویه‌ی باکتری با اندازه یکسان ایجاد شد که حضور T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین را تأیید می‌کند. پی سی آر توالی ژنی *vir D* سبب تکثیر قطعات در DNA ریشه‌های مویین تراریخت و ریشه‌های غیرتراریخت نشد، که نشان‌دهنده عدم حضور بقایای ژن‌های

باکتری در روی ریشه‌های مویین تراریخت می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲. تحلیل PCR تراریخت بودن ریشه‌های مویین با پرایمرهای اختصاصی ژن *rol C* و ژن *vir D*

M) نشانگر اندازه‌ی دی ان ای 100 bp DNA Marker، A و B) ریشه‌های تراریخت به ترتیب گونه زوفای دارویی (*Hyssopus officinalis*) و زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) می‌باشد، C) پلاسمید سویه‌ی باکتری ATCC5834 (کنترل مثبت)، E و D) ریشه غیر تراریخت به ترتیب گونه زوفای دارویی (*Hyssopus officinalis*) و زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) است، G و F) ویر دی (کنترل منفی) می‌باشد.

تجزیه واریانس وزن تر و خشک در دو گونه زوفا تحت تأثیر تیمار نانوذره و همچنین واریانس اثر نانوذرات نقره، ریزنمونه و گونه گیاهی زوفا بر خصوصیات فیتوشیمیایی در جداول ۱ و ۲ بیان شده است (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس وزن تر و خشک در دو گونه زوفا تحت تأثیر تیمار نانوذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن تر	وزن خشک
گونه	۱	۰/۰۲ ns	۰/۴۶ **
نانوذرات نقره	۳	۷۳/۷۹ **	۱۳/۳۷ **
نانوذرات نقره × گونه	۳	۳/۶۲ **	۰/۲۴ **
خطا	۱۶	۰/۵۰	۰/۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۷/۱۶	۱۰/۴۲

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

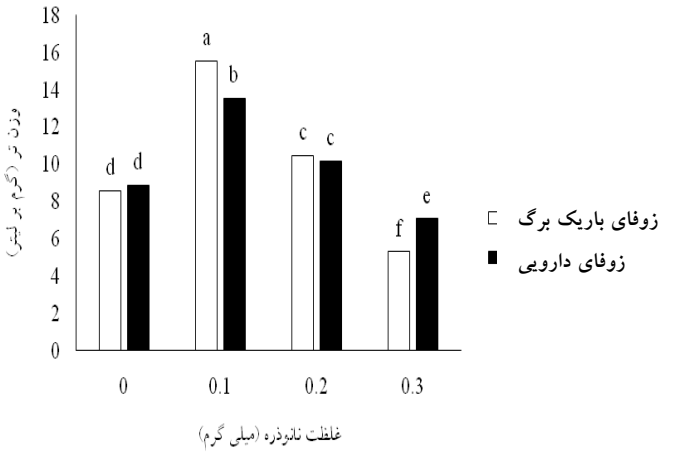
جدول ۲. واریانس اثر نانوذرات نقره، ریزنمونه و گونه گیاهی زوفا بر خصوصیات فیتوشیمیایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	ترکیبات فنلی
		میانگین مربعات	
گونه	۱	۸۱۹۴/۱۷ **	3.01E-09**
ریزنمونه	۲	۲۹۳۰/۹۱**	4.63E-07**
نانونقره	۳	۱۶/۲۲**	5.95E-08**
گونه × ریزنمونه	۲	۵۶۳۳/۷۱**	1.43E-07**
گونه × نانونقره	۳	۱۲۲۰/۴۵**	3.82E-08**
ریزنمونه × نانونقره	۶	۱۲۳۸/۰۶**	9.21E-08**
گونه × ریزنمونه × نانونقره	۶	۶۱۲/۸۷**	3.82E-08**
خطا	۲۴	۰/۰۳۵	3.01E-09
ضریب تغییرات (درصد)		۰/۲۸	3.01E-09

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

۱.۳. وزن تر

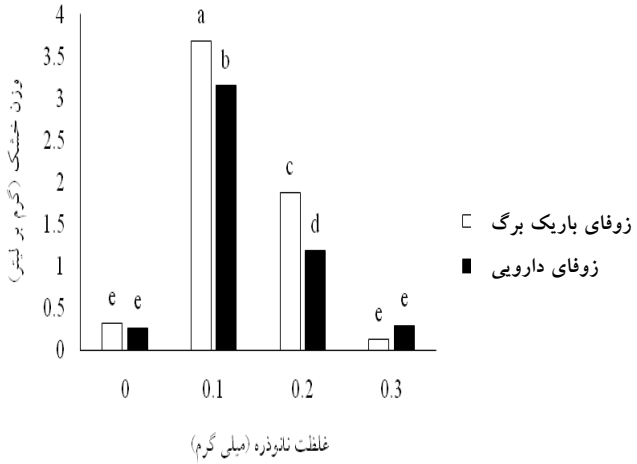
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده، نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره اثر معنی‌داری بر تولید ریشه‌های مویین در هر دو گونه زوفا داشته‌اند.حداکثر میزان تولید وزن تر ریشه مویین در گونه باریک برگ و دارویی به ترتیب تقریباً ۱۸ و ۱۴ گرم بر لیتر در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره حاصل شد (شکل ۳). با توجه به نمودار مقایسه میانگین مشاهده شد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، وزن تر و رشد ریشه‌های مویین کاهش می‌یابد. بنابراین غلظت‌های پایین نانوذرات اثر مطلوبی بر رشد ریشه مویین داشته است.



شکل ۳. مقایسه میانگین وزن تر در دو گونه زوفا تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات نقره

۲.۳. وزن خشک

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان وزن خشک ریشه مویین در هر دو گونه زوفا در سطح یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک به ترتیب در گونه باریک برگ و دارویی زوفا به مقدار ۳/۷ و ۳ گرم بر لیتر در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه میانگین وزن خشک در دو گونه زوفا تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات نقره

۳.۳. ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی

در این آزمایش اثر نانوذرات نقره بر 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 نانوذرات، ریشه‌های غیرتراریخت و قسمت‌های هوایی گیاه (شاخساره) اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌گرم عصاره بیان شد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نیز به روش DPPH محاسبه شد.

با توجه به جدول تجزیه واریانس می‌توان بیان نمود که اثر گونه، ریزنمونه و تیمار نانوذرات نقره بر ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مورد آزمایش در سطح یک درصد معنی‌دار است. اثر متقابل گونه و ریزنمونه و همچنین نانوذرات نقره در سطح یک درصد معنی‌دار شد.

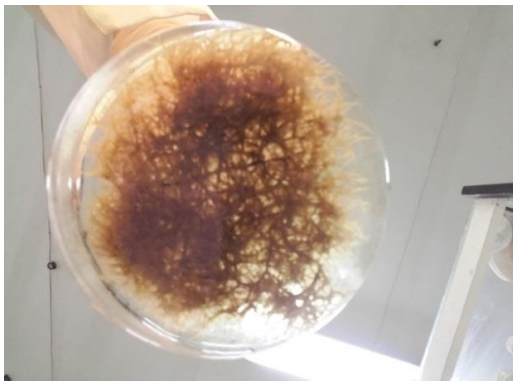
در این آزمایش میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی ریشه غیرتراریخت و شاخساره گیاه علاوه بر ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شده است، جدول مقایسه میانگین نشان

می‌دهد که در گیاه زوفای دارویی، کمترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ۹/۶۳ درصد در ریشه غیرتراریخت مشاهده شد، در حالی که میزان این ترکیبات در اندام‌های هوایی گیاه ۷۵/۵ درصد است. اما این ترکیبات در ریشه مویین بدون تیمار نانوذرات (شاهد) ۸۱/۳ درصد بود که این موضوع به ارزش ریشه‌های مویین اشاره دارد. با اضافه نمودن تیمار نانوذرات نقره به ریشه مویین در زوفای دارویی، میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت نانو ذرات نقره کاهش یافته است و بیشترین درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم نانوذرات نقره به میزان ۸۹/۸۴ درصد حاصل شده است.

میزان ترکیبات فنلی در زوفای دارویی تقریباً متناسب با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها و تیمارهای مورد آزمایش بود. به طوری که بیشترین میزان ترکیبات فنلی به مقدار ۰/۰۳۲۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گالیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم نانو نقره حاصل شد و با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان ترکیبات کاهش یافت. مقدار ترکیبات فنلی شاخساره گیاه از ریشه غیرتراریخت بیشتر اما مقدار این ترکیبات از ریشه مویین کمتر بود (جدول ۳).

پرآوری ریشه مویین گونه زوفای دارویی و باریک برگ در اثر تلقیح سویه‌ی ATCC15834 و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره بعد یک هفته در شکل ۵ و ۶ نشان داده شده است (شکل ۵ و ۶).

شکل ۵. پرآوری ریشه مویین گونه زوفای دارویی در اثر تلقیح سویه‌ی ATCC15834 و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره بعد یک هفته



شکل ۶. پرآوری ریشه مویین گونه زوفای باریک برگ در اثر تلقیح سویه‌ی ATCC15834 و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره بعد یک هفته

جدول ۳. مقایسه میانگین برهمکنش گونه، ریزنمونه و تیمار نانوذرات نقره از نظر صفات ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی

گونه	ریز نمونه	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	ترکیبات فنلی
زوفای دارویی	شاخساره گیاه	۷۵/۵۱۷ ± ۰/۰۰۷g	۰/۰۳۰۷۸ ± ۰/۰۰۰ f
	ریشه غیر تراریخت	۹/۶۳۰ ± ۰/۰۲۵ k	۰/۰۳۰۷۶ ± ۰/۰۰۰ g
	ریشه تراتریخت (شاهد)	۸۱/۳۵۰ ± ۰/۰۲۶ d	۰/۰۳۱۱۳ ± ۰/۰۰۰ b
	۰/۱ میلی‌گرم نانونقره	۸۹/۸۴۰ ± ۰/۰۱۵ b	۰/۰۳۲۳۶ ± ۰/۰۰۰ a
	۰/۲ میلی‌گرم نانو نقره	۲۶/۱۲۳ ± ۰/۰۱۲ h	۰/۰۳۰۶۸ ± ۰/۰۰۰ j
	۰/۳ میلی‌گرم نانونقره	۲۰/۵۵۰ ± ۰/۳۳۹ j	۰/۰۳۰۷۰ ± ۰/۰۰۰ i
زوفای باریک برگ	شاخساره گیاه	۸۶/۹۸۰ ± ۰/۰۰۶ c	۰/۰۳۰۸۴ ± ۰/۰۰۰ d
	ریشه غیر تراریخت	۳۳/۳۳۷ ± ۰/۰۰۳ i	۰/۰۳۰۷۷ ± ۰/۰۰۰ fg
	ریشه تراریخت (شاهد)	۷۹/۱۴۰ ± ۰/۰۸۰ f	۰/۰۳۰۸۱ ± ۰/۰۰۰ e
	۰/۱ میلی‌گرم	۹۰/۸۱۳ ± ۰/۱۴۰ a	۰/۰۳۱۸۵ ± ۰/۰۰۰ b
	۰/۲ میلی‌گرم	۸۰/۵۲۷ ± ۰/۰۱۹ e	۰/۰۳۰۹۳ ± ۰/۰۰۰ c
	۰/۳ میلی‌گرم	۸۰/۲۵۷ ± ۰/۰۰۷ e	۰/۰۳۰۷۳ ± ۰/۰۰۰ h

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

در گیاه زوفای باریک برگ بیشترین میزان ترکیبات فنلی در ۰/۱ میلی‌گرم نانوذرات نقره و به میزان ۹۰/۸۱ درصد مشاهده شد که از گیاه زوفای دارویی بیشتر بود و در این گونه نیز میزان این ترکیبات با افزایش غلظت نانوذرات کاهش یافت. نکته قابل توجه این است که در گیاه زوفای باریک برگ میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در شاخساره گیاه بیشتر از ریشه مویین شاهد است که احتمالاً به علت گونه و ژنوتیپ زوفا باریک برگ می‌باشد. در زوفای باریک برگ، 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.

۴. بحث

طی سال‌های اخیر، کشت ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعه مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها کمک قابل توجهی به بهبود و تقویت تحقیقات در زمینه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه کرده است. نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز حکایت از این دارد که ترکیب‌های فنلی و آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در بررسی‌های انجام شده در بین کلون‌های ریشه‌های مویین کاسنی حاصل از جدایه‌های مختلف آگروباکتریوم، مقدار ترکیب‌های فنلی تغییرات معنی‌داری نشان دادند [۳۳]. 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. با توجه به عدم قطعیت در تعداد کپی و مکان ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان و همچنین برهم کنش آنها با ژن‌های اطراف، ریشه‌های مویین ایجاد شده اغلب الگوهای متفاوتی را از نظر تجمع متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهند. 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 بسزایی در محتوای فنل‌ها دارند [۳۴].

در این مطالعه از روش التراسونیک جهت عصاره‌گیری استفاده شد که قابل توجه بود. مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داد که روش استخراج التراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاهتر در مقایسه با روش سنتی می‌شود [۳۵]. مطالعه انجام شده روی گیاه (*Hyoscyamus squarrosus*) نشان داد عصاره التراسونیک در به دام اندازی رادیکال DPPH و به دام‌اندازی نیتریک اکساید بهتر از دیگر روش‌ها عمل می‌کند [۳۶].

پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که در بسیاری از ترکیبات طبیعی وجود دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مواد به گروه‌های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان موجود در ساختارشان نسبت داده می‌شود. یکی از مکانیسم‌های محتمل برای این مواد، به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد از طریق الکترون‌های جفت شده موجود در اطراف حلقه آروماتیک آنها است که این توانایی ناشی از وجود پیوندهای هیدروژنی حلقه آروماتیک است [۳۷].

جدول مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً 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 [۴۲ – ۳۸]. نقش کلیدی ترکیب‌های فنلی به عنوان حذف‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد در چندین مقاله گزارش شده است [۴۴، ۴۳]. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده و بنابراین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند [۴۵].

محرک‌ها ممکن است باعث تغییر و تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و یا تبادل مواد ذخیره شده در واکوئل‌ها، تبدیل و یا تجزیه متابولیت‌های ثانویه شوند [۱۷].

مطالعه حاضر روی ریشه‌ی مویین دو گونه 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 [۱۹] هم سویی نشان می‌دهد. مطالعات نشان داده است که تأثیر نانوذرات بر روی گیاهان می‌تواند مفید (برای رشد گیاهان و توسعه آنها) و یا غیرمفید (جلوگیری از رشد ریشه) باشد [۴۶]. کاهش طول و وزن خشک ریشه با افزایش غلظت نانوذرات نقره در گیاه *Lolium multiflorum* مشاهده شد [۴۷]. تجمع نانو ذرات نقره در سلول‌های گیاهی موجب کاهش عملکرد آنها می‌شود [۴۸].طی تحقیقی نشان داده شد 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 می‌شود. مهار رشد ریشه تا حد زیادی میان نانوذرات و بین گیاهان متفاوت است و با غلظت نانوذرات در ارتباط است [۴۷].

در این مطالعه از محرک نانوذرات نقره استفاده شد که در غلظت‌های پایین باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی شد اما در غلظت‌های بالاتر منجر به کاهش ترکیبات مذکور گشت که با تحقیقات یوسفی و همکاران [۴۹] که با افزایش غلظت محرک نانو نقره در محیط کشت، میزان ترکیبات فنلی بیشتر شده، مغایرت داشت. افزایش محتوای فنل‌ها که در یک مسیر آبشاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شوند، می‌توانند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد [۵۲، ۵۰] اثرات مهاری اتیلن در غلظت‌های بالا بر مهار سنتز متابولیت‌های ثانویه و

از طرف دیگر اثرات تحریکی آن بر افزایش متابولیت‌های ثانویه در غلظت‌های کم به اثبات رسیده است [۵۴، ۵۳]. بنابراین می‌توان اثرات مثبت نقره بر افزایش محتوای فنلی و آنتی‌اکسیدانی را به اثر بازدارندگی آن بر فعالیت اتیلن نسبت داد [۵۵]. هر چند مشخص شده که نانونقره می‌تواند به دیواره سلولی نفوذ و تغییر در نفوذپذیری دیواره ایجاد کند و با تغییر در جذب و دفع مواد توسط دیواره، روی بسیاری از فرایندهای داخل سلول تأثیرگذار بوده و حتی می‌تواند به فسفر و سولفور موجود در دیواره متصل شده و به این صورت به DNA متصل و حتی در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نیز تغییر ایجاد کند.

مکانیسم عمل نانوذرات بسیار گسترده است و ایجاد سمیت می‌کند [۵۶] که ممکن است به دلیل سطح وسیع‌تر نانوذرات باشد که در تماس با مولکول های زیستی موجب انجام واکنش‌های احیا می‌شود [۵۷]. این سمیت نانوذرات نقره می‌تواند موجب کاهش تجمع متابولیت‌ها در ساعت‌های پایانی و یا غلظت‌های بالا شود. از طرفی یکی دیگر از دلایل افزایش متابولیت‌های ثانویه در زمان‌های ابتدایی اعمال تیمار می‌تواند به این دلیل باشد که حضور نقره در محیط باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و همین عامل موجب شده که گیاه با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فنل‌ها و افزایش محتوای فنل کل، اثر تنش‌های ایجاد شده را کاهش دهد [۵۲، ۴۹] یعنی با وادار کردن گیاه به تولید مواد دفاعی (متابولیت‌های ثانوی) موجبات افزایش آنها را فراهم کند [۵۸] گیاهان واکنش‌های دفاعی متفاوتی در برابر محرک‌ها دارند [۶۰، ۵۹]، لذا بسته به نوع گیاه و واکنش دفاعی آن و همچنین نوع متابولیت ثانویه مورد نیاز باید محرک خاصی انتخاب کرد. حتی گزارش شده [۱۶] زمان اضافه نمودن محرک و مدت زمانی که این سلول‌ها در معرض محرک‌ها قرار می‌گیرند از فاکتورهای مؤثر در تولید متابولیت‌ها است و این زمان دسترسی به حداکثر میزان متابولیت بسته به غلظت و نوع محرک مختلف است [۱۸]. البته یکی از دلایل کاهش متابولیت‌ها در غلظت‌های بالا، شروع پاسخ فوق حساسیت و سمی شدن سلول‌ها به دلیل تماس بیشتر محرک‌ها با آنها در محیط کشت و ایجاد اثر باز خوردی و عدم بیان ژن‌های مؤثر است [۶۲، ۶۱]. به نظر می‌رسد یکی از موانع ادامه تجمع مواد فنلی در زمان‌های طولانی و غلظت‌های بالا نانو ذرات نقره، سمیت نانوذرات مورد استفاده باشد [۲۲].

طی تحقیقی [۱۹] روی سنتز نانوذرات و تأثیر نانوذرات فلزی روی فاکتورهای رویشی گیاه ریحان انجام دادند، مشخص شد که نانوذرات نقره و مس میزان قند و پرولین را در گیاه افزایش داده و همچنین موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و کاتالاز می‌شوند و احتمال می‌رود که نانوذرات روی افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نقش بسزایی داشته باشد [۲۰]. مطالعه تأثیر نانوذرات نقره بر برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه بومادران نشان داد که که گیاه بومادران هزار برگ تحت تأثیر نانوذرات نقره با حفظ تمامیت غشا، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافته و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت تأثیر قرار گرفت. نانوذرات نقره با ایجاد تغییر در ترکیبات اسانس روغنی و عصاره گیاه، خواص آنتی‌باکتریایی اسانس گیاه را دو چندان افزایش داده و عصاره آن نیز موجب افزایش سمیت سلولی و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شده است [۱۰].

۵. نتیجه‌گیری

نانوذرات نقره (Nano-Ag) به دلیل خاصیت ضدمیکروبی، یکی از مهم‌ترین و تجاری‌ترین نانوذرات محسوب می‌شود که در این آزمایش نیز اثر مطلوبی بر رشد ریشه مویین گیاه زوفا داشت. با توجه به نتایج این تحقیق

غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره میزان زیست توده ریشه مویین تراریخت را افزایش داد و همچنین باعث افزایش تولید مواد فنلی و آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین شد. نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات پایه مناسبی را جهت انتقال ژن و القاء ریشه مویین در گیاه زوفا ایجاد می‌کند و می‌تواند بویژه در تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش مانند: ۱ و ۸- سینئول، آلفا و بتا -پینن، پینوکـامفون، ایزوپینوکامفون، کامفور، پینوکاروول و ایزوپینوکاروول در این گیاه از طریق کشت ریشه‌های مویین، مفید واقع شود.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان مقاله، تأثیر نانوذرات نقره بر رشد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ریشه مویین تراریخت در دو گونه زوفا (*Hyssopus officinalis* و *H. angustifolius*) به ترتیب شامل سمیه طایفه، ناصر مهنا، سیدکمال کاظمی‌تبار و ولی‌اله قاسمی عمران می‌باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه سمیه طایفه در دوره دکتری بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی گیاهان باغی در دانشگاه تبریز می‌باشد. نویسندگان برخود لازم می‌دانند از آقای محمد اکبرزاده، از اعضای هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران بخاطر شناسایی گیاه و همچنین دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ساری بخاطر انجام مراحل پایان نامه تشکر نمایند.

منابع

1. Dzhumaev KhK. Dynamics of essential oil accumulation in (*Hyssopus seravschanicus*). *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*. 1986; 6: 31-33.

2. Kochan E, Wysokinska H and Chmiel A. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of (*Hyssopus officinalis*). *Natur forsch*. 1999; 54c, 11.16182-185.

3. Gollapudi S, Shara HA, Aggarval S, Byers LD, Ensley HE and Gupta S. Isolation of a previously unidentified polysacharide (MAR – 10) from (*Hyssopus officinalis*) that exhibits strong activity agains human imunodeficiency virus type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995; 210: 145-151.

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

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

6. Garg S, Naqvi AA, Singh A, Ram G and Kumar S. Composition of essential oil from an annual crop of (*Hyssopus officinalis*) grown in Indian plains. *Flavor. Frag. J*. 1999; 14: 170-172.

7. Mitic V and Dordevic S. Essential oil composition of (*Hyssopus officinalis* L.) cultivated in Serbia. Facta Universitatis, *Physics Chemistry and Technology* 2000; 2: 105-108.

8. Ozer H, Sahin F, Kilic H and Gulluce M. Essential oil composition of (*Hyssopus officinalis* L.) subsp. Angustifolius (Bieb.) Archangelic from Turkey. *Flavor Fragr. J*. 2005; 20: 42 44.

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

10. Kizil S, Toncer O, Ipek A, Arslan N, Saglam S and Khawar K.M. Blooming stages of Turkish hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) affect essential oil composition. *Acta Agriculture Scandinavia*, Section B-Soil and Plant Science, 2008; 58(3): 273-279.

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

12. Mojab F, Mosadegh M, Monsefesfahani H.R and Najari A. Examination of retail journalism and identification of components essential oil (*Hyssopus officinalis*). *Journal of Pazhohandeh*. 2002; 8(2): 9-15. (In Persian).

13. Shun YM , Wen YH , Yong CY and Jian GS. Two benzyl dihydroflavones from phellinus igniarius. *Chin. J. Chem.* 2003; 14(8): 810-13.

14. Wesołowska A, Jadczak D and Grzeszczuk M. Essential oil composition of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) cultivated in north-western Poland. *Herba Polonica*. 2010; 56(1): 57-65.

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

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

17. Odjakova M and Hadjiivanova C. The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg J. Plant Physiol*. 2001; 27(1-2): 101-109.

18. Mahna N, Vahed SZ and Khani S. Plant In vitro Culture goes Nano: Nanosilver-Mediated Decontamination of Ex vitro Explants. *J. Nanomed. Nanotechol*. 2013; 4: 161.

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

20. Kayhani Behrouz M, Mohammad Parast B and Qanati F. Investigating the effect of silver nanoparticles on some secondary metabolites of (*Achillea millefolium* L.) Thesis, University of Malayer. 2013.

21. Khodayari M, Omidi M, Shah Nejat Bushehri A, Yazdani D, Naqvi MR and Kadkhoda Z Effect biological elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). *Iran. Horticult. Sci*. 2015; 45: 287-295.

22. Hazrati Jahan R, Zare N, Dezhsetan S and Sheikhzadeh Mosaddeg P. Enhanced Taxol - precursor. *Sci. J. Manag Sys*. 2017; 33(1): 73-89.

23. Parsa M and Zeinali A. Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of (*Hyoscyamus niger* L.). *Sci. J. Manag. Sys*. 2016; 32(4): 655-666.

24. Riahi-Madvar A, Yousefi K and Nasiri-Bezenjani M. Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic

acid in (*Melissa offisinalis* L.). *Sci. J. Manag. Sys*. 2014; 30: 714-723.

25. Kheiry A, Tori H, Mortazavi N. Effects of drought stress and jasmonic acid elicitors on morphological and phytochemical characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Sci J Manag Sys.* 2017; 33(2): 268-280.

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

27. Marwani E, Pratiwi D, Wardhani K and Esyanti R. Development of hairy root culture of (*Andrographis Paniculata*) for in Vitro Andrographollide Production. *Journal of Medical and Bioengineering* 2015; 4(6): 446-450.

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

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

30. Sahraroo A, Babalar M, Mirjalili Moghaddam M. and Nejad Ebrahimi S *In-vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *(Satureja khuzistanica*) jamzad (Lamiaceae). *Iran. J. Pharm. Res*. 2014; 13 (4): 1447-1456.

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

32. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phytother Res*. 2000; 14: 323-328.

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

34. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V and Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol biochem*: PPB/Societe francaise de physiologie vegetale, 72: 1-20.

35. He Ch, Gi X, Pan Ym, Wang H, Wang K and Liang M. Antioxidant Activity Of Alcoholic Extract Of (*Agrimonia Pilosa*) Ledeb. *Med. Chem. Res*. 19(5): 448-61.

36. Ebrahimzadeh Ma, Nabavi Sf and Nabavi Sm. Antioxidant Activities Of Methanol Extract Of (*Sambucus Ebulus*) L. Flower. *Pak J Boil Sci*. 2009; 12(5): 447-50.

37. Fukumoto LR and Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48(8): 3597-604.

38. Damien Dorman H J, Koşar M, Kahlos K, Holm Y and Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from Mentha Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *J. Agric*. *Food Chem*. 2003; 51 (16): 4563-9.

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

40. Cheung S and TAI J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis. *Oncology reports*. 2007; 17: 1525-31.

41. Zeng HH, Tu PF, Zhou K, Wang H, Wang B and Lu JF. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from (*Rosmarinus*

officinalis). *Acta Pharmacol Sin*. 2001; 22 (12): 1094-8.

42. Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Shao X, Pan MH and Ho CT. Flavonoids and phenolic compounds from (*Rosmarinus officinalis*). *J. Agric Food Chem*. 2010; 12: 58(9): 5363-7.

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

44. Theriault M, Caillet S, Kermash S and Lacroix M. Antioxidant, antiradical and at mutagenic activity of phenolic compounds present in maple products. *Food Chem*. 2006; 98: 490-501.

45. Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A and Ozken H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from (*Mentha longifolia* L.) ssp. longifolia. *Food Chem*. 2007; 103: 1449-1456.

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

47. Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman B P, Auffan M, Wiesner M. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on (*Lolium multiflorum*). *Environmental Science & Technology* 2011; 45(6): 2360-2367.

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

49. Yousefi K, Riahi Madvar A and A B. Effect of flavone synthase gene expression and elicitor silver and copper on some biochemical parameters in seedlings of native Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L). *J. Plant* (*Iran. J. Biolog*). 2016; 28: 210-223.

50. Saboura A, Ahmadi A, Zeynali A, Parsa M. Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in Scutellaria pinnatifida in Two NorthIranian Populations. *J. Rafsanjan Uni. Med. Sci*. 2014; 13(3): 249-266.

51. Kamalizadeh M, Bihamta MR, Peyghambari SA and J H. Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles. *Genetic 3RD millennium.* 2014; 12: 3428-3437.

52. Yousefi K, Riahi A and Baghizadeh A. Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on (*Cuminum cyminum* L.) endemic from Iran. *J. Plant Res*. 2015; 28(1): 210-223.

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

54. Jeandet P, Delaunois B, Aziz A, Donnez D, Vasserot Y, Cordelier S and Courot E. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *J. Bio. Med. Rese*. 2012.

55. Zhang Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res-Fund. Mol. M*. 2004; 555(1-2): 173-190.

56. Asghari G, Mostaejer A, Sadeghi Ali Abadi H and Nakhaee A. Effect of silver nitrate and salicylic acid on taxol production at the plant (*Taxus baccata* L.). *J. Med. Plants* 2009; 5: 74-78.

57. Singh R and Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 2009; 86(3): 215-223.
58. Khoshbakhat T, Bahadori F, Khalighi A and Ardalan MM. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on the macro elements and performance aloe vera plant in a greenhouse. *J. Crop. Physiol.* 2012; 2: 45-59.
59. Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS and Lee HJ. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 1999; 4: 300.
60. Chang JH, Shin JH, Chung IS and Lee HJ. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnol*. 1998; 20(12): 1097-1099.
61. Naguib AE-MM, El-Baz FK, Salama ZA, Hanaa HAEB, Ali HF, Gaafar AA. Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of Broccoli (*Brassica olaracea*, var. Italica) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *J Saudi Soc of Agricult Sci*. 2012; 11(2): 135-142.
62. Yang F, Hong F, You W, Liu C, Gao F, Wu C and Yang P. Influence of nano-anatase TiO2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol Trace Elem Res*. 2006; 110(2): 179-190.

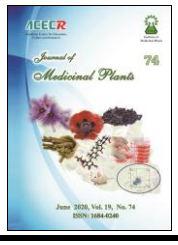
How to cite this article: Tayefeh S, Mahna N, Kazemitabar SK, Ghasemiomran V. The effect of silver nanoparticles on the growth and antioxidants of transgenic hairy roots in hyssop (*Hyssopus officinalis, H. angustifolius*). ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 129-144.
doi: 10.29252/jmp.19.74.129

J. Med. Plants 2020; 19(74): 129-144

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

The effect of silver nanoparticles on the growth and antioxidants of transgenic hairy roots in hyssop (*Hyssopus officinalis, H. angustifolius*)

Somaye Tayefeh[1], Nasser Mahna[1,*], Seyyed Kamal Kazemitabar[2], Valiallah Ghasemiomran[3]

[1] *Department of Horticultural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran*
[2] *Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari University of Agriculture and Natural Resources, Mazandaran, Iran*
[3] *Department of Biotechnology and Plant Breeding, Genetics Research Institute, University of Agriculture and Natural Resources, Sari University, Mazandaran, Iran*

ARTICLE INFO

Keywords:
Antioxidants
Hairy Root
Hyssop
Silver nanoparticles

ABSTRACT

Background: Nowadays, biotechnological methods such as transgenic hairy root culture and application of elicitors have become an attractive source for secondary metabolites production. Hyssop species (*Hyssopus* spp.) having active ingredients including antioxidants such as phenolics, in this plant have shown anti-mutagenic, anti-carcinogenic and antiglycemic effects. **Objective:** The present study was conducted to investigate the effect of silver nanoparticles on the growth and antioxidants of transgenic hairy root in two *Hyssopus* species including *H. officinalis* and *H. angustifolius*. **Methods:** In this experiment, we used silver nanoparticles concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l on transgenic hairy roots and *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 strain for induction of hairy roots. Extraction of the samples were performed following ultrasonic method. Total phenolics content were determined using spectrophotometry. The antioxidant activity (AOA) of the extract were evaluated through 2, 2-dipheny l-1-picryl-hydrazy l (DPPH) method. **Results:** The results showed that silver nanoparticles as an elicitor had significant effect on the measured traits. The highest dry weight and fresh weight of the transgenic hairy roots were observed as much as 3.8 and 16 g/l in *H. angustifolius* and 3.2 and 14 g/l in *H. officinalis*, respectively. Which were caused by silver nanoparticles at the concentration of 0.1 mg/l, The amount of total antioxidants in *H. angustifolius* and *H. officinalis*were 90.81% and 89.84%, respectively. In this study, we could observe relationship between antioxidant activity and plant phenolic content. **Conclusion:** In general, we found that 0.1 mg/l silver nanoparticles could improve the growth of transgenic hairy roots and increase their phenolics and antioxidants content.

Abbreviations: OD, جذب نوری; TPC, تعیین ترکیبات فنلی; DPPH, دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل; Rpm, دور در دقیقه; PPM, میلی‌گرم بر لیتر; Bp, جفت باز; PCR, واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

* Corresponding author: mahna@tabrizu.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.74.129
Received 23 October 2018; Received in revised form 20 February 2019; Accepted: 26 February 2019
© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)