



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



سمیه طایفه*۱، سید کمال کاظمی تبار۲، ناصر مهنا۳، ولی اله قاسمی عمران۴

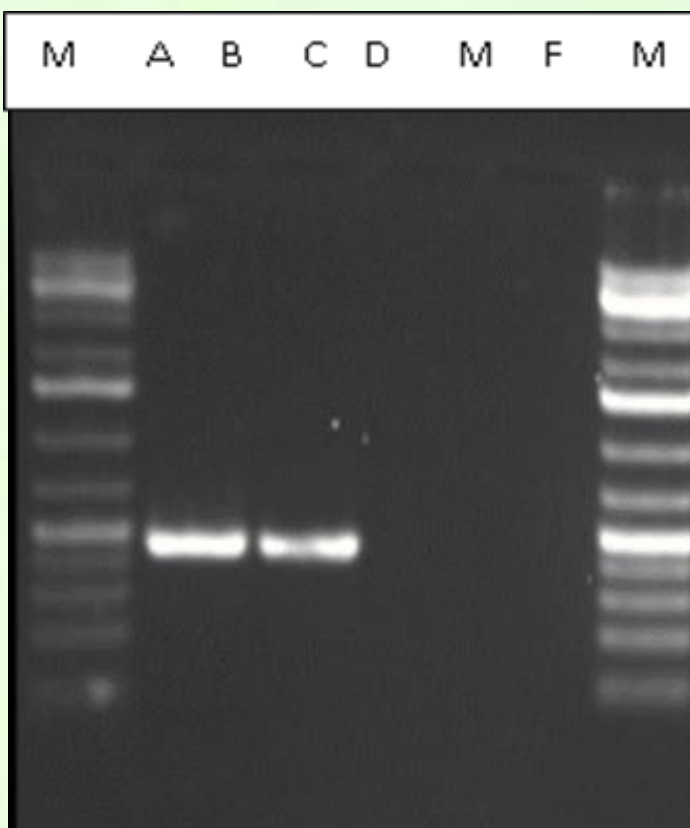
۱- مدرس گروه گیاهان زراعی، آموزشکده کشاورزی ساری، دانشگاه فنی و حرفه ای استان مازندران، ایران. ۲- دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران. ۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران. ۴- استادیار، پژوهشکده ژنتیک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

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

نتایج و بحث

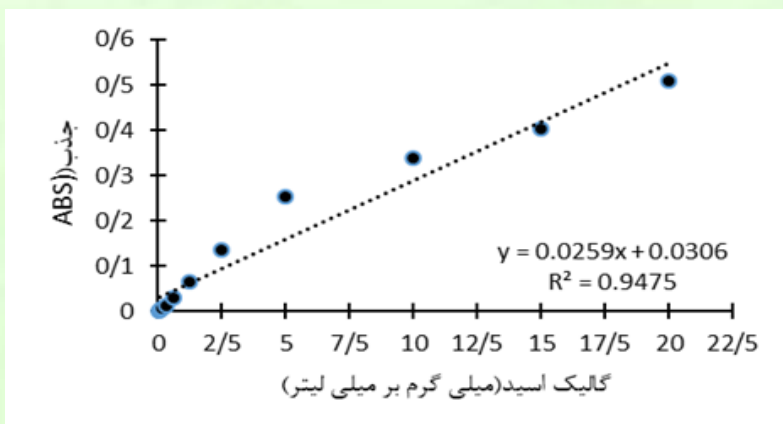
امروزه بهره گیری از کشت ریشه‌های موین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشه‌ی موین توسط سویه‌های مختلف (A. rhizogenes) متفاوت می‌باشد. در این آزمایش، حدود یک هفته پس از انتقال ریشه‌ها به محیط مایع MS 2/1 و غلظت‌های مختلف نانوذره نقره، در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

ریشه‌های موین به دست آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن rol C مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR با DNA استخراج شده از ریشه‌های موین تراریخت شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۴۳۰ جفت باز شد، ولی این ژن در DNA به دست آمده از ریشه ی غیر تراریخت گیاه مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- تحلیل PCR با پرایمر اختصاصی ژن rol C
M: نشانگر اندازه ی ۱۰۰ bp DNA Marker
A: ریشه ی تراریخت زوفای باریک برگ
B: پلاسמיד سویه ی باکتری (ATCC5834 کنترل مثبت)
C: ریشه غیر تراریخت
D: ویر دی (کنترل منفی)

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



شکل ۲- منحنی استاندارد گالیک اسید

در این آزمایش میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی ریشه غیر تراریخت و شاخساره گیاه علاوه بر ریشه‌های موین اندازه گیری شد. بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در ۱/۰ میلی گرم نانوذره نقره و به میزان ۸۱/۹۰ درصد مشاهده شد، میزان این ترکیبات با افزایش غلظت نانوذره کاهش یافت. نکته قابل توجه این است که در این گیاه زوفای، میزان فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدانی در شاخساره گیاه بیشتر از ریشه موین شاهد است که احتمالاً به علت گونه و ژنوتیپ زوفا می‌باشد. میزان ترکیبات فنلی نیز در تیمار ۱/۰ میلی گرم نانوذره بیشترین مقدار و به میزان ۳۱۸۵/۰ میلی گرم بر میلی لیتر گالیک اسید بود و کمترین مقدار نیز در ریشه غیر تراریخت مشاهده شد (جدول ۱).

جدول (۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش ریزنمونه و تیمار نانوذره از نظر صفات ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی

ترکیبات فنلی	ظرفیت آنتی اکسیدانی	ریز نمونه
۰/۰۳۰۸۴ ^c	۸۶/۹۸ ^b	شاخساره گیاه
۰/۰۳۰۷۷ ^c	۳۳/۳۳۷ ^e	ریشه غیر تراریخت
۰/۰۳۰۸۱ ^d	۷۹/۱۴۰ ^d	ریشه تراریخت (شاهد)
۰/۰۳۱۸۵ ^a	۹۰/۸۱۳ ^a	۰.۱ میلی گرم
۰/۰۳۰۹۳ ^b	۸۰/۵۲۷ ^c	۰.۲ میلی گرم
۰/۰۳۰۷۳ ^f	۸۰/۲۵۷ ^c	۰.۳ میلی گرم

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

منابع

- Angelova, Z., Georgiev, S., & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. Biotechnol Biotechnol Equip; 20: 72-83. 12.
- Arumugam, P., Ramamurthy, P., & Ramesh, A. (2010). Antioxidant and Cytotoxic Activities of Lipophilic and Hydrophilic Fractions of (Mentha Spicata L.) (Lamiaceae). Inter. J. Food Properties. 13(1): 23 – 31.
- Brijwal, L., & Tamta, S. (2015). Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root induction in endangered (Berberis aristata) DC. Springer Plus 4: 443-453.

چکیده

ترکیبات فنولی به ویژه آنهایی که منشأ گیاهی دارند به دلیل ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، بخش اساسی رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) گیاهی علفی، چندساله، متعلق به تیره نعناعیان است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر چهار غلظت نانوذره نقره (۰، ۱/۰، ۲/۰، ۳/۰ میلی گرم بر لیتر) بر ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی ریشه‌های موین این گیاه انجام گرفت. برای تلقیح از سویه ی ATCC15834 باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز استفاده شد. نتایج نشان داد که اثر محرک نانوذره نقره بر صفات مورد آزمایش (فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی) در گیاه زوفا در سطح یک درصد معنی دار است. بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در زوفای باریک برگ (۸۱/۹۰ درصد) بدست آمد که در غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره نقره حاصل شد. در این مطالعه مشاهده شد که ارتباط مناسبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاه وجود دارد.

مقدمه

زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*) گیاهی علفی و چندساله، متعلق به تیره نعناعیان و بومی ایران می‌باشد (این گونه در برخی منابع به عنوان زیر گونه *H. officinalis* بیان شده است) (Dzhumaev, 1986). ترکیبات گوناگونی به عنوان ترکیبات اصلی زوفا توسط محققین مختلف شناسایی شده است: میتلیوگنول، ۱ و ۸- سیننول، پینوکامفون، ایزوپینوکامفون، پینوکاروول، ایزوپینوکاروول، بتا-پینن، لیمونن، پینو-کامفون، بتاپینن، سیس-پینوکامفن، ایزوپینوکامفون و بتا-پینن شناسایی شده است (Kizil et al, 2010; Said-Al et al, 2015; Shun et al, 2003). از سوی دیگر، آنتی اکسیدان‌هایی مانند ترکیبات فنولی (شامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و فلاونوئیدها) در این گیاه وجود دارند که ویژگی‌های ضد جهشی، ضد سرطانی و همچنین کاهش قند خون را دارند. ریشه‌های موین مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی و حتی سایر اندام‌های گیاهی را تقلید می‌نمایند. چنین ریشه‌هایی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه به خصوص متابولیت‌هایی با خاصیت دارویی، به دلیل پایداری و بالا بودن میزان تولید آن‌ها در محیط‌های کشت مورد توجه است. هدف از تحقیق حاضر، مطالعه اثر محرک نانوذره نقره بر میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی ریشه موین این گیاه، در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی:

بذر زوفای باریک برگ ایران از طبیعت (بخش دو دانگه از توابع ساری، ۸۰ کیلومتری جنوب ساری، کد هر بار بومی: ۱۲۵) جمع‌آوری شد، به منظور تهیه گیاهچه استریل، بذور زوفای باریک برگ در محیط کشت جامد MS با غلظت هورمونی ۱/۰ میلی گرم در لیتر، جبرلین اسید کشت شدند.

آماده سازی و تلقیح ریز نمونه‌ها:

جهت تلقیح ریز نمونه‌ها با باکتری، از برگ‌ها و ساقه‌های جوان گیاهچه‌های چهار هفته‌ای گونه زوفا استفاده شد. ریز نمونه‌ها با استفاده از اسکالپل به قطعات دو سانتی متری تقسیم شدند. کشت‌های باکتریایی آگروباکتریوم رایزوزنز سویه ی (ATCC15834) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و روی شیکر دوار با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm به مدت ۱۴ تا ۱۸ ساعت نگهداری شد.

القای ریشه موین:

کشت باکتریایی آگروباکتریوم رایزوزنز سویه ی ATCC15834 در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سرعت 5000 rpm رسوب داده شد و پلیت باکتری در محیط کشت MS حاوی استوسرینگون به آرامی حل شد. ریز نمونه‌ها در سوسپانسیون تلقیح به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی استریل، بر روی محیط کشت مناسب با pH=۷/۵ کشت شدند

تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های موین:

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

روش عصاره گیری اولتراسونیک

تعیین ترکیبات فنولی (Total Phenolic Content))

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH