

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

فاطمه ناصری^۱، بهمن حسینی^{۲*} و لطفعلی ناصری^۳

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

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

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

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

اسید رزمارینیک به‌عنوان یکی از مهمترین پلی‌فنل‌ها شناخته شده است که یک استر از کافئیک اسید و ۳ و ۴-دی‌هیدروکسی فیل لاکتیک اسید می‌باشد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق تأثیر به‌وسیله ترکیب ضدسرطانی دوکسوروبیسین، القای آسیب به DNA را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. ریشه‌های مویین زرین گیاه حاوی اسید رزمارینیک است که دارای خواص بیولوژیکی و ضدسرطانی می‌باشد. اما به‌دلیل تولید بالای ترکیب‌های فنلی در محیط کشت مایع، ریشه‌های مویین با مشکل قهوه‌ای شدن و مرگ بافت‌ها مواجه می‌شوند. در این تحقیق تأثیر ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی بر رشد ریشه‌های مویین زرین گیاه و جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنها مطالعه شده است. ریشه‌های مویین از تلقیح کوتیلدون‌های دو هفته‌ای درون شیشه‌ای زرین گیاه توسط آگروباکتریوم رایزوترن سویه ۱۵۸۳۴ القاء شدند. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *roIB* انجام گردید. به‌منظور بهینه‌سازی رشد و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌ها در محیط کشت پایه ۱/۲MS مایع از مواد ضداکسایشی مختلف شامل اسید آسکوربیک (۰/۱g/L و ۰/۰۵)، MES بافر (۵/۳۳g/L و ۲/۶۶)، زغال فعال (۳g/L و ۱/۵) و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) (۱/۵g/L و ۰/۵) هر یک در دو غلظت متفاوت استفاده شد. برای بررسی کیفی ریشه‌های مویین تولیدی تحت تأثیر بافرهای مختلف، خواص فیتوشیمیایی نمونه‌ها (فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پس از ۲۱ روز بهترین محیط کشت برای افزایش زیست‌توده (۱/۶۴g) و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین، محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۱/۵g/L زغال فعال بود. پس از زغال فعال بیشترین میزان زیست‌توده (۱/۳۶g) در دو غلظت PVP و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن و کاهش رشد در نمونه‌های شاهد مشاهده گردید. حداکثر و حداقل میزان فنل و فلاونوئید کل به‌ترتیب در نمونه‌های شاهد و تیمار زغال فعال ۱/۵g/L مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب مربوط به زغال فعال ۱/۵g/L و نمونه‌های شاهد بود. کنترل pH محیط کشت و همچنین مهار آنزیم PAL از طریق استفاده از مواد ضد اکسایشی مانند زغال فعال و PVP، توان قابل توجهی را برای کاهش بیوسنتز ترکیب‌های فنلی و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ایجاد می‌کند.

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

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dacocephalum kotschy* Boiss. گیاهی از تیره نعناع (Lamiaceae) می‌باشد که دارای خواص دارویی متعددی است (Fattahi *et al.*, 2016). با توجه به اینکه سرعت و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت آهسته بوده و مدت زمان زیادی برای تولید آنها لازم است، بنابراین برای تولید ترکیب‌های دارویی از فناوری DNA نو ترکیب و انتقال ژن به دلیل آگروباکتریوم استفاده می‌شود (Ebrahimi *et al.*, 2015). ریشه مویین نوعی بیماری گیاهی است که توسط آلوده‌سازی ماده گیاهی با سویه‌های ریزوبیوم رایزوزنز (*Rhizobium rhizogenes*) (بیشتر با آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*)) ایجاد می‌شود (Pezeshki & Petersen, 2018). برخی از مشکلات اصلی در کشت بافت زرین گیاه قهوه‌ای شدن، کاهش شدید سرعت رشد و در نهایت از بین رفتن ریشه‌های مویین این گیاه در محیط مایع می‌باشد. قهوه‌ای شدن اکسیداتیو مشکل رایج در کشت بافت گیاهی است که سبب کاهش رشد، درصد پایین باززایی و یا در نهایت سبب مرگ سلول، بافت یا گیاه می‌شود. علت اصلی قهوه‌ای شدن بافت‌ها، تجمع و متعاقباً اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی در بافت و محیط کشت می‌باشد. ترکیب‌های فنلی می‌توانند از طریق ایجاد تغییرات در pH محیط کشت، سبب جلوگیری از جذب ترکیب‌های مورد نیاز نمونه‌های گیاهی شده و از این طریق نیز سبب مرگ سلول‌ها و در نتیجه قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردند (Maxwell *et al.*, 2013). تیمار نمونه‌ها با بازدارنده‌های فعالیت آنزیم PAL، می‌تواند قهوه‌ای شدن را کاهش داده و از تجمع ترکیب‌های فنلی آزاد جلوگیری کند (Nguyen *et al.*, 2003). پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP: Polyvinylpyrrolidone) یک پلی‌آمید بافری است که بسیاری از محققان از آن برای جذب سطحی ترکیب‌های فنلی در کشت بافت استفاده کرده‌اند (George *et al.*, 2008). MES بافر (2-[N-morpholino]

(ethanesulfonic acid (MES buffer) یکی از محدود بافرهای تجاری با اثرگذاری بالا می‌باشد که با ظرفیت بافری معنی‌دار، در pH بین ۵-۶ به محیط کشت گیاهان افزوده می‌شود. زیرا این بافر ظرفیت پایینی برای ترکیب شدن با میکرومولکول‌ها دارد (George *et al.*, 2008). اسید آسکوربیک از آنتی‌اکسیدان‌های مهم سلولی می‌باشد که با واکنش‌های مهم آنزیمی و غیرآنزیمی در جذب گونه‌های فعال اکسیژن شرکت می‌کند (Daneshmand, 2014). زغال فعال دارای شبکه‌ای از منافذ با سطح داخلی (فضای خالی) بزرگ است که می‌تواند بسیاری از مواد را به خود جذب کرده و در کشت بافت برای بهبود رشد و توسعه سلولی استفاده شود (Dennis, 2008). Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه دارویی باب‌آدم (*Arctium lappa* L.)، بهترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به PVP با غلظت ۵٪ (w/v) را گزارش کردند. Shirazi و همکاران (۲۰۱۸) به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) در محیط کشت پایه MS مایع زغال فعال ۱٪ را گزارش نمودند. ترکیب‌های معمول و رایج محیط کشت‌های معمولی ظرفیت کمی در خاصیت بافری دارند، به همین علت استفاده از بافرهای ویژه به منظور حفظ pH در سطح انتخابی و ثابت نگه داشتن آن حائز اهمیت است. بافر مؤثر بافری است که بتواند pH را با کمترین تغییرات تا زمان بدست آمدن محصول کشت بافتی تثبیت کند (George *et al.*, 2008). به منظور تولید بهینه ریشه‌های مویین زرین گیاه ابتدا باید مشکل قهوه‌ای شدن ریشه‌ها برطرف شود. بدین منظور بهینه‌سازی و فراهم نمودن محیط کشت مایع استاندارد ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی اثر بافرهای مختلف برای رشد ریشه‌های مویین زرین گیاه و جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنها ارائه نشده است، بنابراین هدف اصلی از این تحقیق معرفی بهترین بافر با بالاترین اثرگذاری از بین ۴ بافر PVP، MES، بافر، اسید آسکوربیک و زغال فعال برای حفظ pH محیط می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

آزمایش‌های این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه انجام شد. بذرهای زرین گیاه پس از ضدعفونی سطحی در محیط کشت MS، کشت و در اتاق‌های رشد با دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها

سوسپانسیون باکتری *A. rhizogenes* سویه ۱۵۸۳۴، از کشت تک کلونی باکتری در محیط کشت (Luria) LB (Bertani, 1951) مایع حاوی ۵۰ mg/L آنتی‌بیوتیک ریفامپسین بدست آمد. ریزنمونه‌های تهیه شده از کوتیلدون‌های دو هفته‌ای در شرایط استریل به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری با $0.4-0.6$ OD₆₀₀ غوطه‌ور شدند. پس از خشک کردن ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل، به مدت ۴۸ ساعت به محیط کشت MS حاوی

استوسرینگون با غلظت $150 \mu\text{M}$ منتقل گردیدند. پس از دو روز هم‌کشتی (Co-culture)، شستشو انجام و نمونه‌ها به محیط کشت $1/2\text{MS}$ جامد حاوی ۲۵۰ mg/L سفوتاکسیم منتقل شدند. واکنش ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام و در هر دوره واکنش، غلظت سفوتاکسیم به میزان ۵۰ mg/L کاهش داده شد تا در نهایت از محیط کشت حذف گردید.

تأیید مولکولی انتقال ژن به ریشه‌های مویین

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های مویین احتمالی با استفاده از روش CTAB انجام شد (Khan et al., 2007). همچنین DNA ژنومی ریشه‌های غیر تراریخت و پلاسמיד باکتری *A. rhizogenes* به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند (Soleimani et al., 2012). DNA استخراج شده به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تعیین حضور ژن roIB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طبق برنامه مربوطه انجام گردید. توالی آغازگرهای ژن roIB به صورت زیر بود.

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

گرم در لیتر، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۵ و ۱/۵ گرم در لیتر، زغال فعال ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ و ۰/۱ گرم در لیتر به محیط‌های $1/2\text{MS}$ مایع افزوده شدند. محیط کشت $1/2\text{MS}$ مایع، فاقد ترکیب‌های ضداکسایشی به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همچنین محیط کشت ارلن‌ها هر هفته تعویض و تجدید گردید.

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

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

تکثیر ژن roIB با آغازگرهای اختصاصی بیان شده، برای ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای 94°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای 60°C به مدت ۱ دقیقه و سنتز DNA در 72°C به مدت ۱ دقیقه و ۱۰ ثانیه انجام شد.

استقرار ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع و اعمال تیمارها

۳۰۰ میلی‌گرم از لاین انتخابی ۱۸ (انتخاب لاین پر رشد براساس اندازه‌گیری میزان رشد انجام شد) به ارلن‌های ۲۵۰ ml حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط کشت $1/2\text{MS}$ مایع همراه با توری منتقل شده و غلظت‌های مختلفی از ترکیب‌های ضداکسایشی شامل: بافر MES در دو غلظت ۲/۶۶ و ۵/۳۳

شاخص‌های اندازه‌گیری

میزان رشد زیست‌توده با استفاده از اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌ها با ترازو با دقت 0.001 g و خواص فیتوشیمیایی با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر (HALO DB-20) Dynamica در طول موج مربوطه سنجیده و محاسبه شد.

عصاره‌گیری متانولی

عصاره‌گیری متانولی به روش Hajimahdipour و همکاران (۲۰۰۹) به منظور اندازه‌گیری فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شد. در این روش 0.5 گرم از ریشه مویین به داخل هاون سرد منتقل و بعد 10 میلی‌لیتر متانول 80% به آن افزوده و به‌طور کامل ساییده شد. آنگاه نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه با 10000 دور در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و پس از جداسازی محلول رویی، از آن به‌منظور انجام اندازه‌گیری‌ها استفاده گردید.

اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل با استفاده از روش Slinkard و Singleton (۱۹۷۷)، 150 میکرولیتر از عصاره با 1200 میکرولیتر معرف فولین 10% داخل لوله‌های آزمایش اضافه و پس از 5 دقیقه انتظار، 960 میکرولیتر کربنات سدیم 7.5% و در نهایت 180 میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. پس از 30 دقیقه، در شرایط تاریکی میزان جذب در طول موج 760 نانومتر خوانده شد. مقدار جذب بدست‌آمده از اسپکتروفتومتری (Y) در رابطه حاصل از کالیبراسیون که در زیر ارائه شده است، جایگذاری شده و مقدار فنل کل (X) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک بیان گردید.

$$Y = 0.144X + 0.2303$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل با استفاده از روش Shin و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. طی این روش 300 میکرولیتر از عصاره متانولی در لوله آزمایش اضافه و 150 میکرولیتر نیتريت سدیم 5% به آن افزوده شد. پس از 5 دقیقه، 300 میکرولیتر کلرید آلومینیوم 10% و 1000 میکرولیتر سود 1 مولار اضافه و میزان جذب در طول موج 380 نانومتر قرائت گردید. در نهایت محاسبه آن برحسب کوئرستین / گرم ماده خشک بیان شد.

$$Y = 0.013X - 0.159$$

Y: مقدار جذب

X: فلاونوئید کل

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از DPPH از روش Chiou و همکاران (۲۰۰۷) استفاده گردید. بدین‌منظور 50 میکرولیتر از عصاره متانولی همراه با 950 میکرولیتر DPPH ($6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) در لوله آزمایش اضافه و پس از 30 دقیقه میزان جذب آن در طول موج 517 نانومتر قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بدست آمد.

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

AC: میزان جذب بلنک

AS: میزان جذب نمونه

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها

یک روز پس از برداشت ریشه‌های مویین، 0.5 گرم از بافت ریشه در هاون سرد با $2/5$ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7.5$ ساییده شد تا عصاره همگنی بدست آمد. عصاره حاصل به مدت 20 دقیقه در دمای

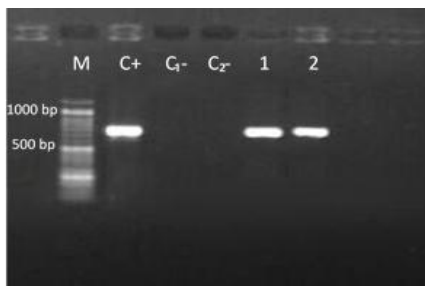
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

نتایج

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین

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



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

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

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6)

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

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) (EC 1.11.1.7)

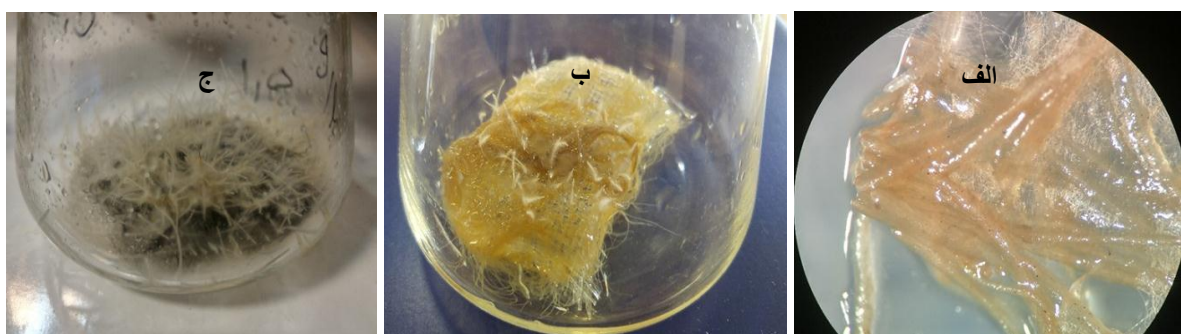
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به‌عنوان سوبسترا و براساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. افزایش جذب به‌دلیل اکسیداسیون گایاکول، در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین کل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

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC 1.11.1.1)

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

تر ریشه‌ها داشتند ($1/36g$) اما تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف این تیمار مشاهده نگردید. همچنین آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر نوع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان قهوه‌ای شدن، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). با بررسی تفاوت میزان قهوه‌ای شدن در نمونه‌های مختلف و در انواع محیط‌های بافری مشاهده شد که حداکثر میزان قهوه‌ای شدن ($24/5$) در نمونه‌های شاهد رخ داده است، در حالیکه کمترین میزان قهوه‌ای شدن در تیمار زغال فعال با غلظت $1/5g/L$ ($5/5$) و پس از آن در زغال فعال $3g/L$ و $PVP g/L$ ($1/5$) ($8/5$) مشاهده گردید (البته باید بیان کرد که در میان هر دو غلظت PVP و زغال فعال تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید). به‌نحوی که به‌ترتیب بافرهای MES بافر و پس از آن اسید آسکوربیک کمترین تأثیر را بر میزان قهوه‌ای شدن از خود نشان دادند (شکل ۱). با توجه به این اطلاعات می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً قهوه‌ای شدن ریشه‌ها با میزان رشد آنها رابطه معکوس دارد.

اثر ترکیب‌های ضد اکسایشی بر رشد و میزان قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر نوع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان وزن تر نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/01$) (جدول ۱). بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف بافری بر رشد ریشه‌های مویین پس از گذشت ۲۱ روز نشان داد که حداکثر میزان وزن تر با افزایش $5/46$ برابری ($1/64g$) در تیمار زغال فعال با غلظت $1/5g/L$ و پس از آن در غلظت $3g/L$ زغال فعال ($1/53g$) مشاهده گردید. به‌طوری که کمترین میزان وزن تر نیز ($0/72g$) در نمونه‌های شاهد و پس از آن تیمار اسید آسکوربیک ($0/73g$) با غلظت $0/05g/L$ ثبت شد (شکل ۲). البته بین دو غلظت اسید آسکوربیک تفاوت معنی‌داری از نظر میزان وزن تر مشاهده نشد. پس از اسید آسکوربیک، افزایش وزن تر به‌ترتیب مربوط به MES بافر $2/66g/L$ ($0/95g$) و MES بافر با غلظت $5/33g/L$ ($1/28g$) بود. البته هر دو غلظت PVP نیز تأثیر بسزایی در افزایش وزن



شکل ۲- ریشه‌های مویین زیرین گیاه

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

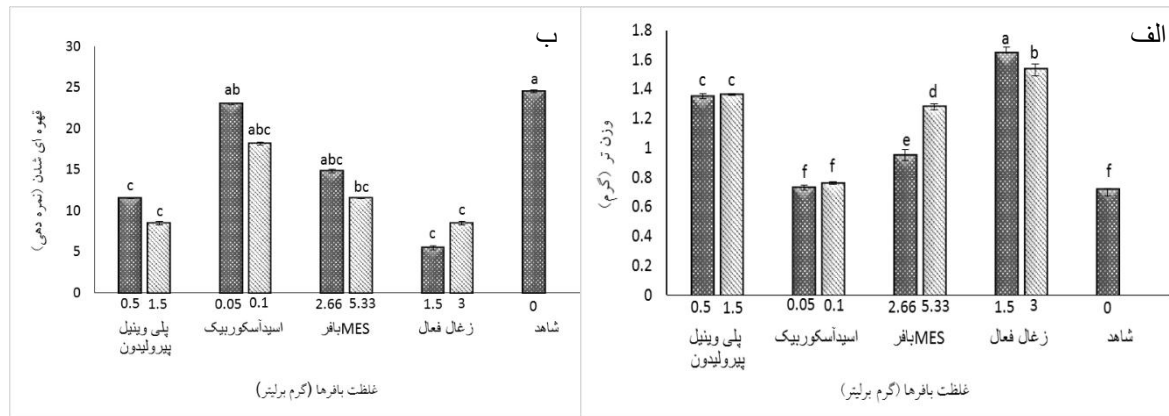
ج: نمونه تیمار شده با زغال فعال در غلظت $1/5 g/L$ پس از گذشت ۱۵ روز

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

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

** نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

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

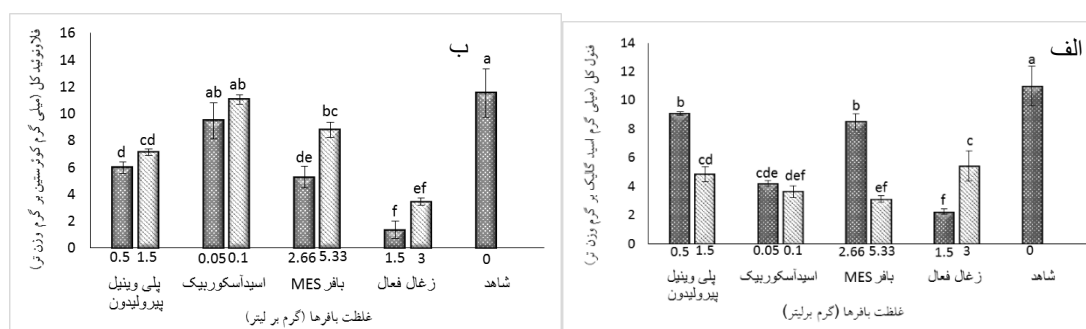


شکل ۲- اثر نوع و غلظت بافر و مواد ضد اکسایش بر الف: وزن تر ریشه‌های موین، ب: میزان قهوه‌ای شدن ریشه‌های موین زرين گیاه در محیط مایع

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد.

از سوی دیگر آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر انواع بافرها بر میزان فلاونوئید کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.01$) (جدول ۱). حداقل میزان فلاونوئید کل در هر دو تیمار زغال فعال و حداکثر میزان فلاونوئید کل در نمونه‌های شاهد (۱/۵۵ mg/g FW) مشاهده گردید. پس از آن بیشترین میزان فلاونوئید کل به ترتیب در اسید آسکوربیک (۰/۱۱ mg/L) و اسید آسکوربیک (۰/۰۵ mg/L) (۱۱/۰۷ mg/g FW) مشاهده شد. پس از این تیمارها به ترتیب MES بافر (۵/۳۳ mg/L) و (۸/۸۲ mg/g FW) و هر دو غلظت (۷/۱۳ mg/g FW) PVP بر لیتر (۰/۵ و ۱/۵) دارای حداکثر میزان فلاونوئید کل بودند (شکل ۳).

اثر نوع و غلظت بافر بر میزان فنل و فلاونوئید کل تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر انواع بافر و غلظت‌های مختلف آن بر میزان فنل کل نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.01$) (جدول ۱). حداکثر میزان فنل کل در نمونه‌های شاهد (فاقد ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی) (۱۵/۶۴ mg/g FW) مشاهده گردید که این مقدار ۶/۹ برابر میزان فنل کل در ریشه‌های مویین تحت تیمار زغال فعال (۱/۵ mg/L) و ۳/۲۲ برابر میزان فنل کل در ریشه‌های تیمار شده با PVP (۱/۵ mg/L) بود. مؤثرترین ماده در کاهش میزان فنل کل زغال فعال ۱/۵ mg/L (۲/۲۴ mg/g FW) بود. کمترین میزان تأثیر در میان بافرها نیز مربوط به MES بافر (۲/۶۶ mg/L) و (۸/۵۲ mg/g FW) و PVP با غلظت ۰/۵ mg/L (۹/۰۹ mg/g FW) بود (شکل ۳).

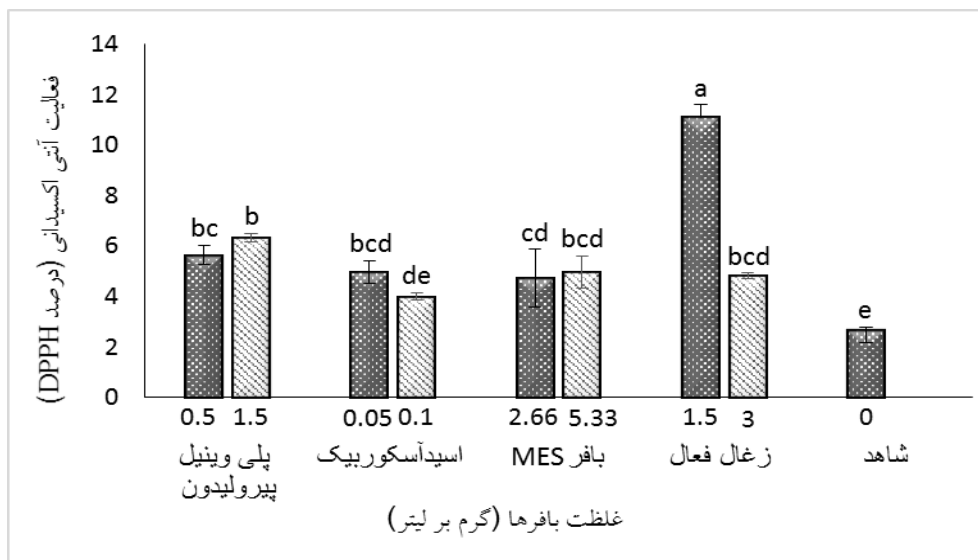


شکل ۳- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر الف: محتوای فنل کل، ب: فلاونوئید کل ریشه‌های مویین زیرین گیاه

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

زغال فعال ۱/۵ mg/L (۱۱/۱۰٪) مشاهده گردید. همچنین PVP (۱/۵ mg/L) (۶/۳۲٪) نیز تأثیر بسزایی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با نمونه‌های شاهد داشت. تأثیر بافرهای اسید آسکوربیک (۰/۱۱ mg/L) (۳/۹۹٪) و MES بافر (۲/۶۶ mg/L) (۴/۷۲٪) مشاهده نشد. افزایش ۴ برابری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زغال فعال نسبت به شاهد حکایت از آن دارد که این غلظت از زغال فعال می‌تواند برای جلوگیری از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن بسیار مؤثر و تأثیرگذار باشد (شکل ۴).

اثر نوع و غلظت بافر بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتایج بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین زیرین گیاه نشان داد که پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال بافرهای مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری در تمام محیط کشت‌های بافری نسبت به شاهد افزایش یافته است ($P < 0.01$) (جدول ۱). حداقل میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های شاهد (۲/۶۶٪) و پس از آن در تیمار اسید آسکوربیک (۰/۱۱ mg/L) (۳/۹۹٪) مشاهده شد. افزایش چشمگیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار با

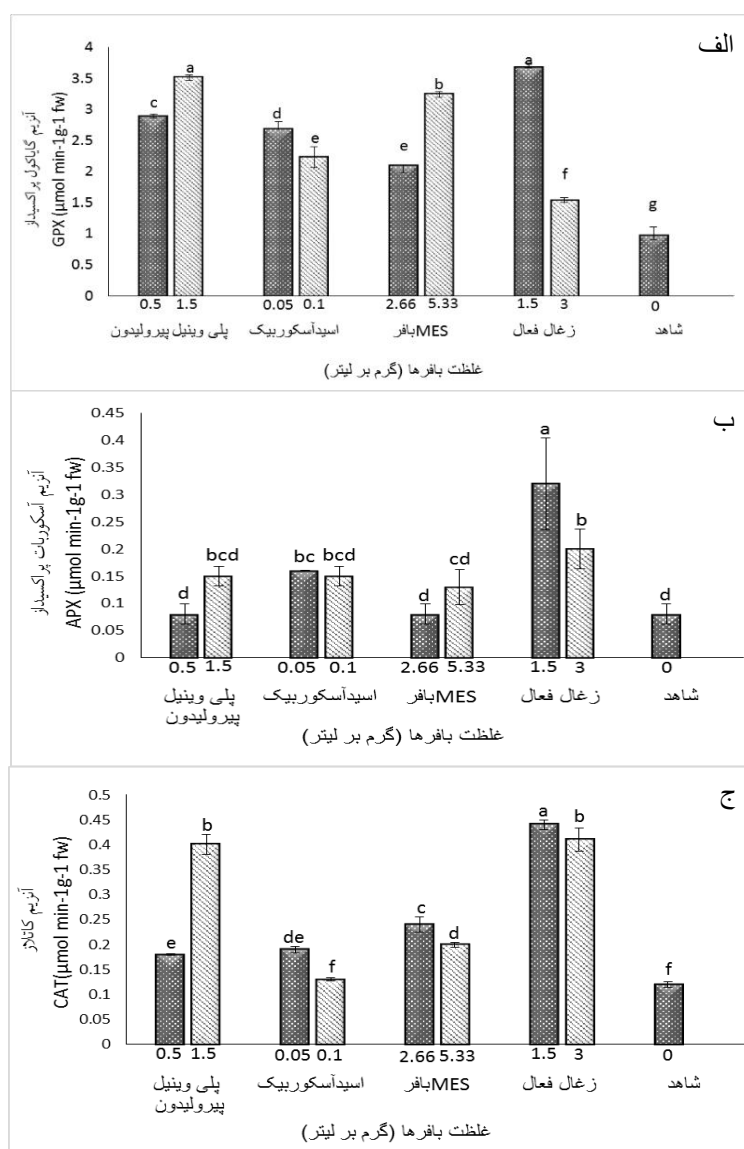


شکل ۴- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه‌های موین زیرین گیاه

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

اثر نوع و غلظت بافر بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مقایسه میانگین اثر نوع و غلظت بافر بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز نشان داد که اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.05$) و در آنزیم گایاکول پراکسیداز اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) بین تیمارها وجود دارد (جدول ۱). براساس نتایج مقایسات میانگین، کمترین میزان فعالیت هر سه آنزیم گایاکول پراکسیداز ($0.098 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$)، آسکوربات پراکسیداز ($0.08 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$) و کاتالاز ($0.12 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$) در نمونه‌های شاهد و حداکثر میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز ($3.67 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$)، آسکوربات پراکسیداز ($0.32 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$) و کاتالاز ($0.44 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$) در نمونه‌های تیمار شده با زغال فعال $1/5 \text{g/L}$ مشاهده گردید. البته باید توجه داشت که تأثیر سایر تیمارها بر میزان فعالیت هر یک از آنزیم‌ها متفاوت بوده است. به‌عنوان مثال تیمار PVP ($1/5 \text{g/L}$) سبب افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ($3/51 \mu\text{mol}/\text{min.g.FW}$) و کاتالاز

تأثیر را بر آنزیم گایاکول پراکسیداز داشتند (شکل ۵).



شکل ۵- اثر نوع بافر و مواد ضد اکسایشی بر

الف: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (معنی دار در سطح ۱٪)، ب: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

(معنی دار در سطح ۵٪)، ج: فعالیت آنزیم کاتالاز (معنی دار در سطح ۵٪) در ریشه‌های مویین زین گیاه

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد.

بحث

ترکیب‌های فنلی اکسید شده جزو مواد مسموم‌کننده بافت‌های زنده بوده و بدین ترتیب اثر بازدارندگی در رشد توده ریشه‌های مویین دارند (Al-Khayri et al., 2017). تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق با کنترل pH در محدوده تنظیم شده اولیه مانع اکسیداسیون بیشتر ترکیب‌های فنلی ریشه‌ها و

ریشه‌های مویین زین گیاه به دلیل غنی بودن از مواد مختلف فنلیکی، در معرض اکسیژن محیط کشت به سرعت قهوه‌ای می‌شوند. قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین به‌طور عمده به دلیل اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی محتوای آنهاست.

ترکیب‌های فنلی تولیدی و در نتیجه قهوه‌ای شدن ریشه‌های مویین می‌شود، در نتیجه این امر، بافت مردگی در ریشه‌ها رخ داده و عملاً رشد بیشتر ریشه‌ها متوقف شده و وزن زیست‌توده نیز کاهش می‌یابد (George et al., 2008).

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

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

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

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

بر تأثیر غلظت‌های کمتر اسید آسکوربیک هم‌راستا بود. بافرها از طریق تأثیر بر میزان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر به‌عنوان بازدارنده فرایند اکسیداتیو و از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و به تبدیل شدن رادیکال‌های آزاد به گونه‌هایی با فعالیت کمتر کمک می‌کنند که به این طریق مانع اکسید شدن ترکیب‌های فنلی و قهوه‌ای شدن بافت گیاهی می‌شوند (Krishna et al., 2008). تجمع آنتی‌بادی‌های تولید شده در ریشه‌های مویین در محیط کشت می‌تواند به‌وسیله افزودن عامل پایدارکننده پروتئین‌ها از قبیل PVP بهبود یابد. تحقیقات پیشین نیز نشان دادند که افزودن عامل پایدارکننده پروتئین‌ها (PVP) در محیط کشت می‌تواند سبب افزایش پایداری آنتی‌بادی شود (Lonoce et al., 2016). بافرهای آنتی‌اکسیدانی از قبیل اسید آسکوربیک با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مانند کاتالاز، گاپاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی سبب کاهش تنش اکسیداتیو می‌گردند (Daneshmand, 2014). در این تحقیقات نیز ممکن است مواد استفاده شده از طریق واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در حذف و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن شرکت کرده و ریشه‌ها را از تنش اکسیداتیو محافظت نمایند. البته کاهش ترکیب‌های فنلی تنها در ابتدای مراحل کشت بوده و با افزایش رشد ریشه‌ها، کاهش این ترکیب‌ها در عملکرد کلی می‌تواند جبران شود و از سوی دیگر در کشت مقیاس بزرگ در محیط کشت مایع نیاز کمتری به این ترکیب‌های کنترل‌کننده pH می‌باشد.

منابع مورد استفاده

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

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

Shirazi و همکاران (۲۰۱۸) در ریشه‌های تراریخت شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) تأثیر مثبت زغال فعال ۱٪ در محیط کشت MS مایع را گزارش کردند. گرچه ترکیب‌های فنلی معمولاً در بافت‌های سالم گیاهی وجود دارند و می‌توانند در سلول‌های اختصاصی انباشته شوند، با این حال پس از زخم شدن بافت و یا در شرایط تنش به‌عنوان یک پاسخ دفاعی به فراوانی تولید می‌شوند (Maxwell et al., 2013). اصلی‌ترین علت قهوه‌ای شدن را می‌توان وجود ترکیب‌های فنلی فراوان در زرین گیاه و اکسید شدن آنها توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز دانست که ممکن است تقریباً در تمام گیاهان یافت شود. این آنزیم در بافت‌های گیاهی مسئول قهوه‌ای شدن بافت‌ها بوده و نقش با اهمیتی در کنترل فرایندهای اکسیداتیو دارد. فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تنش‌زا، از قبیل آسیب مکانیکی و تغییر در موقعیت بیوشیمیایی افزایش می‌یابد (Krishna et al., 2008). به همین علت می‌توان یکی از دلایل قهوه‌ای شدن ریشه‌ها در محیط فاقد بافر را فعالیت بیش از حد آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در اثر جابجایی ریشه‌ها از محیط جامد به محیط مایع دانست (Maxwell et al., 2013). Yusefi و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر کالوس‌زایی و تراوش ترکیب‌های فنلی در کشت درون شیشه‌ای نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) نشان دادند که غلظت ۳۰۰mg/L اسید آسکوربیک بر کاهش تولید ترکیب‌های فنلی تأثیرگذار بود، در حالیکه غلظت‌های پایین‌تر تأثیر چندانی ایجاد نکردند. نتایج این تحقیق با نتایج این پژوهش

- hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 262-265.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
 - Nguyen, T.B.T., Ketsa, S. and Doorn, W.G.V., 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2): 187-193.
 - Pezeshki, S. and Petersen, M., 2018. Rosmarinic acid and related metabolites: 25-60. In: Schwab, W., Lange, B.M. and Wüst, M., (Eds.). *Biotechnology of Natural Products*. Springer, 316p.
 - Ramage, C.M. and Williams, R.R., 2002. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1437-1443.
 - Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D. and Watkins, C.B., 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 349-357.
 - Shirazi, Z., Alami, A., Tohidfar, M. and Sohani, M.M., 2018. Metabolic engineering of glycyrrhizin pathway by over-expression of beta-amyrin 11-oxidase in transgenic roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Molecular Biotechnology*, 60(6): 412-419.
 - Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1): 49-55.
 - Soleimani, T., Keihanfar, M., Piri, Kh. and Hasanlu, T., 2012. Hairy root induction in burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 4(44): 176-184.
 - Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3): 613-619.
 - Yusefi, Z., Majd, A., Kolahi, M. and Jonubi, P., 2015. Effect of ascorbic acid on callus induction and exudation of phenolic compounds on in vitro culture of *Saccharum officinarum* L. varieties cp48-103. *Second National Conference on Cellular and Molecular Genetics*, Parand city, 10-11 November: 3.
 - Zhang, J., Liu, H., Sun, Y., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2, 4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1): 185-190.
 - Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 102(2): 516-522.
 - Daneshmand, F., 2014. The effect of ascorbic acid on reducing oxidative stress from salinity in potato. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(3): 417-426.
 - Dennis, T.T., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26: 618-631.
 - Ebrahimi, R., Jafari, M., Ghadimzade, M. and Abdollahi Mandolkani, B., 2015. Optimization of induction and culture conditions of transgenic muine roots in medicinal plant of *Scrophularia deserti*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 7(4): 1-20.
 - Fattahi, M., Bonfill, M., Fattahi, B., Claveria, L.T., Sefidkon, F., Cosid, R.M. and Palazon, J., 2016. Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschy* Boiss at three phenological stages using uni- and multivariate methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4): 177-185.
 - George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J., 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer-Verlag, New York, LLC, 501p.
 - Hajimahdipour, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Piralı Hamedani, M., 2009. Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. *Journal of Medicinal Plants*, 4(8): 145-152.
 - Khan, S., Irfan, Q.M., Kamaluddin, A.T. and Abdin, M.Z., 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology*, 6: 175-178.
 - Krishna, H., Sairam, R.K., Singh, S.K., Patel, V.B., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L. and Sachdev, A., 2008. Mango explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 118(2): 132-138.
 - Lonoce, C., Salem, R., Marusic, C., Jutras, P.V., Scaloni, A., Salzano, A.M., Lucretti, S., Steinkellner, H., Benvenuto, E. and Donini, M., 2016. Production of a tumour-targeting antibody with a human compatible glycosylation profile in *N. benthamiana* hairy root cultures. *Biotechnology Journal*, 11(9): 1209-1220.
 - Maxwell, A., Jones, P. and Saxena, P.K., 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. *PLoS One*, 8: 10.e76802.
 - Morgan, J.A., Barney, C.S., Penn, A.H. and Shanks, J.V., 2000. Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus*

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

F. Naseri¹, B. Hosseini^{2*} and L. Naseri³

1- M.Sc. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir

3- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: March 2019

Revised: October 2019

Accepted: October 2019

Abstract

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

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