

اثر القایی کیتوزان و کلشی‌سین بر تولید رزمارینیک اسید در ریشه موین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy 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 kotschy 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 رایزوزنز به دست آمد. در این مطالعه اثر محرکهای زیستی شامل محرک کلشی‌سین در غلظتهای (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۵ 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 می‌باشد 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 $35/8 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ و کیتوزان با غلظت $100 \text{ mg}/\text{l}$ ، به میزان $15/1 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ و کمترین مقدار رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد)، $13/8 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ و ثبت گردید. با توجه به اهمیت تولید رزمارینیک اسید در صنعت داروسازی، نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از روشهای فناوری زیستی امکان بهبود تولید ترکیبات ارزشمند دارویی فراهم می‌باشد. 0441-32779558

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوزنز، رزمارینیک اسید، ریشه موین، محرک

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

مقدمه

گیاه از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن می‌باشد. 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

جنس *Dracocephalum* از مهم‌ترین جنسهای تیره نعناع بوده که شامل ۱۸۶ گونه می‌باشد که ۸ گونه آن در ایران می‌روید. یکی از گونه‌های مهم بومی این جنس در ایران *Dracocephalum kotschy Boiss* است که در قسمتهای از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود (۲۸). این گونه انحصاری با نام زرین گیاه ($2n=20$) و بادرنجبویه دناپی مشخص می‌شود. زرین گیاه یکی از گیاهان در معرض انقراض ایران می‌باشد (۵).

تحقیقات اخیر نشان داده است که ترکیبات موجود در زرین

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 موین می‌تواند 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 فناوری دانشگاه ارومیه انجام گردید. برای انجام کار ابتدا بذرهاى زرین گیاه، از شرکت پاکان بذر (اصفهان-ایران) خریداری شد. به منظور 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 می‌باشد که تمام این مراحل در زیر هود لامینار انجام گردید.

القای ریشه موین: در این آزمایش ریزنمونه‌های تهیه شده از برگهای یک هفته‌ای با سویه ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوترنر ($OD = 0.4-0.3$) به مدت ۱ دقیقه به روش غوطه‌وری تلقیح داده شد و سپس به محیط کشت MS انتقال داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی در دمای 24 ± 2 جهت القای ریشه موین 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

نمی‌باشد، لازم است روشهای جدیدتری جایگزین یا تکمیل‌کننده روشهای قبلی مورد استفاده قرار گیرد. مناسب‌ترین راه برای رسیدن به این هدف، استفاده از روشهای زیست فناوری می‌باشد (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 می‌باشد (۱۰). القاء ریشه موین 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 موین از ریزنمونه‌های برگ‌ی و گیاهچه‌های یک ماهه *Dracocephalum kotschyi* توسط سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوترنر (LBA 9402، A4، ATTCC15834، A13، 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

Pandalus borealis و دیواره سلولی قارچها به دست می‌آید (۱۷). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن‌دار، به‌ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول می‌شود (۲۱). در تحقیقی اثر کیتوزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی ریشه موین *Artemisinin annua L.* صورت گرفت، و باعث افزایش آرتیمیزینین به مقدار $1/8 \mu\text{g}/\text{mg}$ شد (۲۶). کلشی سین آلکالوئیدی است که برای اولین بار از غده گل حسرت (*Colchicum autumnale*) پاییزه توسط Zeisel در سال ۱۸۸۳ استخراج شد (۶). با توجه به اهمیت زرین گیاه و ترکیبات بسیار با ارزش این گیاه که کاربرد بسیار

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: جهت اندازه‌گیری 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 اسپکتروفوتومتر 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).

$$AC: \text{میزان جذب بلنگ} = \frac{AS-AB}{AC} \times 100$$

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 اسپکتروفوتومتر 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 ($\mu\text{g/g DW}$) به دست آید (۳۳).

$$Y=0.0007X+0.0145$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت 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 اسپکتروفوتومتر و طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت شد. مقدار جذب (Y) را در معادله زیر جای گذاری کرده تا مقدار فلاونوئید کل (X) بر حسب ($\mu\text{g Qu/g DW}$) به دست آید. از کوئرسیتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (۳۲).

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 ۱/۴ منتقل گردید و در همان شرایط محیطی آزمایش قبل (شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان، فنول کل و فلاونوئید: مقدار ۰/۱ گرم از ریشه‌های خشک شده در آن، 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 سانتی‌گراد) 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 سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴ و ۳۵)

$$Y = 0.002X + 0.011$$

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

F: 5'-TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA-3'
R: 5'-TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTACTGCAGC-3'

واشرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد سپس ۳۹ سیکل دمایی شامل مرحله واشرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. به منظور آماده‌سازی 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 DNA مارکر شرکت فرمتاز استفاده گردید.

اندازه‌گیری میزان رزمارینیک اسید در نمونه‌های ریشه موین زرین گیاه: در این پژوهش از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل ۱۱۰۰ اجیلنت، مجهز به پمپ گرادیان چهار حلالی، با دتکتور

فوتودیوداری، ستون C₁₈، ۳۰ سانتیمتری استفاده گردید. برای تهیه عصاره‌ها از دستگاه اولتراسونیک یوروندا کشور ایتالیا و همچنین برای توزین ترازوی آزمایشگاهی آنالیتیکال به دقت ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ گرم مدل ED1245 شرکت سارتوریوس استفاده شد. برای کمی‌سازی 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 رقیق‌سازی محلول مادر تهیه شد و با تزریق مستقیم ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 استخراج‌کننده با نمونه کامل گردد. سپس نمونه سانتریفیوژ شده و از فاز بالایی و شفاف بعد از گذراندن از فیلتر به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 9.1 مورد تجزیه و تحلیل 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

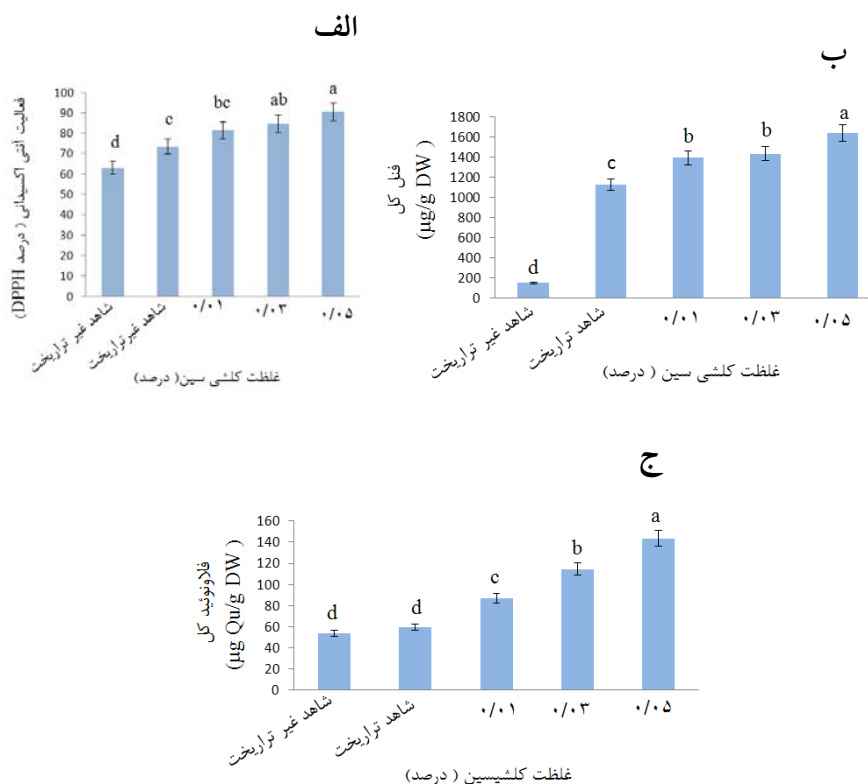
۰/۰۵ درصد می‌باشد (۹۰/۳۳ درصد). این مقدار ۱/۲۳ برابر میزان آنتی‌اکسیدان در ریشه‌های مویین تیمار نشده و ۱/۴۳ برابر ریشه‌های غیرتراریخت می‌باشد. کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز در ریشه‌های غیر تراریخت (۶۳ درصد) مشاهده گردید (شکل ۱ الف).

تأثیر کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح (۰/۰۱) قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۱). بیشترین افزایش در میزان آنتی‌اکسیدان مربوط به سطح

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر کلشی‌سین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین زیرین گیاه

منابع تغییرات	درجه	میانگین مربعات
کلشی‌سین	۴	فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۳۳۹/۷۶۶** فنونل کل ۱۰۳۴۶۳۵/۷۰۶** فلاونوئید کل ۴۲۷۹/۹۷۵**
اشتباه آزمایش	۱۰	۲۰/۰۶۶
ضریب تغییرات (درصد)		۵/۷۰

** نشان دهنده معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، می‌باشد.



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

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 می‌تواند بر میزان تنفس (۸)، فعالیت ژنی و میزان فعالیت آنزیمها تأثیر داشته باشد (۲۷). شواهد به دست آمده از آنالیزهای شیمیایی آلویلی‌پلوئید 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 Dejesus-Gonzalez و Weathers (۱۱) در درمنه (*Artemisia annua*) و *Lavania* (۲۳) در گیاه عطری ویتور (*Vetiveria zizanioides* L.) (۲۴) مطابقت دارد.

تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کیتوزان بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/01$) قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۲). با افزایش غلظت کیتوزان تا سطح 100mg/l فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش نشان داد (۸۹/۶۶ درصد). این مقدار $1/22$ برابر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های مویین تیمار نشده و $1/42$ برابر ریشه‌های غیرتراریخت بود. کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 ($P < 0/01$) وجود دارد (جدول ۲). نتایج نشان داد که افزایش سطح کیتوزان تا 100mg/l باعث افزایش در میزان فنول کل شد. بیشترین افزایش در میزان فنول کل مربوط به سطح 100mg/l با میانگین $1617/85\ \mu\text{g/g DW}$ و کمترین میزان فنول کل در ریشه‌های غیر تراریخت با میانگین $144/52\ \mu\text{g/g DW}$ بود.

تأثیر کلشی‌سین بر میزان فنول کل: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فنول کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/01$) قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۱). افزایش سطح کلشی‌سین تا $0/05$ درصد با افزایش تولید فنول کل ($1632/61\ \mu\text{g/g DW}$) همراه بود. این مقدار $1/45$ برابر میزان فنول کل در ریشه‌های مویین تیمار نشده و $11/29$ برابر ریشه‌های غیرتراریخت بود. کمترین میزان فنول کل نیز در ریشه‌های غیر تراریخت ($144/52\ \mu\text{g/g DW}$) مشاهده گردید (شکل ۱ ب).

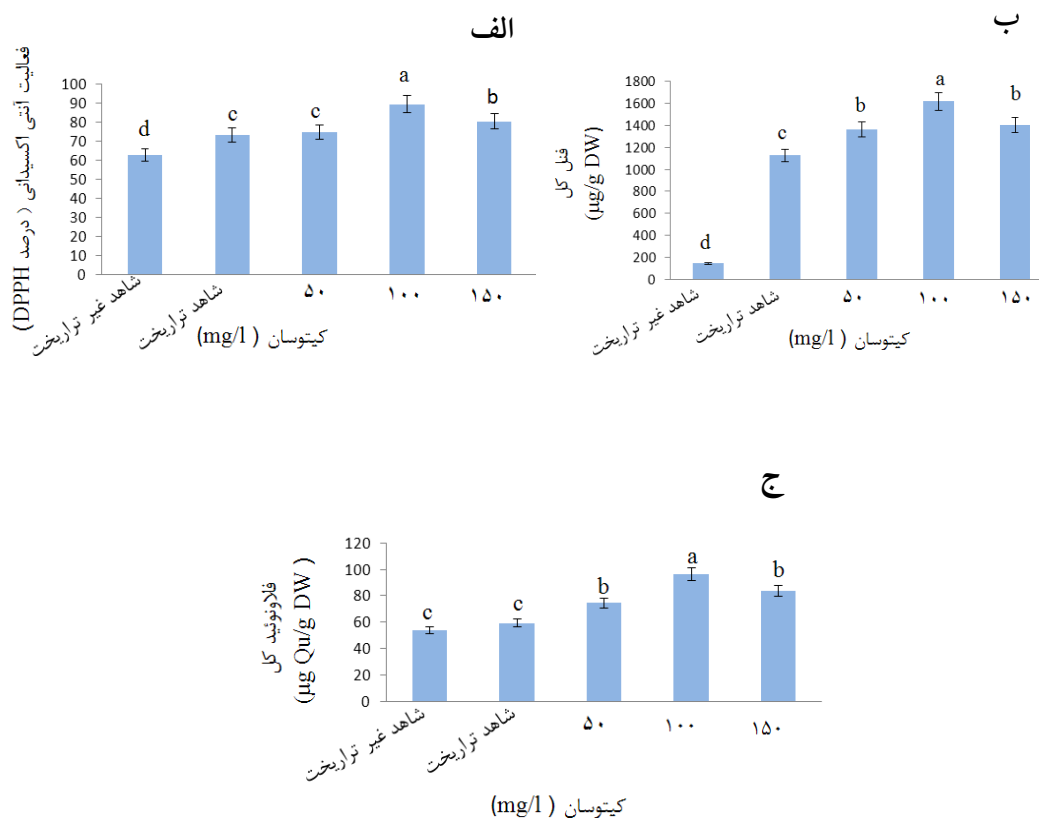
تأثیر کلشی‌سین بر میزان فلاونوئید کل: آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر کلشی‌سین بر میزان فلاونوئید کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/01$) قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۱). افزایش کلشی‌سین تا سطح $0/05$ درصد با افزایش تولید فلاونوئید کل همراه بود ($1433/50\ \mu\text{g/g DW}$). این مقدار $2/41$ برابر میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین تیمار نشده و $2/66$ برابر ریشه‌های غیرتراریخت می‌باشد. کمترین میزان فلاونوئید کل نیز در ریشه‌های غیر تراریخت ($53/83\ \mu\text{g/g DW}$) مشاهده گردید (شکل ۱ ج).

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین در محیط کشت تجمع هر فاکتور ماده آنتی‌اکسیدان، 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 می‌تواند به این دلیل باشد که کلشی‌سین منجر به افزایش سطح پلوئیدی شده و در نتیجه مضاعف شدگی مستقیم ژنومیک به وجود می‌آید، مواد ژنتیکی آنها مشابه باقی مانده و فقط دز ژنی افزایش می‌آید، بنابراین منجر به افزایش تولید متابولیتها در اتوتراپلوئیدها می‌شود. یک مدل رایج جهت توجیه این تغییرات را، کاهش نسبت غشای هسته به مقدار کروماتین آن می‌دانند. این کاهش سطح منجر به افزایش

همچنین با افزایش غلظت کیتوزان به 150 mg/l میزان فنول با 50 mg/l تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲ ب). کل تولید شده نسبت به مقدار آن در ریشه‌های تیمار شده جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر کیتوزان بر وزن تر و خشک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و فلاونوئید کل در ریشه‌های موین زیرین گیاه

منابع تغییرات		درجه آزادی					منابع تغییرات
فلاونوئید کل	فنل کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	وزن خشک	وزن تر	مواد مؤثره	وزن تر و خشک	
$9.07/1.41^{**}$	$100.2488/1.17^{**}$	$288/1.33^{**}$	0.00009^{ns}	0.449^{**}	۴	۳	
$4.0/6.16$	$30.19/9.76$	$7/6.00$	0.00003	0.016	۱۰	۸	
$8/67$	$4/86$	$3/61$	$6/39$	$10/10$		ضریب تغییرات (درصد)	

** 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 آنتی‌اکسیدانی کل، ب: فنول کل، ج: فلاونوئید کل ریشه‌های موین زیرین 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- که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) قابل مشاهده می باشد (جدول ۲). افزایش سطح کیتوزان تا های حاصل از اثر کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل نشان داد

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 آمونیلایز (PAL) باعث تولید فیتوالکسین‌هایی 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 رایزورژن بعد از یک هفته ریشه موین تولید کردند (شکل ۳). نتایج آنالیز PCR برای ریشه‌های تراریختی احتمالی، حضور قطعه‌ای حدوداً به طول ۷۸۰ bp 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 ریشه‌های غیرتراریخت، و ریشه‌های موین تحت تأثیر محرکهای مختلف به وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد (شکل ۵). مطابق (جدول ۳) مقدار رزمارینیک اسید، کمترین مقدار رزمارینیک اسید مربوط به ریشه‌های غیر تراریخت، $13/8 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌های تراریخت تیمار شده با محرک کلشی-سین با غلظت $0/05$ درصد به میزان $35/8 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ و کیتوزان با غلظت 100 mg/l ، به میزان $15/1 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ می‌باشد. در تحقیق حاضر تجمع رزمارینیک اسید در ریشه‌های موین احتمالاً به دلیل برخی تغییرات بیوشیمیایی در متابولیسم گیاه-آگروباکتریوم رایزورژن می‌باشد (۱۶). مقدار رزمارینیک اسید در ریشه‌هایی که با محرکها تیمار

سطح 100 mg/l باعث افزایش در میزان فلاونوئید کل شد. بیشترین افزایش در میزان فلاونوئید کل مربوط به سطح 100 mg/l با میانگین $(96/33 \mu\text{g}/\text{g DW})$ و کمترین میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های غیر تراریخت با $(\mu\text{g}/\text{g})$ $(53/83 \text{ DW})$ مشاهده گردید. با افزایش غلظت کیتوزان به 150 mg/l میزان فلاونوئید کل تولید شده نسبت به مقدار آن در ریشه‌های تیمار شده با 50 mg/l تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲ ج).

نتایج مطالعه نشان داد که با تغییر غلظت کیتوزان، خصوصیات بیوشیمیایی ریشه‌های موین تحت تیمار تحریک‌زایی تغییر می‌یابد اما این تغییر رابطه مستقیمی با افزایش غلظت عنصر محرک ندارد و می‌تواند 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 می‌رسد 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 می‌باشد. بعد از سیگنال تحریک، گیرنده‌های گیاهی سیگنال اجرایی‌شان را مثل نشست یونی، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال،

نشان داد. در ارتباط با دلیل اصلی اثر این محرکها بر تغییر تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما مواد غذایی و شرایط محیطی نیز بر آن مؤثر می‌باشد (۳۰).

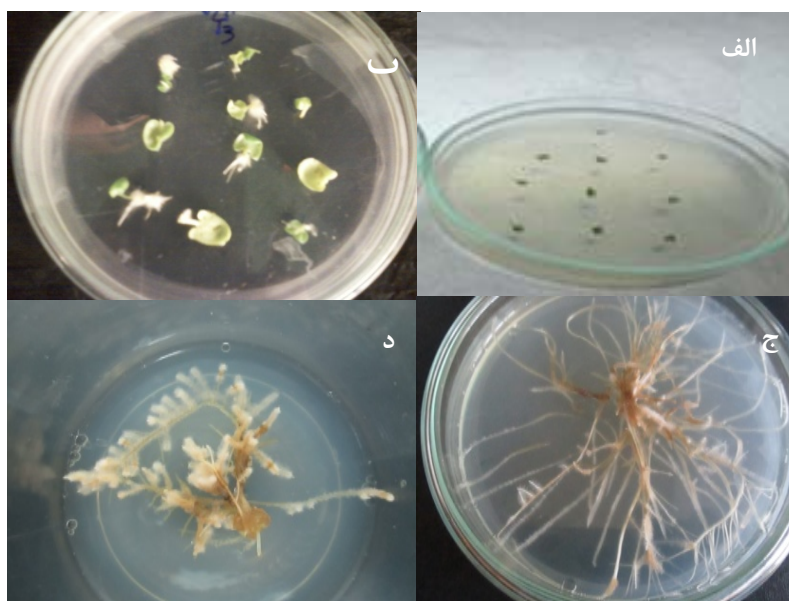
شده‌اند خیلی بیشتر از ریشه‌های تیمار نشده بود. بیوستنز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما مواد غذایی و شرایط محیطی نیز بر آن مؤثر می‌باشد (۳۰).

جدول ۳- اندازه‌گیری 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

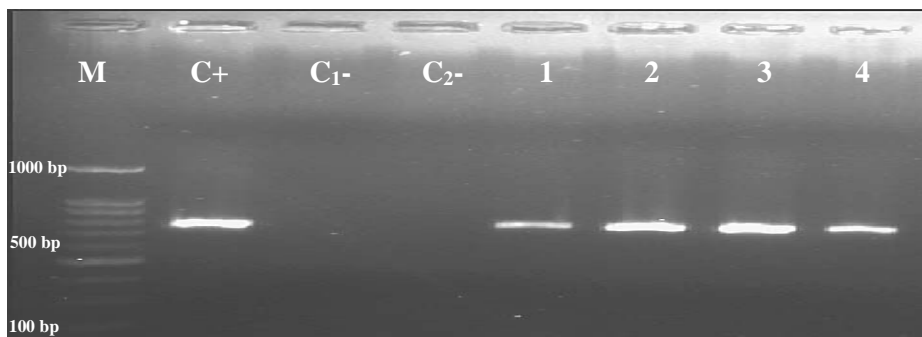
در این مطالعه دو نوع محرک زیستی جهت تحریک تولید رزمارینیک اسید مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آنالیز HPLC تغییر در میزان اسید رزمارینیک را در هر دو تیمار

Yan و همکاران (۳۸) تجمع رزمارینیک اسید و فعالیت آنزیمهای تیروزین آمینوترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیا لایاز (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 ریزنمونه‌های 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 (لایین پررشد) در محیط کشت جامد MS (د) ریشه مویین (لایین کم رشد) در محیط MS جامد

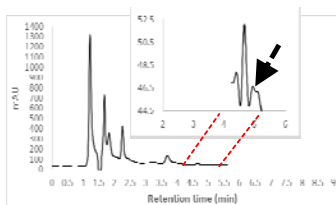
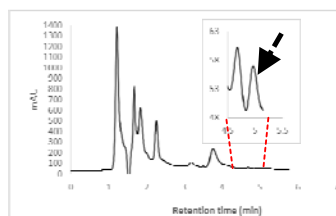
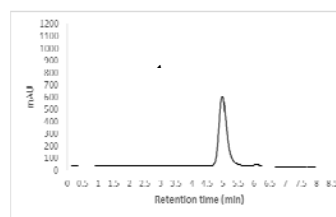


شکل ۴- آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های تراریخت زین گیاه. M: DNA مارکر 1kb (Fermentase). C+: باکتری آگروباکتریوم سویه ۱۵۸۳۴ به عنوان کنترل مثبت. C₁-: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی اول. C₂-: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی دوم. لاین ۱-۴: ریشه‌های مویین القاء شده در ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای توسط سویه ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوزن.

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 فیتوالکسین‌ها (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 آنتی‌اکسیدانها 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

زین گیاه از گیاهان دارویی مهم و باارزش می‌باشد که



شکل ۵- کروماتوگرام HPLC برای تعیین مقدار رزمارینیک اسید ریشه‌های مویین گیاه بذرالینج مشبک

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

امکان تغییر متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. به نظر می‌رسد با انتخاب و تعیین محرک مناسب زیستی یا غیر زیستی به راحتی امکان تولید متابولیت‌های با ارزش از طریق کشت ریشه مویین فراهم گردد.

به دلیل عدم توجه کافی دارای مشکلات متعددی می‌باشد. 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 می‌توان باعث ایجاد تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه به ویژه رزمارینیک اسید شود. با تغییر نوع محرک و غلظت آن

منابع

- ۱- بیضایی، س.، صفی‌پور افشار، ا. و سعید نعمت‌پور ف. (۱۳۹۴). تولید ترکیبات فنولی در کشت ریشه‌های مویین گیاه ترپچه (*Raphanus sativus* L). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، (انتشار آن لاین).
- ۲- شرفی، ع.، هاشمی، ه.، موسوی، ا. و آزادی، پ. (۱۳۹۲). باززایی گیاه دارویی *Dracocephalum kotschy* پس از القاء ریشه مؤثین. هشتمین همایش ملی زیست فناوری، دانشگاه تهران، ۲۸ (۳): ۲۰۸-۲۱۵.
- ۳- فتاحی، م. (۱۳۹۱). ارزیابی تنوع مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و تولید ریشه مؤثینه در بادرنجبویه دنیایی. 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). Tetraploid *Artemisia 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 kotschy* 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 kotschy* 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 Omid, 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 peanut (*Arachis hepogaea* L) transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(5): 4641-4647.
- 23- Lavania, U.C. (1988). Development of fertile autotetraploid 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 biphosphate 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- Sevón, 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 kotschy* Boiss)

Ayyobi N., Hosseini B. and Fattahi M.

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

Abstract

Dracocephalum kotschy Boiss belonging to Labiateae family is an herbaceous, perennal 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 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) obtained in colchicine (0.05%) and chitosan (100 mg/l) respectively. Although minimum Rosmarinic acid content (13.8 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) 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.