اثر القایی کیتوزان و کلشی‌سین بر تولید رزمارینیک اسید در ریشه موین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss)

نسرین ایوبی، بهمن حسینی* و محمد فتاحی

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۷

چکیده

زرین گیاه با نام علمی (*Dracocephalum kotschyi* Boiss) گیاهی علفی، چندساله و اندمیک ایران از خانواده نعناع است. تحقیقات اخیر دارویی نشان داده است که فلاونوئید متوکسی موجود در پیکره رویشی گیاه خاصیت ضدسرطانی دارد. ریشه‌های موین پس از تلقیح ریزنمونه برگی با سویه ۱۵۸۳۴ باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به دست آمد. در این مطالعه اثر محرکهای زیستی شامل محرک کلشی‌سین در غلظتهای (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) و کیتوزان در غلظتهای (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی-گرم در لیتر) به مدت ۴۸ ساعت بر رشد ریشه‌های موین تولید شده و تولید رزمارینیک اسید مطالعه شد. آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین و کیتوزان بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل، فنول کل و میزان فلاونوئید نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین افزایش در میزان آنتی اکسیدان (۹۰/۳۳ درصد) مربوط به سطح ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین می باشد و کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۶۳ درصد) مشاهده گردید. نتایج آنالیز HPLC نشان داد که بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با محرک کلشی‌سین با غلظت ۰/۰۵ درصد به میزان ۳۵/۸ µg /mg DW و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ mg/l، به میزان ۱۵/۱ µg /mg DW و کمترین مقدار رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد)، ۱۳/۸ µg /mg DW و ثبت گردید. با توجه به اهمیت تولید رزمارینیک اسید در صنعت داروسازی، نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از روشهای فنآوری زیستی امکان بهبود تولید ترکیبات ارزشمند دارویی فراهم می باشد. 0441-32779558

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، رزمارینیک اسید، ریشه موین، محرک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۱-۳۲۷۷۹۵۵۸ ، پست الکترونیکی: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

جنس *Dracocephalum* از مهم‌ترین جنسهای تیره نعناع بوده که شامل ۱۸۶ گونه می باشد که ۸ گونه آن در ایران می‌روید. یکی از گونه‌های مهم بومی این جنس در ایران *Dracocephalum kotschyi* Boiss است که در قسمتهایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود (۲۸). این گونه انحصاری با نام زرین گیاه (۲n=۲۰) و بادرنجبویه دنایی مشخص می‌شود. زرین گیاه یکی از گیاهان در معرض انقراض ایران می باشد (۵).

تحقیقات اخیر نشان داده است که ترکیبات موجود در زرین گیاه از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن می باشد. پیکره رویشی زرین گیاه حاوی اسانس بوده و درصد آن بین ۰/۶ تا ۱/۶۷ (حجمی به وزنی) گزارش شده است (۳). رزمارینیک اسید دارای فعالیتهای زیستی قابل توجهی از جمله: ضد ویروس، ضد باکتری، ضد فسادپذیری و آنتی‌اکسیدانی است (۳۷).

با توجه به اینکه امروزه روشهای قدیمی و کلاسیک تکثیر و اصلاح گیاهان به تنهایی جواب‌گوی بسیاری از نیازها

نمی باشد، لازم است روشهای جدیدتری جایگزین یا تکمیل کننده روشهای قبلی مورد استفاده قرار گیرد. مناسب‌ترین راه برای رسیدن به این هدف، استفاده از روشهای زیست فناوری می باشد (۴). سیستم آگروباکتریوم، اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان می‌باشد که کاربرد آن در سال ۱۹۸۳ میلادی، علائمی از برطرف شدن موانع در مهندسی ژنتیک گیاهی می باشد (۱۰). القاء ریشه موئین به پارامترهای مختلفی وابسته است مثل: گونه گیاهی، سن و بافت گیاهی. عموماً نمونه‌های جوان به باکتری‌ها خیلی حساس هستند (۳۱). مطالعات قبلی روی القای ریشه موئین از ریز نمونه‌های برگی و گیاهچه‌های یک ماهه *Dracocephalum kotschyi* توسط سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز (LBA 9402، A13، ATTCC15834، A4 و MSU 440) نشان داد که بالاترین درصد تراریختی (۶۰ درصد) از سویه ATTCC ۱۵۸۳۴ حاصل گردید (۲).

افزایش تولید متابولیتهای ثانویه، از طریق محرکها در کشت سلولی گیاه، فضای مطالعاتی جدیدی باز کرده است که می‌تواند منافع اقتصادی مهم برای صنایع زیستی داشته باشد که بسیاری از این ترکیبات از ارزش بالای دارویی برخوردارند (۷ و ۲۰). کیتوزان پلی ساکاریدی است که به فراوانی در طبیعت از صدف و سایر سخت پوستان دریایی از جمله *Pandalus borealis* و دیواره سلولی قارچها به‌دست می‌آید (۱۷). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن‌دار، به‌ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول می-شود (۲۱). در تحقیقی اثر کیتوزان ۱۵۰ میلی گرم در لیتر روی ریشه موئین *Artemisinin annua* L. صورت گرفت، و باعث افزایش آرتمیزینین به مقدار ۱/۸ µg /mg شد (۲۶). کلشی‌سین آلکالوئیدی است که برای اولین بار از غدهٔ گل حسرت (*Colchicum autumnale*) پاییزه توسط Zeisel در سال۱۸۸۳ استخراج شد (۶). با توجه به اهمیت زرین گیاه و ترکیبات بسیار با ارزش این گیاه که کاربرد بسیار فراوانی در داروسازی دارد و با توجه به قرار گرفتن گیاه در لیست گیاهان در معرض انقراض برای استفاده از این گیاه در کوتاه مدت، روشهای کشت بافت شامل کشت سلول و سیستم ریشه موئین می تواند با مقدار کم مواد اولیه انجام شود. بنابراین در پژوهش حاضر برای اولین بار اثر برخی از محرکها مانند کلشی سین و کیتوزان بر میزان مواد مؤثره در این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: تمامی آزمایشات این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی، در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گردید. همچنین مطالعات ژنتیکی و تأیید حضور ژن *rol* B نیز در پژوهشکده زیست فنآوری دانشگاه ارومیه انجام گردید. برای انجام کار ابتدا بذرهای زرین گیاه، از شرکت پاکان بذر (اصفهان–ایران) خریداری شد. به‌منظور برطرف کردن خواب بذر، ابتدا بذور در اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند تا حداکثر جوانه‌زنی بذور اتفاق افتد (۱۳). جهت ضدعفونی، بذور ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شده و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده و بعد با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد تجاری به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. لازم به ذکر می باشد که تمام این مراحل در زیر هود لامینار انجام گردید.

القای ریشه موئین: در این آزمایش ریزنمونه‌های تهیه شده از برگهای یک هفته‌ای با سویه ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوژنز (OD =۰/۴–۰/۳) به مدت ۱ دقیقه به روش غوطه‌وری تلقیح داده شد و سپس به محیط کشت MS انتقال داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی در دمای ۲±۲۴ جهت القای ریشه موئین نگهداری شدند و بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده و به روی کاغذ صافی استریل شده جهت جذب آب اضافی انتقال

داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم جهت حذف باکتری از ریزنمونه منتقل شده و جهت ظهور ریشه‌های مویین در شرایط تاریکی و در زیر فویل آلومینیومی نگهداری شدند. ۰/۱ گرم از لاین پر رشد ریشه‌های مویین به شیشه‌های مخصوص توری‌دار که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط مایع MS ۱/۴ بودند در زیر هود لامینار انتقال داده شد و پس از یک هفته شروع به اعمال تیمار اول کیتوزان در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در ۳ تکرار و تیمار دوم کلشی‌سین در ۳ غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد با ۳ تکرار در محیط کشت پایه MS مایع و به مدت ۴۸ ساعت اعمال شد. بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و به محیط کشت مایع MS ۱/۴منتقل گردید و در همان شرایط محیطی آزمایش قبل (شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی و با دور ۱۸۰ دور در دقیقه) نگهداری شدند. ریشه‌های گیاهان غیر تراریخت هم به منظور مقایسه در آزمایشات آنالیز بیوشیمیایی و مولکولی با کشت بذر گیاه در محیط کشت پایه MS تهیه گردید.

عصاره‌گیری متانولی جهت اندازه گیری آنتی اکسیدان، فنول کل و فلاونوئید: مقدار ۰/۱ گرم از ریشه‌های خشک شده در آون، در هاون آسیاب شده و به داخل لوله آزمایش منتقل گردید. در زیر هود مقدار ۱۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر داخل لوله اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. بعد از چند بار تکان دادن لوله-ها، عصاره اتری حاصله را در زیر هود داخل بشر ۱۰ سی سی منتقل گردید. دوباره مقدار ۵ میلی‌لیتر از اتر را داخل لوله ریخته و بعد از گذشت ۵ ساعت با تبخیر شدن اتر، به ماده جامد باقی مانده مقدار ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه و سپس دیواره ظرف را کاملاً تمیز کرده تا به محلول اضافه بشود و در نهایت عصاره حاصل شده از صافی عبور داده شده و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۴ و ۳۵)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: جهت اندازگیری فعالیت آنتی-اکسیدانی به ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها، ۹۵۰ میکرولیتر DPPH (6×10^{-5} mol/lit) اضافه و پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر اسپکتروفتومتر قرائت و در فرمول زیر جای گذاری شد. جهت تهیه شاهد (بلنگ) آنتی‌اکسیدان نیز به روش بالا عمل کرده، فقط به جای عصاره، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد (۹).

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

AC : میزان جذب بلنگ

AS : میزان جذب نمونه

اندازه‌گیری فنول کل: به منظور اندازه‌گیری فنول کل ابتدا به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد اضافه کرده و پس از ۵ الی ۱۰ دقیقه، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد اضافه شده و در نهایت ۱/۵ الی ۲ ساعت در جای تاریک نگهداری گردید تا رنگ نمونه‌ها به بنفش تغییر کند و سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت مقدار جذب (Y) را در معادله حاصل از کالیبراسیون جای گذاری کرده تا مقدار فنول کل (X) بر حسب (µg/g DW) به دست آید (۳۳).

$$Y=0.0007X+0.0145$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرو-لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شده و پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار اضافه و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت شد. مقدار جذب (Y) را در معادله زیر جای گذاری کرده تا مقدار فلاونوئید کل (X) بر حسب (µg Qu/g DW) به دست آید. از کوئرسیتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (۳۲).

$$Y = 0.002X+0.011$$

تأیید آنالیز PCR برای ریشه مویین: به منظور تأیید حضور ژن *rol*B، ابتدا DNA ژنومی هریک از ریشه‌های مویین به روش CTAB استخراج گردید (۱۹). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور تأیید حضور ژن *rol* B آگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه های مویین انجام گردید توالی آغازگرهای زیر بر اساس توالی ژن در بانکهای اطلاعاتی طراحی و به منظور تکثیر قطعات 780 bp ژن *rol* Bمورد استفاده قرار گرفتند:

F : 5´- TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA-3´
R:5´-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3´

واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد سپس ۳۹ سیکل دمایی شامل مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در نهایت سیکل دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه امجام گرفت. به منظور آماده سازی باکتری به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR، مقداری از کلنی باکتری سویه ۱۵۸۳۴ در آب مقطر استریل حل شد سپس از محلول حاصل ۱ میکرولیتر به تیوپهای حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه اضافه گردید. بعد از انجام واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۳ میکرولیتر Dye در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۸۰ ولت، به مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. به منظور مشخص شدن اندازه قطعات حاصل از DNAمارکر شرکت فرمنتاز استفاده گردید.

اندازه گیری میزان رزمارینیک اسید در نمونه‌های ریشه مویین زرین گیاه: در این پژوهش از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا مدل ۱۱۰۰ اجیلنت، مجهز به پمپ گرادیان چهار حلالی، با دتکتور فوتودیوداری، ستون C_{18}، ۳۰ سانتیمتری استفاده گردید. برای تهیه عصاره‌ها از دستگاه اولتراسونیک یوروندا کشور ایتالیا و همچنین برای توزین ترازوی آزمایشگاهی آنالیتیکال به دقت ۰/۰۰۰۱و ۰/۰۱ گرم مدل ED1245 شرکت سارتوریوس استفاده شد. برای کمی سازی رزمارینیک اسید در نمونه‌ها، ابتدا محلول مادر ۵۰۰ میلی-گرم در لیتر از رزمارینیک اسید در حلال استونیتریل تهیه شد. پنج غلظت متفاوت ۱، ۶، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی-گرم بر لیتر از رقیق سازی محلول مادر تهیه شد و با تزریق مستقیم ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا زمان بازداری و سطح زیر پیک آنها مشخص شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از داده‌های به دست آمده رسم گردید و معادله کالیبراسیون به دست آمد. بعد از رسم منحنی کالیبراسیون، نمونه‌های ریشه در هاون پودر و یکنواخت شد. برای تهیه عصاره از نمونه‌ها، حدود ۰/۱ گرم از ریشه توزین و به لوله آزمایش منتقل گردید. ۲ میلی‌لیتر از آبی که ۱ درصد اسید استیک دارد به آن افزوده و پس از همزنی کامل به دستگاه اولتراسونیک منتقل گردید تا تحت امواج مافوق صوت قرار گیرد و تماس حلال استخراج کننده با نمونه کامل گردد. سپس نمونه سانتریفیوژ شده و از فاز بالایی و شفاف بعد از گذراندن از فیلتر به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا تزریق گردید. سطح زیر پیک کروماتوگرامهای نمونه‌های ریشه محاسبه شده و در معادله کالیبراسیون قرار گرفت و غلظت رزمارینیک اسید در نمونه‌های ریشه بر حسب (µg /mg DW) محاسبه گردید.

آنالیز آماری: تمام آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. داده‌های حاصل از آزمایشات در نرم افزار SAS 9.1مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسات میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 رسم گردید.

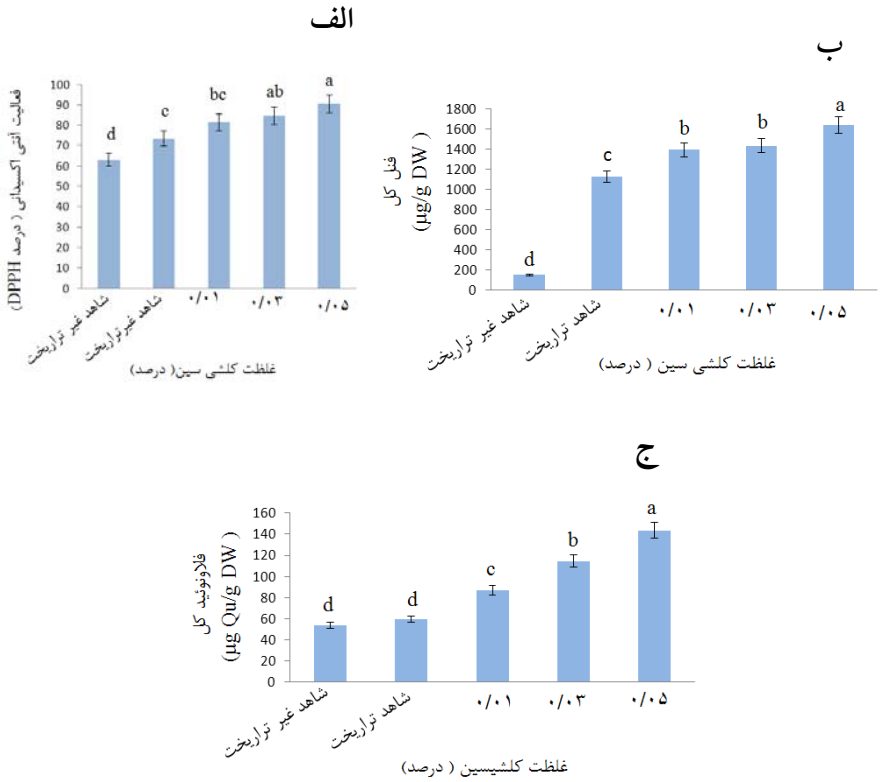
نتایج و بحث

تأثیر کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P<$ ۰/۰۱) قابل مشاهده می باشد (جدول ۱). بیشترین افزایش در میزان آنتی اکسیدان مربوط به سطح ۰/۰۵ درصد می باشد (۹۰/۳۳ درصد). این مقدار ۱/۲۳ برابر میزان آنتی اکسیدان در ریشه‌های مویین تیمار نشده و ۱/۴۳ برابر ریشه‌های غیرتراریخت می باشد. کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۶۳ درصد) مشاهده گردید (شکل ۱ الف).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر کلشی‌سین بر فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول کل و فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین زرین گیاه

منابع تغییرات	درجه	میانگین مربعات		
		فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فنول کل	فلاونوئید کل
کلشی سین	۴	۳۳۹/۷۶۶**	۱۰۳۴۶۳۵/۷۰۲**	۴۲۷۹/۹۷۵**
اشتباه آزمایش	۱۰	۲۰/۰۶۶	۴۹۲۸۲/۲۴۷	۱۵/۱۸۳
ضریب تغییرات (درصد)		۵/۷۰	۶/۱۳	۴/۲۵

** نشان دهنده معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، می باشد.



شکل ۱- نمودار اثرات کلشی‌سین بر الف: فعالیت آنتی اکسیدانی کل، ب: فنول کل، ج: فلاونوئید کل ریشه‌های مویین زرین گیاه. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

تأثیرکلشی‌سین بر میزان فنول کل: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فنول کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P<$ ۰/۰۱) قابل مشاهده می باشد (جدول ۱). افزایش سطح کلشی‌سین تا ۰/۰۵ درصد با افزایش تولید فنول کل (۱۶۳۲/۶۱µg/g DW) همراه بود. این مقدار ۱/۴۵ برابر میزان فنول کل در ریشه-های مویین تیمار نشده و ۱۱/۲۹ برابر ریشه‌های غیرتراریخت بود. کمترین میزان فنول کل نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۱۴۴/۵۲µg/g DW) مشاهده گردید (شکل ۱ ب).

تأثیر کلشی‌سین بر میزان فلاونوئید کل: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فلاونوئید کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح (۰/۰۱ >P) قابل مشاهده می باشد (جدول ۱). افزایش کلشی‌سین تا سطح ۰/۰۵ درصد با افزایش تولید فلاونوئید کل همراه بود (۱۴۳/۵۰µg/g DW). این مقدار ۲/۴۱ برابر میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین تیمار نشده و ۲/۶۶ برابر ریشه‌های غیرتراریخت می باشد. کمترین میزان فلاونوئید کل نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۵۳/۸۳µg/g DW) مشاهده گردید (شکل ۱ ج).

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین در محیط کشت تجمع هر فاکتور ماده آنتی اکسیدان، فلاونوئید کل و فنول کل افزایش یافت ولی در این تحقیق بررسی در زمینه تغییر سطح پلوئیدی ریشه‌ها انجام نگردید. افزایش رشد ریشه‌های مویین در اثر تیمار با کلشی‌سین می تواند به این دلیل باشد که کلشی‌سین منجر به افزایش سطح پلوئیدی شده و در نتیجه مضاعف شدگی مستقیم ژنومیک به وجود می‌آیند، مواد ژنتیکی آنها مشابه باقی مانده و فقط دز ژنی افزایش می آید، بنابراین منجر به افزایش تولید متابولیتها در اتوتتراپلوئیدها می‌شود. یک مدل رایج جهت توجیه این تغییرات را، کاهش نسبت غشای هسته به مقدار کروماتین آن می‌دانند. این کاهش سطح منجر به افزایش تماس ماده کروماتینی با غشای هسته‌ای و در نتیجه افزایش فعالیت ژنی و بهبود روابط آبی، وضعیت هورمونی و سرعت فتوسنتز به ازای هر سلول را به دنبال دارد (۲۵). از آنجا که فرض بر آن است که با دو برابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه برداری افزایش یابد، این افزایش می تواند بر میزان تنفس (۸)، فعالیت ژنی و میزان فعالیت آنزیمها تأثیر داشته باشد (۲۷). شواهد به دست آمده از آنالیزهای شیمیایی آلوپلی‌پلوئید نشان می‌دهد که چنین پلی‌پلوئیدهایی از لحاظ ترکیبات فنولی غنی‌تر بوده و نسبت به والدین خود تنوع آنزیمی بیشتری نشان می‌دهند (۱۲). یافته‌های این تحقیق با نتایج تحقیقات Dejessus-Gonzalezو Weathrs (۱۱) در درمنه (*Artemisia annua*) و Lavania (۲۳) در گیاه عطری ویتور (*Vetiveria zizanioides* L.) (۲۴) مطابقت دارد.

تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کیتوزان بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح (۰/۰۱ >P) قابل مشاهده می باشد (جدول ۲). با افزایش غلظت کیتوزان تا سطح ۱۰۰mg/l فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش نشان داد (۸۹/۶۶ درصد). این مقدار ۱/۲۲ برابر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه‌های مویین تیمار نشده و ۱/۴۲ برابر ریشه‌های غیرتراریخت بود. کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۶۳ درصد) مشاهده گردید (شکل ۲ الف).

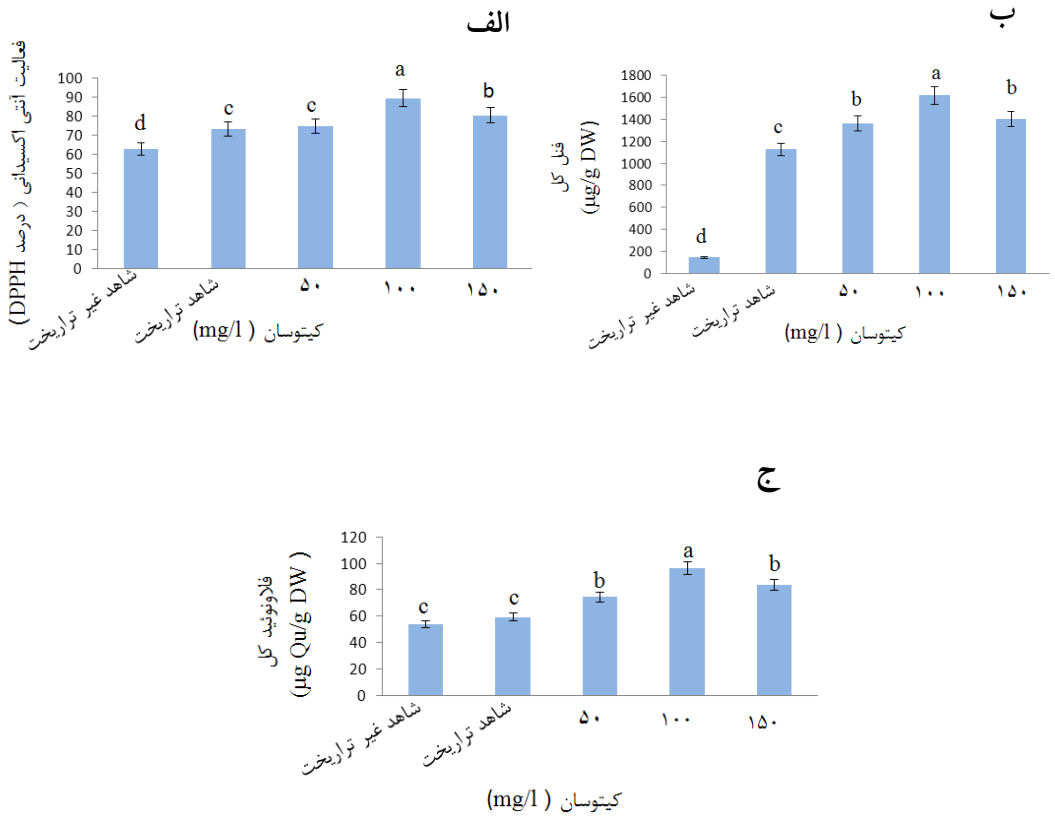
تأثیر کیتوزان بر میزان فنول کل: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کیتوزان بر میزان فنول کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح (۰/۰۱ >P) وجود دارد (جدول ۲). نتایج نشان داد که افزایش سطح کیتوزان تا ۱۰۰mg/l باعث افزایش در میزان فنول کل شد. بیشترین افزایش در میزان فنول کل مربوط به سطح ۱۰۰mg/l با میانگین ۱۶۱۷/۸۵ µg/g WD و کمترین میزان فنول کل در ریشه‌های غیر تراریخت با میانگین ۱۴۴/۵۲µg/g DW بود.

همچنین با افزایش غلظت کیتوزان به ۱۵۰mg/l میزان فنول کل تولید شده نسبت به مقدار آن در ریشه‌های تیمار شده با ۵۰mg/l تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲ ب).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر کیتوزان بر وزن تر و خشک، فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول کل و فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین زرین گیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	منابع تغییرات					
	وزن تر و خشک	مواد مؤثره	وزن تر	وزن خشک	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فنل کل	فلاونوئید کل
کیتوزان	۳	۴	۰/۴۴۹**	۰/۰۰۰۰۹ ns	۲۸۸/۸۳۳**	۱۰۰۲۴۸۸/۸۱۷**	۹۰۷/۱۴۱**
اشتباه ازمایش	۸	۱۰	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۰۳	۷/۶۰۰	۳۰۱۹/۹۷۶	۴۰/۶۱۶
ضریب تغییرات (درصد)			۱۰/۱۰	۶/۳۹	۳/۶۱	۴/۸۶	۸/۶۷

** و ns به ترتیب نشان دهنده معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.



شکل ۲- نمودار اثرات کیتوسان بر الف: فعالیت آنتی اکسیدانی کل، ب: فنول کل، ج: فلاونوئید کل ریشه‌های مویین زرین گیاه.
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

تأثیر کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل: آنالیز واریانس داده-های حاصل از اثر کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P<$ ۰/۰۱) قابل مشاهده می باشد (جدول ۲). افزایش سطح کیتوزان تا

سطح ۱۰۰ mg/l باعث افزایش در میزان فلاونوئید کل شد. بیشترین افزایش در میزان فلاونوئید کل مربوط به سطح ۱۰۰ mg/l با میانگین (۹۶/۳۳µg/g DW) و کمترین میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های غیر تراریخت با (µg /g ۵۳/۸۳DW) مشاهده گردید. با افزایش غلظت کیتوزان به ۱۵۰mg/l میزان فلاونوئید کل تولید شده نسبت به مقدار آن در ریشه‌های تیمار شده با ۵۰mg/l تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲ ج).

نتایج مطالعه نشان داد که با تغییر غلظت کیتوزان، خصوصیات بیوشیمیایی ریشه‌های مویین تحت تیمار تحریک‌زایی تغییر می‌یابد اما این تغییر رابطه مستقیمی با افزایش غلظت عنصر محرک ندارد و می تواند در یک غلظت بهینه، حداکثر تغییرات بیوشیمیایی مشاهده و در بعد از آن یا کاهش در خصوصیات بیوشیمیایی و ترکیبات تولیدی اتفاق بیفتد و یا اینکه تغییر معنی‌داری بین غلظتهای بالای مورد استفاده و غلظت بهینه وجود نداشته باشد. نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده است که غلظت محرک نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری بر شدت پاسخ است. غلظت مؤثر محرک بر حسب گونه گیاهی متفاوت است، به طوری که غلظتی از محرک که در یک گیاه اثر تحریکی بر متابولیتهای ثانویه دارد، ممکن است در گیاه دیگر اثری نداشته باشد. در غلظتهای بالا، محرکها واکنش فوق حساسیت را القاء می‌کنند که منجر به مرگ سلولها می‌گردد در حالی که غلظتهای پایین سبب القای واکنشهای دفاعی می‌گردد (۲۱). مکانیسم اثر محرکهای زیستی در گیاهان به خوبی مشخص نشده است ولی به نظر می رسد که محرکهای زیستی (کیتوزان) به ترکیبات دیواره سلولی حمله می‌کنند و در پی پاسخ به پیام محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. محرکها به وسیله گیرنده گیاهی یا R پروتئین شناسایی می‌شوند. شناسایی در دیواره پلاسما، آغاز سیگنال پاسخ‌دهی می باشد. بعد از سیگنال تحریک، گیرنده‌های گیاهی سیگنال اجرایی‌شان را مثل نشت یونی، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال، فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئینها را به کار می‌اندازد و به وسیله مولکولهای پیام‌بر دوم مثل H_2O_2، اسید جاسمونیک، اسید سالسلیک، آزادکننده‌های کلسیم داخلی و تلفیق چند ژن و سرانجام بیان ژن دفاعی مانند فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) باعث تولید فیتوآلکسین‌هایی مانند فنولها می‌شوند. با این حال این وقایع و بر همکنش بین آنها پیچیده و هنوز در حال بررسی است (۳۶). یافته‌های این تحقیق با نتایج بیضایی و همکاران در تربچه (*Raphanus sativus* L.) (۱) مطابقت دارد.

ریزنمونه‌های گیاهی تلقیح شده با سویه ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوژنز بعد از یک هفته ریشه مویین تولید کردند (شکل ۳). نتایج آنالیز PCR برای ریشه‌های تراریختی احتمالی، حضور قطعه‌ایی حدوداً به طول bp ۷۸۰ مربوط به ژن *rol* B برای ریشه‌های حاصل از تلقیح با باکتری *A.rhizogenes* را نشان داد که هم اندازه قطعات تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (باکتری *A. rhizogenes*) بود، در صورتی که در ریشه‌های شاهد (ریشه‌های غیر تراریخت) به علت عدم تلقیح با *A. rhizogenes* هیچ نواری مشاهده نگردید (شکل ۴).

میزان رزمارینیک اسید: مقدار رزمارینیک اسید در ریشه-های غیرتراریخت، و ریشه‌های مویین تحت تأثیر محرکهای مختلف به وسیله دستگاه HPLC اندازگیری شد (شکل ۵). مطابق (جدول ۳) مقدار رزمارینیک اسید، کمترین مقدار رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت، µg /mg DW ۱۳/۸ و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با محرک کلشی-سین با غلظت ۰/۰۵ درصد به میزان µg /mg DW ۳۵/۸ و کیتوزان با غلظت mg/l ۱۰۰، به میزان µg /mg DW ۱۵/۱ می باشد. در تحقیق حاضر تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین احتمالاً به دلیل برخی تغییرات بیوشیمیایی در متابولیسم گیاه–آگروباکتریوم رایزوژنز می باشد (۱۶). مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌هایی که با محرکها تیمار

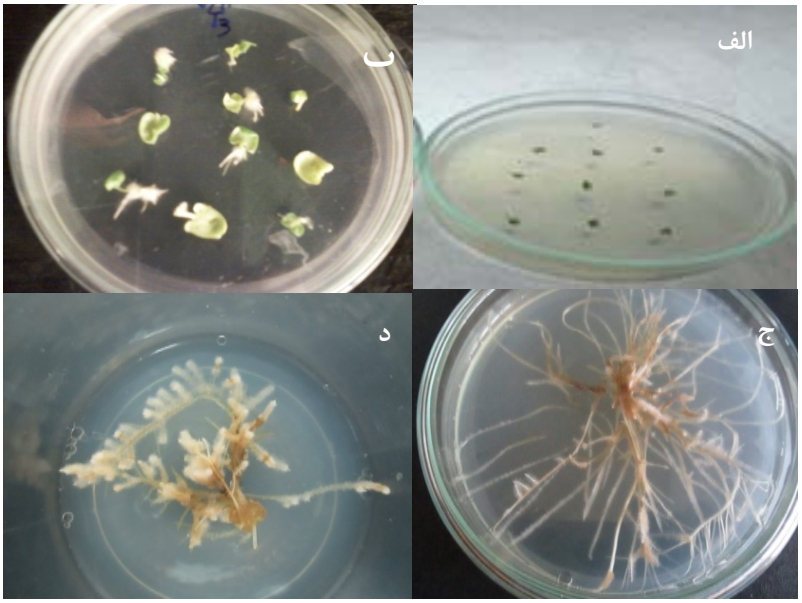
شده‌اند خیلی بیشتر از ریشه‌های تیمار نشده بود. بیوسنتز متابولیتهای ثانویه در ریشه‌های مویین به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما مواد غذایی و شرایط محیطی نیز بر آن مؤثر می باشد (۳۰).

جدول ۳- اندازه گیری اسید رزمارینیک در تیمارهای مختلف زرین گیاه

نمونه	غلظت اسید رزمارینیک (میکروگرم بر گرم وزن خشک)
ریشه‌های غیر تراریخت	۱۳/۸
ریشه‌های تراریخت تحت تیمار کلشی‌سین	۳۵/۸
ریشه‌های تراریخت تحت تیمار کیتوزان	۱۵/۱

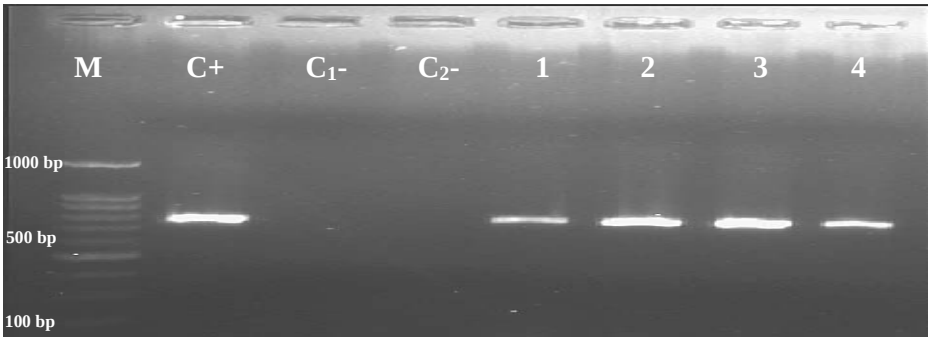
در این مطالعه دو نوع محرک زیستی جهت تحریک تولید رزمارنیک اسید مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آنالیز HPLC تغییر در میزان اسید رزمارینیک را در هر دو تیمار نشان داد. در ارتباط با دلیل اصلی اثر این محرکها بر تغییر تولید متابولیتهای ثانویه مطالعه جامعی انجام نشده است اما احتمال می رود که کلشی‌سین با جلوگیری از به هم پیوستن زیر واحدهای میکروتوبول (پروتئین توبولین) و یا با از هم باز نمودن آنها مانع از تشکیل دوک در هنگام تقسیم سلولی شده، کروموزومها را در مرحلهٔ متافاز متوقف می‌کند و مانع وقوع آنافاز در آنها می گردد. بنابراین، تقسیم سلولی بدون تشکیل دیوارهٔ سلولی رخ می‌دهد که منجر به دو برابر شدن شمار کروموزومها در سلول گیاهی می‌گردد (۱۸ و ۳۴).

Yan و همکاران (۳۸) تجمع رزمارینیک اسید و فعالیت آنزیمهای تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) را در *Salvia miltiorrhiza* تحت تیمار عصاره مخمر و Ag^{+} بررسی کردند. نتایج نشان داد که هر دو محرک منجر به تجمع رزمارینیک اسید گردید.

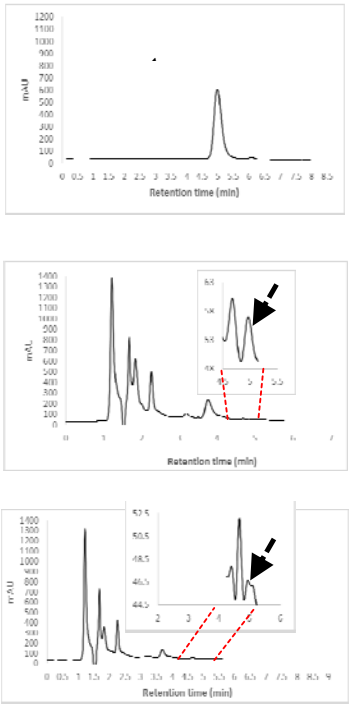


شکل ۳– القای ریشه مویین در ریزنمونه های مختلف گیاه زرین گیاه

الف) ریزنمونه‌های برگ و میانگره یک هفته‌ای زرین گیاه کشت شده در محیط MS جامد. ب) ظهور ریشه‌های مویین روی ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای ج) ریشه مویین (لاین پررشد) در محیط کشت جامد MS د) ریشه مویین (لاین کم رشد) در محیط MS جامد



شکل ۴- آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rol* B در ریشه‌های تراریخت زرین گیاه. .M : DNA مارکر 1kb (Fermentase). +C: باکتری آگروباگتریوم سویه ۱۵۸۳۴ به عنوان کنترل مثبت. -C_1: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی اول. -C_2: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی دوم. لاین ۱-۴: ریشه‌های مویین القاء شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته-ای توسط سویه ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوژنز.



شکل ۵- کروماتوگرام HPLC برای تعیین مقدار رزمارینیک اسید ریشه های مویین گیاه بذرالبنج مشبک

الف) نمونه استاندارد. ب) ریشه‌های تیمار شده با کلشی‌سین (۰/۰۵ درصد). ج) ریشه‌های تیمار شده با کیتوسان (۱۰۰mg/l).

به کارگیری محرکها یکی از موفق‌ترین استراتژیها در افزایش متابولیتهای ثانویه از جمله رزمارینیک اسید هستند. محرکها به عنوان محرکهای دفاعی و القاء کننده تنش در گیاه تعریف می‌شوند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژنهای مرتبط با بیوسنتز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌گردند و میزان اثر محرکها بر تولید متابولیتهای ثانویه معمولاً به غلظت و زمان وابسته است (۳۶). کیتوزان باعث تولید فیتوآلکسین‌ها (۲۹) و بسیاری از ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی(۲۱) می‌شود. سنتز ترکیبات دفاعی گیاه پس از تحریک با کیتوزان، معمولاً مرتبط با فعالیتهای فیزیولوژیکی، عمدتاً به‌عنوان آنتی اکسیدانها به‌عنوان مثال پلی‌فنولها است (۱۵) . همچنین کیتوزان جهت افزایش عملکرد بسیاری از ترکیبات مفید در کشتهای آزمایشگاهی در بافتها و گیاهان کامل مورد استفاده قرار گرفته است. به عنوان مثال، در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار کل ترکیبات فنولی و ترپن‌دار، به‌ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول شد (۲۲).

نتیجه‌گیری

زرین گیاه از گیاهان دارویی مهم و باارزش می باشد که

به دلیل عدم توجه کافی دارای مشکلات متعددی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که امکان القاء و تولید ریشه مویین به راحتی با استفاده از انتخاب سویه و ریزنمونه مناسب فراهم بوده و استفاده از محرکهای مختلف می توان باعث ایجاد تغییر در تولید متابولیتهای ثانویه به ویژه رزمارینیک اسید شود. با تغییر نوع محرک و غلظت آن امکان تغییر متابولیتهای ثانویه و آنزیمهای آنتی اکسیدانی وجود دارد. به نظر می رسد با انتخاب و تعیین محرک مناسب زیستی یا غیر زیستی به راحتی امکان تولید متابولیتهای با ارزش از طریق کشت ریشه مویین فراهم گردد.

منابع

۱- **بیضایی، س.، صفی‌پور افشار، ا. و سعید نعمت‌پور ف. (۱۳۹۴).** تولید ترکیبات فنولی درکشت ریشه‌های مویین گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی، (انتشار ان لاین).

۲- شرفی، ع.، هاشمی، ه.، موسوی، ا. و آزادی، پ. (۱۳۹۲). باززایی گیاه دارویی *Dracocephalum kotschyi* پس از القاء ریشه موئین. هشتمین همایش ملی زیست فناوری، دانشگاه تهران، ۲۸ (۳): ۲۱۵-۲۰۸.

۳- فتاحی، م. (۱۳۹۱). ارزیابی تنوع مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و تولید ریشه موئینه در بادرنجبویه دنایی. رساله دکتری، دانشگاه تهران،۲۲۰ ص.

۴- مشایخی، ک. (۱۳۸۶). جنین زایی رویشی گیاهی. انتشارات فراغی، ۴۸۳ ص.

۵- مظفریان، و.ا. (۱۳۸۲). فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، ۷۴۰ ص.

6- Ade, R. and Kumar Rai, M. (2010). Review: Colchicine, current advances and future prospects. Nusantara Bioscience, 2: 102-125.

7- Angelov, Z., Georgiev., S. and Roos, W. (2006). Elicitation of plants. Biotechnology and Biotechnology, 20:2.

8- Byrne, M.C., Nelson, C.J. and Randall, D.D. (1981). Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant physiology, 68: 891-893.

9- Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry, 102: 516-522.

10- Chawla. H.S. (2000). Introduction to plant biotechnology. 500pp.

11- De Jesus-Gonzalez, L. and Weathers, P.J. (2003). Tetrapolid *Arttemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports, 21: 809-813.

12- Dhawan, O.P. and Lavania, U.C. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A Review. Euphytica, 87: 81-89.

13- Fattahi, M., Nazeri, V., Sefidkon, F., Zamani, Z. and Palazon, J. (2011). The effect of pre-sowing treatments and light on seed germination of *Dracocephalum kotschyi* Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 52: 559-566.

14- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R.M., Zamani, Z. and Palazon, J. (2013). Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS. Food Chemistry, 141: 139-146.

15- Ferri, M. and Tassoni, A. (2011). Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites *in vitro* plant cell culture. Ibm Journal of Research and Development, 1: 445-455.

16- Gandi, S. and Giri, A. (2012). Genetic transformation of *Centella asiatica* by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Pharmacognosy, 3(2): 82-84.

17- Gavhane, Y., Gurav, A. and Yadav, A. (2013). Chitosan and its applications. Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4: 312-331.

18- Gupta, P. K. (2002). Cytology Genetics and Evolution. Rastogi Publications. India, 864p.

19- 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.

20- Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosroushahi, M., Maghdibadi, H., Dadpour, M.R. and Omidi, Y. (2005). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus bacata*. Cell Biology International Reports, 30(3): 9-262.

21- Kim S.J., Lee S.Y. and Park, S. (2004). Agrobacterium mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports, 23: 386-390.

22- Kim, S.J., Lee, S.Y. and Park, S. (2009). An efficient protocol for peant (*Arachis hepogaea* L) transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. Romanion Biothechnological Letters, 14(5): 4641-4647.

23- Lavania, U.C. (1988). Development of fertile autotetrapliod strain in *Hyoscyamus muticus*. Journal of Tropical Agricultural, 65: 277-278.

24- Lavania, U.C. (1988). Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotetraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). Euphytica, 38: 271-276.

25- Levin, D.A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist, 122:1-25.

26- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of Artemisia annua L. *Biotechnology letters*, *29*(7), 1143-1146.

27- Randall, D.D., Nelson, C.J., and Asay, K.H. (1977). Ribulose bisphosphate carboxylase altered genetic expression in tall fescue. Plant Physiology, 59: 38-41.

28- Rechinger, H. (1986). Labiatae in flora iranica. Akademische Druck Verlagsantalt, Graz, Austria, 701p.

29- Righetti, L., Franceschetti, M., Ferri, M., Tassoni, A. and Bagni, n. (2007) Resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions treated with several elicitors. Caryologia, 60: 169-171.

30- Sevon, N. and Oksman-Caldentey, K.M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica, 68: 859–868.

31- Sevón, N., Hiltunen, R. and Oksman-Caldentey, K.M. (1992) Chitosan increases hyoscyamine content in hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 2: 96-99.

32- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., 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.

33- 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.

34- Tambong, J. T., Sapra, V.T. and Garton, S. (1998). *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated *cocoyam* plantlets. Euphytica, 104: 191-197.

35- Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A. and Simon, J.E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. Biochemical Systematics and Ecology, 29: 287-304.

36- Wen Wang, J. and Yong Wu, J. (2010). Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. Application Microbiology Biotechnology, 88: 437-449.

37- Xiao, Y., Di, P., Chen, J., Liu, Y., Chen, W. and Zhang, L. (2009). Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (Smhppd) from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. Molecular Biology Reports, 36: 2019-2029.

38- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Wu, J.Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Science, 170: 853-858.

Induction Effects of Colchicine and Chitosan on Rosmarinic Acid Production in Hairy Root Cultures of Zarrin-Giah (Dracocephalum kotschyi Boiss

Ayyobi N., Hosseini B. and Fattahi M.

Horticulture Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, , Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Dracocephalum kotschyi Boiss belonging to Labiateae family is an herbaceous, pereninal and endemic plant known in Iran as Zarrin-Giah. Recent pharmacological studies demonstrated this plants with methoxylated flavonoids, have anti-cancer effects. Hairy roots were obtained from leaves explants, inoculated with 15834 strain of *Agrobacterium rhizogenesis*. In present study, The effects of biotic elicitors including, Colchicine with different cocentrations (0, 0.01, 0.03 and 0.05% (w/v)) and Chitosan (0, 50, 100 and 150 mg/l) for 48 hours on hairy root growth and Rosmarinic acid production were investigated. ANOVA results of Antioxidant activity, total phenol and total flavonoids showed significant difference among the various treatments *(P<0.01).* maximum Antioxidant activity (90.23%) was observed in 0.05% colchicine and lowest Antioxidant activity (63%) was observed in non-transformed roots. HPLC analysis revealed that the maximum Rosmarinic acid content (35.8 and 15.1 µg /mg DW) obtained in colchicine (0.05%) and chitosan (100 mg/l) respectively. Although minimum Rosmarinic acid content (13.8 µg /mg DW) were recorded in non-transformed roots. based on the importance of rosmarinic acid production in the pharmaceutical industry, the results showed that using biotechnological methods, production improving of valuable medicinal substances is acceptable.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, Rosmarinic acid, Hairy Roots, Elicitors.