Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۶، صفحه ۹۹۰-۹۷۷ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.125661.2529
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.977.98.6.1578.41

تأثیر مواد بافری و آنتی‌اکسیدانی بر شاخص رشد و خصوصیات بیوشیمیایی ریشه‌های مویین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.)

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

اسید رزمارینیک به‌عنوان یکی از مهمترین پلی‌فنل‌ها شناخته شده است که یک استر از کافئیک اسید و ۳ و۴- دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید می‌باشد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق تأثیر به‌وسیله ترکیب ضدسرطانی دوکسوروبیسین، القای آسیب به DNA را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. ریشه‌های مویین زرین گیاه حاوی اسید رزمارینیک است که دارای خواص بیولوژیکی و ضدسرطانی می‌باشد. اما به‌دلیل تولید بالای ترکیب‌های فنلی در محیط کشت مایع، ریشه‌های مویین با مشکل قهوه‌ای شدن و مرگ بافت‌ها مواجه می‌شوند. در این تحقیق تأثیر ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی بر رشد ریشه‌های مویین زرین گیاه و جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنها مطالعه شده است. ریشه‌های مویین از تلقیح کوتیلدون‌های دو هفته‌ای درون شیشه‌ای زرین گیاه توسط آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ۱۵۸۳۴ القاء شدند. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن rolB انجام گردید. به‌منظور بهینه‌سازی رشد و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌ها در محیط کشت پایه ½MS مایع از مواد ضداکسایشی مختلف شامل اسید آسکوربیک (۰/۱g/L و ۰/۰۵)، MES بافر (۵/۳۳g/L و ۲/۶۶)، زغال فعال (۳g/L و ۱/۵) و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) (۱/۵g/Lو ۰/۵) هر یک در دو غلظت متفاوت استفاده شد. برای بررسی کیفی ریشه‌های مویین تولیدی تحت تأثیر بافرهای مختلف، خواص فیتوشیمیایی نمونه‌ها (فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پس از ۲۱ روز بهترین محیط کشت برای افزایش زیست‌توده (۱/۶۴g) و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین، محیط کشت ½MS حاوی ۱/۵g/L زغال فعال بود. پس از زغال فعال بیشترین میزان زیست‌توده (۱/۳۶g) در دو غلظت PVP و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن و کاهش رشد در نمونه‌های شاهد مشاهده گردید. حداکثر و حداقل میزان فنل و فلاونوئید کل به‌ترتیب در نمونه‌های شاهد و تیمار زغال فعال ۱/۵g/L مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب مربوط به زغال فعال ۱/۵g/L و نمونه‌های شاهد بود. کنترل pH محیط کشت و همچنین مهار آنزیم PAL از طریق استفاده از مواد ضد اکسایشی مانند زغال فعال و PVP، توان قابل توجهی را برای کاهش بیوسنتز ترکیب‌های فنلی و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ایجاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه تراریخت، فنل کل، قهوه‌ای شدن.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dacocephalum kotschyi* Boiss. گیاهی از تیره نعناع (Lamiaceae) می‌باشد که دارای خواص دارویی متعددی است (Fattahi *et al.*, 2016). با توجه به اینکه سرعت و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت آهسته بوده و مدت زمان زیادی برای تولید آنها لازم است، بنابراین برای تولید ترکیب های دارویی از فناوری DNA نوترکیب و انتقال ژن به‌دلیل آگروباکتریوم استفاده می‌شود (Ebrahimi *et al.*, 2015). ریشه مویین نوعی بیماری گیاهی است که توسط آلوده‌سازی ماده گیاهی با سویه‌های ریزوبیوم رایزوژنز (*Rhizobium rhizogenes*) (بیشتر با آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*)) ایجاد می‌شود (Pezeshki & Petersen, 2018). برخی از مشکلات اصلی در کشت بافت زرین گیاه قهوه‌ای شدن، کاهش شدید سرعت رشد و در نهایت از بین رفتن ریشه‌های مویین این گیاه در محیط مایع می‌باشد. قهوه‌ای شدن اکسیداتیو مشکل رایج در کشت بافت گیاهی است که سبب کاهش رشد، درصد پایین باززایی و یا درنهایت سبب مرگ سلول، بافت یا گیاه می‌شود. علت اصلی قهوه‌ای شدن بافت‌ها، تجمع و متعاقباً اکسیداسیون ترکیب های فنلی در بافت و محیط کشت می‌باشد. ترکیب های فنلی می‌توانند از طریق ایجاد تغییرات در pH محیط کشت، سبب جلوگیری از جذب ترکیب های مورد نیاز نمونه‌های گیاهی شده و از این طریق نیز سبب مرگ سلول‌ها و در نتیجه قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردند (Maxwell *et al.*, 2013). تیمار نمونه‌ها با بازدارنده‌های فعالیت آنزیم PAL، می‌تواند قهوه‌ای شدن را کاهش داده و از تجمع ترکیب‌های فنلی آزاد جلوگیری کند (Nguyen *et al.*, 2003). پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP :Polyvinylpyrrolidone) یک پلی‌آمید بافری است که بسیاری از محققان از آن برای جذب سطحی ترکیب‌های فنلی در کشت بافت استفاده کرده‌اند (George *et al.*, 2008). MES بافر (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES buffer) یکی از محدود بافرهای تجاری با اثرگذاری بالا می‌باشد که با ظرفیت بافری معنی‌دار، در pH بین ۶-۵ به محیط کشت گیاهان افزوده می‌شود. زیرا این بافر ظرفیت پایینی برای ترکیب شدن با میکرومولکول‌ها دارد (George *et al.*, 2008). اسید آسکوربیک از آنتی‌اکسیدان‌های مهم سلولی می‌باشد که با واکنش‌های مهم آنزیمی و غیرآنزیمی در جذب گونه‌های فعال اکسیژن شرکت می‌کند (Daneshmand, 2014). زغال فعال دارای شبکه‌ای از منافذ با سطح داخلی (فضای خالی) بزرگ است که می‌تواند بسیاری از مواد را به خود جذب کرده و در کشت بافت برای بهبود رشد و توسعه سلولی استفاده شود (Dennis, 2008). Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه دارویی بابا‌آدم (*Arctium lappa* L.)، بهترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به PVP با غلظت (w/v) ۰/۵٪ را گزارش کردند. Shirazi و همکاران (۲۰۱۸) به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) در محیط کشت پایه MS مایع زغال فعال ۱٪ را گزارش نمودند. ترکیب‌های معمول و رایج محیط کشت‌های معمولی ظرفیت کمی در خاصیت بافری دارند، به همین علت استفاده از بافرهای ویژه به‌منظور حفظ pH در سطح انتخابی و ثابت نگه‌داشتن آن حائز اهمیت است. بافر مؤثر بافری است که بتواند pH را با کمترین تغییرات تا زمان بدست آمدن محصول کشت بافتی تثبیت کند (George *et al.*, 2008). به‌منظور تولید بهینه ریشه‌های مویین زرین گیاه ابتدا باید مشکل قهوه‌ای شدن ریشه‌ها برطرف شود. بدین‌منظور بهینه‌سازی و فراهم نمودن محیط کشت مایع استاندارد ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی اثر بافرهای مختلف برای رشد ریشه‌های مویین زرین گیاه و جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن آنها ارائه نشده است، بنابراین هدف اصلی از این تحقیق معرفی بهترین بافر با بالاترین اثرگذاری از بین ۴ بافر PVP، MES، اسید آسکوربیک و زغال فعال برای حفظ pH محیط می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

آزمایش‌های این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه انجام شد. بذرهای زرین گیاه پس از ضدعفونی سطحی در محیط کشت MS، کشت و در اتاق‌های رشد با دمای ۲۴±۲°C و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها

سوسپانسیون باکتری *A. rhizogenes* سویه ۱۵۸۳۴، از کشت تک کلونی باکتری در محیط کشت LB (Luria Bertani, 1951) مایع حاوی ۵۰mg/L آنتی‌بیوتیک ریفامپسین بدست آمد. ریزنمونه‌های تهیه شده از کوتیلدون‌های دو هفته‌ای در شرایط استریل به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری با OD_{600}= ۰/۴-۰/۶ غوطه‌ور شدند. پس از خشک کردن ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل، به مدت ۴۸ ساعت به محیط کشت MS حاوی استوسرینگون با غلظت ۱۵۰µM منتقل گردیدند. پس از دو روز هم‌کشتی (Co-culture)، شستشو انجام و نمونه‌ها به محیط کشت ½MS جامد حاوی ۲۵۰mg/L سفوتاکسیم منتقل شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام و در هر دوره واکشت، غلظت سفوتاکسیم به میزان ۵۰mg/L کاهش داده شد تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید.

تأیید مولکولی انتقال ژن به ریشه‌های مویین

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های مویین احتمالی با استفاده از روش CTAB انجام شد (Khan *et al*., 2007). همچنین DNA ژنومی ریشه‌های غیر تراریخت و پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند (Soleimani *et al*., 2012). DNA استخراج شده به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تعیین حضور ژن rolB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طبق برنامه مربوطه انجام گردید.

توالی آغازگرهای ژن rolB به صورت زیر بود.

Forward Primer: 5'- ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA-3'
Reverse Primer: 5' - TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3'

تکثیر ژن rolB با آغازگرهای اختصاصی بیان شده، برای ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه و سنتز DNA در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و ۱۰ ثانیه انجام شد.

استقرار ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع و اعمال تیمارها

۳۰۰ میلی‌گرم از لاین انتخابی ۱۸ (انتخاب لاین پر رشد براساس اندازه‌گیری میزان رشد انجام شد) به ارلن‌های ۲۵۰ml، حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط کشت ½MS مایع همراه با توری منتقل شده و غلظت‌های مختلفی از ترکیب‌های ضداکسایشی شامل: بافر MES در دو غلظت ۲/۶۶ و ۵/۳۳ گرم در لیتر، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۵ و ۱/۵ گرم در لیتر، زغال فعال ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ و ۰/۱ گرم در لیتر به محیط‌های ½MS مایع افزوده شدند. محیط کشت ½MS مایع، فاقد ترکیب‌های ضداکسایشی به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همچنین محیط کشت ارلن‌ها هر هفته تعویض و تجدید گردید.

برای ارزیابی میزان قهوه‌ای شدن ریشه‌ها از روش درجه‌بندی بصری Maxwell و همکاران (۲۰۱۳) به‌شرح زیر استفاده شد.

درجه صفر: بدون هیچ‌گونه نشانه قهوه‌ای شدن ریشه‌ها، درجه ۱: قهوه‌ای شدن کم ریشه‌ها، درجه ۲: قهوه‌ای شدن متوسط ریشه‌ها، درجه ۳: قهوه‌ای شدن زیاد ریشه‌ها، درجه ۴: قهوه‌ای شدن کامل ریشه‌ها.

www.SID.ir

Archive of SID

شاخص‌های اندازه‌گیری

میزان رشد زیست‌توده با استفاده از اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌ها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ g و خواص فیتوشیمیایی با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر Dynamica (HALO DB-20) در طول موج مربوطه سنجیده و محاسبه شد.

عصاره‌گیری متانولی

عصاره‌گیری متانولی به روش Hajimahdipour و همکاران (۲۰۰۹) به‌منظور اندازه‌گیری فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از ریشه مویین به داخل هاون سرد منتقل و بعد ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪به آن افزوده و به‌طور کامل سابیده شد. آنگاه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و پس از جداسازی محلول رویی، از آن به‌منظور انجام اندازه‌گیری‌ها استفاده گردید.

اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل با استفاده از روش Slinkard و Singleton (۱۹۷۷)، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۱۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰٪ داخل لوله‌های آزمایش اضافه و پس از ۵ دقیقه انتظار، ۹۶۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۷/۵٪ و در نهایت ۱۸۰ میکرولیتر آب‌مقطر به آن اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه، در شرایط تاریکی میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب بدست‌آمده از اسپکتروفتومتری (Y) در رابطه حاصل از کالیبراسیون که در زیر ارائه شده است، جایگذاری شده و مقدار فنل کل (X) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک بیان گردید.

$$Y= 0.144X+ 0.2303$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل با استفاده از روش Shin و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. طی این روش ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی در لوله آزمایش اضافه و ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ به آن افزوده شد. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ و ۱۰۰۰ میکرولیتر سود ۱ مولار اضافه و میزان جذب در طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت محاسبه آن برحسب کوئرستین/ گرم ماده خشک بیان شد.

$$Y = 0.013X- 0.159$$

Y: مقدار جذب

X: فلاونوئید کل

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از DPPH از روش Chiou و همکاران (۲۰۰۷) استفاده گردید. بدین‌منظور ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی همراه با ۹۵۰ میکرولیتر DPPH ($۶\times۱۰^{-۵}mol/^{L}$) در لوله آزمایش اضافه و پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بدست آمد.

$$\frac{AC - AS}{AC} * 100$$

AC: میزان جذب بلنک

AS: میزان جذب نمونه

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

یک روز پس از برداشت ریشه‌های مویین، ۰/۵ گرم از بافت ریشه در هاون سرد با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ سابیده شد تا عصاره همگنی بدست آمد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای

www.SID.ir

Archive of SID

۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. محلول رویی با دقت جدا شده و دوباره در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه و ۹۰۰۰ دور قرار گرفت. در نهایت محلول رویی به ویال‌های جداگانه منتقل و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز استفاده شد (Sudhakar *et al*., 2001).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)(EC 1.11.1.6)

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Bergmeyer (۱۹۷۴) انجام شد. تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت یک دقیقه بررسی و محتوای فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)(EC 1.11.1.7)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به‌عنوان سوبسترا و براساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. افزایش جذب به‌دلیل اکسیداسیون گایاکول، در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC 1.11.1.1)

برای سنجش فعالیت سینتتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) استفاده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۹۲۵ نانومتر قرائت و میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید.

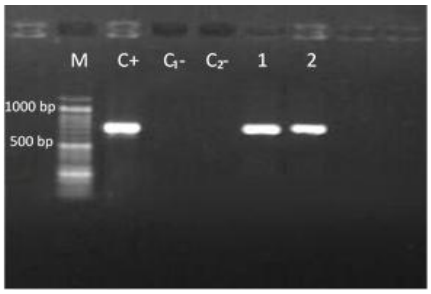
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های پارامتریک توسط نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین آنها با استفاده از آزمون دانکن و تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های غیرپارامتریک (قهوه‌ای شدن) با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و آزمون Kruskal-Wallis و مقایسات میانگین آنها به روش کای اسکوئر انجام گردید. درنهایت نمودارها توسط نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین

تأیید ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین توسط PCR انجام گردید. پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪، نوار مورد انتظار در حدود ۷۸۰bp مربوط به تکثیر ژن rolB در ریشه‌های مویین احتمالی مشاهده شد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری مورد استفاده در تلقیح) هم‌اندازه بود. از سوی دیگر در ریشه‌های مربوط به ریزنمونه تلقیح نیافته (شاهد منفی) نواری در تکثیر مشاهده نگردید (شکل ۱). این نتایج نشان داد که ژن rolB موجود در T-DNA پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* در داخل ژنوم ریشه‌های مویین زرین گیاه تلفیق شده است.



شکل ۱- آنالیز PCR ژن rolB در ریشه‌های مویین زرین گیاه

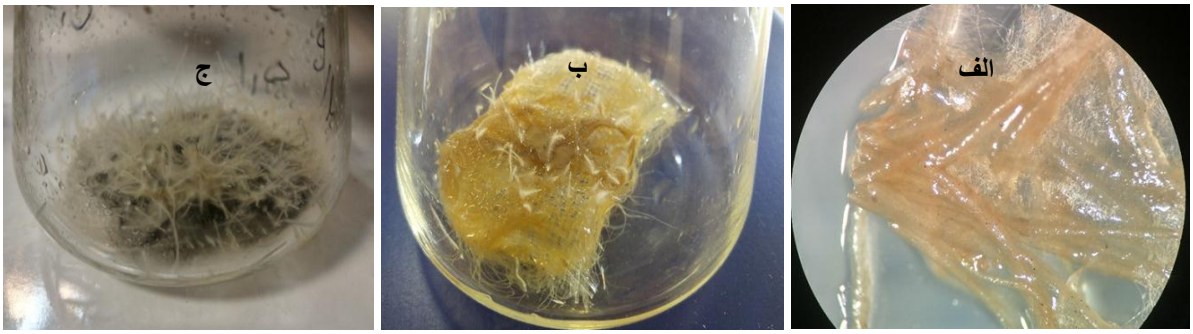
M: مارکر مولکولی ۱ Kb (Fermentase). C+: *A. rhizogenes* کنترل مثبت C_1-: واکنش PCR فاقد DNA کنترل منفی C_2-: ریشه غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی ۱ و ۲: ریشه‌های مویین تراریخت زرین گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

اثر ترکیب‌های ضد اکسایشی بر رشد و میزان قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین

آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر نوع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان وزن تر نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱$) (جدول ۱). بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف بافری بر رشد ریشه‌های مویین پس از گذشت ۲۱ روز نشان داد که حداکثر میزان وزن تر با افزایش ۵/۴۶ برابری (۱/۶۴g) در تیمار زغال فعال با غلظت ۱/۵g/L و پس از آن در غلظت ۳g/L زغال فعال (۱/۵۳g) مشاهده گردید. به‌طوری که کمترین میزان وزن تر نیز (۰/۷۲g) در نمونه‌های شاهد و پس از آن تیمار اسید آسکوربیک (۰/۷۳g) با غلظت ۰/۰۵g/L ثبت شد (شکل ۲). البته بین دو غلظت اسید آسکوربیک تفاوت معنی‌داری از نظر میزان وزن تر مشاهده نشد. پس از اسید آسکوربیک، افزایش وزن تر به‌ترتیب مربوط به MES بافر ۲/۶۶g/L (۰/۹۵g) و MES بافر با غلظت ۵/۳۳g/L (۱/۲۸g) بود. البته هر دو غلظت PVP نیز تأثیر بسزایی در افزایش وزن تر ریشه‌ها داشتند (۱/۳۶g) اما تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف این تیمار مشاهده نگردید. همچنین آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر نوع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان قهوه‌ای شدن، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). با بررسی تفاوت میزان قهوه‌ای شدن در نمونه‌های مختلف و در انواع محیط‌های بافری مشاهده شد که حداکثر میزان قهوه‌ای شدن (۲۴/۵) در نمونه‌های شاهد رخ‌داده است، در حالیکه کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن در تیمار زغال فعال با غلظت ۱/۵g/L (۵/۵) و پس از آن در زغال فعال ۳g/L و (۱/۵ PVP g/L) (۸/۵) مشاهده گردید (البته باید بیان کرد که در میان هر دو غلظت PVP و زغال فعال تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید). به‌نحوی که به‌ترتیب بافرهای MES بافر و پس از آن اسید آسکوربیک کمترین تأثیر را بر میزان قهوه‌ای شدن از خود نشان دادند (شکل ۱). با توجه به این اطلاعات می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً قهوه‌ای شدن ریشه‌ها با میزان رشد آنها رابطه معکوس دارد.



شکل ۲- ریشه‌های مویین زرین گیاه

الف: ریشه‌های قهوه‌ای شده در زیر لوپ، ب: نمونه شاهد پس از گذشت ۱۵ روز،

ج: نمونه تیمار شده با زغال فعال درغلظت ۱/۵ g/L پس از گذشت ۱۵ روز

www.SID.ir

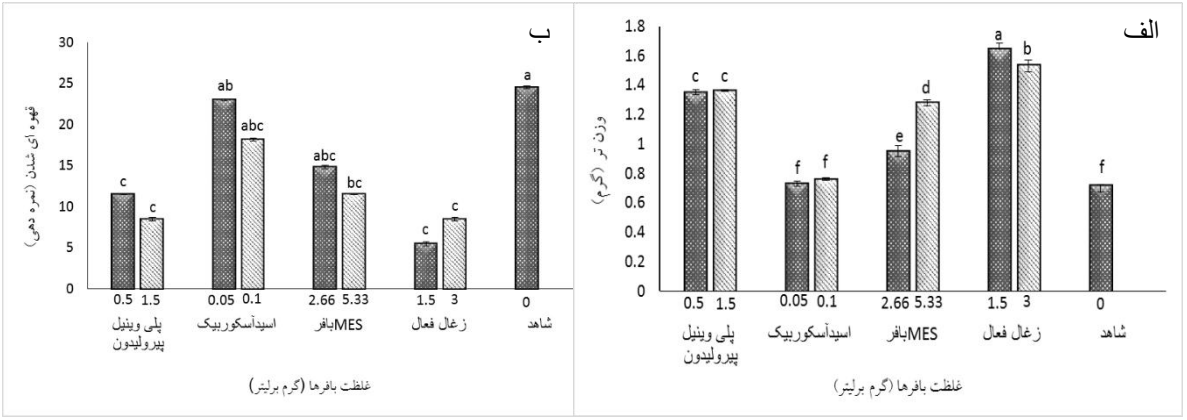
Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر بافرها و مواد ضد اکسایشی بر وزن تر، میزان قهوه‌ای شدن، فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین زرین گیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		وزن تر	قهوه‌ای شدن	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز
تیمار	۱۰	۰/۳۱۱**	۰/۱۸۸**	۲۳/۹۲**	۲۸/۸۹**	۱۳/۳۸۲**	۱/۹۸۳**	۰/۰۱۳*	۰/۰۳۹*
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۰۰۰۷	۰/۰۱۸	۷/۳۴	۰/۸۸۶	۰/۳۳۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)		۲/۴۰	۹/۰۹	۱۰/۷۵	۱۳/۲۱	۱۰/۶۱	۳/۳۵	۲۳/۸۴	۴/۷۳

*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

**: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۲- اثر نوع و غلظت بافر و مواد ضد اکسایش بر الف: وزن تر ریشه‌های مویین، ب: میزان قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین زرین گیاه در محیط مایع

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد.

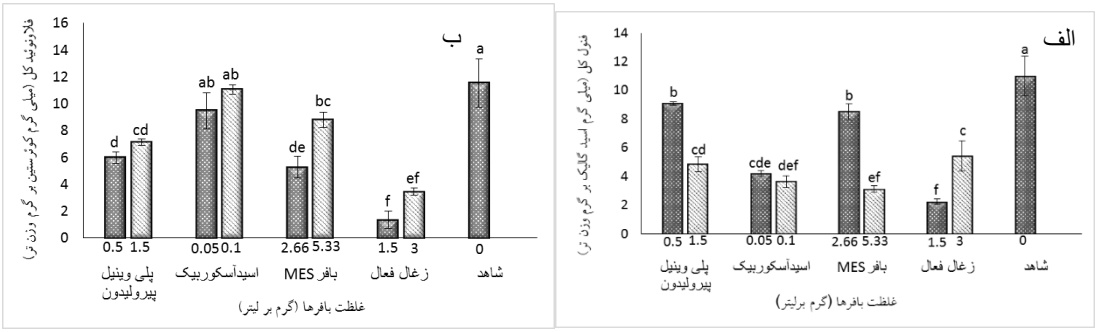
www.SID.ir

Archive of SID

اثر نوع و غلظت بافر بر میزان فنل و فلاونوئید کل

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر انوع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان فنل کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱$) (جدول ۱). حداکثر میزان فنل کل در نمونه‌های شاهد (فاقد ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی) (۱۵/۶۴mg/g FW) مشاهده گردید که این مقدار ۶/۹ برابر میزان فنل کل در ریشه‌های مویین تحت تیمار زغال فعال (۱/۵g/L) و ۳/۲۲ برابر میزان فنل کل در ریشه‌های تیمار شده با PVP (۱/۵g/L) بود. مؤثرترین ماده در کاهش میزان فنل کل زغال فعال ۱/۵g/L (۲/۲۴mg/g FW) بود. کمترین میزان تأثیر در میان بافرها نیز مربوط به MES بافر ۲/۶۶g/L (۸/۵۲mg/g FW) و PVP با غلظت ۰/۵g/L (۹/۰۹mg/g FW) بود (شکل ۳).

از سوی دیگر آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر انواع بافرها بر میزان فلاونوئید کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱$) (جدول ۱). حداقل میزان فلاونوئید کل در هر دو تیمار زغال فعال ۱/۵g/L (۱/۳۴mg/g FW) و ۳g/L (۳/۴۵mg/g FW) و حداکثر میزان فلاونوئید کل در نمونه‌های شاهد (mg/g ۱۱/۵۵FW) مشاهده گردید. پس از آن بیشترین میزان فلاونوئید کل به‌ترتیب در اسید آسکوربیک (۰/۱g/L) (۱۱/۰۷mg/g FW) و اسید آسکوربیک (۰/۰۵g/L) (۹/۴۸mg/g FW) مشاهده شد. پس از این تیمارها به‌ترتیب MES بافر ۵/۳۳g/L (۸/۸۲mg/g FW) و هر دو غلظت ۱/۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر PVP (۷/۱۳mg/g FW) (mg/g ۶FW) دارای حداکثر میزان فلاونوئید کل بودند (شکل ۳).



شکل ۳- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر الف: محتوای فنل کل، ب: فلاونوئید کل ریشه‌های مویین زرین گیاه

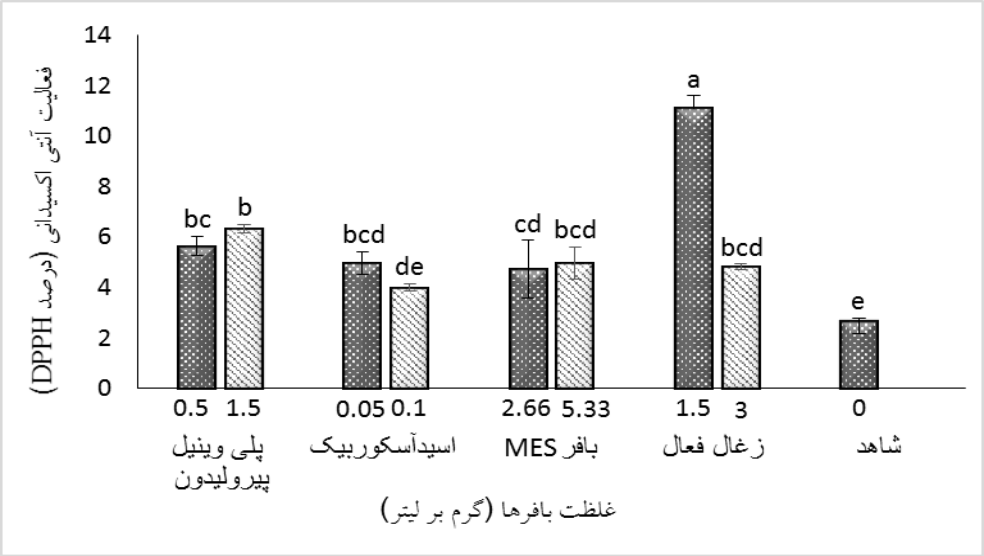
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد.

اثر نوع و غلظت بافر بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین زرین گیاه نشان داد که پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال بافرهای مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری در تمام محیط کشت‌های بافری نسبت به شاهد افزایش یافته است ($P<۰/۰۱$) (جدول ۱). حداقل میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های شاهد (۲/۶۶٪) و پس از آن در تیمار اسید آسکوربیک ۰/۱g/L (۳/۹۹٪) مشاهده شد. افزایش چشمگیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار با زغال فعال ۱/۵g/L (۱۱/۱۰٪) مشاهده گردید. همچنین PVP (۱/۵g/L) (۶/۳۲٪) نیز تأثیر بسزایی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با نمونه‌های شاهد داشت. تأثیر بافرهای اسید آسکوربیک ۰/۱g/L (۳/۹۹٪) و MES بافر ۲/۶۶g/L (۴/۷۲٪) مشاهده نشد. افزایش ۴ برابری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زغال فعال نسبت به شاهد حکایت از آن دارد که این غلظت از زغال فعال می‌تواند برای جلوگیری از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن بسیار مؤثر و تأثیرگذار باشد (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین زرین گیاه

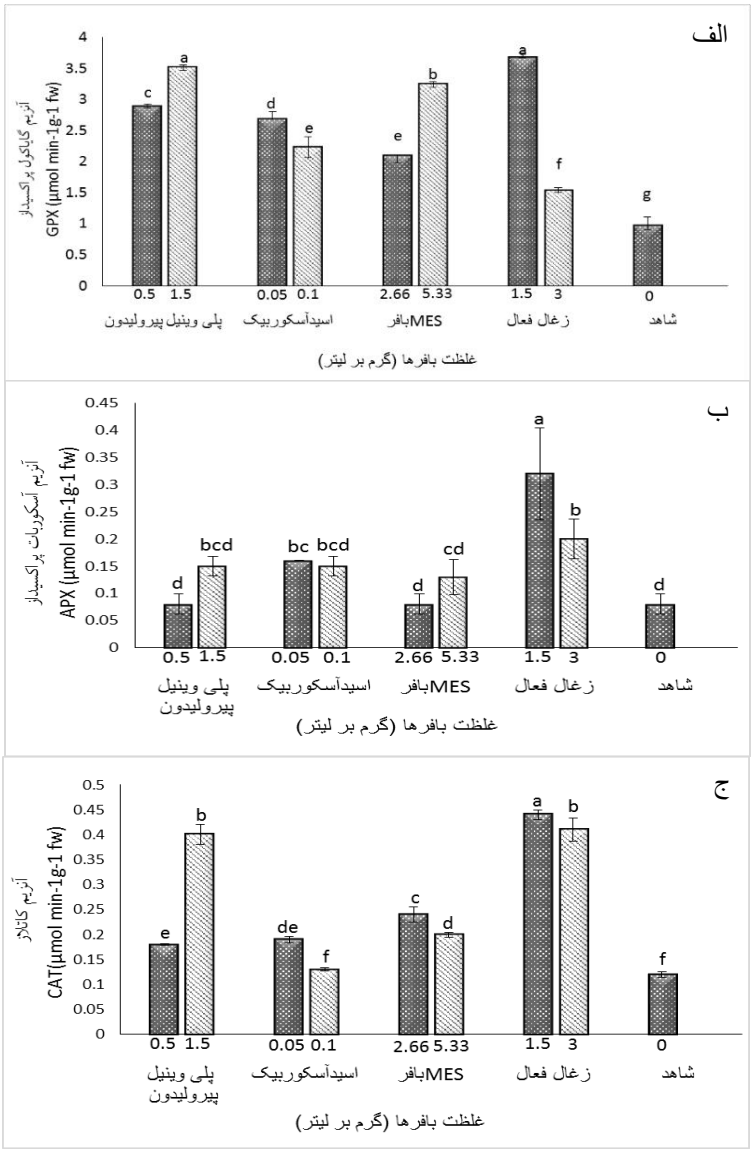
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ براساس آزمون دانکن می‌باشد.

اثر نوع و غلظت بافر بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

مقایسه میانگین اثر نوع و غلظت بافر بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز نشان داد که اختلاف معنی‌دار در سطح ($P<۰/۰۵$) و در آنزیم گایاکول پراکسیداز اختلاف معنی‌دار در سطح ($P<۰/۰۱$) بین تیمارها وجود دارد (جدول ۱). براساس نتایج مقایسات میانگین، کمترین میزان فعالیت هر سه آنزیم گایاکول پراکسیداز (۰/۹۸µmol/min.g.FW)، آسکوربات پراکسیداز (۰/۰۸µmol/min.g.FW) و کاتالاز (۰/۱۲µmol/min.g.FW) در نمونه‌های شاهد و حداکثر میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (۳/۶۷µmol/min.g.FW)، آسکوربات پراکسیداز (۰/۳۲µmol/min.g.FW) و کاتالاز (۰/۴۴µmol/min.g.FW) در نمونه‌های تیمار شده با زغال فعال ۱/۵g/L مشاهده گردید. البته باید توجه داشت که تأثیر سایر تیمارها بر میزان فعالیت هر یک از آنزیم‌ها متفاوت بوده است. به‌عنوان مثال تیمار PVP (۱/۵g/L) سبب افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (۳/۵۱µmol/min.g.FW) و کاتالاز (۰/۴۰µmol/min.g.FW) گردید، در حالیکه تأثیر چندانی بر افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۰/۱۵ µmol/min.g.FW) نداشت. همچنین زغال فعال ۳g/L تأثیر بسزایی در افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (۰/۲۰µmol/min.g.FW) و کاتالاز (۰/۴۱µmol/min.g.FW) داشت اما این تیمار پس از شاهد کمترین تأثیر را بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (۱/۵۴µmol/min.g.FW) نشان داد. نکته قابل توجه تأثیر پایین اسید آسکوربیک و MES بافر بر میزان فعالیت هر سه آنزیم گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز می‌باشد. به‌عنوان مثال تفاوت معنی‌داری بین تیمار اسید آسکوربیک ۰/۱g/L (۰/۱۳µmol/min.g.FW) و شاهد در فعالیت آنزیم کاتالاز و بین MES بافر ۲/۶۶g/L (۰/۰۸µmol/min.g.FW) و شاهد در آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشاهده نشد. MES بافر ۵/۳۳g/L (۳/۲۴µmol/min.g.FW) و اسید آسکوربیک ۰/۰۵g/L (۲/۶۸µmol/min.g.FW) نسبت به سایر آنزیم‌ها بیشترین تأثیر را بر آنزیم گایاکول پراکسیداز داشتند (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر

الف: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (معنی‌دار در سطح ۱٪)، ب: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (معنی‌دار در سطح ۵٪)، ج: فعالیت آنزیم کاتالاز (معنی‌دار در سطح ۵٪) در ریشه‌های مویین زرین گیاه

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد.

بحث

ریشه‌های مویین زرین گیاه به‌دلیل غنی بودن از مواد مختلف فنلیکی، در معرض اکسیژن محیط کشت به سرعت قهوه‌ای می‌شوند. قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین به‌طور عمده به‌دلیل اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی محتوای آنهاست. ترکیب‌های فنلی اکسید شده جزو مواد مسموم‌کننده بافت‌های زنده بوده و بدین‌ترتیب اثر بازدارندگی در رشد توده ریشه‌های مویین دارند (Al-Khayri *et al.*, 2017). تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق با کنترل pH در محدوده تنظیم شده اولیه مانع اکسیداسیون بیشتر ترکیب‌های فنلی ریشه‌ها و

www.SID.ir

Archive of SID

قهوه‌ای شدن آنها می‌شوند (Krishna *et al*., 2008). ترکیب‌های رایج محیط‌های کشت بافتی ظرفیت کمی از خاصیت بافری دارند، به همین علت توانایی کنترل کاهش pH در اثر اکسید شدن ترکیب‌های فنلی را نداشته و نمی‌توانند از قهوه‌ای شدن بافت‌ها جلوگیری کنند. محققان مختلفی دریافتند که اسیدهای آلی و نمک‌های سدیمی و پتاسیمی آنها می‌توانند pH محیط کشت‌های درون شیشه‌ای را پایدار نگه دارند. اگرچه باید متذکر شد که این اسیدها به اندازه بافرهای سنتزی مؤثر نمی‌باشند. همچنین می‌توان از طریق افزودن اسیدهای آلی به رشد بافت‌ها کمک کرد (George *et al*., 2008).

مهار آنزیم PAL که عامل اصلی در قهوه‌ای شدن و تغییر pH می‌باشد از طریق استفاده از مواد ضد اکسایشی مانند زغال فعال، توان قابل توجهی برای کاهش بیوسنتز ترکیب‌های فنلی ایجاد می‌کند. همچنین مهار فعالیت آنزیم PAL و اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی ممکن است یک منبع جدید از منابع کربن را ایجاد کرده و یا با تنظیم‌کننده‌های رشد درونی گیاهان ارتباط برقرار کند که از این طریق می‌تواند به افزایش رشد نیز کمک کند (Maxwell *et al*., 2013). در آزمایش‌هایی بر روی سرخالو (*Litchi chinensis*) به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها از ترکیب اسید آسکوربیک و اسید سیتریک استفاده شد که این ترکیب مؤثر بوده و سبب توقف قهوه‌ای شدن گردید. در حالیکه استفاده از هر یک از این آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی تأثیری بر بهبود کشت ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای نداشت (Soleimani *et al*., 2012). نتایج بدست‌آمده از آزمایش‌ها با نتایج Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. اسید آسکوربیک جزو آنتی‌اکسیدان‌هایی است که تأثیر آن در مقایسه با بافرهای سنتزی چندان چشمگیر نبوده و به تنهایی تغییرات معنی‌داری را در کنترل pH محیط کشت ایجاد نمی‌کند. زیرا این بافر تأثیر چندانی بر کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تولید شده بر اثر تنش حاصل از تغییر محیط کشت ریشه‌ها ندارد (George *et al*., 2008). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز از طریق فعالیت خود سبب اکسید شدن ترکیب‌های فنلی تولیدی و در نتیجه قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین می‌شود، در نتیجه این امر، بافت مردگی در ریشه‌ها رخ داده و عملاً رشد بیشتر ریشه‌ها متوقف شده و وزن زیست‌توده نیز کاهش می‌یابد (George *et al*., 2008).

یکی از بافرهای مؤثر، MES بافر می‌باشد اما باید توجه کرد که ظرفیت اثرگذاری این بافر به گونه گیاهی و غلظت مورد استفاده نیز بستگی دارد. MES بافر برحسب گونه گیاهی می‌تواند سبب مرگ پروتوپلاست و یا به خوبی سبب افزایش درصد تقسیم سلولی و یا باززایی گیاه شود. MES بافر برای بسیاری از گیاهان سمی نبوده اما برخی از گیاهان نسبت به آن حساس می‌باشند (Ramage & Williams, 2002). Ramage و Williams (۲۰۰۲) گزارش کردند که MES بافر بر جوانه‌زنی شاخساره تنباکو، حتی با افزایش غلظت تا حد ۱۰۰ میلی‌مولار نیز مؤثر واقع نشد. Morgan و همکاران (۲۰۰۰) کاربرد مؤثر بافر MES در غلظت ۵۰mM را در محیط کشت MS مایع در ریشه‌های مویین گل پریوش (*Catharanthus roseus*) گزارش کردند. در این پژوهش باتوجه به برداشت ریشه‌های زرین گیاه در روز ۲۱، تأثیر منفی MES بافر بر کاهش وزن ریشه‌ها مشاهده نشد. همچنین هر دو غلظت MES بافر نسبت به اسید آسکوربیک مؤثرتر واقع گردید که این ترکیب می‌تواند از طریق کنترل pH موجب کاهش قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نسبت به شاهد و اسید آسکوربیک و افزایش رشد ریشه‌ها در مقایسه با دو تیمار دیگر شود. از سوی دیگر به احتمال زیاد تأثیر MES بافر را می‌توان به گونه گیاهی زرین گیاه نیز نسبت داد، زیرا همان‌گونه که در بالا ذکر شد MES بافر می‌تواند در گونه‌های گیاهی مختلف، تأثیرات متفاوتی بر درصد تقسیم سلولی یا باززایی گیاه داشته باشد.

کاربرد ۰/۵٪ PVP در محیط کشت گیاه *Myrica esculenta*، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را تا ۷۹/۶۱٪ کاهش داد. همچنین تأثیر مثبت PVP در کاهش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای گیاه در *Cleistanthus collinus*، *Tectona grandis* و *Gossypium hirsutum* گزارش شده است (Soleimani *et al*., 2012). در ریزازدیادی خرما غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

۱/۵g/L زغال فعال به صورت قابل توجهی از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها جلوگیری کرده و سبب افزایش رشد آنها گردید (Chiou *et al*., 2007). طبق نتایج این تحقیق نیز PVP و زغال فعال هر دو در افزایش رشد ریشه‌های مویین و جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنها مؤثر بودند. بنابراین می‌توان بیان کرد که نتایج این تحقیقات در راستای تحقیقات Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) و Chiou و همکاران (۲۰۰۷) بود.

Shirazi و همکاران (۲۰۱۸) در ریشه‌های تراریخت شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) تأثیر مثبت زغال فعال ۱٪ در محیط کشت MS مایع را گزارش کردند. گرچه ترکیب‌های فنلی معمولاً در بافت‌های سالم گیاهی وجود دارند و می‌توانند در سلول‌های اختصاصی انباشته شوند، با این حال پس از زخم شدن بافت و یا در شرایط تنش به‌عنوان یک پاسخ دفاعی به فراوانی تولید می‌شوند (Maxwell *et al*., 2013). اصلی‌ترین علت قهوه‌ای شدن را می‌توان وجود ترکیب‌های فنلی فراوان در زرین گیاه و اکسید شدن آنها توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز دانست که ممکن است تقریباً در تمام گیاهان یافت شود. این آنزیم در بافت‌های گیاهی مسئول قهوه‌ای شدن بافت‌ها بوده و نقش با اهمیتی در کنترل فرایندهای اکسیداتیو دارد. فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط تنش‌زا، از قبیل آسیب مکانیکی و تغییر در موقعیت بیوشیمیایی افزایش می‌یابد (Krishna *et al*., 2008). به همین علت می‌توان یکی از دلایل قهوه‌ای شدن ریشه‌ها در محیط فاقد بافر را فعالیت بیش از حد آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اثر جابجایی ریشه‌ها از محیط جامد به محیط مایع دانست (Maxwell *et al*., 2013). Yusefi و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر کالوس‌زایی و تراوش ترکیب‌های فنلی در کشت درون شیشه‌ای نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) نشان دادند که غلظت ۳۰۰mg/L اسید آسکوربیک بر کاهش تولید ترکیب‌های فنلی تأثیرگذار بود، در حالیکه غلظت‌های پایین‌تر تأثیر چندانی ایجاد نکردند. نتایج این تحقیق با نتایج این پژوهش بر تأثیر غلظت‌های کمتر اسید آسکوربیک هم‌راستا بود. بافرها از طریق تأثیر بر میزان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر به‌عنوان بازدارنده فرایند اکسیداتیو و از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و به تبدیل شدن رادیکال‌های آزاد به گونه‌هایی با فعالیت کمتر کمک می‌کنند که به این طریق مانع اکسید شدن ترکیب‌های فنلی و قهوه‌ای شدن بافت گیاهی می‌شوند (Krishna *et al*., 2008). تجمع آنتی‌بادی‌های تولید شده در ریشه‌های مویین در محیط کشت می‌تواند به‌وسیله افزودن عامل پایدارکننده پروتئین‌ها از قبیل PVP بهبود یابد. تحقیقات پیشین نیز نشان دادند که افزودن عامل پایدارکننده پروتئین‌ها (PVP) در محیط کشت می‌تواند سبب افزایش پایداری آنتی‌بادی شود (Lonoce *et al*., 2016). بافرهای آنتی‌اکسیدانی از قبیل اسید آسکوربیک با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مانند کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی سبب کاهش تنش اکسیداتیو می‌گردند (Daneshmand, 2014). در این تحقیقات نیز ممکن است مواد استفاده شده از طریق واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در حذف و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن شرکت کرده و ریشه‌ها را از تنش اکسیداتیو محافظت نمایند. البته کاهش ترکیب‌های فنلی تنها در ابتدای مراحل کشت بوده و با افزایش رشد ریشه‌ها، کاهش این ترکیب‌ها در عملکرد کلی می‌تواند جبران شود و از سوی دیگر در کشت مقیاس بزرگ در محیط کشت مایع نیاز کمتری به این ترکیب‌های کنترل کننده pH می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. and Johnson, D., 2017. Date Palm Biotechnology Protocols: Volume I: Tissue Culture Applications (Methods in Molecular Biology). Humana Press, 346p.
- Bergmeyer, H.U., 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag chemie, Weinheim, New York, 682p.
- Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K., 2007.

www.SID.ir

Archive of SID

hairy roots. Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 262-265.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22(5): 867-880.
- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S. and Doorn, W.G.V., 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. Postharvest Biology and Technology, 30(2): 187-193.
- Pezeshki, S. and Petersen, M., 2018. Rosmarinic acid and related metabolites: 25-60. In: Schwab, W., Lange, B.M. and Wüst, M., (Eds.). Biotechnology of Natural Products. Springer, 316p.
- Ramage, C.M. and Williams, R.R., 2002. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. Journal of Experimental Botany, 53: 1437-1443.
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D. and Watkins, C.B., 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45: 349-357.
- Shirazi, Z., Alami, A., Tohidfar, M. and Sohani, M.M., 2018. Metabolic engineering of glycyrrhizin pathway by over-expression of beta-amyrin 11-oxidase in transgenic roots of *Glycyrrhiza glabra*. Molecular Biotechnology, 60(6): 412-419.
- 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.
- Soleimani, T., Keihanfar, M., Piri, Kh. and Hasanlu, T., 2012. Hairy root induction in burdock (*Arctium lappa* L.). Journal of Medicinal Plants, 4(44): 176-184.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.
- Yusefi, Z., Majd, A., Kolahi, M. and Jonubi, P., 2015. Effect of ascorbic acid on callus induction and exudation of phenolic compounds on in vitro culture of *Saccharum officinanum* L. varieties cp48-103. Second National Conference on Cellular and Molecular Genetics, Parand city, 10-11 November: 3.
- Zhang, J., Liu, H., Sun, Y., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2, 4-dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19(1): 185-190.

Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry, 102(2): 516-522.
- Daneshmand, F., 2014. The effect of ascorbic acid on reducing oxidative stress from salinity in potato. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 27(3): 417-426.
- Dennis, T.T., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.
- Ebrahimi, R., Jafari, M., Ghadimzade, M. and Abdollahi Mandolkani, B., 2015. Optimization of induction and culture conditions of transgenic muine roots in medicinal plant of *Scrophularia deserti*. Journal of Agricultural Biotechnology, 7(4): 1-20.
- Fattahi, M., Bonfill, M., Fattahi, B., Claveria, L.T., Sefidkon, F., Cosid, R.M. and Palazon, J., 2016. Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschyi* Boiss at three phenological stages using uni- and multivariate methods. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3(4): 177-185.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J., 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer-Verlag, New York, LLC, 501p.
- Hajimahdipour, H., Khanavi, M., SHekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M., 2009. Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plants, 4(8): 145-152.
- Khan, S., Irfan, Q.M., Kamaluddin, A.T. and Abdin, M.Z., 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology, 6: 175-178.
- Krishna, H., Sairam, R.K., Singh, S.K., Patel, V.B., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L. and Sachdev, A., 2008. Mango explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae, 118(2): 132-138.
- Lonoce, C., Salem, R., Marusic, C., Jutras, P.V., Scaloni, A., Salzano, A.M., Lucretti, S., Steinkellner, H., Benvenuto, E. and Donini, M., 2016. Production of a tumour-targeting antibody with a human compatible glycosylation profile in *N. benthamiana* hairy root cultures. Biotechnology Journal, 11(9): 1209-1220.
- Maxwell, A., Jones, P. and Saxena, P.K., 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. PLoS One, 8: 10.e76802.
- Morgan, J.A., Barney, C.S., Penn, A.H. and Shanks, J.V., 2000. Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus*

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of buffer materials and antioxidants on growth rate and biochemical characteristics of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. hairy roots

F. Naseri[1], B. Hosseini[2*] and L. Naseri[3]

1- M.Sc. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: March 2019 Revised: October 2019 Accepted: October 2019

Abstract

Rosmarinic acid (RA) is considered as one of the most important polyphenols. It is an ester of 3, 4-dihydroxyphenyl actic and caffeic acids and as an antioxidant significantly reduces the DNA damage induced by the anticancer compound doxorubicin. Hairy roots of *Dracocephalum kotschyi* Boiss contain rosmarinic acid with biological and anticancer activities. However, due to the high production of phenolic compounds in liquid medium, the hairy roots encounter with tissue browning and death problem. In this study, the effect of antioxidant compounds on growth of *D. kotschyi* hairy roots and inhibition of tissue browning has been surveyed. In vitro Hairy roots were induced by inoculation of two-weeks-old cotyledons of *D. kotschyi* via *Agrobacterium rhizogenes* (15834 strain). Gene transformation confirmed by PCR using rol B gene specific primers. In order to optimize the growth and prevent the tissue browning, hairy roots were cultured in ½MS liquid medium containing different buffers and antioxidants including ascorbic acid (0.05 and 0.1 g/L), MES buffer (2.66 and 5.33 g/L), activated charcoal (1.5 and 3 g/L) and polyvinyl pyrrolidone (0.5 and 1.5 g/L) in two concentrations. In order to record the quality of hairy roots under the influence of different chemicals, the phytochemical properties of samples (total phenol and flavonoid, antioxidant activity and antioxidant enzymes activity) were analyzed by spectrophotometer. Results after 21 days showed that the maximum biomass (1.64 g) and the lowest tissue browning was obtained in ½MS media containing activated charcoal (1.5 g/L). And after AC the highest biomass was observed on both PVP concentrations (1.36 g) and the highest browning and growth loss was observed in the control samples. The maximum and minimum amount of total phenol and flavonoid were observed in control samples and 1.5 g/L of activated charcoal treatment, respectively. The highest and the lowest levels of total antioxidant activity and antioxidant enzymes were related to 1.5 g/L of activated charcoal and control samples, respectively. It is considerable that the inhibition of PAL enzyme by using antioxidants such as activated charcoal and PVP has a potential to reduce biosynthesis of phenolic compounds and prevent the browning.

Keywords: *Agrobactrium rhizogenes*, transgenic root, total phenol, browning.

www.SID.ir