

تجمع رزمارینیک اسید و بیان ژن آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز در گیاهچه‌های بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) تیمار شده با نانو ذره اکسید مس

علی ریاحی مدوار^{۱*}، معین الدین نصیری بزنجانی^۱، فاطمه رضائی^۲ و امین باقی‌زاده^۱

^۱ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.

^۲ مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه فیزیولوژی گیاهی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۸



چکیده

رزمارینیک اسید یک ترکیب با ارزش دارویی است و در گیاهان از طریق مسیر بیوستتزی فنیل پروپانوییدی تولید می‌شود. در این تحقیق، محتوی رزمارینیک اسید، فلاونوئید کل و همچنین بیان ژن آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) در گیاهچه‌های ۳۰ روزه بادرنجبویه تیمار شده به مدت ۸ ساعت با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (۰، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی-گرم بر لیتر) مورد آنالیز قرار گرفت. محتوی رزمارینیک اسید گیاهچه‌های تیمار شده در تمامی غلظتها به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. بیشترین محتوی این ماده مؤثره در تیمار گیاهچه‌ها با پایین‌ترین غلظت نانوذره مشاهده شد و با افزایش غلظت نانوذره در محیط محتوی آن کاهش یافت. جالب توجه اینکه، بیان ژن آنزیم TAT نیز الگویی مشابه با محتوی رزمارینیک اسید نشان داد. محتوی فلاونوئید کل گیاهچه‌های تیمار شده نیز به صورت گرادیان تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت و در بالاترین غلظت به صورت معنی‌داری نسبت به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده، چنین به نظر می‌رسد که این نانوذره با تأثیر بر بیان ژنهای درگیر در بیوستتزی ترکیبات فنلی محتوی فلاونوئید و رزمارینیک اسید را تحت تأثیر قرار داده است.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه، رزمارینیک اسید، نانو ذرات اکسید مس، فلاونوئید.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱، پست الکترونیکی: riahi.ali@gmail.com

مقدمه

کافنیک اسید، ۱۰ برابر ویتامین A و E خواص آنتی-اکسیدانی دارد (۱۷). بیشتر خواص درمانی این گیاه را به ماده مؤثره آن یعنی رزمارینیک اسید نسبت می‌دهند (۲۹).

رزمارینیک اسید، یک استر از کافنیک اسید و ۳، ۴-دی-هیدروفنیل لاکتیک اسید است که در گیاهان از طریق مسیر بیوستتزی فنیل پروپانوییدی تولید می‌شود (۳۰). اسید آمینه‌های تیروزین و فنیل آلانین، سوبستراهای این مسیر بیوستتزی بوده و آنزیمهای تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمینو لیااز (PAL) آنزیمهای اصلی کاتالیز کننده این مسیر می‌باشند (شکل ۱) (۳۰). نتایج منتشر شده

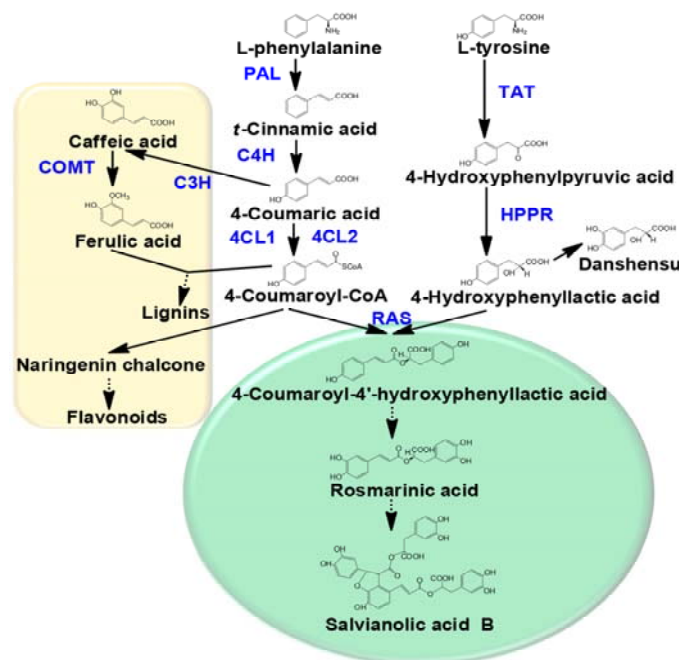
گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) از رده دو لپه‌ایها، راسته لب‌گلیها، خانواده نعنائیان (Lamiaceae) و جنس بادرنجبویه‌ها است و دارای دو گونه *M. officinalis* و *M. romana* می‌باشد. این گیاه دارویی پراکنش وسیعی از غرب اروپا (۴) تا نواحی غربی و مرکزی ایران را دارد (۲).

امروزه از اسانس این گیاه به وفور در زمینه‌های مختلفی از قبیل پزشکی، غذایی، عطرسازی و آرایشی استفاده می‌شود (۱). این گیاه دارای خواص ضد توموری (۳۰)، ضد باکتریایی و ضد ویروسی (۸، ۱۰ و ۲۸) است. بادرنجبویه به دلیل داشتن ترکیبات فنلی نظیر رزمارینیک اسید و

آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید معرفی نمودند (۳۷).

به دلیل اهمیت دارویی و کاربردهای صنعتی رزمارینیک اسید، تاکنون تولید آن در گونه‌های گیاهی مختلفی از قبیل *Salvia*، *Orthosiphon aristatus*، *Melissa officinalis* و *multiorrhiza* و *Coleus blumei* تحت تأثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴، ۲۱، ۲۲، ۲۶ و ۳۷).

توسط یان و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که تجمع رزمارینیک اسید در گیاه مریم‌گلی (*Salvia multiorrhiza*) تحت تیمار با عصاره مخمر افزایش یافت. آنها گزارش کردند که تحت این تیمار فعالیت آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز افزایش یافته، درحالی که فعالیت آنزیم PAL تغییر نکرده بود. آنها افزایش در فعالیت آنزیم TAT را دلیل افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید دانستند و آن را



شکل ۱- شمای کلی مسیرهای بیوسنتزی رزمارینیک اسید از سوبسترهای تیروزین و فنیل آلانین (۳۰).

حالت حجیم تغییر می‌کند (۲۷). این مواد در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، میکروالکترونیک، نساجی، ساختمان سازی، پزشکی و کشاورزی کاربردهای بسیار زیادی دارند (۱۳، ۱۶، ۲۳ و ۳۶). گزارشات متعددی تأثیر منفی و مثبت این ذرات بر گیاهان را گزارش نموده‌اند (۱۱، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۳۲ و ۳۸). اخیراً مطالعات انجام شده توسط Aminizadeh و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که محتوی سولفارافان در گیاهچه‌های *Lepidium draba* تحت تیمار با نانوذرات اکسید مس و آهن تحت تأثیر قرار گرفته است (۹). علاوه بر آن تأثیر مثبت نانوذره نقره بر تولید مواد

اهمیت فلاونوئیدها در مقاومت به تنش‌های گوناگونی از قبیل گرما، سرما، خشکی، اشعه ماوراء بنفش و فلزات سنگین به اثبات رسیده است (۳۴). این متابولیتها خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و ثابت شده است که میزان تولید آنها و همچنین بیان ژن مرتبط با سنتز آنها در شرایط اعمال تنش افزایش می‌یابد (۱۸ و ۳۵).

علم نانوتکنولوژی به بررسی ساختار و عملکرد مواد ترکیباتی می‌پردازد که حداقل یکی از ابعاد عملکردی آنها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد (۱۲). با کاهش ابعاد ذرات، ویژگیهای فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی آنها در مقایسه با

طور جداگانه توزین و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلدن در ارلن شیشه‌ای (۲۵۰ میلی‌لیتری) اضافه شدند. گیاهان پس از جمع‌آوری از روی محیط پس از چندین بار آبکشی، به مدت ۸ ساعت در ارلنها در معرض نانوذره قرار گرفتند. برای ایجاد محیطی یکنواخت از لحاظ تیمار و هوادهی لازم، ارلنها در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر با دور rpm ۱۲۰ قرار گرفتند (۲۶).

بعد از گذشت زمان مورد نظر، گیاهچه‌ها از محیط جمع‌آوری و بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل به دو قسمت تقسیم شدند. نیمی از گیاهچه‌ها (بافت کامل گیاهچه) به منظور بررسی محتوی رزمارینیک اسید در سایه و در هوای آزاد خشک شدند و نیمی دیگر به منظور سنجش محتوی فلاونوئید کل و بررسی بیان ژن TAT بلافاصله در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند (۲۶).

سنجش مقدار رزمارینیک اسید: مقدار رزمارینیک اسید با استفاده از روش نصیری بزنجانی و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد (۲۶). به این منظور، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت خشک گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد آسیاب و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۳۰ درصد به آن اضافه گردید. این مخلوط توسط دستگاه سونیکاتور (با استفاده از امواج فرا صوت) به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد تا گیاه به اندازه کافی متلاشی و عصاره آن خارج گردد، سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ در دمای اتاق سانتیفریژ گردید. محلول رویی با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری صاف گردید. جهت تفکیک نمونه‌ها از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Agilent 1100, USA) استفاده شد. فاز جامد شامل ستون ZORBAX SB-C18 (5 μ m) و فاز مایع، شامل یک سیستم حلال دو فازی؛ حلال A (شامل آب و ارتوفسفریک ۱ درصد) و حلال B (متانول و ارتوفسفریک ۱ درصد) به نسبت ۰/۴ و ۰/۶ بود.

مؤثره در گیاه *Artemisia annua* و *Calendula officinalis* ثابت شده است (۱۵ و ۳۹). همچنین افزایش محتوی ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید در گیاه اسطوخودوس (*Lavandua angostiflora*) تحت تیمار با نانوذرات نقره گزارش شده است (۶).

در این تحقیق، میزان تجمع رزمارینیک اسید، فلاونوئید کل و همچنین بیان ژن TAT در گیاهچه‌های ۳۰ روزه بادرنجبویه که به مدت ۸ ساعت با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس تیمار شده بود مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت گیاه: در این تحقیق، از بذرهای نسل اول گیاه بادرنجبویه (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) برای کشت استفاده شد. جهت ضد عفونی بذرهای از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه با سه مرحله آبکشی با آب مقطر استریل بین مراحل استفاده شد. تعداد ۳۰ عدد بذر ضد عفونی شده درون پتری دیش (با قطر ۹ سانتیمتر) بر روی محیط کشت موراشینگ-اسکوگ (MS) (Murashige and Skoog) (۲۴) (1962) حاوی آگار ۰/۸ درصد کشت داده شدند. پتری دیشهای در انکوباتور در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 5 ± 55 درصد و تاریکی مطلق قرار گرفتند. بعد از جوانه زنی بذرهای (روز پانزدهم)، پلیتها به مدت پانزده روز به داخل گلخانه با دمای 25 ± 2 ، رطوبت نسبی 5 ± 55 درصد و سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. گیاهچه‌ها برای بررسی اثر نانوذرات بر محتوی رزمارینیک اسید، فلاونوئید کل و بیان ژن TAT تیمار شدند.

تیمار کردن گیاهچه‌ها: غلظت‌های مختلف (صفر) به عنوان شاهد، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نانو اکسید مس (میانگین اندازه ۶۰ نانومتر، درصد خلوص ۹۸ درصد تهیه شده از شرکت NaBond Technology) به

اضافه و به شدت تکان داده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول روشن‌آور بی‌رنگ به میکروتیوب جدید منتقل و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون روی یخ، مطابق برنامه قبل سانتریفیوژ انجام شد. در ادامه، فاز رویی حذف گردید و به رسوب سفید رنگ مقدار یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد افزوده و این‌بار به مدت ۸ دقیقه با دور ۷۵۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی دور ریخته شد و رسوب در دمای اتاق انکوبه گردید تا خشک شود. در نهایت به رسوب، ۳۰ μL آب تیمار شده با DEPC ۰/۱ درصد اضافه گردید و تا زمان استفاده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. لازم به ذکر است که کلیه مراحل کار در شرایط RNase free و بر روی یخ انجام گرفت. در نهایت کیفیت RNA تخلص شده بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. در ادامه، از RNA استخراج شده کتابخانه cDNA ساخته شد.

به منظور ساخت cDNA، ۲ میکروگرم از RNA کل به تیوبهای ۰/۲ اضافه شد (کلیه مراحل ساخت cDNA روی یخ انجام شد). در ادامه، پس از اضافه نمودن ۲ میکرولیتر پرایمر الیگو dT به تیوپها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس یک میکرولیتر آنزیم RNA (200U) DNA پلی‌مراز وابسته به RNA (RNA (Dependent DNA Polymerase, RT شرکت فرمنتاز)، مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر رونوشت RT (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor و در نهایت آب دیونیزه استریل (RNase free) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوپها اضافه شد. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتهای واکنش به منظور حذف آنزیم RT، تیوپها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همچنین به منظور حذف

از جذب ۳۳۰ نانومتر جهت شناسایی رزمارینیک اسید و همچنین از استاندارد رزمارینیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما) برای تعیین زمان نگهداری نمونه در ستون و مقدار رزمارینیک اسید تولید شده استفاده گردید. مقدار رزمارینیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش گردید.

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید: محتوی فلاونوئید کل گیاهچه‌های بر اساس روش کریزک و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۹). به این منظور، مقدار ۰/۲ گرم از بافت تر (فریز شده) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و اسید استیک گلایسال به نسبت ۱:۹۹) ساییده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موجهای ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian, Cary 50Australia) اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول $A = \epsilon \cdot C \cdot L$ (A، میزان جذب؛ ϵ ، ضریب خاموشی؛ C، غلظت و L، طول مسیر نور) و ضریب خاموشی $3300 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ محتوی فلاونوئید کل محاسبه و محتوی آن بر حسب $\mu\text{M/g FW}$ گزارش گردید.

آنالیز مولکولی: استخراج RNA کل، سنتز cDNA و تکثیر ژن:

به منظور بررسی بیان ژن آنزیم TAT، استخراج RNA کل از گیاهچه‌های فریز شده با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سینا ژن، شماره کاتالوگ: RN7713C) و مطابق روش انجام شده توسط یوسفی و همکاران انجام شد (۷). برای این منظور، ۵۰۰ mg از بافت فریز شده، در حضور نیتروژن مایع ساییده و به میکروتیوب استریل منتقل شد. سپس ۵۰۰ μL از محلول RNX-Plus به آن افزوده و مخلوط کاملاً همگن گردید. مخلوط مذکور به مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه شد، سپس ۲۰۰ μL کلروفرم به آن

مقدار مساوی (۴ میکرولیتر) از محصول PCR هر کدام از ژنها (TAT و GPDH) بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و پس از تفکیک و رنگ آمیزی ژلها با اتیدیوم بروماید، از ژلها وسیله دستگاه ژل داگ عکسبرداری شد. میزان بیان با استفاده از نرم افزار Gene tools و از روی شدت باند تکثیر شده ژن TAT پس از نرمالیز کردن با ژن GPDH ارزیابی شد (۶ و ۲۵). نتایج به صورت درصد بیان ژن در نمونه شاهد گزارش گردید.

آلودگیهای اضافی RNA از آنزیم RNase A (۱ میکرولیتر، ۲۰ دقیقه در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد) استفاده شد. تکثیر TAT و GPDH (به عنوان کنترل داخلی) با استفاده از کتابخانه cDNA و آنزیم DNA Taq پلیمرز در حضور پرایمرهای اختصاصی که توالی آنها در جدول ۱ آمده است انجام شد. واکنش تکثیر این ژنها در جدول ۲ نشان داده شده است.

به منظور بررسی میزان بیان ژن TAT تحت شرایط تیمار، از روش نیمه کمی RT-PCR استفاده شد. به این منظور،

جدول ۱- پرایمرهای مربوط به تکثیر ژن آنزیم تیروزین آمینو ترانسفراز و کنترل داخلی (GPDH).

نام پرایمر	توالی	Tm	GC %
F TAT	5'-GGAGAACGGGAAAAGAGTGA-3'	۵۴/۴	۵۰
R TAT	5'-AAATACTCCGCGATAGCCTC-3'	۵۴/۳	۵۰
F GPDH	5'-GAGTTGATCTGAACGGTTCCTG-3'	۵۵/۵	۵۰
R GPDH	5'-GTTAGACCGGACATGAGGATCG-3'	۵۵	۵۴/۵

*توالی مربوط به پرایمر پیشرو (F) و معکوس (R) ژن تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) بر اساس توالی این ژن در گیاه بادرنجبویه با شماره دستیابی JN863949 و برای ژن GPDH بر اساس توالی این ژن در گیاه *Arabidopsis thaliana* با شماره دستیابی NM_127989.4 ثبت شده در Gene Bank طراحی شدند و توسط شرکت MWG ساخته شدند.

جدول ۲- شرایط تکثیر برای ژنهای TAT و GPDH

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	سیکل
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۴	۱
واسرشته سازی	۹۵	۱	۳۰
اتصال پرایمرها	۵۱	۱	
بسط	۷۲	۱	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

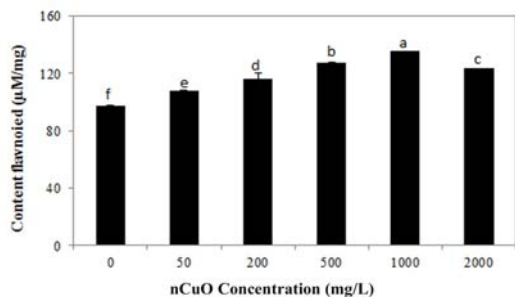
بیانگر معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد، حروف مشابه و مشترک بیانگر عدم معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد می‌باشد.

نتایج

محتوی رزمارینیک اسید: زمان نگهداری رزمارینیک اسید در ستون و همچنین تعیین غلظت آن با استفاده از تزریق

آنالیز آماری: کشت گیاه با سه تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین داده‌ها حاصل از سه تکرار مستقل با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P \leq 0.05$ ، مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند. معنی‌دار بودن نتایج با حروف بر روی هر ستون مشخص گردید. حروف متفاوت

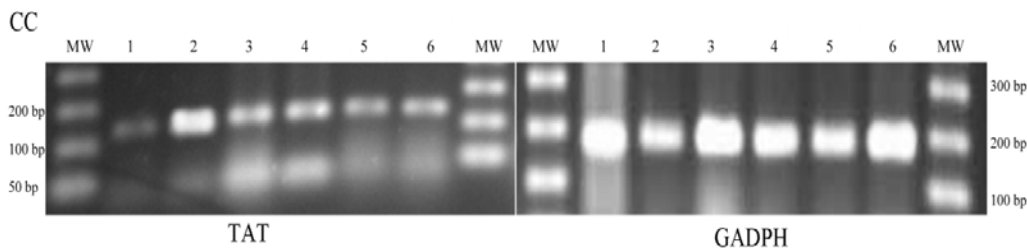
افزایش محتوی فلاونوئیدها تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور گرا دیان و هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط افزایش یافت. اما محتوی آن در تیمار با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور معنی‌داری کاهش نشان داد.



شکل ۳- اثر غلظتهای مختلف نانو ذرات اکسید مس بر محتوی فلاونوئید کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه پس از ۸ ساعت تیمار. آزمایش با ۳ تکرار مستقل انجام شد. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد است.

آنالیز نیمه کمی بیان ژن TAT: کیفیت RNA استخراج شده با تفکیک باندهای rRNA بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. دو باند مربوط به ۲۸S و ۱۸S مشخص کننده کیفیت مناسب RNA تخلیص شده و دست نخورده بودن آن می‌باشد (نتایج نشان داده نشد).

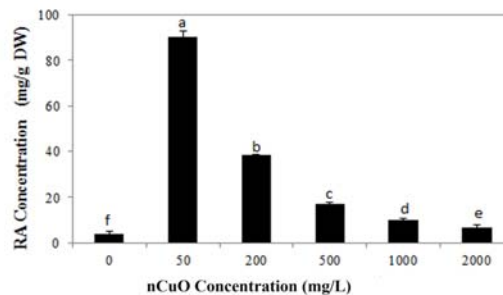
مطابق شکل ۴ قطعه تکثیر شده برای ژن TAT باندی معادل ۱۷۷ bp و برای ژن GPDH باندی معادل ۲۰۰bp بر روی ژل مشاهده شد.



شکل ۴- نمونه‌ای از تصویر ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن TAT و GADPH در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظتهای مختلف نانو ذرات اکسید مس. قطعه تکثیر شده از ژن TAT، باندی معادل ۱۷۷ bp و برای ژن GPDH باندی تقریباً معادل ۲۰۰bp روی ژل در کنار باند مربوط به مارکر وزن مولکولی ظاهر گردید. MW بیانگر مارکر وزن مولکولی و شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب مربوط به تیمارهای صفر، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشند.

غلظتهای مشخصی از نمونه استاندارد به ستون به دست آمد (نتایج نشان داده نشد).

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، تولید رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های تیمار شده با تمامی غلظتهای نانو ذره به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در پایین‌ترین غلظت نانوذره (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) تولید شد ولی با افزایش غلظت نانوذره در محیط، محتوی آن به طور معنی‌داری نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت.



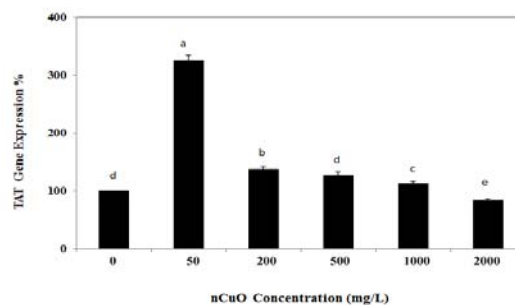
شکل ۲- تأثیر غلظتهای مختلف نانو ذرات اکسید مس بر تجمع رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های بادرنجبویه پس از ۸ ساعت تیمار. آزمایش با ۳ تکرار مستقل انجام شد. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد است.

محتوی فلاونوئید کل: در گیاهچه‌های بادرنجبویه تیمار شده با نانو ذرات اکسید مس، محتوی فلاونوئید کل در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳). همان طور که در شکل قابل مشاهده می‌باشد،

طوری که در بالاترین غلظت نانوذره کاهش محتوی این ماده مؤثره نسبت به نمونه شاهد در سطح ۵ درصد معنی-دار می‌باشد. این مشاهدات با نتایج منتشر شده توسط کمال زاده و همکاران (۵) همخوانی دارد. آنها گزارش کردند محتوی این ماده مؤثره در گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica L.*) بعد از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذره اکسید تیتانیوم تا غلظت ۳۰ ppm افزایش می‌یابد و در غلظت ۵۰ ppm محتوی آن کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج حاصله، بیان ژن TAT در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذره تحت تأثیر قرار گرفته است. همان طور که در شکل‌های ۲ و ۵ مشاهده می‌شود، الگوی تغییرات بیان این ژن با محتوی رزمارینیک اسید گیاهچه-های تیمار شده هماهنگ است. این مشاهدات با نتایج منتشر شده توسط Nasiri-Bezenjani و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی دارد (۲۶). آنها گزارش کردند که بیان ژن TAT در گیاه بادرنجبویه تحت تیمار با عصاره مخمر با تولید رزمارینیک اسید هماهنگ می‌باشد. همچنین مطالعات گذشته نشان داده است که تجمع رزمارینیک اسید در گیاه مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) تحت تیمار با عصاره مخمر با فعالیت آنزیم TAT مرتبط می‌باشد نه با فعالیت آنزیم PAL (۳۷). نتایج به دست آمده بر روی بیان ژن TAT با مشاهدات کمال زاده و همکاران (۵) مغایرت دارد. آنها گزارش کردند که همزمان با افزایش محتوی رزمارینیک اسید در گیاه بادرشبو تیمار شده با نانوذرات اکسید تیتانیوم بیان ژن PAL تحت تأثیر قرار گرفته ولی بیان ژن TAT تحت تأثیر قرار نگرفته است.

از طرف دیگر، محتوی فلاونوئید کل گیاهچه‌های تیمار شده با تمامی غلظت‌های نانوذره اکسید مس نیز به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. در مقایسه با افزایش تولید رزمارینیک اسید و بیان ژن TAT که بیشترین مقدار در غلظت‌های کم نانو ذره مشاهده شد، محتوی این ترکیبات هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت. این

همان طور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، بیان ژن TAT تحت تأثیر نانو ذرات اکسید مس قرار گرفته و میزان بیان آن به طور معنی‌داری در تمامی غلظت‌ها (به جز غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر که نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است) نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است. بیشترین میزان بیان ژن این آنزیم در تیمار با پایین‌ترین غلظت نانوذره مشاهده شد و با افزایش غلظت نانوذره در محیط میزان بیان آن نسبت به غلظت ۵۰ میلی-گرم بر لیتر کاهش یافت.



شکل ۵- میزان بیان ژن TAT در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس. آزمایش با سه تکرار مستقل انجام شد. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد است. حروف متفاوت بالای نمودارها بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس بر مسیر فنیل پروپانوئیدی شامل محتوی فلاونوئید کل و ماده مؤثره رزمارینیک اسید و همچنین بیان ژن TAT در گیاهچه‌های ۳۰ روزه بادرنجبویه مورد آنالیز قرار گرفت.

بر اساس نتایج حاصله، تولید رزمارینیک اسید در گیاهچه-های بادرنجبویه تیمار شده با نانو ذرات اکسید مس تحت تأثیر قرار گرفت و افزایش معنی‌دار این ماده در تیمار با تمامی غلظت‌های این نانوذره نسبت به شاهد مشاهده گردید. بیشترین محتوی این ماده مؤثره در پایین‌ترین غلظت نانوذره (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده گردید ولی با افزایش غلظت نانو ذره در محیط محتوی آن کاهش یافت به

و بیان ژن TAT به خوبی نشان داده شد. تاکنون گزارشی مبنی بر افزایش محتوی رزمارینیک اسید و بیان ژن TAT تحت تیمار با این نانوذره منتشر نشده است. چنین به نظر می‌رسد که تحریک این مسیر با نانوذره اکسید مس از طریق تحریک بیان ژن‌ها درگیر در این مسیر بیوستیزی (مثلاً TAT) صورت گرفته است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان با قرارداد شماره ۱/۲۶۷۴ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

نتایج می‌تواند به دلیل فعال شدن مسیر PAL در غلظتهای بالای نانوذره و در نتیجه افزایش محتوی فلاونوئیدها باشد. PAL یکی از آنزیمهای اصلی مسیر فنیل پروپانوییدی می‌باشد (۳۰) و افزایش فعالیت آن تحت تیمار با یون مس در برگهای گیاه *Phyllanthu stenellus* و افزایش بیان ژن آن تحت تیمار با نانوذرات اکسید تیتانیوم در گیاه *Dracocephalum moldavica* گزارش شده است (۵) و (۳۱). تغییر بیان ژن‌ها تحت تیمار با یون مس (۷) و حتی تغییر توالی DNA موجودات تحت تیمار با نانو اکسید مس گزارش شده است (۳).

در مجموع، این مشاهدات بیانگر تحت تأثیر قرار گرفتن مسیر سنتز فنیل پروپانوییدی تحت تیمار با این نانوذره می‌باشد که با افزایش محتوی فلاونوئید کل، رزمارینیک اسید

منابع

- ۵- کمال زاده، م.، بی‌همتا، م.، پیغمبری، س.ع. و هادیان، ج. ۱۳۹۲. بیان ژنهای مسیر بیوستیز رزمارینیک اسید بادرشبو تحت تأثیر نانوذره. ژنتیک در هزاره سوم. ۱(۱)۱۲، ۳۴۳۶-۳۴۲۸.
- ۶- علیرضایی، ف.، کبارستمی، خ. و حسین زاده نمین، م. ۱۳۹۳. اثر نانو نقره بر ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید در کالوس های حاصل از کشت بافت گیاه اسطوخودوس. اولین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران.
- ۷- یوسفی، ک.، ریاحی مدوار، ع. و باقی زاده، ا. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر الیستورهای نقره و مس بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گیاهچه‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بومی ایران. مجله زیست‌شناسی ایران (مجله پژوهش‌های گیاهی). ۲۸ (۱)، ۲۲۳-۲۱۰.
- ۸- Allaverdiev, M., Damien Dorman, H.J., Onionen, P. and Hiltunens, R., (2007) Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a Lemon Balm extract. *J Herbs Spices Med Plants*. 7, 391-400.
- 9- Aminizadeh, M. Riahi-Madvar, A. and Mohammadi, M. 2016. Nano-Metal Oxides Induced Sulforaphane Production and Peroxidase Activity in Seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *Progress in Biological Sciences*. 6(1), 75-83.
- 10- Apic, G., Gough, J. and Teichmann, S.A., (2001) Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. *J. Mol. Biol*. 310, 311-325.
- ۱- آدینه، ج. ۱۳۸۱. مطالعه کشت بافت و تغییرات کیفی و کمی مواد مؤثره سیترونلول و ژرانیول در اسانس گیاه بادرنجبویه *Melissa officinalis* در شرایط *In vivo* و *In vitro* در منطقه همدان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بوعلی سینا همدان.
- ۲- اردکانی، م.، امن زاده، ی. جهانشیر، ف. و جمشیدی، ا.ج. ۱۳۸۳. تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل. فصلنامه گیاهان دارویی، ۶۸-۷۱.
- ۳- امجدی، ف.، گلستانی ایمانی، ب. و کریمی، ف. ۱۳۹۴. بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشیشیاکالی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۸ (۴)، ۴۸۷-۴۷۵.
- ۴- بدیهی قزوینی، ف. ۱۳۶۶. بررسی اسانس و فیتوشیمی گیاه بادرنجبویه *Melissa officinalis* پایان نامه دکترا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، صفحه ۸۷.

- 11- Atha, D.H., Wang, H., Petersen, E.J., Cleveland, D., Holbrook, R.D., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Xing, B. and Nelson, B.C. 2011. Copper Oxide Nanoparticle Mediated DNA Damage in Terrestrial Plant Models. *Environ. Sci. Technol.* 46(3), 1819-1827.
- 12- Ball, P. (2002) Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology.* 13, 15-28.
- 13- Corredor, E., Testillano P.S., Coronado M.J., Gonzalez-Melendi P., Fernandez-Pacheco R., Marquina C., Ibarra M.R., Fuente J.M., Rubiales D., Perez-de-Luque A. and Risueno M.C. (2009) Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situsubcellular identification. *BMC Plant Biology.* 9, 1-11.
- 14- Esmaeilzadeh-Salestani K and Riahi-Madvar A. 2014. Effects of Iron Ions on Rosmarinic Acid Production and Antioxidant System in *Melissa officinalis* L. Seedlings. *Annu. Res. Rev. Biol.* 4(22), 3359-72.
- 15- Ghanati, F. and Bakhtiarian. S. 2014. Effect of Methyl Jasmonate and Silver Nanoparticles on Production of Secondary Metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). *Trop J Pharm Res.* 13, 1783.
- 16- Gonzalez-Melendi, P., Fernandez- Pacheco R., Coronado M.J., Corredor E., Testillano P.S., Risueno M.C., Marquina C., Ibarra M.R., Rubiales D. and Perez-De- Luque A. 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant Tissues. *Ann. Bot.* 101, 187-195.
- 17- Herodez, M., Sairman, R.V., Hassel, R., Parani, M. and Smith, B. 2003. Characterization of *Melissa officinalis* Volatile compounds. *J. Med. Plants Res.* 75, 79-85.
- 18- Hsieh, T.H., Lee, J.T., Charng, Y.Y. and Chan, M.T. 2002. How to define resistance to water deficit stress. *Plant physiol.* 130, 618-626.
- 19- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv, New Red Fire Lettuce. *Physiol. Plant.* 103, 1-7.
- 20- Lee, W.M., An Y.J., Yoon, H. and Kweon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1915-1921.
- 21- Lin, D. and Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut.* 150, 243-250.
- 22- Mizukam, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B. E. 1992. Induction of Rosmarinic Acid Biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* Cell Suspension Cultures by Yeast Extract. *Plant Cell Rep.* 11, 480-483.
- 23- Monica, R.C. and Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia.* 62(2), 161-165.
- 24- Muhammad Azam, A., Iqra, R., Adnan, I., Salah, ud, Di., Abdul Qayyum, R., Ayesha L., TahirRehman, S., Saira, A. and Tayyab, H. 2014. Nanotechnology, a new frontier in Agriculture. *Adv life sci.* 1, 129-138.
- 25- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15, 473-497.
- 26- Nasiri-Bezenjani, M.A. Riahi-Madvar, A. Baghizadeh, A. Ahmadi, A.R. 2014. Rosmarinic acid production and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa officinalis* seedlings in response to yeast extract. *J. Agr. Sci. Tech.* 16, 921-930.
- 27- Nel, A., Xia, T., MadlerL. and Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 311, 622-627.
- 28- Ninfalli, E., Mareczek, A. and Maria, L. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* 93, 223-226.
- 29- Park, S., Romij, M.d., Xu, H., Kyoung Kim, Y. and Young Lee, S. 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (25), 4959-4965.
- 30- Petersen, M. and Simmonds, M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry.* 62(2), 121-5.
- 31- Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W., Vargas-Reus, M.A., Reip, P. and Allaker, R.P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33(6), 587-590.
- 32- Riahi-Madvar, A., Rezaee F. and Jalali V. 2012. Effects of alumina nanoparticles on morphological properties and antioxidant system of *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Plant Physiology.* 3, 595-603.
- 33- Santiago, L.J.M., Louro, R.P. and De Oliveira, D.E. 2000. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in

- leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb and their induction by copper sulphate. *Ann. Bot.* 86(5),1023-32.
- 34- Stapleton, A.E. 1999. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell.* 4, 1353.
- 35- Tang, L., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.S., Cho, K.Y., Sung, C.K., Kwak, S.S. and Lee, H.S. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature, *Plant Cell Rep.* 25(12), 1380-1386.
- 36- Wei, C., Zhang, Y., Guo, J., Han, B., Yang, X. and Yuan, J. 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedemus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences.* 22, 155-160.
- 37- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Yong, J. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *J. Biol. Chem.* 234, 2597-2604.
- 38- Yang, L. and Watts, D.J. 2005. particles surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 158, 122-132.
- 39- Zhang, B., Zheng, L.P., Yi Li, W. and Wen Wang, J. 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Curr. Nano sci.* 9, 363-370.
- 40- Zhang, S., Ma, P., Yang, D., Li, W., Liang, Z., Liu, Y. and Liu F. 2013. Cloning and Characterization of a Putative R2R3 MYB Transcriptional Repressor of the Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway from *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS ONE.* 8(9):1-12.

Rosmarinic acid accumulation and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa officinalis* seedlings in response to CuO nanoparticles

Riahi-Madvar A.¹, Nasiri-Bezenjani M.A.¹, Rezaee F.² and Baghizadeh A.¹

¹Biotechnology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

²Plant Physiology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Rosmarinic acid (RA) is a valuable medicinal compound which can be produce through the phenylpropanoid biosynthesis pathway. In this research, RA accumulations, flavonoid content and TAT gene expression were analyzed in 30 days old Lemon balm seedlings which treated with different concentrations of CuO nanoparticles for 8 hours. RA contents were significantly evaluated in treated seedlings with all nano particles concentrations in compared to the control. The most content of this matter was seen in the treated seedlings with the lowest nanoparticles and decreased by increasing nano particles in media. Interestingly, the TAT gene expression showed the similar pattern as seen for RA content. The total flavonoid content gradually increased up 1000 mg/L concentration and significantly decreased at the highest concentration rater to 1000 mg/L. Based on the results, it seems the nanoparticle affected flavonoid and RA contents through effect on the genes expression which involve in phenolic compound biosynthesis pathway.

Key words: *Melissa officinalis*, Tyrosine aminotransferase, Rosmarinic acid, Nanoparticles.