

تأثیر کاربرد نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO₂ NPs) بر میزان ترکیبات پلی‌فنولی، فیتوشیمیایی و پروتئین SO6 ریشه‌های موئین *Saponaria officinalis*

حسین هنری^{۱*}، احد هدایتی^۲، زهرا مشیری^۳، محمدعلی ابراهیمی^۴، افسانه منوچهری^۵

۱ و ۲. دانشیار و دانشجوی مقطع دکتری، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

۳. دانشجوی مقطع دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) قزوین، ایران.

۴ و ۵. استاد و دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱)

Effect of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) application on the polyphenolic, phytochemical and SO6 protein compounds content in *Saponaria officinalis* hairy roots

Hossein Honari^{1*}, Ahad Hedayati², Zahra Moshiri³, Mohammad Ali Ebrahimi⁴, Afsaneh Manouchehri⁵

1, 2. Associate Professor and Ph.D. Student, Biology Science and Technology Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

3. Ph.D. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

4, 5. Professor and M.Sc. Student of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: 10 Nov. 2020 - Accepted: 26 Mar. 2021)

Abstract

Saponaria officinalis is a perennial plant of the clove family. Hairy root culture system is a suitable alternative to improve the production of compounds with medicinal value. Extensive application of nanotechnology in hairy root culture is a suitable substrate for the production of active elements. In this study, the effect of different concentrations of titanium dioxide nanoparticles (0, 10, 20, 30 and 50 mg / l) and two exposure times (24 and 48 hours) on growth rate, antioxidant capacity, phenol and flavonoid content, antioxidant enzymes activity, polyphenol compounds content and the amount of SO6 protein in soapy hairy roots were investigated. The highest and lowest fresh weight of hairy roots (3.09 and 0.96 g, respectively) were found in culture medium treated with 10 and 20 mg / l titanium dioxide nanoparticles at 48 and 24 hours of exposure time, respectively. The highest total Phenol (9.79 mg GAE per g FW) and flavonoid (1.06 mg Que per g FW) content were observed in hairy roots treated with 50 and 30 mg / l titanium dioxide nanoparticles at 24 and 48 hours of exposure time respectively. The highest amount of most polyphenols including rosmarinic acid, cinnamic acid and rutin were achieved during 24 hours of treatment. The highest levels of SO6 protein was obtained in hairy roots treated with 50 mg/l titanium dioxide nanoparticles after 48 hours. By laboratory optimization of hairy root production of soap plant, SO6 can be produced in fermenter.

Keywords: Hairy root, nanoparticles, *Saponaria officinalis*, SO6 protein, titanium dioxide.

چکیده

غاسول صابونی (*Saponaria officinalis*)، یک گیاه چند ساله از خانواده میخک است. سیستم کشت ریشه‌های موئین جایگزین مناسبی جهت بهبود تولید ترکیبات با ارزش دارویی می‌باشد. کاربرد گسترده فناوری نانو در کشت ریشه‌های موئین، بستری مناسب جهت تولید عناصر فعال می‌باشد. در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) در زمان‌های (۲۴ و ۴۸ ساعت) بر میزان رشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، برخی از ترکیبات پلی‌فنول و میزان پروتئین SO6 در ریشه‌های موئین غاسول صابونی بررسی شد. بیشترین و کمترین میزان وزن تر ریشه‌های موئین (به ترتیب ۳/۰۹ و ۰/۹۶ گرم) به ترتیب در محیط کشت‌های تیمار شده با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ و ۲۴ ساعت مشاهده گردید. بیشترین میزان فنول کل (۹/۷۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) و فلاونوئید کل (۱/۰۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و به ترتیب مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌دست آمد. بیشترین میزان اکثر پلی‌فنول‌ها از جمله رزمارینیک اسید، سینامیک اسید و روتین در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت تولید شد. بیشترین میزان پروتئین SO6 در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت به‌دست آمد. با بهینه‌سازی آزمایشگاهی تولید ریشه موئین گیاه غاسول صابونی، می‌توان SO6 را در فرماتور تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: تیتانیوم دی‌اکسید و پروتئین SO6، ریشه موئین، غاسول صابونی، نانوذرات.

مقدمه

غاسول صابونی با نام علمی *Saponaria officinalis* یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده میخک (Caryophyllaceae) می‌باشد که بومی اروپا و آسیا بوده و در سراسر جهان به دلیل خواص دارویی آن کشت می‌شود. این گیاه دارای ریشه‌های ضخیم و سمی بوده و در گذشته از ریشه آن برای تولید صابون استفاده می‌کردند و از این رو به آن صابونی گفته می‌شود (Petrović et al., 2018). این گیاه دارای ترکیباتی مثل ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها بوده که به دلیل وجود این ترکیبات از نظر دارویی یک گیاه با ارزش می‌باشد و از لحاظ دارویی دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری و خلط آور بوده و در طب سنتی به‌عنوان داروی مسهل صفرآ، تصفیه‌کننده‌ی خون، عرق آور، ادرار آور، ضد احتقان، مسهل و درمان خارش‌های پوستی استفاده می‌شود (Sengul et al., 2010). گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی القایی و ساختمانی برای حفاظت در مقابل بیماری‌زاهای ویروسی، باکتریایی و قارچی را در طول دوره تکامل خود به‌دست آورده‌اند. یکی از این ساز و کارهای دفاعی به‌کارگیری مواد شیمیایی است که ماهیت پروتئینی با وزن مولکولی کم داشته و پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم (RIP) نامگذاری شده‌اند. این پروتئین‌ها می‌توانند به میزان زیاد و در پاسخ به تنش‌ها در گیاهان جمع شده و با غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها فرایند پروتئین سازی را متوقف کنند. یکی از این ترکیبات ساپورین است که خانواده چند ژنی می‌باشد و در گیاه غاسول صابونی وجود داشته و حداقل ۱۰ ایزوفرم پروتئینی متفاوت از بخش‌های مختلف گیاه شامل بذر، برگ و ریشه استخراج شده است (Strip and Battelli, 2006). غلظت مهارکنندگی در ایزوفرم‌های مختلف

پروتئین‌های ساپورین متفاوت است. ایزوفرم‌های SO5، SO6 و SO9 جزو قوی‌ترین ایزوفرم‌ها می‌باشند به صورتی که این غلظت برای این سه ایزوفرم به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰۶ و ۰/۰۳۷ نانو مولار می‌باشد. پروتئین‌های این گیاه علاوه بر فعالیت ضد ویروسی و ضد قارچی، می‌توانند با اختلال در سنتز پروتئین‌ها سلول‌ها را نیز از بین ببرند و از همین رو به‌عنوان عوامل فعال بیولوژیک و ضد سرطان استفاده می‌شوند (Schrot et al., 2015). عوامل متعددی موجب محدودیت منابع در تامین ترکیبات شیمیایی می‌گردد که می‌توان با کشت سلولی (سوسپانسیون و ریشه موئین) بر آن‌ها غلبه کرد. ریشه موئین نوعی بیماری گیاهی است که توسط باکتری گرم منفی خاکزی به نام آگروباکتریوم (*Agrobacterium rhizogenes*) ایجاد می‌شود. *A. rhizogenes* باکتری گرم منفی متعلق به خانواده Rhizobiaceae می‌باشد که می‌تواند پس از فعال شدن با ترکیبات فنولی از بافت‌هایی که زخمی شده‌اند گیاه را آلوده کند. بعد از اتصال باکتری به سلول گیاهی، انتقال بخشی از پلاسمیدهای بزرگ باکتری به نام Ri- Plasmid با تلفیق پایدار به گیاه رخ می‌دهد. این امر باعث شکل‌گیری تومورهای گیاهی به نام ریشه موئین می‌شود. این تومورها قادر به تولید ترکیبات خاص (Opines) برای حمایت از رشد باکتری‌ها به‌عنوان مواد مغذی هستند (Chilton et al., 1982; Hedayati et al., 2020). ریشه‌های موئین دارای رشد سریع، تکثیر فراوان و عدم زمین‌گرایی در شرایط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی می‌باشند. ویژگی‌هایی از قبیل ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی و نگهداری آسان، ریشه‌های موئین را به‌عنوان منبعی دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است (Srivastava and Sirvastava, 2007; Hasanloo et al., 2008). تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از فناوری کشت بافت گیاهی هنوز هم دچار محدودیت‌های بیولوژیکی

لیتر) سبب کاهش در میزان رشد ریشه و گیاهچه توتون (*Nicotiana tabacum*) گردید (Frazier et al., 2104). Ghorbanpour و همکاران (۲۰۱۵)، اثر غلظت‌های مختلف محرک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO₂) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید آلکالوئیدهای تروپانی گیاه *Hyoscyamus niger* کشت شده در گلخانه را مورد بررسی قرار دادند. با افزایش غلظت محرک، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز افزایش یافت و بیشترین محتوی آلکالوئید هیوسیامین (۰/۲۸۶ گرم بر کیلوگرم) و آسکوپولامین (۰/۱۲۶ گرم بر کیلوگرم) به ترتیب در تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید به‌دست آمد. با توجه به اهمیت گیاه غاسول صابونی در زمینه پزشکی و سلامت و همچنین اهمیت کاربرد نانوذرات، این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان تولید SO₆، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین تغییر میزان پروتئین SO₆ انجام گردید.

مواد و روش‌ها

کشت بذر، تهیه ریزنمونه و تلقیح با آگروباکتریوم بذر گیاه غاسول صابونی پس از خریداری از شرکت پاکان بذر اصفهان به‌منظور برطرف نمودن خواب بذر، ابتدا به‌مدت ۴ ساعت در هیپوکلرید سدیم نگهداری شد. سپس با استفاده از اسید جیبرلیک ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و در زیر هود لامینار توسط الکل اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد و جهت جوانه زنی و تهیه ریزنمونه در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار کشت و در اتاق رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی

و زیست‌فناوری است، از جمله این مشکلات درصد پایین متابولیت‌های تولید شده در این تکنیک می‌باشد. با توجه به این‌که نقش عمده متابولیت‌های ثانویه گیاهی حفاظت از گیاه در برابر حشرات، عوامل بیماری‌زا و یا در مقابل سایر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد، راهبردهای متعددی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موئن اتخاذ شده است. کاربرد محرک‌های زیستی و غیر زیستی از جمله راهبردهای رایج به‌کار رفته، به‌منظور افزایش تولید ترکیبات باارزش دارویی می‌باشد (Hu and Du, 2006; Guillon et al., 2006). اخیراً، نانوذرات به‌عنوان نسل جدیدی از محرک‌های مؤثر، به‌طور گسترده‌ای در زمینه زیست‌فناوری و به‌منظور تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش از طریق القاء پاسخ‌های دفاعی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Marslin et al., 2017). تیتانیوم (Ti) عنصری سودمند برای گیاه است و می‌تواند جذب برخی عناصر نظیر نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی را تحریک کند (Pais, 1983). نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO₂ NPs) از نانوذرات مهمی است که می‌تواند باعث تحریک تقسیم سلولی، افزایش اندازه سلول و همچنین تحریک کالوس‌زایی در شرایط تاریکی شود و اثرات مشابهی با هورمون‌های گیاهی (سایتوکینین و جیبرلین) داشته باشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش دهد (Mandeh et al., 2012). مطالعات زیادی مبنی بر استفاده از محرک‌ها به‌عنوان راه‌کاری مهم به‌منظور بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موئن وجود دارد ولی در مورد استفاده از نانوذرات مطالعات کمی صورت گرفته است. استفاده از محرک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در غلظت‌های بالا (۵۰ گرم بر

درجه به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه به مدت ۸۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. توالی آغازگرها که جهت تکثیر قطعات 780 bp ژن *rol B* مورد استفاده قرار گرفت به صورت زیر بود:

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

تهیه غلظت‌های مختلف محرک و تیمار ریشه‌های موئین

نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد-ایران) تهیه شد. نانوذرات به شکل کریستالی با اندازه ۲۰ نانومتر بود (شکل ۳-۲). رنگ نانوذرات سفید و به لحاظ مورفولوژی کروی شکل و مساحت سطح ویژه آن $10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ تا ۴۵ و درصد خلوص این نانو ذره ۹۹ درصد بود. غلظت‌های مختلف نانو ذره تیتانیوم دی‌اکسید (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) جهت تیمار ریشه‌های موئین تهیه گردید. نیم گرم از ریشه‌های موئین غاسول صابونی به داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری توری‌دار حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ۳ تکرار، منتقل و داخل شیکر انکوباتور با ۱۱۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. در بیست و یکمین روز، محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات سیلیسیوم دی‌اکسید به ارلن‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، ریشه‌های موئین از محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف محرک نانوذرات خارج و به محیط کشت MS مایع فاقد محرک انتقال یافتند. پس از گذشت یک هفته، عمل برداشت ریشه‌های موئین صورت گرفت و بعد از شستشو با آب مقطر و حذف رطوبت اضافی ریشه‌ها توسط کاغذ صافی، وزن تر اندازه‌گیری شد.

قرار گرفتند. به منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی، دو هفته پس از جوانه‌زنی، ریزنمونه برگ‌گی در زیر هود لامینار از گیاهچه‌های مادری استریل جدا شده و داخل پتری دیش استریل قرار گرفتند. جهت تلقیح ریزنمونه‌ها از سویه A13 آگروباکتریوم رایزوزنز که از بانک میکروبی مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران-ایران تهیه گردیده بودند استفاده شد. تک‌کلون هر سویه در محیط کشت LB مایع به مدت ۴۸ ساعت و در شیکر اینکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. غلظت بهینه باکتری (OD_{600}) جهت تلقیح به میزان ۰/۵ الی ۰/۶ تعیین گردید. ریزنمونه‌ها به روش غوطه‌وری توسط سویه باکتری تیمار شدند. بدین منظور ریزنمونه‌ها پس از ایجاد زخم سطحی توسط اسکالپل استریل در محل دمبرگ و پشت برگ، به مدت ۱۰ دقیقه توسط سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند و جهت همکشتی در محیط کشت پایه MS فاقد هورمون به مدت ۴۸ ساعت و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت هم‌کشتی، ریزنمونه جهت حذف باکتری به محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند (Nourozi *et al.*, 2019).

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

به منظور تأیید حضور ژن *rol B* آگروباکتریوم رایزوزنز، DNA ژنومی ریشه‌های موئین غاسول صابونی به روش CTAB^۱ استخراج گردید (Kamalizadeh *et al.*, 2014). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور تأیید حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن *rol B* شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴

1. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

به‌دست آمد. از گالیک اسید^۴ به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (Slinkard and Singleton, 1977):

$$Y=0.0007X+0.0145.$$

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه و پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار نیز اضافه گردیده و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت شد. مقدار جذب (Y) در معادله زیر جاگذاری شده تا مقدار فلاونوئید کل (X) برحسب (mg Que/g DW) به‌دست آید. از کوئرستین^۵ به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (Shin *et al.*, 2007).

$$Y=0.0094 X+0.8712$$

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH و FRAP

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH، مقدار مشخصی از عصاره متانولی هر نمونه را در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۰/۰۰۴ گرم پودر DPPH در ۱۰۰ cc متانول ۸۰٪) اضافه شد و میزان جذب پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شده و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید. جهت تهیه شاهد (بلنک) نیز به‌روش بالا عمل و فقط به‌جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر

سپس میزان فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH^۱ و FRAP^۲ اندازه‌گیری و در نهایت شناسایی ترکیبات پلی‌فنولی با آنالیز HPLC^۳ انجام و میزان تغییرات پروتئین SO₆ بررسی شد.

عصاره‌گیری متانولی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل

به‌منظور تهیه عصاره متانولی، ۰/۱ گرم از ریشه‌های موئین فریز شده در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد، در هاون و توسط ازت مایع آسیاب شده و به داخل لوله آزمایش منتقل گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به هر لوله اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اولتراسونیک (مدل E120H ساخت کشور آلمان) گردید و در نهایت عصاره حاصل‌شده از کاغذ صافی عبور داده شده و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hajimahdipour *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری فنول کل

به‌منظور اندازه‌گیری فنول کل ابتدا به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد اضافه و پس از ۵ الی ۱۰ دقیقه، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد افزوده شد و در نهایت ۱/۵ الی ۲ ساعت در شرایط تاریکی نگهداری گردید تا رنگ نمونه‌ها به بنفش تغییر کند و سپس میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. در نهایت مقدار جذب (Y) در معادله حاصل از کالیبراسیون جایگذاری شده و مقدار فنول کل (X) بر حسب (mg Gal/g FW)

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

^۲ Ferric reducing antioxidant power

^۳ High Performance Liquid Chromatography

4. Gallic acid

5. Quercetin

عصاره حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به‌عنوان سوبسترا و براساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲/۷۷ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۷، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴ درصد بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر گرم وزن تر ($\Delta OD \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

پس از آماده‌سازی عصاره‌های آنزیمی، برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳ درصد، ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حمام یخ با یکدیگر مخلوط گردید. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوای فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر گرم وزن تر ($\text{U g}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید (Nakano and Asada, 1981).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ تهیه شد. سپس به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از آن بافر و ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳ درصد برای هر

متانول ۸۰ درصد اضافه شد (Chiou *et al.*, 2007).

$$\text{DPPH (\%)} = (\text{AC-AS/AC}) \times 100.$$

AC: میزان جذب بلنک

AS: میزان جذب نمونه

به‌منظور سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین به‌روش FRAP، مقدار مشخصی از هر عصاره با ۳ میلی‌لیتر از معرف تازه FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۳/۶، فریک-تری پریدیل-اس-تریازین ۲ و فریک کلرید) باهم مخلوط شدند. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها براساس Zugic *et al.*, (2014) بیان شد ($\text{mmol Fe}^{++}/\text{g FW}$).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

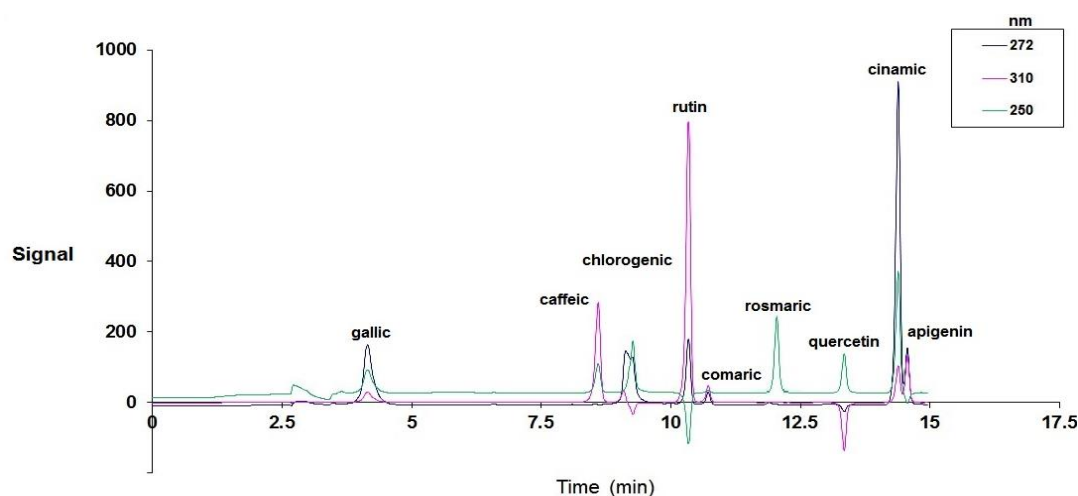
استخراج عصاره‌ی گیاهی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها جهت عصاره‌گیری، ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین فریز توزین شد و به میزان پنج برابر وزن آن بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/5$ بر حسب میلی‌لیتر اضافه و بر روی یخ به‌مدت ۲۰ دقیقه خرد شد تا یک عصاره‌ی کاملاً همگن به‌دست آمد. عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل VS-15000CFNH ساخت کشور کره جنوبی)، سانتریفیوژ شد. محلول رویی از رسوب با دقت جدا شده و به ویال‌های تمیز منتقل و با سرعت ۹۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در پایان، ویال‌ها به آرامی از دستگاه سانتریفیوژ خارج شده و محلول رویی در چند ویال کوچک توزیع گردید.

۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادیانی چهار حلالی و آشکار ساز آرایه دیودی صورت گرفت. جداسازی بر روی ستون اکتا دسیل سیلان (به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر (Shimadzu Kyoto, Japan) انجام شد. منحنی استاندارد نیز براساس سطح زیر منحنی استاندارد تمام ترکیبات (محصولات شرکت سیگما) در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسم شد. سرعت جریان حلال ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و فاز متحرک شامل استونیتریل و بافر استیک اسید به نسبت‌های ۸۰:۱۰ بود. انتخاب طول موج مناسب یکی از نکات مهم در آنالیز ترکیبات می‌باشد و با توجه به این که ترکیبات مورد آنالیز متفاوت بودند از طول موج‌های ۲۵۰ نانومتر (رزمارینیک اسید)، ۲۷۲ نانومتر (گالیک اسید)، ۳۱۰ نانومتر (کافئیک اسید)، ۳۲۰ نانومتر (کلروژنیک اسید)، ۳۱۰ نانومتر (کوماریک اسید)، ۲۷۲ نانومتر (سینامیک اسید)، ۳۶۰ نانومتر (کوئرستین) و ۳۱۰ نانومتر (روتین) استفاده شد (شکل ۱) (Fattahi *et al.*, 2013).

نمونه برداشته شد. این مواد با هم مخلوط شده و سپس ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به آن افزوده و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۱ دقیقه بررسی شد. محتوای فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای گرم وزن تر ($U\ g^{-1}\ FW$) محاسبه شد (Aebi and Bergmeyer, 1974).

استخراج ترکیبات پلی‌فنولی و آنالیز به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

جهت استخراج ترکیبات پلی‌فنولی، ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئن فریز شده با ازت مایع خرد شده و بلافاصله ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۲۵ °C در دستگاه اولترا سونیک قرار گرفت. عصاره متانولی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از گذراندن از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی جهت آنالیز ترکیبات به دستگاه HPLC تزریق گردید. جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار کمی ترکیبات پلی‌فنولی مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از دستگاه HPLC مدل سری



شکل ۱. کروماتوگرام پیک‌های استاندارد حاصل از دستگاه HPLC ترکیبات پلی‌فنولی در طول موج‌های مختلف

بررسی میزان تولید پروتئین SO6

در این پژوهش استخراج پروتئین براساس روش گای انجام شد (Guy et al., 1992). با توجه به این که بررسی کمیت و کیفیت پروتئین استخراج شده از بافت گیاهی اهمیت زیادی دارد در این تحقیق از دو روش الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE و الایزا برای این منظور استفاده گردید. از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد به منظور بررسی پروتئین بیان شده و تعیین وزن مولکولی پروتئین و از آزمون الایزا جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین SO6 ریشه‌های موئین غاسول صابونی تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو محرک استفاده شد.

آنالیز آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های حاصل از آزمایشات، در نرم‌افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها با استفاده از برنامه Excel 2007 رسم شد. همچنین همبستگی بین صفات مورد بررسی نیز با استفاده از نرم‌افزار R انجام گرفت.

نتایج و بحث

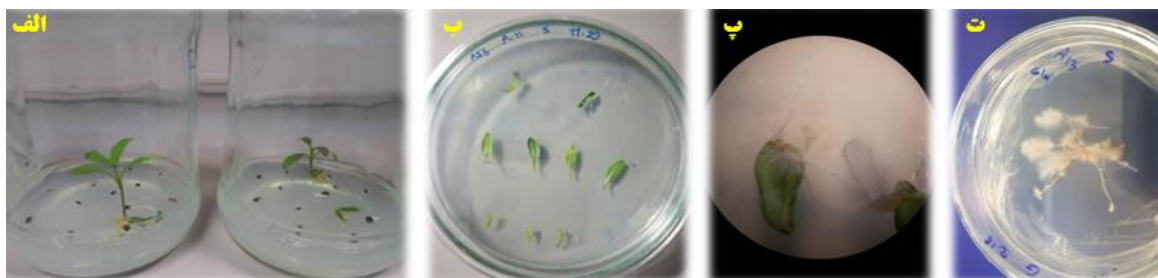
ظهور ریشه‌های موئین

ده روز پس از کشت، بذرها شروع به جوانه‌زنی کردند و هشت روز پس از تلقیح با آگروباکتریوم، اولین

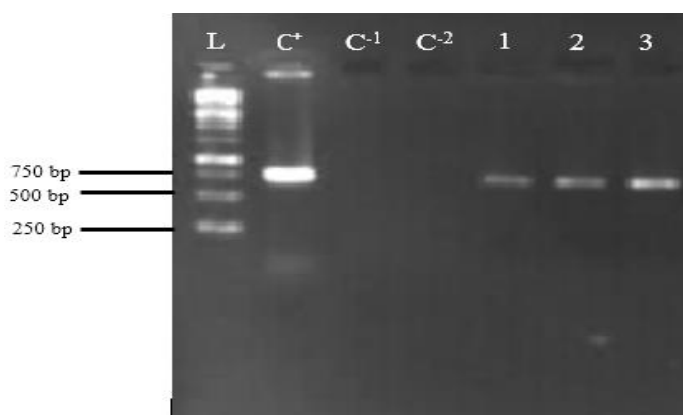
ریشه‌های موئین ظاهر شدند (شکل ۲). بعد از گذشت یک هفته، جهت افزایش رشد ریشه‌های موئین در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار به صورت تکی و لاین‌های مجزا به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون و حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند و پر رشدترین لاین انتخاب و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز PCR جهت تأیید حضور ژن *rol B* و ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین

نتایج آنالیز الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه با اندازه حدودی ۷۸۰ bp مربوط به ژن *rol B* را در ریشه‌های حاصل تأیید نمود (شکل ۳) که هم‌اندازه قطعه تکثیرشده در نمونه کنترل مثبت (آگروباکتریوم مورد استفاده در تلقیح) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی گیاه و محصول واکنش PCR بدون DNA الگو (به‌عنوان کنترل منفی)، هیچ باند تکثیری مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین بود. با توجه به این موضوع که القای ریشه‌های موئین در نتیجه انتقال ژن خارجی به سلول‌های گیاهی ایجاد می‌شود، می‌توان تراریخت بودن آن‌ها را به کمک آغازگرهای اختصاصی تأیید نمود.



شکل ۲. مراحل مختلف تولید ریشه‌های موئین گیاه دارویی غاسول صابونی. الف) کشت بذر، ب) تلقیح با آگروباکتریوم، پ) ظهور ریشه‌های موئین و ت) رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت MS جامد

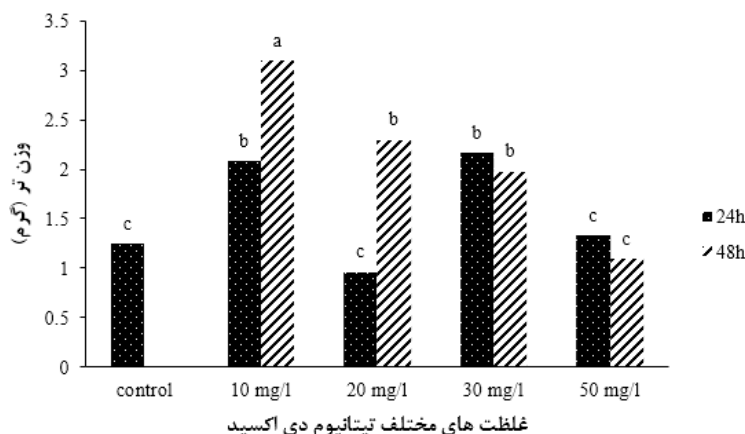


شکل ۳. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن rol B در ریشه‌های تراریخت غاسول صابونی: DNA مارکر (1 kb ladder Fermentase)، C⁺: باکتری آگروباکتریوم به‌عنوان کنترل مثبت، C⁻¹: ریشه‌های غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی اول، C⁻²: واکنش PCR بدون DNA الگو به‌عنوان کنترل منفی دوم، 1، 2، 3: ریشه‌های موئین القاء شده توسط سویه‌های A4، A13، و ATCC1583 آگروباکتریوم رایزوزنز.

فتوستنتز در گیاهان می‌گردد (Yang *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2010). در این تحقیق، اثرات تحریک‌کنندگی نانو تیتانیوم دی‌اکسید بر رشد ریشه‌های موئین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد و با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار، کاهش یافت که با نتایج حاصل از سایر مطالعات مطابقت دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در غلظت‌های بالا می‌تواند موجب آسیب به DNA شده و اثرات بازدارندگی بر رشد و پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه‌ها داشته باشد (Klančnik., 2011). در اثر کاربرد نانو تیتانیوم دی‌اکسید در گیاه بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger*)، بیشترین (۷/۵۳ گرم) و کمترین (۳/۲۴ گرم) زیست‌توده گیاهی به‌ترتیب در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر محرک حاصل گردید (Ghorbanpour *et al.*, 2015). در تحقیق انجام شده توسط Mahmoodzade و Aghili (۲۰۱۸)، مشخص گردید که نانو تیتانیوم دی‌اکسید در محدوده غلظت بهینه (۱۲۰۰ ppm) سبب تحریک رشد ریشه‌ها در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) گردید، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر نانومحرک به‌عنوان عامل محدودکننده رشد شناخته شد.

تأثیر تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان رشد ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین غاسول صابونی نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار در سطح احتمال ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین تیمار شده داشت (جدول ۱). بیشترین میزان وزن تر (۳/۰۹ گرم) در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۰/۹۶ گرم) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت مشاهده گردید. در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، با افزایش غلظت تیتانیوم دی‌اکسید میزان وزن تر ریشه‌ها کاهش یافت (شکل ۴). نانو ذره تیتانیوم دی‌اکسید منبع مناسبی از عناصر غذایی ضروری برای گیاهان به‌شمار می‌رود که سبب افزایش زیست‌توده گیاهی از طریق افزایش فعالیت‌های متابولیکی می‌گردد (Palmqvist *et al.*, 2015). نانو ذره تیتانیوم دی‌اکسید از طریق تأثیر بر متابولیسم نیتروژن، به‌وسیله القاء فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز به‌واسطه جذب نیترات، سبب بهبود رشد شده و در نتیجه باعث افزایش وزن تر، وزن خشک و میزان



شکل ۰۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با محرک تیتراتیوم دی‌اکسید بر وزن تر ریشه‌های موئین غاسول صابونی. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

داشته ولی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش نشان داد (شکل ۵-ب).

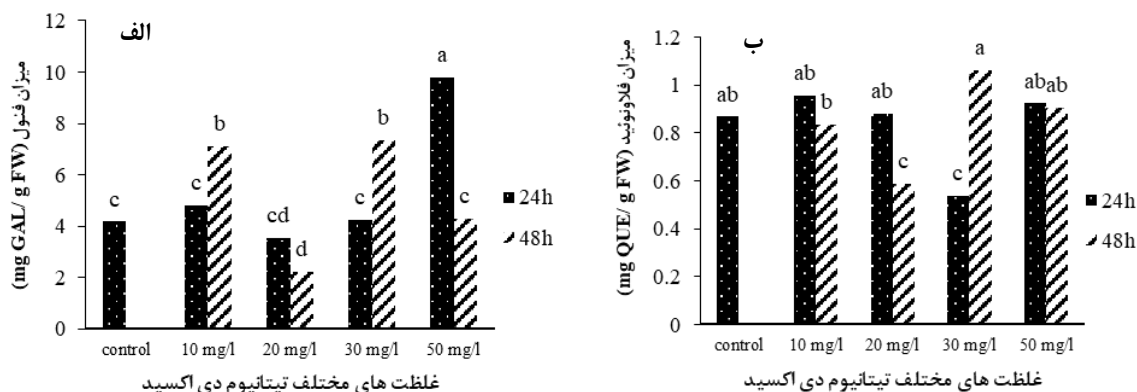
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتراتیوم دی‌اکسید بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین به‌روش DPPH و FRAP نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتراتیوم دی‌اکسید در هر دو روش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان ۳۷/۹۷ درصد بود. همچنین کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این روش در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان ۱۱/۳۷ درصد بود (شکل ۶-الف). درحالی‌که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش FRAP در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان $2 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ بود. کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این روش هم با مقدار $1 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بود (شکل ۶-ب).

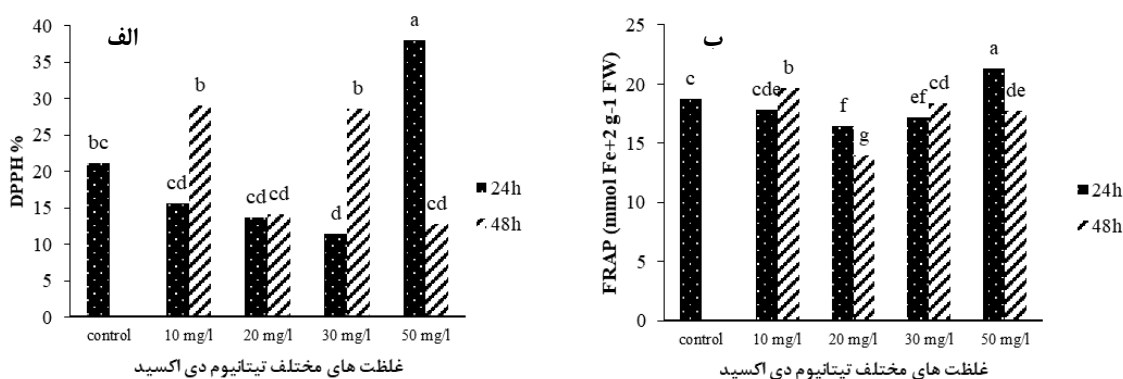
تأثیر نانوذرات تیتراتیوم دی‌اکسید بر میزان فنول، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در ریشه‌های موئین

محتوای فنول کل و فلاونوئید کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتراتیوم دی‌اکسید در سطح احتمال ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان فنول کل و فلاونوئید کل داشت. براساس نتایج مقایسات میانگین، بیشترین میزان فنول کل (۹/۷۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتراتیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و کمترین میزان فنول کل (۲/۲۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) مربوط به ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو تیتراتیوم دی‌اکسید، در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بود. با توجه به نتایج در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت، با افزایش غلظت محرک میزان فنول کل افزایش یافته است (شکل ۵-الف). بیشترین (۱/۰۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) و کمترین (۰/۵۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و به‌ترتیب در مدت زمان تیمار ۴۸ و ۲۴ ساعت، مشاهده گردید. میزان فلاونوئید کل در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر روند کاهشی



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان فنول کل (الف) و فلاونوئید کل (ب) در ریشه‌های موئین غاسول صابونی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش DPPH (الف) و FRAP (ب) در ریشه‌های موئین غاسول صابونی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

فرآیند رشد و نمو گیاهان به‌شمار می‌روند. در حال حاضر، ترکیبات فنولی به‌دلیل نقش مؤثر خود در حفاظت از گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو و تنش‌های محیطی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ghorbanpour, 2015). قرارگرفتن در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید منجر به تولید ROSها و انفجار اکسیداتیو می‌گردد (Falck et al., 2009). مکانیسم سلول‌های گیاهی جهت کنترل آسیب ناشی از غلظت‌های بالا و سمیت ناشی از نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید ناشناخته است (Laure et al., 2012). با

افزایش متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید می‌تواند بدین دلیل باشد که حضور نانوذرات در محیط باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد و همین عامل موجب می‌شود که گیاه با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فنول و فلاونوئیدها و افزایش محتوای فلاونوئید، آسیب ناشی از تنش‌های ایجاد شده را کاهش دهد (Yousefi et al., 2015; Yousefi and Riahi Madvar, 2016). ترکیبات فنولی از جمله ترکیبات مهم و ضروری در طول

وابسته به گونه گیاهی می‌باشد (Zhang *et al.*, 2018). براساس نتایج تحقیق حاضر، چنین به نظر می‌رسد که تیمار نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت، احتمالاً غلظت بهینه جهت تجمع ترکیبات فنولی در ریشه‌های موئین غاسول صابونی باشد. تأثیر نانو محرک‌ها بر افزایش تولید فنول و فلاونوئید کل در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است (Suriyaprabha *et al.*, 2012; Oloumi *et al.*, 2015). با این وجود، مطالعات در خصوص بررسی اثر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در گیاهان محدود می‌باشد. کاربرد نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) سبب تغییر در میزان فنول و فلاونوئید کل و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره گیاهی گردید، به طوری که بیشترین (۳۵/۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) و کمترین (۲۱/۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) فنول کل به ترتیب در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد حاصل گردید. همچنین، بیشترین میزان فلاونوئید کل (۲۱/۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید مشاهده شد. تغییر در مقدار ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه پنبه (*Cosyrium hirsutum* L.) تحت تأثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید گزارش گردیده است (Shallan *et al.*, 2016).

تأثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین
نتایج نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان فعالیت هر سه آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین براساس نتایج مقایسات میانگین، تیمار ریشه‌های موئین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم

این وجود تولید ROSها و آسیب اکسیداتیو به عنوان اثرات منفی نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر کارایی گیاهان در نظر گرفته می‌شود. کاهش فعالیت (و یا حذف) ROSها از طریق فعال کردن سیستم‌های دفاعی از جمله: افزایش بیان آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌های دفاعی، نقش مهمی در کاهش اثرات تنش القاشده توسط تیتانیوم ایفا می‌کنند (Ghorbanpour, 2015). افزایش ترکیبات فنولی با القاء فعالیت ویژه‌ی آنزیم PAL که آنزیم کلیدی در مسیر تولید این ترکیبات هستند تحت شرایط تنش، رخ می‌دهد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به گروه بزرگی از ترکیبات فنولی وابسته است. همچنین، رابطه‌ی مستقیمی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات فنولی در گیاهان وجود دارد (Thiruvengadam *et al.*, 2014)، همانند نتایج حاصل از این تحقیق، وجود همبستگی مثبت بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول کل در سایر گیاهان دارویی نیز گزارش شده است (Li *et al.*, 2008; Ghorbanpour, 2015). DPPH یک رادیکال آزاد ناپایدار است که در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان، می‌تواند یک الکترون و یا یک اتم هیدروژن بپذیرد تا به یک مولکول بسیار پایدار DPPH تبدیل گردد. به دلیل سهولت و سرعت بالای این آزمون، معمولاً از این روش برای بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود (Nour *et al.*, 2014). در روش FRAP ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق واکنش اکسیداسیون-احیاء مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که با تغییر رنگ همراه است (Gülçin, 2012). در این تحقیق بالا بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت می‌تواند به دلیل بالا بودن میزان فنول و فلاونوئید باشد. غلظت محرک نقش قابل توجهی در پاسخ گیاهی دارد، همچنین منجر به ایجاد مجموعه‌ای از تغییرات و فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی می‌گردد. غلظت مؤثر محرک به شدت،

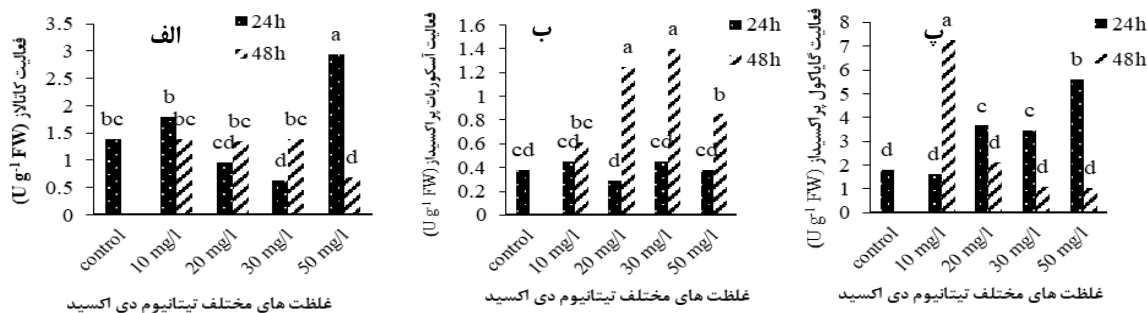
تیتانیوم دی‌اکسید به درون بافت‌های گیاهی منجر به ایجاد سمیت و افزایش میزان ROSها در داخل گیاه می‌گردد که به دنبال آن فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌منظور خنثی‌کردن اثرات نامطلوب ROSها، افزایش می‌یابد (Ebrahimi et al., 2016). مکانیسم‌های مختلفی جهت پاسخگویی به تنش اکسیداتیو ناشی از نانوتیتانیوم دی‌اکسید در گیاهان گزارش شده است؛ اولین مکانیسم مربوط به افزایش تعدیل (Modulating) مسیر پیام‌رسانی ROSها به‌واسطه نانوتیتانیوم دی‌اکسید (به‌وسیله توانایی پرواکسیدان/آنتی‌اکسیدان این ترکیب)^۱ می‌باشد (Mattiello et al., 2015) و دومین مکانیسم با تحریک متابولیسم نیتروژن در گیاهان از طریق نانو تیتانیوم دی‌اکسید در ارتباط می‌باشد (Yuan et al., 2013). گیاهان دارای سیستم سمیت‌زدایی اختصاصی به‌منظور تعدیل سطوح ROSها هستند، که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز^۲، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان به‌شمار می‌روند (Mittler, 2017). تغییر در وضعیت ROSها به‌شدت به غلظت نانو تیتانیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار وابسته می‌باشد، به عبارت دیگر، افزایش غلظت نانو تیتانیوم دی‌اکسید منجر به سمیت سلولی (ژنتیکی)^۳ در گیاهان می‌گردد (Mattiello et al., 2015; Schiavo et al., 2016). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت در مقایسه با زمان ۴۸ ساعت، ممکن است به‌دلیل افزایش تولید ROSها در ساعات اولیه بعد از تیمار و یا بازگشت آنزیم‌ها به وضعیت اولیه در اثر گذشت زمان، باشد

دی‌اکسید در مدت زمان ۲۴ ساعت بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز ($2/94 \text{ U g}^{-1} \text{ FW}$) را نشان داد. همچنین غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ($0/63 \text{ U g}^{-1} \text{ FW}$) را نشان داد (شکل ۷-الف). بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با $3/7$ و $3/3$ برابر افزایش در مقایسه با تیمار شاهد، به‌ترتیب در غلظت‌های ۳۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید. ولی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت میزان فعالیت کاهش یافت. کمترین میزان فعالیت این آنزیم هم در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان $0/29 \text{ U g}^{-1} \text{ FW}$ به‌دست آمد (شکل ۷-ب). بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ($7/26 \text{ U g}^{-1} \text{ FW}$) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت ایجاد شده است. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ($1/05 \text{ U g}^{-1} \text{ FW}$) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید (شکل ۷-پ).

آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که منجر به شکستن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و تبدیل آن به مولکول‌های آب و اکسیژن می‌گردند. گایاکول پراکسیداز به‌عنوان آنزیم تنش شناخته شده است. این آنزیم از یک پیش‌ماده نظیر ترکیبات فنولی یا آنتی‌اکسیدان‌های دیگر، به‌عنوان دهنده الکترون به H_2O_2 استفاده می‌کند و سبب تجزیه آن می‌شود. آسکوربات پراکسیداز به‌واسطه قدرت چسبندگی زیادی که با مولکول H_2O_2 دارد، می‌تواند در رفع سمیت اکسیداتیو در گیاه کمک نماید، در حالی که دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قادرند سرعت این واکنش را افزایش دهند (Furukawa and Fujita, 2017). به‌نظر می‌رسد که ورود نانوذرات

1. Antioxidant/pro-oxidant ability
2. Superoxide dismutase
3. Cyto (geno) toxicity

(Soares et al., 2010).



شکل ۷. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب) و گایاکول پراکسیداز (پ) در ریشه‌های موئین غاسول صابونی. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین، کوماریک اسید، رزمارینیک اسید، کوئرستین، سینامیک اسید و آپی ژنین را در عصاره ریشه‌های موئین گیاه غاسول صابونی شناسایی کرد. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در مورد گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کوماریک اسید، رزمارینیک اسید، کوئرستین و آپی ژنین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان سینامیک اسید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با محرک بر میزان کافئیک اسید و روتین معنی‌دار نبود. تیمار ریشه‌های موئین توسط ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، سبب افزایش تولید (۱۲/۷۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) گالیک اسید شد، درحالی‌که این ترکیب در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت کمترین میزان (۱/۱ میکروگرم بر گرم وزن تر) را ایجاد گردید. با توجه به نتایج، بیشترین میزان کلروژنیک اسید با مقدار ۲۱/۸۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر در ریشه‌های موئین تیمار شده با

مطالعات زیادی نشان دادند که، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاهان ممکن است به دلیل حضور پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدان در آن‌ها باشد (Li et al., 2008; Ghorbanpour, 2015; Chung et al., 2016). مشابه نتایج حاصل از این تحقیق، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) و کاهش تجمع ROS در گیاهان تیمار شده به‌وسیله نانو تیتانیوم دی‌اکسید در مطالعات انجام شده توسط Servin و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه خیار (*Cucumis sativus*) و Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris*) گزارش شده است. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گیاه بذربنچ سیاه (*Hyoscyamus niger* L.) به‌وسیله غلظت بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) نانو تیتانیوم دی‌اکسید افزایش یافت (Ghorbanpour et al., 2015). در گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) در اثر تیمار با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو تیتانیوم دی‌اکسید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهان تیمار نشده، افزایش یافت (Ghorbanpour, 2015).

تأثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان ترکیبات فنولی در ریشه‌های موئین
آنالیز با دستگاه HPLC ۹ ترکیب فنولی شامل

بر کیلوگرم وزن تر) سینامیک اسید گردید. میزان آپی‌ژنین در غلظت‌های مختلف تیمار با نانو ذرات تیتانیوم دی‌اکسید متفاوت بود. غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بیشترین میزان آپی‌ژنین (۱۲/۹۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) را تولید کرد. همچنین کمترین میزان این ترکیب (۵/۹۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده شد (جدول ۱).

امروزه ارزش ضد‌اکسیداسیونی ترکیبات پلی‌فنولی از جمله فلاونوئیدها بر کسی پوشیده نیست. این ترکیبات به‌دلیل نقشی که در بیولوژی سلول و سلامت انسان دارند مورد توجه زیادی هستند. روتین پایه تمامی بیوفلاونوئیدهاست و نقش مهمی در درمان دارد؛ به‌عنوان مثال سبب کاهش درد و کاهش فشار چشم می‌گردد (Jiang *et al.*, 2007). کلروژنیک‌اسید یکی دیگر از ترکیبات فنولی مهم است که یک حد واسط بیوسنتزی مهم در سنتز لیگنین است و از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز برخوردار است. همچنین کلروژنیک‌اسید و کافئیک‌اسید دارای خاصیت ضد‌دیابتی بوده و موجب کاهش قند خون می‌شوند (Boerjan *et al.*, 2003). کاربرد محرک‌های غیرزیستی و توانایی آن‌ها در افزایش تجمع ترکیبات فنولی و تقویت سیستم حفاظت آنتی‌اکسیدانی به وضوح مشخص گردیده است. با قرار گرفتن گیاه تحت معرض شرایط تنش‌زاه، تولید ترکیبات فنولی به‌منظور مقابله با تنش، در گیاه افزایش می‌یابد (Martinez *et al.*, 2016). الگوی بیان ژن‌ها به‌وسیله تحریک‌زایی دچار تغییر می‌شود و این تفاوت در بیان ژن اغلب با افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه گیاهی همراه است (Thiruvengadam *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2011). تولید و تجمع ترکیبات فنولی در گیاهان در شرایط تنش، تحت تأثیر غلظت و مدت زمان

غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت به‌دست آمد. همچنین کمترین میزان این ترکیب (۶/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید. ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵۳/۶۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵۳/۳۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) با مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بیشترین میزان ترکیب با ارزش کوماریک اسید را تولید کردند. همچنین غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر با مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ کمترین میزان (۳۲/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) کوماریک اسید را تولید کرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های موئین غاسول صابونی، تحت تأثیر تیمار با نانو تیتانیوم دی‌اکسید در مقایسه با تیمار شاهد افزایش قابل توجهی یافت. بیشترین میزان تولید و تجمع رزمارینیک اسید (۶۴/۵۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و در مدت زمان ۲۴ ساعت حاصل گردید که این میزان، حدود ۱/۵ برابر بیشتر از تیمار شاهد بود. کمترین میزان رزمارینیک اسید (۳۰/۵۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در مدت تیمار ۴۸ ساعت حاصل شد. بیشترین میزان کوئرستین (۱۹/۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید به‌مدت زمان ۴۸ ساعت و کمترین میزان این ترکیب (۱۱/۳۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. افزودن ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید به محیط کشت ریشه‌های موئین و مدت تیمار ۲۴ ساعت سبب افزایش میزان (۲/۰۷ میلی‌گرم

موجب افزایش آلکالوئیدهای سنگوئینارین و تبائین تا ۲/۱ برابر نسبت به شاهد در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Papaver bracteatum* شد که با گذشت زمان این مقدار کاهش یافت. نقش ترکیبات فنولی، به‌ویژه فلاونوئیدها در پاکسازی رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها و اندام‌های گیاهی، گزارش گردیده است، در نتیجه این ترکیبات به تکمیل واکنش‌های دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو کمک می‌نمایند (Singh et al., 2018).

تأثیر تیمار با محرک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان تولید پروتئین SO6

بررسی وضعیت کمی و کیفی پروتئین‌های استخراجی به‌روش SDS-PAGE انجام گرفت. آزمون SDS-PAGE یک روش پایه‌ای برای آزمون پروتئینی می‌باشد. نتایج نشان داد که باند پروتئین SO6 با وزن مولکولی ۲۹/۵ kDa در ریشه‌های موئین تیمار شده با محرک مشاهده شد (شکل ۸).

تیمار می‌باشد. انجام مطالعات جهت شناسایی غلظت‌های بهینه نانوذرات، به‌طوری که دارای تأثیر مثبت بر میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه و حداقل اثرات منفی بر روی گیاه باشند، بسیار ضروری می‌باشد. رزمارینیک اسید از جمله مهم‌ترین اسیدهای فنولی موجود در غاسول صابونی با خواص آنتی‌اکسیدانی است که به‌عنوان یک ترکیب دفاعی از قبل تشکیل شده عمل می‌کنند، همچنین به‌عنوان شاخص مناسبی جهت ارزیابی کیفیت گونه‌های گیاهان دارویی شناخته شده است (Lamien-Meda et al., 2010). کاربرد نانو تیتانیوم دی‌اکسید در گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) سبب افزایش میزان تولید برخی ترکیبات فنولی از جمله، رزمارینیک اسید، لوتئولین-O-γ-گلوکوزید، پارا کوماریک^۲، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و جنتسیک اسید^۳ گردید (Kamalizadeh et al., 2019). استفاده از نانو تیتانیوم دی‌اکسید در پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) سبب افزایش انباشت پلی‌فنول‌ها و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه گردید (Shallan et al., 2016). کاربرد محرک نانو ذره تیتانیوم دی‌اکسید پس از ۲۴ ساعت اعمال تیمار،

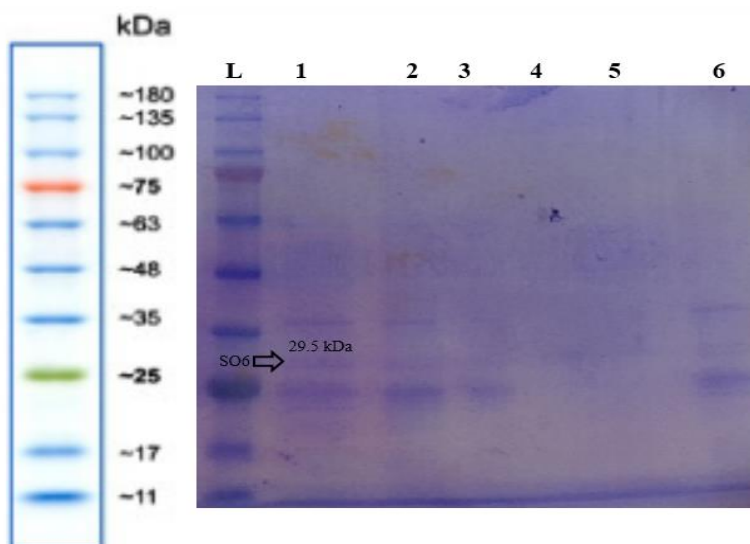
جدول ۱. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با محرک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر ترکیبات پلی‌فنولی در ریشه‌های موئین غاسول صابونی

ترکیبات فنولی									غلظت محرک (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان تیمار (ساعت)
Apigenin	Cinamic acid	Quercetin	Rosmaric acid	Comaric acid	Rutin	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Gallic acid		
10.97 ^{ab}	1.58 ^b	16.96 ^b	47.37 ^c	35.89 ^{cd}	5.06 ^a	11.27 ^{cd}	5.47 ^a	2.63 ^{cd}	0	
8.59 ^b	1.18 ^b	11.39 ^d	57.78 ^b	32.65 ^d	5.04 ^a	16.3 ^b	6.01 ^a	11.47 ^a	25	
10.9 ^{ab}	1.11 ^b	17.25 ^b	58.88 ^b	34.22 ^d	5.43 ^a	6.83 ^{ef}	4.82 ^a	8.11 ^b	50	24 (h)
10.35 ^{ab}	2.07 ^a	14.66 ^c	58.41 ^b	40.77 ^{bc}	4.97 ^a	10.97 ^{cd}	4.96 ^a	1.10 ^e	100	
11.48 ^a	1.3 ^b	12.17 ^d	64.59 ^a	44.4 ^b	4.84 ^a	12.73 ^c	4.75 ^a	4.94 ^{cd}	200	
10.97 ^{ab}	1.58 ^b	16.96 ^b	47.37 ^c	35.89 ^{cd}	5.06 ^a	11.27 ^{cd}	5.47 ^a	2.63 ^{cd}	0	
8.59 ^b	1.18 ^b	11.39 ^d	57.78 ^b	32.65 ^d	5.04 ^a	10.81 ^{cd}	4.75 ^a	0.99 ^e	25	
5.95 ^c	1.45 ^b	19.13 ^a	44.87 ^c	40.09 ^{bc}	4.9 ^a	8.76 ^{de}	5.26 ^a	12.73 ^a	50	48 (h)
12.96 ^a	1.52 ^b	17.03 ^b	62.09 ^a	53.34 ^a	4.34 ^a	6.05 ^f	4.65 ^a	1.10 ^{ed}	100	
10.72 ^{ab}	1.3 ^b	13.87 ^c	30.59 ^d	53.68 ^a	3.98 ^a	21.83 ^a	5.5 ^a	6.20 ^{bc}	200	

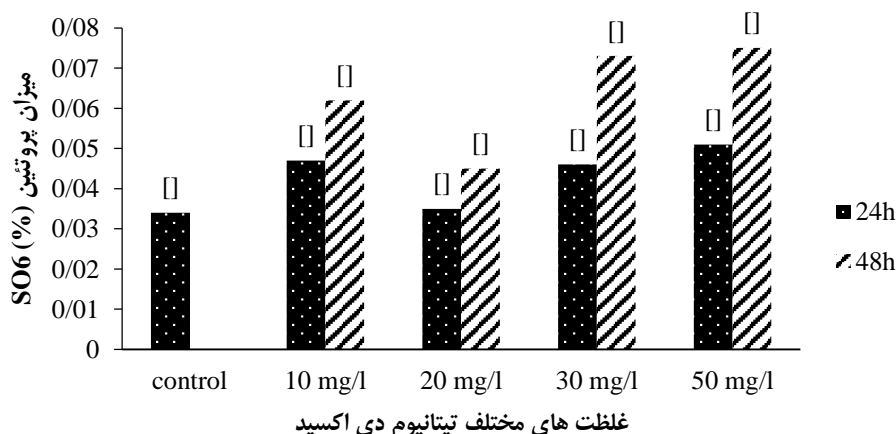
- 2. p-Cumaric
- 3. Gentisic acid

میزان پروتئین SO₆ (۰٪/۰۷۵) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان پروتئین SO₆ (۰٪/۰۳۴) مربوط به شاهد بود (شکل ۹). با توجه به نتایج می‌توان گفت که با افزایش غلظت محرک میزان تولید پروتئین SO₆ نیز افزایش یافته است. همچنین با بیشتر شدن مدت زمان تیمار با محرک نیز میزان تولید این پروتئین افزایش یافت.

برای اندازه‌گیری مقدار SO₆ در عصاره ریشه‌های موئین از روش الایزا استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان پروتئین SO₆ ریشه‌های موئین غاسول صابونی نشان داد که اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار در سطح احتمال ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین SO₆ داشت. براساس نتایج مقایسات میانگین، بیشترین



شکل ۸. الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به‌منظور بیان پروتئین مورد نظر. L: سایز مارکر، 1-6: نمونه ریشه‌های موئین گیاه غاسول صابونی تیمار شده با محرک



شکل ۹. مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان پروتئین SO₆ براساس نتایج

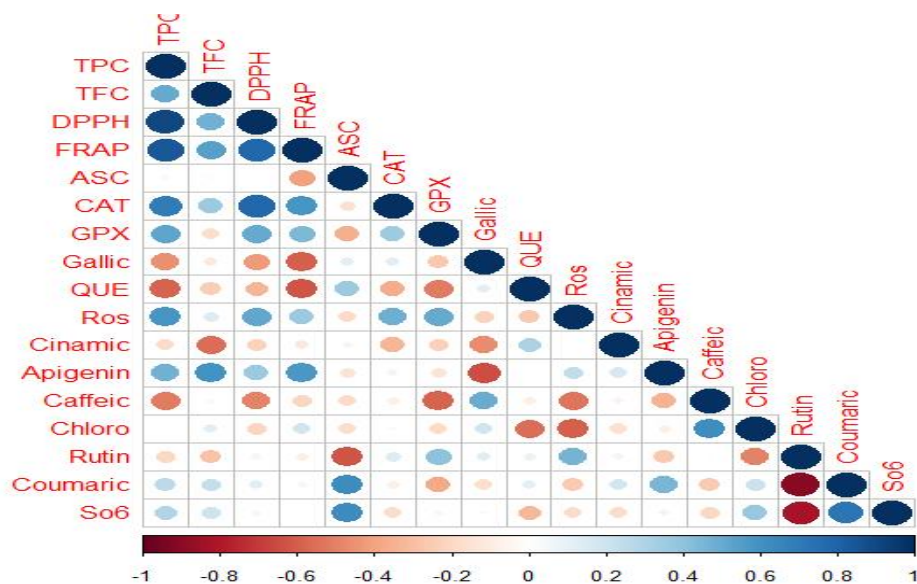
آزمون الایزا در ریشه‌های موئین غاسول صابونی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، زمان افزودن محرک به محیط کشت و مدت زمانی که محیط در معرض محرک قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد. اما آنچه بیشترین تأثیر را در نتایج این تحقیق نشان داد غلظت محرک مورد استفاده بود که نقشی کلیدی در افزایش ساپورین SO₆ از خود نشان داد و تفاوت معنی‌داری در افزایش میزان پروتئین SO₆ در بین غلظت‌های مورد استفاده از نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید را ایجاد کرد.

همبستگی بین صفات مورد بررسی

آنالیز همبستگی بین صفات مورد بررسی در ریشه‌های موئین گیاه غاسول صابونی در شکل ۹ آمده است. همبستگی مثبت و منفی به ترتیب با رنگ‌های آبی و قرمز نشان داده شده است. همچنین اندازه دایره‌ها و شدت رنگ آن‌ها نیز متناسب با ضرایب همبستگی می‌باشد. نتایج نشان داد که بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP، فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و میزان رزمارینیک اسید و آپی ژنین با محتوای فنول کل همبستگی مثبت بالایی وجود دارد.

با توجه با خاصیت ضد سرطانی پروتئین SO₆ تلاش‌ها در جهت افزایش آن در غاسول صابونی است. یکی از روش‌های افزایش این متابولیت استفاده از محرک‌ها می‌باشد. در این تحقیق استفاده از نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید باعث افزایش تولید این پروتئین گردید به طوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت میزان پروتئین SO₆ نسبت به تیمار شاهد تقریباً دو برابر افزایش را نشان داد. به طور کلی هر چقدر مدت زمان تیمار و غلظت محرک افزایش می‌یابد میزان تولید پروتئین SO₆ نیز افزایش می‌یابد. محرک‌ها با فعال کردن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌گردند. میزان تأثیر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت، معمولاً به غلظت اضافه شده و زمان بستگی دارد (Mehrabani et al., 2013). پاسخ گیاهان به نانوذرات برحسب نوع گونه، مرحله رویشی و ماهیت نانوذرات متفاوت است، از آنجا که نانوذرات قادر به تحریک مکانیسم دفاعی در سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه هستند، اخیراً از آن‌ها در محیط‌های کشت به‌عنوان محرک استفاده شده است (Karimi and Mirjalili, 2009). عوامل مختلفی



شکل ۹. آنالیز همبستگی بین صفات موردبررسی در ریشه‌های موئین گیاه غاسول صابونی تیمار شده با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید

نتیجه‌گیری

با توجه به توانایی ژنتیکی و بالابودن پایداری ریشه‌های موئین در سنتز انبوه پروتئین‌ها و متابولیت‌هایی که به‌صورت نرمال در ریشه‌ها و اندام‌های دیگر گیاهان وجود دارد و حفظ منابع ارزشمند و طبیعی گیاهی، راکتورهای زیستی روش مناسبی برای تولید ایمنوژن‌های نو ترکیب محسوب می‌شوند و با توجه به امتیازات نامبرده بعنوان تکنیکی فناورانه در تولیدات زیستی آزمایشگاهی به‌شمار می‌آید. با استفاده از نتایج این تحقیق با تولید و کشت ریشه‌های موئین می‌توان هم گیاهان دارویی با ارزش را حفظ نمود و باززایی کرد و هم می‌توان سطح تولید برخی پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه که به‌طور طبیعی کم تولید می‌شوند را افزایش داد.

همچنین میزان تولید پروتئین SO6 با میزان کوماریک اسید و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز همبستگی مثبتی دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH هم با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش FRAP و فعالیت آنزیم کاتالاز همبستگی بالایی را نشان داد. به‌طور کلی، با افزایش غلظت ترکیبات فنولی، میزان توانایی عصاره حاصل از ریشه‌های موئین در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Zhang et al., 2009).

REFERENCES

- Aebi H, Bergmeyer H (1974) Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York. 2: 674-684.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. Annual review of plant biology. 54(1): 519-546.
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature, 295(5848): 432-445.
- Chiou A, Karathanos VT, Mylona A, Salta FN, Preventi F, Andrikopoulos NK (2007) Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food chemistry.

- 102: 516-522.
- Chung IM, Thiruvengadam M, Rekha K, Rajakumar G (2016) Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59: 1-10.
- Ebrahimi A, Galavi, M., Ramroudi, M., and Moaveni, P. (2016). Effect of TiO₂ nanoparticles on antioxidant enzymes activity and biochemical biomarkers in Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Molecular Biology Research*, 6(1), 58-66.
- Falck GCM, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalan J, Savolainen K, Norppa, H (2009) Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Human and Experimental Toxicology* 28(6-7): 339-352.
- Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido R, Zamani Z, Palazon J (2013) A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Ind. Crops. Prod.* 50: 256-263.
- Frazier TP, Burklew CE, Zhang B (2014) Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Functional and Integrative Genomics*. 14 (1): 75-83.
- Furukawa S, Fujita T (2017) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 114 (12): 1752-1761.
- Ghorbanpour M (2015) Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*. 20(3): 249-256.
- Ghorbanpour M, Hatami M, Hatami M (2015) Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. *Acta agriculturae Slovenica*. 105 (1): 23-32.
- Goran M, Marija D, Vesna P, Gordana S, Snežana Č (2018) Phytochemical analysis of *Saponaria officinalis* L. shoots and flowers essential oils. *Natural Product research*. 32(3): 331-334.
- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*. 9 (3): 341-346.
- Gülcin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86(3):345-391.
- Guy C, Haskell D, Neven L, Klein P, Smelser C (1992) Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*. 188: 265-270.
- Hajimahdipour H, Khanavi M, Shekarchi M, Abedi Z, Piralı Hamedani M (2009) Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*. *Journal of Medicinal Plants*: 4 (8): 145-152.
- Hasanlu T, Rezazadeh S, Rahnema H (2008) Hairy roots sources for the production of valuable pharmaceutical compounds. *Journal of Medicinal Plants*. 29: 34-42.
- Hedayati A, Hosseini B, Palazon J, Maleki R (2020) Improved tropane alkaloid production and changes in gene expression in hairy root cultures of two *Hyoscyamus* species elicited by silicon dioxide nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry*. 155: 416-428.
- Hu ZB, Du M (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 121-127.
- Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ (2007) Rutin and flavonoid contents in three

- buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*. 40 (3): 356-364.
- Kamalizadeh M, Bihamta M, Zarei A (2019) Drought stress and TiO₂ nanoparticles affect the composition of different active compounds in the Moldavian dragonhead plant. *Acta Physiologiae Plantarum*. 41 (2): 21-29.
- Kamalizadeh M, Bihamta MR, Peyghambari SJH (2014) Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles. *Genetics in the third millennium*. 12: 3428-3437.
- Karimi L, Mirjalili M (2009). Titanium dioxide. *Journal of Nanotechnology*. 8: 23-25.
- Klančnik K, Drobne D, Valant J, Koce JD (2011) Use of a modified Allium test with nano TiO₂. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74 (1): 85-92.
- Lamien-Meda A, Nell M, Lohwasser U, Börner A, Franz C, Novak J (2010) Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the gene bank in Gatersleben. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(6): 3813-3819.
- Larue C, Laurette J, Herlin-Boime N, Khodja H, Fayard B, Flank AM, Brisset F, Carriere M (2012) Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*. 431: 197-208.
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*. 24: 815-820.
- Mahmoodzadeh H, Aghili R (2018) Effect on germination and early growth characteristics in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) seeds exposed to TiO₂ nanoparticles. *Journal of Chemical Health Risks*. 4 (1): 29-36.
- Mandeh M, Omid M, Rahaie M (2012) *In vitro* influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biol Trace Elem Res*. 150 (1-3): 376-380.
- Marslin G, Sheeba CJ, Franklin G (2017) Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst. *Front Plant Sci*. 19 (8): 832.
- Martinez V, Mestre TC, Rubio F, Girones-Vilaplana A, Moreno DA, Mittler R, Rivero RM. (2016) Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in plant science*. 7: 1-17.
- Mattiello A, Filippi A, Pošćić F, Musetti R, Salvatici MC, Giordano C, Vischi M, Bertolini A, Marchiol L (2015) Evidence of phytotoxicity and genotoxicity in *Hordeum vulgare* L. exposed to CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-13.
- Mehrabani B, Nazeri S, Piri KH (2013) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koochi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. *Agricultural Biotechnology Journal*. 4 (2): 77-88.
- Mittler R (2017) ROS are good. *Trends in Plant Science*. 22 (1): 11-19.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179 (3): 154-163.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22 (5): 867-880.
- Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S (2014)

- Influence of preparing method on antioxidant activity and polyphenols content of green Walnuts comfiture. *South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*. 5: 83-94.
- Nourozi E, Hosseini B, Maleki R, Abdollahi Mandoulakani B (2019) Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschyi* hairy roots elicited by SiO₂ nanoparticles. *Industrial Crops and Products*. 133: 435-446.
- Oloumi H, Soltaninejad R, Baghizadeh A (2015) The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology*. 20 (2): 157-161.
- Pais I (1983) The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition*. 6: 3-131.
- Palmqvist NGM, Bejai S, Meijer J, Seisenbaeva GA, Kessler VG (2015) Nano titania aided clustering and adhesion of beneficial bacteria to plant roots to enhance crop growth and stress management. *Scientific Reports*. 5: 1-12.
- Schiavo S, Oliviero M, Miglietta M, Rametta G, Manzo S (2016) Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. *Science of the Total Environment*. 550: 619-627.
- Schrot J, Weng A, Melzing MF (2015) Ribosome-inactivating and related proteins. *Toxins*. 7 (5): 1556-615.
- Sengul M, Ercisli S, Yildiz H, Gungor N, Kavaz A, Çetin B (2010) Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 49-55.
- Servin AD, Morales MI, Castillo-Michel H, Hernandez-Viezcas JA, Munoz B, Zhao L, Gardea-Torresdey JL (2013) Synchrotron verification of TiO₂ accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environmental Science and Technology*. 47 (20): 11592-11598.
- Shallan MA, Hassan HM, Namich AA, Ibrahim AA (2016) Biochemical and physiological effects of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on cotton plant under drought stress. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. 7 (4): 1540-1551.
- Shin Y, Liu RH, Nock JF, Holliday D, Watkins CB (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.
- Singh RS, Chattopadhyay T, Thakur D, Kumar N, Kumar T, Singh PK (2018) Hairy root culture for *in vitro* production of secondary metabolites: A promising biotechnological approach. In Kumar N. (eds). *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Singapore. pp. 235-250.
- Slinkard K, Singleton VL, (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28 (1): 49-55.
- Soares AMDS, Souza TFD, Jacinto T, Machado OLT (2010) Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 22(3): 151-158.
- Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 27 (1): 29-43.
- Stripe F, Battelli M (2006) Ribosome-

- inactivating protens: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63 (16): 1850-66.
- Sudhakar C, Lakshmi A, 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.
- Suriyaprabha R, Karunakaran G, Yuvakkumar R, Prabu P, Rajendran V, Kannan N (2012) Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *Journal of Nanoparticle Research*. 14 (12): 1294-1296.
- Thiruvengadam M, Praveen N, John KM, Yang YS, Kim SH, Chung, I. M (2014) Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 118 (3): 545-557.
- Yang HG, Sun CH, Qiao SZ, Zou J, Liu G, Smith SC, Cheng HM, Lu GQ (2008) Anatase TiO₂ single crystals with a large percentage of reactive facets. *Nature*. 453 (7195): 638-641.
- Yousefi K, Riahi Madvar A (2016) Effect of flavone synthase gene expression and elicitor silver and copper on some biochemical parameters in seedlings of native Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Plant (Iranian Journal of Biology)*. 28: 210-223.
- Yousefi K, Riahi MA, Baghizadeh A (2015) Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran. *Journal of Plant Researches*. 28 (1): 210-223.
- Yuan SJ, Chen JJ, Lin ZQ, Li WW, Sheng GP, Yu HQ (2013) Nitrate formation from atmospheric nitrogen and oxygen photocatalysed by nano-sized titanium dioxide. *Nature Communications*. 4: 1-7.
- Zhang L, Kai GY, Lu BB, Zhang HM, Tang KX, Jiang JH, Chen WS (2005) Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants. *J Integr Plant Biol*. 47: 136-143.
- Zhang Y, Yan X, Guo H, Zhao F, Huang L (2018) A novel protein elicitor BAR11 from *Saccharothrix yanglingensis* Hhs. 015 improves plant resistance to pathogens and interacts with catalases as targets. *Frontiers in Microbiology*. 9: 700-716.
- Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z (2009) Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem*. 113 (1): 160-165.
- Žugić A, Đorđević S, Arsić I, Marković G, Živković J, Jovanović S, Tadić V (2014) Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Industrial Crops and Products*. 52: 519-527.