

## تأثیر نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید (SiO<sub>2</sub> NPs) بر میزان ترکیبات پلی‌فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و کوتاه

احد هدایتی<sup>۱،۲</sup>، بهمن حسینی<sup>۱\*</sup>، رامین ملکی<sup>۳</sup> و خاویر پالازون<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

<sup>۲</sup> ایران، ارومیه، جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، گروه پژوهشی تولید متابولیت‌های ثانویه در سامانه‌های زیستی

<sup>۳</sup> ایران، ارومیه، جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، گروه شیمی تجزیه

<sup>۴</sup> اسپانیا، بارسلونا، دانشگاه بارسلون، دانشکده داروسازی، گروه فیزیولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

### چکیده

نانوذرات به عنوان گروهی جدیدی از محرک‌ها برای تولید متابولیت‌های با ارزش استفاده می‌شوند. در این مطالعه، تأثیر نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی ریشه‌های موئین دو گونه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) و کوتاه (*Hyoscyamus pusillus*) مطالعه شد. ریشه‌های موئین از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون (در گونه مشبک) و برگ (در گونه کوتاه) با باکتری آگروباکتریوم رایزوتنز تولید شد. سپس تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و مدت زمان تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) بر میزان وزن تر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و برخی ترکیبات پلی‌فنولی در ریشه‌های موئین دو گونه بذرالبنج مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداکثر وزن تر (۱۰/۴۸ گرم) در ریشه‌های موئین تیمار شده با ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر محرک و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت در گونه کوتاه بدست آمد. بیشترین میزان DPPH (۱۸/۰۵ درصد) و FRAP (۶/۲۶ mmol Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup> FW) به ترتیب در گونه مشبک تیمار شده با ۲۵ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محرک و مدت زمان تیمار ۴۸ و ۲۴ ساعت مشاهده گردید. حداکثر میزان ترکیب با ارزش رزمارینیک اسید (۹/۰۲ میکروگرم بر گرم وزن تر) در گونه مشبک تیمار شده با ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر محرک و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید، در حالی که این ترکیب در ریشه‌های موئین گونه کوتاه شناسایی نگردید. نتایج مشخص کرد که نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید می‌تواند به عنوان یک محرک جهت افزایش برخی ترکیبات پلی‌فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و کوتاه استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** بذرالبنج، ترکیبات پلی‌فنولی، ریشه موئین، محرک، نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۸، پست الکترونیکی: b.hosseini@urmia.ac.ir

### مقدمه

از جمله هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشند. گونه بذرالبنج مشبک (*H. reticulatus*) گیاهی علفی و یکساله یا دوساله است که بومی مناطق خشک و نیمه خشک مصر، جنوب غرب آسیا، ایران و ترکیه است (۷). گونه بذرالبنج کوتاه (*H. pusillus* L.) یکی دیگر از گونه‌های این جنس و گیاهی

جنس بذرالبنج یا بنگ دانه (*Hyoscyamus*) از تیره Solanaceae دارای ۲۷ گونه بوده که ۹ گونه آن منحصراً در ایران و ۱۸ گونه در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارند. گونه‌های مختلف بذرالبنج، گیاهانی یکساله، دوساله و یا چندساله هستند که منابع غنی از آکالوئیدهای تروپانی

تمایز یافته، بیشتر پژوهش‌ها بر کشت ریشه‌های موئین (Hairy Root Culture) تأکید دارند. ریشه موئین نوعی بیماری گیاهی است که توسط باکتری گرم منفی خاکزی آگروباکتریوم رایزوزنز ایجاد می‌گردد. 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 بیوستیزی و نگهداری آسان، ریشه‌های موئین را به عنوان منبعی دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است (۳۹). روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که یکی از آن‌ها کاربرد محرک‌ها (Elicitors) می‌باشد. محرک‌ها ترکیباتی با منشأ زیستی و غیرزیستی هستند که منجر به تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین شده و از طریق القاء پاسخ‌های دفاعی باعث بیوستز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (۴۶). عوامل مختلفی مثل نوع و غلظت محرک، سن کشت، زمان افزودن محرک به محیط کشت و مدت زمانی که محیط کشت در معرض محرک قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (۴۳). اخیراً، نانوذرات به عنوان 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 (۹). نانوذرات سیلیسیم دی‌اکسید ( $\text{SiO}_2$ )، تیتانیوم دی‌اکسید ( $\text{TiO}_2$ )، اکسید روی ( $\text{ZnO}$ )، نقره ( $\text{Ag}$ ) و کبالت ( $\text{Co}$ ) به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی و کشاورزی کاربرد دارند (۱۵)، نانو ذره سیلیسیم دی‌اکسید به‌عنوان یک محرک غیرزیستی، دارای ویژگی‌های نوری، الکتریکی و کاتالیستی مطلوبی بوده و کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف و همچنین کشاورزی دارد (۲۱). تاکنون گزارشاتی مبنی بر تأثیر نانوذرات بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف ارائه شده است. در مطالعه‌ای تیمار ریشه‌های موئین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy*) با

یکساله و خاص ته‌های شنی، مزارع و مناطق بایر است. یکی از تفاوت‌های این گونه با سایر گونه‌ها، بالا بودن میزان اسکوپولامین نسبت به هیوسیامین در اندام‌های این گیاه می‌باشد و باتوجه به این‌که تقاضای تجاری برای اسکوپولامین نسبت به هیوسیامین به‌دلیل ارزش دارویی ۱۰ برابر بیشتر است، این گونه می‌تواند منبع مناسبی برای اسکوپولامین باشد (۲۶). در سال‌های گذشته علاوه بر تروپان آلکالوئیدها، متابولیت‌های دیگری از جمله ساپونین‌های استروئیدی، گلیکوزیدها، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات پلی فنولی (کوماریک اسید، گالیک اسید، کافئیک اسید، روتین و غیره) از گونه‌های مختلف بذربنچ استخراج و مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶). امروزه ارزش ضد اکسیداسیونی ترکیبات پلی فنولی از جمله فلاونوئیدها بر کسی پوشیده نیست. این ترکیبات به دلیل نقشی که در زیست‌شناسی 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 (۱۴). کلروژنیک اسید یکی دیگر از ترکیبات فنولی مهم است که یک حد واسط بیوستزی مهم در سنتز لیگنین است و از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز برخوردار است. همچنین کلروژنیک اسید و کافئیک اسید دارای خاصیت ضددیابتی بوده و موجب کاهش قند خون می‌گردند (۴). کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است، زیرا پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه توسط گیاهان در شرایط طبیعی از نظر کمیت و کیفیت ترکیبات بسیار محدود می‌باشد (۳۵). بزرگ‌ترین چالش موجود در این زمینه، تولید متابولیت‌های مزبور در مرحله خاصی می‌باشد و برخی از ترکیبات نیز تنها در سلول‌های تمایز یافته قابل سنتز و تجمع هستند. بنابراین در برخی موارد کشت‌های سلولی تمایز نیافته، توان بیوستزی فرآورده‌های ثانویه را از دست می‌دهند. باتوجه به نتایج بدست آمده از کشت بافت‌های

جهت جوانه‌زنی و تهیه ریزنمونه در محیط کشت پایه MS (۲۸) حاوی ۷ گرم برلیتر آگار و دارای pH برابر ۵/۷ کشت گردید. بذرها در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. به منظور تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی، دو هفته پس از جوانه‌زنی و پس از انجام آزمایش‌های انتخاب بهترین ریز نمونه، ریز نمونه کوتیلدونی (گونه مشبک) و برگ (گونه کوتاه) در زیر هود لامینار از گیاهچه‌های مادری استریل جدا و داخل پتری دیش استریل قرار گرفتند. جهت تلقیح ریز نمونه‌ها از سویه‌های A7 (برای گونه مشبک) و A13 (برای گونه کوتاه) آگروباکتریوم رایزوزنز که از بانک میکروبی موسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران-ایران تهیه گردیده بودند استفاده شد. غلظت بیهینه باکتری (OD<sub>600</sub>) جهت تلقیح به میزان ۰/۵ الی ۰/۶ تعیین گردید. 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 (-Co-culture) 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 ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند (۳۲).

**اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):** به منظور تأیید حضور ژن *rol B* آگروباکتریوم رایزوزنز، DNA ژنومی ریشه‌های موئین هر دو گونه به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) استخراج گردید (۱۸). 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 درجه به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت یک

غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید به مدت ۴۸ ساعت، باعث افزایش تجمع رزمارینیک اسید ۸ برابر بیشتر از ریشه‌های موئین شاهد گردید. همچنین تولید ترکیبات پلی فنولی مثل گالیک اسید، کلروژنیک اسید و سینامیک اسید افزایش یافت (۳۲). کاربرد محرک نانو اکسید آهن در ریشه‌های موئین گیاه بذربلنج مشبک در غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف تیمار مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین میزان تولید هیوسامین و اسکوپولامین در غلظت‌های ۹۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید آهن به ترتیب در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده گردید (۲۷). در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران (۴۵) صورت گرفت، بررسی اثر نانو ذرات Ag-SiO<sub>2</sub> در غلظت‌های مختلف به مدت سه روز بر ریشه‌های موئین گیاه درمنه (*Artemisia annua L.*) نشان داد که کاربرد نانوذرات نقره منجر به القاء تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موئین گردید. با توجه به این که تولید سریع و بالای متابولیت‌های ثانویه از طریق سنتز با روش‌های شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و نیز به دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آن‌ها در گیاهان دارویی، استفاده از راهکارهایی مثل کشت ریشه‌های موئین در بیوراکتور و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود بخشد. بنابراین، در این پژوهش تأثیر محرک نانوذرات سیلیسیم دی اکسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات پلی فنولی در ریشه‌های موئین دو گونه بذربلنج مشبک و کوتاه مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روشها

**کشت بذر، تهیه ریزنمونه و تلقیح با آگروباکتریوم:** بذر گونه‌های بذربلنج مشبک و کوتاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و در زیر هود لامینار توسط الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و

**عصاره‌گیری و اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و FRAP:** جهت عصاره‌گیری از روش حاجی مهدیپور و همکاران (۱۳) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین گونه‌های بذرالبنج مشبک و کوتاه داخل هاون توسط ازن مایع خرد شد، سپس ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه و ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. پس از آن عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد گردید و پس از گذراندن از کاغذ صافی جهت سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش 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 درصد) 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 (Blank) نیز به روش بالا عمل و فقط به جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد (۵).

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

AC: میزان جذب بلنک

AS: میزان جذب نمونه

به منظور سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین به روش FRAP، مقدار مشخصی از هر عصاره با ۳ میلی‌لیتر از معرف تازه FRAP (۲۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/۶، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) حلال در HCl ۴۰ میلی‌مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O در ۲۰ میلی‌مولار) باهم مخلوط شدند. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر و با

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 ۷۸۰ bp ژن *rolB* مورد استفاده قرار گرفت به صورت زیر بود:

F: 5'- TGGATCCCAAATTGCTATTCCACGA-3'

R: 5'- TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3'

**تهیه غلظت‌های مختلف محرک و تیمار ریشه‌های موئین:**

نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد-ایران) تهیه شد. نانو ذرات به صورت بی‌شکل و نامنظم (Amorphous) با اندازه ۲۰-۳۰ نانومتر بود. رنگ نانو ذرات سیلیکون سفید، مساحت سطح ویژه آن  $600-180 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  و درصد خلوص این نانو ذره ۹۹ درصد بود. غلظت‌های مختلف نانو ذره سیلیسیم دی‌اکسید (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) جهت تیمار ریشه‌های موئین در محیط کشت MS تهیه گردید. یک گرم از ریشه‌های موئین هریک از گونه‌ها به داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری توری‌دار حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ۳ تکرار، منتقل و داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۱۰ در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. در روز ۲۱ ام، محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف نانو ذرات سیلیسیم 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 نانو ذرات 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. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و FRAP (Ferric reducing antioxidant power) اندازه‌گیری و در نهایت شناسایی ترکیبات پلی‌فنولی با آنالیز HPLC انجام شد.

۳۱۰ نانومتر (کوماریک اسید)، ۲۷۲ نانومتر (سینامیک اسید)، ۳۶۰ نانومتر (کوئرستین) و ۳۱۰ نانومتر (روتین) استفاده شد (۱۰).

**آنالیز آماری داده‌ها:** تمام آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های حاصل از آزمایشات در نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 رسم گردید. همچنین همبستگی بین صفات مورد بررسی نیز با استفاده از نرم افزار R انجام گرفت.

## نتایج

**آنالیز PCR جهت تأیید حضور ژن *rol B*** 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* در ریشه‌های حاصل از هر دو گونه را تأیید نمود (شکل ۱) که هم‌اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (آگروباکتریوم مورد استفاده در تلقیح) بود. همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های طبیعی دو گونه و محصول واکنش PCR بدون DNA الگو (به عنوان کنترل منفی)، هیچ باند تکثیری مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰ bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rol B* در ریشه‌های موئین بود.

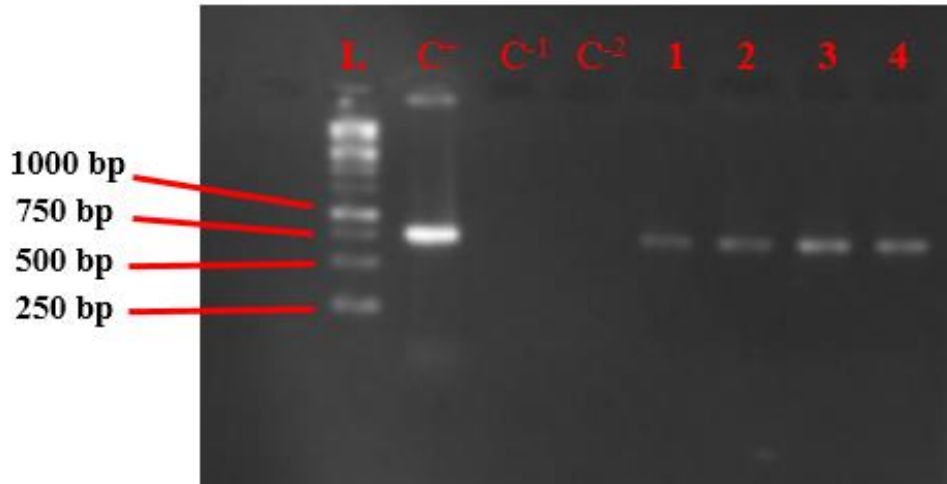
**تأثیر تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر رشد ریشه‌های موئین:** در ریزنمونه‌های کوتیلدونی گونه مشبک ۱۵ روز و در ریزنمونه‌های برگی گونه کوتاه ۱۰ روز بعد از تلقیح، ریشه‌های موئین از محل زخم ظاهر شدند (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین دو گونه بذربنچ نشان داد که اثر متقابل غلظت و

استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها براساس  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g FW}$  بیان شد (۴۸).

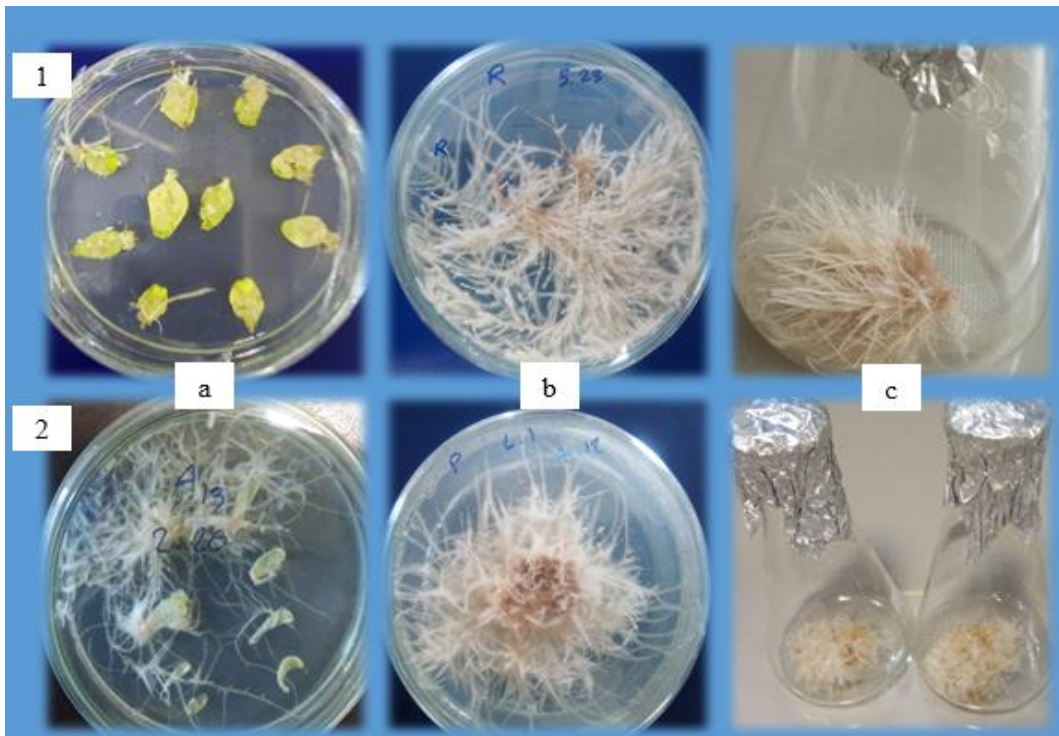
**استخراج ترکیبات پلی‌فنولی و آنالیز به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC High Performance Liquid Chromatography):** جهت استخراج ترکیبات پلی‌فنولی، ۰/۵ گرم از ریشه‌های موئین فریز شده با ازت مایع خرد شده و بلافاصله ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  در دستگاه اولتراسونیک 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 ۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادینانی 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 استیک‌اسید به نسبت‌های ۱۰:۸۰ بود. انتخاب طول موج مناسب یکی از نکات مهم در آنالیز ترکیبات می‌باشد و باتوجه به این‌که ترکیبات مورد آنالیز متفاوت بودند از طول موج‌های ۲۵۰ نانومتر (رزمارینیک اسید)، ۲۷۲ نانومتر (گالیک اسید)، ۳۱۰ نانومتر (کافئیک اسید)، ۳۲۰ نانومتر (کلروژنیک اسید)،

گونه مشبک در تیمار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۳/۳۳ گرم) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید.

زمان تیمار تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین هر دو گونه بذرالبنج مشبک (در سطح احتمال ۵ درصد) و کوتاه (در سطح احتمال ۱ درصد) داشت (جدول ۱). با توجه به نتایج بیشترین میزان وزن تر (۷/۴۳ گرم) در



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت: L: DNA مارکر (1 kb ladder Fermentas); C+: باکتری آگروباکتریوم به عنوان کنترل مثبت، C<sup>-1</sup> و C<sup>-2</sup>: ریشه‌های غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی، 1 و 2: ریشه‌های موئین القاء شده در گونه بذرالبنج مشبک، 3 و 4: ریشه‌های موئین القاء شده در گونه بذرالبنج کوتاه



شکل ۲- مراحل مختلف رشد ریشه‌های موئین بذرالبنج گونه مشبک (1) و کوتاه (2). a: ظهور ریشه‌های موئین از ریز نمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم، b: رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد و c: کشت ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر میزان وزن تر و ظرفیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و کوتاه

میانگین مربعات							
<i>H. pusillus</i>			<i>H. reticulatus</i>			درجه آزادی	منابع تغییرات
FRAP	DPPH	وزن تر	FRAP	DPPH	وزن تر		
2.88**	10.53**	14.35**	22.51**	13.65**	1.713 <sup>ns</sup>	1	زمان تیمار (a)
5.18**	66.89**	20.94**	13.45**	9.09**	11.132**	4	غلظت محرک (b)
0.78*	3.33*	5.67**	11.44**	10.01**	1.65*	4	اثر متقابل (a*b)
0.13	1.148	1.08	0.21	1.23	0.413	20	اشتباه آزمایشی
18.74	8.28	16.08	10.15	7.34	13.95		ضریب تغییرات (درصد)

\*\*\*، \* و ns به ترتیب نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر میزان وزن تر ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و کوتاه

وزن تر (گرم)		غلظت محرک (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان تیمار (ساعت)
<i>H. pusillus</i>	<i>H. reticulatus</i>		
4.79 <sup>de</sup>	3.59 <sup>c</sup>	0	
7.29 <sup>bcd</sup>	5.88 <sup>ab</sup>	25	
5.55 <sup>cde</sup>	4.53 <sup>bc</sup>	50	24 (h)
6.42 <sup>cde</sup>	4.0 <sup>c</sup>	100	
4.87 <sup>de</sup>	3.58 <sup>c</sup>	200	
4.79 <sup>de</sup>	3.59 <sup>c</sup>	0	
10.48 <sup>a</sup>	7.43 <sup>a</sup>	25	
9.03 <sup>ab</sup>	6.21 <sup>a</sup>	50	48 (h)
7.64 <sup>bc</sup>	3.69 <sup>c</sup>	100	
3.90 <sup>e</sup>	3.33 <sup>c</sup>	200	

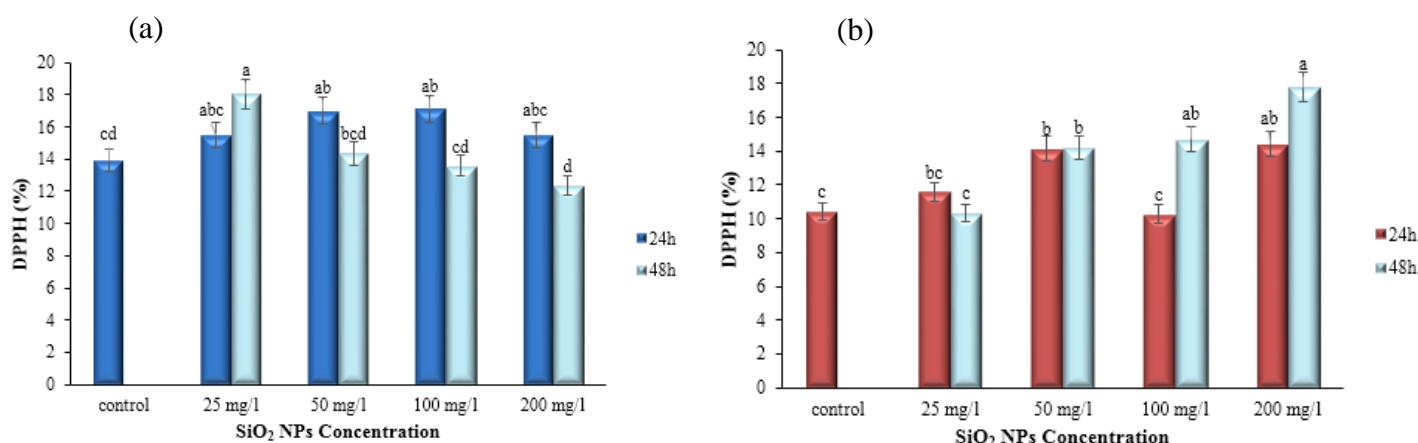
حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (گونه مشبک) و ۱ درصد (گونه کوتاه) در آزمون دانکن می‌باشد.

مشابه همین نتایج در گونه کوتاه نیز بیشترین میزان وزن تر (۱۰/۴۸ گرم) در تیمار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۳/۹۰ گرم) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید (جدول ۲).  
تأثیر تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و FRAP) ریشه‌های موئین: در مطالعه حاضر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله دو روش

مشابه همین نتایج در گونه کوتاه نیز بیشترین میزان وزن تر (۱۰/۴۸ گرم) در تیمار ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان وزن تر (۳/۹۰ گرم) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید (جدول ۲).  
تأثیر تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و FRAP) ریشه‌های موئین: در مطالعه حاضر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله دو روش

اکسیدانی به روش FRAP در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان  $1 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$  و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی هم با مقدار  $0.7 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت مشاهده گردید (شکل ۴a). غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۴ ساعت و تیمار شاهد به ترتیب بیشترین ( $3.92 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ) و کمترین ( $0.69 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ) میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی در ریشه‌های موئین گونه کوتاه را نشان دادند (شکل ۴b). باتوجه به نتایج، در گونه کوتاه با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت ولی در حالت کلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP ریشه‌های موئین گونه بذرالبنج مشبک تقریباً دو برابر بیشتر از گونه کوتاه بود.

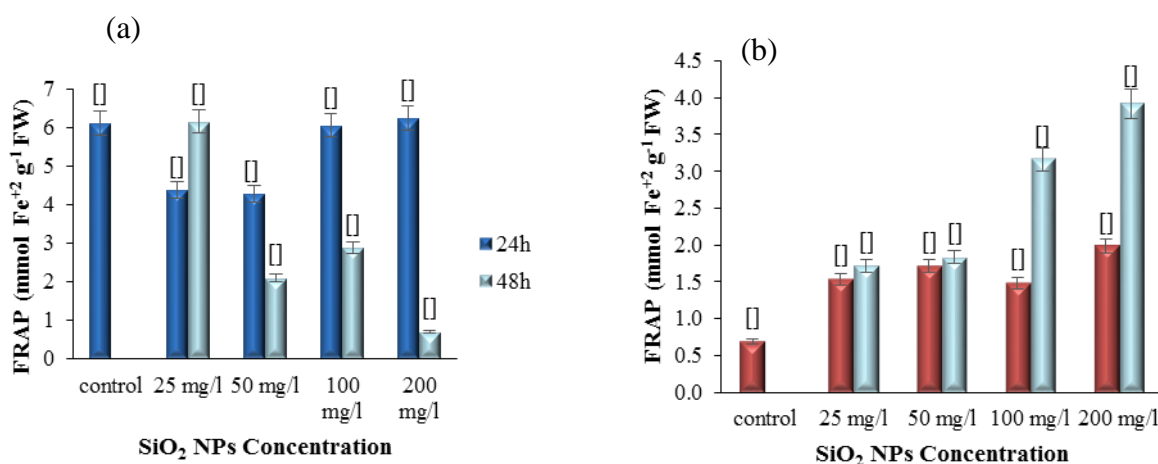
همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که حداکثر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال آزاد DPPH در گونه مشبک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و به میزان ۱۸/۰۵ درصد و کمترین میزان هم در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و به میزان ۱۲/۳۴ درصد بود (شکل ۳a). به طور کلی در گونه مشبک، در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت با افزایش غلظت نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. در گونه کوتاه، بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال آزاد DPPH ( $17.78$  درصد) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت و کمترین میزان ( $10.29$  درصد) هم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت بدست آمد (شکل ۳b). در گونه مشبک بیشترین میزان ظرفیت آنتی-



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک (a) و کوتاه (b). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (گونه مشبک) و ۵ درصد (گونه کوتاه) در آزمون دانکن می‌باشد

سینامیک اسید، روتین، کوئرستین و آپی ژنین را نشان داد. همچنین باتوجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید در مورد تمامی این ترکیبات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

تأثیر تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید بر ترکیبات پلی فنولی ریشه‌های موئین: کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه‌های استاندارد هریک از ترکیبات در شکل ۵ آمده است. در گونه بذرالبنج مشبک، نتایج HPLC وجود ترکیبات پلی فنولی شامل گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کوماریک اسید، رزمارینیک اسید،



شکل ۴- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی روش FRAP در ریشه‌های موئین بذربالنج مشبک (a) و کوتاه (b). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (گونه مشبک) و ۵ درصد (گونه کوتاه) در آزمون دانکن می‌باشد

موئین تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت بدست آمد. در مورد ترکیب با ارزش رزمارینیک اسید، تیمار ریشه‌های موئین با ۲۵ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید به مدت ۴۸ ساعت بیشترین میزان (۹/۰۲ میکروگرم بر گرم وزن تر) این ترکیب را تولید کرد. کمترین میزان (۲/۶۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) رزمارینیک اسید نیز در ریشه‌های موئین تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت بدست آمد. بیشترین میزان ترکیبات کوئرستین (۴۲/۶۰ میکروگرم بر گرم وزن تر)، سینامیک اسید (۲/۷۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) و آپی ژنین (۹۴/۷۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) به ترتیب در غلظت‌های ۵۰، صفر و ۲۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت مشاهده گردید (جدول ۳)

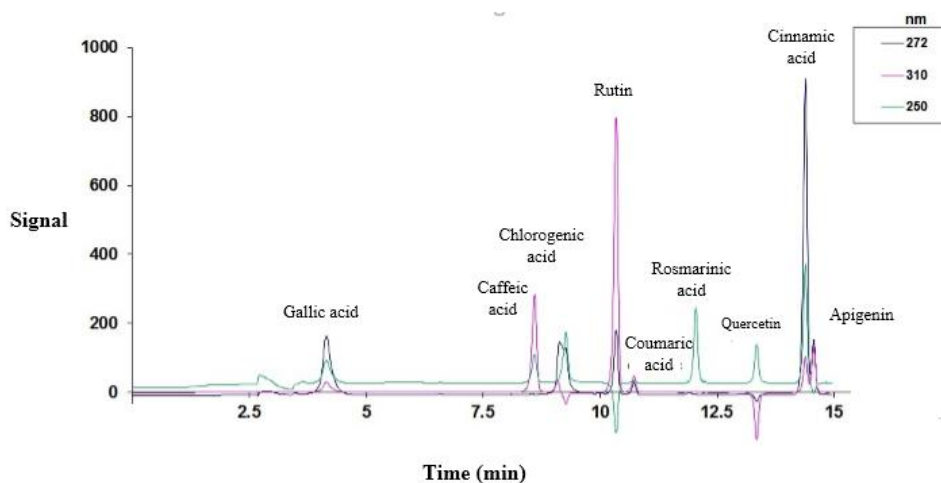
در مورد گونه بذربالنج کوتاه، هشت ترکیب پلی فنولی شامل گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کوماریک اسید، سینامیک اسید، روتین، کوئرستین و آپی ژنین شناسایی گردید که مطابق نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان گالیک اسید (۱۶/۳۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده توسط ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و در مدت زمان ۲۴ ساعت حاصل گردید در حالیکه کمترین میزان این ترکیب (۳/۶۰ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده توسط ۲۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد. باتوجه به نتایج میزان گالیک اسید با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار با محرک کاهش پیدا کرد.

میزان کافئیک اسید در ریشه‌های موئین، به‌طور قابل توجهی متفاوت بود، بیشترین (۴۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) و کمترین (۱۰/۸۱ میکروگرم بر گرم وزن تر) میزان تجمع این ترکیب، به‌ترتیب در ریشه‌های موئین در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید (زمان تیمار ۲۴ ساعت) و شاهد مشاهده گردید که افزایش حدود پنج برابری را نشان می‌دهد. بیشترین میزان ترکیبات کلروژنیک اسید (۵۹/۵۳ میکروگرم بر گرم وزن تر)، کوماریک اسید (۱۳۰/۴۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) و روتین (۱۰/۵۲ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های

میکروگرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بدست آمد. همچنین براساس نتایج، در هر دو مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت با افزایش غلظت محرک میزان کلروژنیک اسید کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان روتین (۷/۹۶ میکروگرم بر گرم وزن تر) و کوماریک اسید (۵۸/۲۲ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین کشت شده در محیط کشت حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت تولید گردید. بیشترین میزان ترکیبات کوئرستین (۲۰/۸۹ میکروگرم بر گرم وزن تر)، سینامیک اسید (۵/۰۷ میکروگرم بر گرم وزن تر) و آپی ژنین (۴۲/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و مدت زمان تیمار ۴۸، ۲۴ و ۲۴ ساعت مشاهده گردید (جدول ۴).

اکسید در مورد تمامی این ترکیبات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. براساس نتایج HPLC، در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت، بیشترین میزان گالیک اسید (۴۵/۳۷ میکروگرم بر گرم وزن تر) بدست آمد که این مقدار ۲/۲ برابر بیشتر از میزان این ترکیب نسبت تیمار شاهد بود. بیشترین میزان کافنیک اسید (۶۱/۴۵ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین تیمار شده توسط ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و در مدت زمان ۲۴ ساعت حاصل گردید در حالیکه کمترین میزان این ترکیب تیمار شده توسط ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید و در مدت زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. در مورد کلروژنیک اسید، بیشترین میزان (۲۰/۶۵ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین شاهد و کمترین میزان (۷/۰۹



شکل ۵- کروماتوگرام پیک‌های استاندارد حاصل از دستگاه HPLC ترکیبات پلی فنولی

و آپی ژنین همبستگی بالایی وجود دارد. همچنین بین روتین با کوماریک اسید و آپی ژنین همبستگی بالایی بدست آمد. بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP با اکثر پلی فنول‌ها از جمله رزمارینیک اسید، گالیک اسید، سینامیک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت بالایی مشاهده گردید. هر دو روش سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP و DPPH) نیز همبستگی مثبتی باهم نشان دادند.

**همبستگی بین صفات مورد بررسی:** آنالیز همبستگی بین صفات مورد بررسی در ریشه‌های موئین دو گونه بذرالبنج مشبک و کوتاه با نرم افزار R انجام شد. 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 در گونه مشبک، بین کافنیک اسید با کوماریک اسید، روتین

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر ترکیبات پلی فنولی در ریشه‌های موئین بذرالبنج مشیک

ترکیبات پلی فنولی									غلظت محرك	زمان تیمار (ساعت)
Apigenin	Cinnamic acid	Quercetin	Rosmarinic acid	Coumaric acid	Rutin	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Gallic acid	(میلی‌گرم بر لیتر)	
19.67 <sup>b</sup>	2.35 <sup>b</sup>	20.29 <sup>a</sup>	ND	20.21 <sup>c</sup>	3.73 <sup>cd</sup>	20.65 <sup>a</sup>	53.19 <sup>c</sup>	19.94 <sup>d</sup>	0	
7.38 <sup>de</sup>	5.07 <sup>a</sup>	15.62 <sup>b</sup>	ND	26.09 <sup>bc</sup>	5.21 <sup>bc</sup>	16.75 <sup>bc</sup>	56.00 <sup>b</sup>	34.66 <sup>c</sup>	25	
12.92 <sup>cd</sup>	1.96 <sup>bc</sup>	10.11 <sup>c</sup>	ND	23.67 <sup>bc</sup>	3.93 <sup>cd</sup>	17.00 <sup>bc</sup>	55.1 <sup>bc</sup>	8.28 <sup>ef</sup>	50	24 (h)
12.98 <sup>cd</sup>	1.52 <sup>bcd</sup>	17.10 <sup>ab</sup>	ND	32.65 <sup>b</sup>	1.48 <sup>e</sup>	13.14 <sup>de</sup>	40.54 <sup>e</sup>	45.37 <sup>a</sup>	100	
42.78 <sup>a</sup>	2.01 <sup>bcd</sup>	17.08 <sup>ab</sup>	ND	26.26 <sup>bc</sup>	3.56 <sup>cd</sup>	11.54 <sup>ef</sup>	61.45 <sup>a</sup>	11.45 <sup>e</sup>	200	
19.67 <sup>b</sup>	2.35 <sup>b</sup>	20.29 <sup>a</sup>	ND	20.21 <sup>c</sup>	3.73 <sup>cd</sup>	20.65 <sup>a</sup>	53.19 <sup>c</sup>	19.94 <sup>d</sup>	0	
17.35 <sup>bc</sup>	1.11 <sup>cd</sup>	18.89 <sup>ab</sup>	ND	58.22 <sup>a</sup>	7.96 <sup>a</sup>	18.46 <sup>ab</sup>	54.4 <sup>bc</sup>	21.48 <sup>d</sup>	25	
10.29 <sup>d</sup>	1.48 <sup>bcd</sup>	9.81 <sup>c</sup>	ND	24.02 <sup>bc</sup>	1.96 <sup>de</sup>	9.91 <sup>f</sup>	41.07 <sup>e</sup>	8.75 <sup>ef</sup>	50	48 (h)
13.08 <sup>cd</sup>	2.26 <sup>b</sup>	20.89 <sup>a</sup>	ND	55.63 <sup>a</sup>	6.84 <sup>ab</sup>	15.02 <sup>cd</sup>	42.03 <sup>e</sup>	40.34 <sup>b</sup>	100	
3.11 <sup>e</sup>	0.74 <sup>d</sup>	10.32 <sup>c</sup>	ND	28.51 <sup>bc</sup>	4.04 <sup>cd</sup>	7.09 <sup>g</sup>	45.53 <sup>d</sup>	5.80 <sup>f</sup>	200	

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

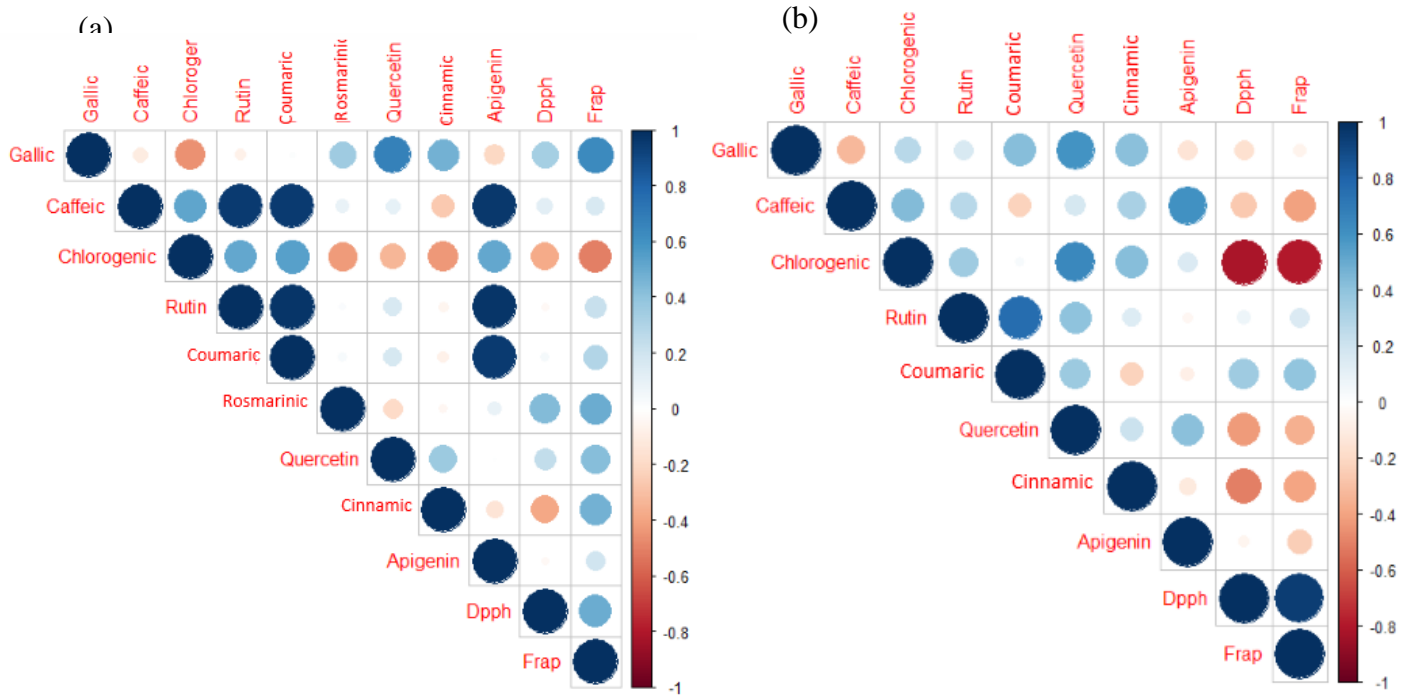
جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید بر ترکیبات پلی فنولی در ریشه‌های موئین بذرالبنج کوتاه

ترکیبات پلی فنولی									غلظت محرك	زمان تیمار (ساعت)
Apigenin	Cinnamic acid	Quercetin	Rosmarinic acid	Coumaric acid	Rutin	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Gallic acid	(میلی‌گرم بر لیتر)	
44.52 <sup>bc</sup>	2.79 <sup>a</sup>	34.79 <sup>c</sup>	5.44 <sup>b</sup>	51.14 <sup>bc</sup>	3.30 <sup>bc</sup>	21.93 <sup>e</sup>	10.81 <sup>b</sup>	12.75 <sup>b</sup>	0	
35.66 <sup>e</sup>	0.99 <sup>b</sup>	41.13 <sup>ab</sup>	5.01 <sup>bc</sup>	51.66 <sup>b</sup>	2.62 <sup>bcd</sup>	42.74 <sup>c</sup>	12.59 <sup>b</sup>	16.33 <sup>a</sup>	25	
39.11 <sup>de</sup>	1.00 <sup>b</sup>	42.60 <sup>a</sup>	5.20 <sup>bc</sup>	35.37 <sup>e</sup>	2.52 <sup>bcd</sup>	11.65 <sup>f</sup>	14.54 <sup>b</sup>	10.9 <sup>bc</sup>	50	24 (h)
41.14 <sup>cd</sup>	0.91 <sup>b</sup>	36.74 <sup>bc</sup>	2.64 <sup>d</sup>	50.97 <sup>bc</sup>	2.74 <sup>bcd</sup>	34.63 <sup>d</sup>	12.36 <sup>b</sup>	8.65 <sup>cd</sup>	100	
94.73 <sup>a</sup>	0.78 <sup>bc</sup>	34.93 <sup>c</sup>	5.30 <sup>bc</sup>	130.44 <sup>a</sup>	10.52 <sup>a</sup>	59.53 <sup>a</sup>	49.00 <sup>a</sup>	8.91 <sup>cd</sup>	200	
52 <sup>bc</sup>	2.79 <sup>a</sup>	34.79 <sup>c</sup>	5.44 <sup>b</sup>	51.14 <sup>bc</sup>	3.30 <sup>bc</sup>	21.93 <sup>e</sup>	10.81 <sup>b</sup>	12.75 <sup>b</sup>	0	
44.15 <sup>c</sup>	0.33 <sup>d</sup>	19.31 <sup>e</sup>	9.02 <sup>a</sup>	44.2 <sup>bcd</sup>	2.38 <sup>cd</sup>	25.35 <sup>e</sup>	14.45 <sup>b</sup>	9.97 <sup>bcd</sup>	25	
41.73 <sup>cd</sup>	0.94 <sup>b</sup>	23.42 <sup>de</sup>	3.50 <sup>cd</sup>	46.9 <sup>bcd</sup>	2.26 <sup>d</sup>	49.86 <sup>b</sup>	14.34 <sup>b</sup>	7.52 <sup>de</sup>	50	48 (h)
48.53 <sup>b</sup>	0.64 <sup>c</sup>	25.24 <sup>d</sup>	5.22 <sup>bc</sup>	42.85 <sup>cde</sup>	2.51 <sup>bcd</sup>	37.55 <sup>d</sup>	14.31 <sup>b</sup>	5.48 <sup>ef</sup>	100	
45.10 <sup>bc</sup>	0.81 <sup>b</sup>	22.17 <sup>de</sup>	2.98 <sup>d</sup>	42.33 <sup>de</sup>	3.44 <sup>b</sup>	54.56 <sup>ab</sup>	11.88 <sup>b</sup>	3.60 <sup>f</sup>	200	

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می‌باشد. ND: عدم شناسایی (Not Detect)

کلروژنیک اسید و کوئرستین همبستگی مثبتی وجود داشت (شکل ۶).

در مورد گونه کوتاه، همبستگی مثبت بالایی بین FRAP و DPPH مشاهده شد. همچنین بین گالیک اسید و سایر ترکیبات پلی فنولی مانند سینامیک اسید، کوماریک اسید،



شکل ۶- آنالیز همبستگی بین صفات مورد بررسی در ریشه‌های موئین گونه‌های بذراالنج مشبک (a) و کوتاه (b) تیمار شده با نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید

ذرات سیلیسیم دی اکسید را در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) در مرحله رشد اولیه مورد بررسی قرار دادند. با کاربرد نانو سیلیسیم دی اکسید، وزن تر و خشک گیاه و حجم ریشه افزایش پیدا کرد. Suriyaprabha و همکاران (۲۰۱۲) (۴۰)، پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیکی ذرت (*Zea mays* L.) به کاربرد نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که، پاسخ‌های رشدی با افزایش غلظت نانو سیلیسیم دی اکسید بیشتر تحت تأثیر قرارگرفت و نانوذرات سیلیسیم دی اکسید در مقایسه با سیلیسیم تأثیرات مثبت بیشتری بر ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیکی ذرت نشان داد. نانو سیلیسیم دی اکسید به عنوان یک محرک غیرزیستی، تحریک‌کننده رشد در گیاهان شناخته شده است (۸). اگرچه سیلیسیم از دیدگاه تغذیه

## بحث و نتیجه‌گیری

سیلیسیم دومین عنصر فراوان در سطح زمین است که بیش از ۴۱ درصد پوسته زمین را تشکیل می‌دهد. عنصر سیلیسیم به دلیل اثرات حفاظتی و ایجاد استحکام ساختاری در گیاهان، بر میزان رشد آن‌ها بسیار مؤثر و مفید می‌باشد (۴۷). در این پژوهش بیشترین میزان وزن تر در هر دو گونه در تیمار ۲۵ میلی‌گرم برلیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت بدست آمد و با افزایش غلظت محرک، میزان رشد ریشه-های موئین کاهش پیدا کرد. مطالعات در خصوص کاربرد نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید در گیاهان محدود می‌باشد. تیمار گیاهچه فلفل (*Capsicum frutescens*) توسط ۶۰ پی پی ام نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید سبب افزایش میزان رشد گردید (۸). حقیقی و پسرکلی (۲۰۱۳) (۱۰)، اثر نانو

گیاه به‌عنوان عنصر ضروری شناخته نشده است، لیکن اثرات مثبت آن بر رشد و بهبود مقاومت گیاهان در تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی اثبات شده است (۲۵). در مطالعات دیگر گزارش شده است که نانوذرات سیلیسیم دی‌اکسید در غلظت‌های بالا، منجر به کاهش مقاومت غشاء و نیز تخریب تمامیت غشاء سلولی شده و در نتیجه کاهش وزن در گیاه را به دنبال دارد که با نتایج این پژوهش که در غلظت‌های بالای محرک وزن تر کاهش یافت مطابقت دارد (۲۴). همچنین گزارش شده است که غلظت‌های بالای محرک با ایجاد تنش‌های شدید، با آسیب به غشای سلولی و یا لیز شدن سلولی منجر به کاهش و عدم رشد و همچنین کاهش متابولیسم سلولی می‌شود (۱).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به ساختارهای شیمیایی ترکیبات است که به آن‌ها اجازه می‌دهد به عنوان عوامل احیاء کننده عمل کنند. 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 (۳۱). در روش FRAP فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق پتانسل کاهش اکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این روش ترکیبات آنتی-اکسیدانی با Ferric tri-pyridyl-triazine complex (Fe (III)-TPTZ) واکنش می‌دهند و موجب ایجاد رنگ آبی می‌شوند (۱۱). نانو ذره سیلیسیم دی‌اکسید، یک نانو ذره شناخته شده با کاربردهای زیست‌پزشکی فراوان است که اثرات ناشی از القاء تنش اکسیداتیو توسط آن، در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۳۳ و ۴۲). نانو ذره سیلیسیم دی‌اکسید از طریق رهاسازی یون‌های فلزی و یا رادیکال‌های آزاد به داخل محیط کشت، باعث ایجاد تنش اکسیداتیو داخل سلولی می‌گردد. به نظر می‌رسد که کاهش آسیب اکسیداتیو از طریق تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌ها و همچنین تغییرات در میزان تعرق و افزایش فعالیت متابولیسم آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در کاهش تنش غیرزیستی القاء شده توسط سیلیسیم ایفاء

می‌کند (۳ و ۲۱). در این تحقیق بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در گونه مشبک و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و در گونه کوتاه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محرک مشاهده گردید. از نتایج این گونه استنباط می‌شود که در گونه مشبک با افزایش غلظت محرک ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش ولی در گونه کوتاه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. در حالی که از نظر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP در هر دو گونه بیشترین میزان در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محرک مشاهده گردید. مکانیسم عمل نانوذرات بسیار گسترده است و سمیت آن‌ها ممکن است به دلیل اندازه سطح نانوذرات باشد که در تماس با مولکول‌های زیستی موجب انجام واکنش می‌شود (۳۷). گزارش شده است که زمان افزودن محرک و مدت زمانی که سلول‌ها در معرض محرک قرار دارند از فاکتورهای مؤثر در تولید متابولیت‌ها بوده و دسترسی به حداکثر میزان متابولیت بسته به غلظت و نوع محرک متفاوت است (۲۹). نتایج سایر مطالعات نشان داد که، غلظت محرک نقش مهمی در فرایند تهیج دارد و غلظت مؤثر هر محرک به گونه گیاهی مورد نظر بستگی دارد. بنابراین ممکن است غلظتی از محرک، دارای اثرات تحریک‌کنندگی بر روی تولید ترکیبات فعال در برخی از گونه‌های گیاهی و یا بدون هیچ اثر مؤثر در گونه‌ای دیگر باشد (۲۰). مطابق نتایج حاصل از این تحقیق، در ریشه‌های موئین زرین گیاه تیمار شده با نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید، حداکثر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان ۳۵/۴۷ درصد بود. همچنین بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق قدرت احیاء کنندگی آهن (FRAP) نیز در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت و به میزان ۲۳/۳۷ میلی‌مول آهن II بر گرم وزن تر بود (۳۰). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان دارویی عمدتاً به دلیل حضور ترکیبات فنولی در این گیاهان بوده و رابطه قوی بین

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات فنولی در کشت‌های درون شیشه‌ای مشاهده شده است (۱۹ و ۴۱).

ترکیبات فنولی رایج‌ترین و وسیع‌ترین گروه از ترکیبات دفاعی بررسی شده در گیاهان هستند. این ترکیبات طی مسیری که به مسیر فنیل پروپانوئید معروف است سنتز می‌شوند. برخی از این متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها، دارای ساختمان شیمیایی مناسب برای پاک‌کردن رادیکال‌های آزاد بوده و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی شناخته می‌شوند (۴۴). گزارشات بسیار زیادی، القاء انباشتگی ترکیبات پلی‌فنولی و فعالیت پراکسیدازها در گیاهان تیمار شده با غلظت بالای عناصر را نشان می‌دهند (۱۷). انجام مطالعات جهت شناسایی غلظت‌های بهینه نانو ذرات، به‌طوریکه دارای تأثیر مثبت بر میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه و حداقل اثرات منفی بر روی گیاه باشند، بسیار ضروری می‌باشد. استفاده از محرک غیرزیستی نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید باعث افزایش میزان ترکیبات پلی‌فنولی در ریشه‌های موئین هر دو گونه گردید. در گونه مشبک، مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت بیشترین افزایش را در میزان گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کوماریک اسید، روتین، کوئرستین و آپی ژنین باعث شد. در گونه کوتاه مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت حداکثر میزان گالیک اسید، کافئیک اسید، سینامیک اسید و آپی ژنین را تولید کرد در حالی که میزان کوماریک اسید، روتین و کوئرستین در زمان تیمار ۴۸ ساعت بیشترین میزان را نشان داد. یکی از تفاوت‌های آشکار بین این دو گونه، وجود رزمارینیک اسید به‌عنوان ترکیب فنولی با ارزش در ریشه‌های موئین گونه مشبک تیمار شده با محرک نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید بود که در ریشه‌های موئین گونه کوتاه شناسایی نگردید. در کل می‌توان گفت که استفاده از محرک غیرزیستی نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید موجب افزایش متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های بذرالبنج مشبک و کوتاه گردید و گونه مشبک افزایش بیشتری نسبت به گونه کوتاه در تولید این ترکیبات نشان داد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سیستم کشت ریشه‌های موئین و همچنین تیمار با نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید، می‌تواند به‌عنوان روشی جایگزین به منظور تولید پلی‌فنول‌ها به‌عنوان ترکیبات فعال مهم در گیاه، در نظر گرفته شود. ترکیبات فنولی گروهی از آنتی‌اکسیدان‌ها با خواص مهارکننده تنش اکسیداتیو به‌شمار می‌روند (۱۵). تحریک‌زایی سلول‌ها و اندام‌های گیاهی منجر به فعال‌شدن ژن‌های کلیدی مربوط به مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدی و تجمع ترکیبات فنولی می‌گردد (۴۱). اثرات مثبت سیلیسیم در مقاومت به تنش، با نقش آن در افزایش فعالیت پمپ‌های پروتونی  $H^+-ATPase$  (موجود در غشاء سلولی) و  $H^+-PPase$  (موجود در تونوپلاست)، جذب بیشتر یون پتاسیم، افزایش غلظت داخل سلول، جذب و نگه‌داری آب، تأثیر بر فعالیت برخی آنزیم‌ها و فرایندهای فیزیولوژیکی در ارتباط می‌باشد (۲۳). با توجه به اثرات فتوکاتالیستی نانو ذرات به‌عنوان نسل جدید محرک‌ها، چنین به نظر می‌رسد که ترکیبات فنولی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در نتیجه شرایط تنش، در سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند. متابولیسم ترکیبات فنولی به‌عنوان ترکیبات محافظتی به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی و عوامل تنش‌زا می‌باشد (۳۴). انتقال T-DNAی باکتری آگروباکتریوم رایزورنز به ریشه‌های موئین گونه‌های بذرالبنج نیز ممکن است در مسیر سنتز ترکیبات پلی‌فنولی اختلال ایجاد کرده و میزان تولید این ترکیبات را تحت تأثیر قرار دهد (۲).

رزمارینیک اسید به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی در گیاهان، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی خود، دارای کاربردهای فراوانی در صنایع داروسازی می‌باشد (۲۲). این ترکیب بر خلاف ریشه‌های موئین گونه مشبک، در گونه کوتاه شناسایی نگردید و این می‌تواند به دلیل تفاوت در پاسخ گونه‌های مختلف یک جنس به انواع محرک‌های خارجی و مقابله با تنش‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه باشد. متفاوت بودن پروفایل شیمیایی گونه‌های مخالف یک جنس در دیگر گیاهان نیز

آنتی‌اکسیدانی در گونه مشبک را بیشتر از گونه کوتاه افزایش داد. نتایج آنالیز HPLC نیز نشان داد که تحت تأثیر نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید تولید ترکیباتی مثل کافئیک اسید، روتین، کلروژنیک اسید و رزمارینیک اسید در گونه مشبک افزایش قابل توجهی داشتند در حالی که در گونه کوتاه ترکیباتی مثل گالیک اسید، کوماریک اسید و آپی ژنین به صورت چشمگیر بیشتر شده و رزمارینیک اسید شناسایی نگردید. آنالیز همبستگی بین صفات مورد بررسی نشان داد که بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP با اکثر پلی‌فنول‌ها از جمله رزمارینیک اسید، گالیک اسید، سینامیک اسید و کوئرستین در ریشه‌های موئین گونه مشبک همبستگی بالایی وجود دارد و بالا بودن میزان FRAP در این گونه نسبت به گونه کوتاه می‌تواند همین مسئله باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله حاضر از کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و کارشناسان بخش آنالیز جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی جهت همکاری صمیمانه تشکر و امتنان را دارند. همچنین از تمام افرادی که در انجام این پژوهش ما را یاری و راهنمایی نمودند سپاسگزاری می‌شود.

به اثبات رسیده است و امروزه از این تفاوت‌ها در دانش شیمیو تاکسونومی برای مطالعه فیلوژنی و روابط خویشاوندی بین گیاهان استفاده می‌شود (۳۸). گزارشات در خصوص تأثیر کاربرد نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید بر میزان تولید ترکیبات پلی‌فنولی در کشت ریشه‌های موئین محدود می‌باشد. در یک مطالعه‌ای بر روی ریشه‌های موئین زرین گیاه، نتایج نشان داد که استفاده از محرک نانو سیلیسیم دی‌اکسید باعث افزایش قابل توجه تولید ترکیباتی مثل رزمارینیک اسید، گالیک اسید، کافئیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین گردید (۳۲ و ۳۶). افزایش در میزان برخی پلی‌فنول‌ها (گالیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوماریک اسید، روتین، کلروژنیک اسید، کوئرستین و سینامیک اسید) در کشت ریشه‌های موئین گیاه دارویی کارلا (*Momordica charantia*) تحت تأثیر تیمار با جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در مقایسه با کشت‌های شاهد، گزارش گردیده است (۶) که نتایج بدست آمده از این پژوهش در زمینه تولید ترکیبات پلی‌فنولی تحت تأثیر تیمار با محرک با گزارشات قبلی مطابقت داشت. در کل باتوجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که استفاده از غلظت‌های پایین نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت باعث افزایش رشد ریشه‌های موئین به‌ویژه در گونه کوتاه گردید. همچنین، کاربرد نانو ذرات سیلیسیم دی‌اکسید ظرفیت

### منابع

۱. پارسا، م.، و زینالی، ا.، ۱۳۹۶. 'تأثیر الیستورهای جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های موئین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Hyoscyamus niger* L'. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، (۴)۳۰، صفحات ۷۷۸-۷۹۱.
۲. سهرابی نژاد، ز.، مرعشی، س.ح.، و مشتاقی، ن.، ۱۳۹۷. بهینه‌سازی کشت ریشه‌های موئین گیاه دارویی همیشه بهار *Calendula officinalis* به منظور تولید ترکیب دارویی اولئانولیک اسید، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، (۳)۳۱، صفحات ۶۴۰-۶۵۴.
3. Ali, A., Ul Haq, T., and Mahmood, R., et al., 2016. Stimulating the anti-oxidative role and wheat growth improvement through silicon under salt stress, *Silicon*, PP: 1-4.
4. Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis, *Annual Review of Plant Biology*, 54, PP: 519-546.
5. Chiou, A., Karathanos, V.T., and Mylona, A., et al., 2007. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of

- simple phenolics and antioxidant activity, Food Chemistry, 102, PP: 516-522.
6. Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., and 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, PP: 1-10.
  7. Deivis, T.H., 1978. Flora of Turkey. University Press, Edinburg, 6, PP: 454-455.
  8. Dung, P.D., Ngoc, L.S., and Duy, N.N., et al., 2016. Effect of nanosilica from rice husk on the growth enhancement of chili plant (*Capsicum frutescens* L.). Vietnam J Sci Technol, 54, PP: 607-613.
  9. Fakruddin, M., Hossain, Z., and Afroz, H., 2012. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. J Nanobiotechnol, 10, PP: 31-39.
  10. Fattahi, M., Nazeri, V., and Torras-Claveria, L., et al., 2013. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss, Ind Crops Prod, 50, PP: 256-263.
  11. Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview, Arch Toxicol, 86, PP: 345-391.
  12. Haghighi, M., and Pessarakli, M., 2013. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage, Scientia Horticulturæ, 161, PP: 111-117.
  13. Hajimahdipour, H., Khanavi, M., and Shekarchi, M., et al., 2009. Study the best method of extraction of phenolic compounds in *Echinacea purpurea*, Journal of Medicinal Plants Research, 4, PP: 145-152.
  14. Jiang, P., Burczynski, F., and Campbell, C., et al. 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, PP: 356-364.
  15. Jomini, S., Clivot, H., Bauda, P., and Pagnout, C., 2015. Impact of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities, Environmental Pollution, 202, PP: 196-204.
  16. Jun, L., Ji, S., Xin-wen, Y., and Jing-kuan, S., et al., 2011. Chemical and Pharmacological Researches on *Hyoscyamus niger*, Chinese Herbal Medicines, 3, PP: 117-126.
  17. Jung, C.H., Maeder, V., Funk, F., and Frey, B., 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L., roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification, Plant Soil 252, PP: 301-3012.
  18. Kamalizadeh, M., Bihamta, M.R., and Peyghambari, S.A., 2014. Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles, Genetics in the third millennium, 12, PP: 3428-3437.
  19. Khoddami, A., Wilkes, M., and Roberts, T., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds, Molecules, 18, PP: 2328-2375.
  20. Kim, K.H., Lee, Y.H., and Kim, D., et al. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports, 23, PP: 386-390.
  21. Kim, Y.H., Khan, A.L., Waqas, M., and Lee, I.J., 2017. Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review, Frontiers in Plant Science, 8, PP: 510-517.
  22. Lamien-Meda, A., Nell, M., and Lohwasser, U., et al., 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, PP: 3813-3819.
  23. Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y.G., and Christie, P., 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review, Environmental Pollution, 147, PP: 422-428.
  24. Liu, Y., Zhang, Z., and Zhang, Q., et al., 2014. Biomembrane disruption by silica-core nanoparticles: effect of surface functional group measured using a tethered bilayer lipid membrane. BBA-Biomembranes, 1838, PP: 429-437.
  25. Ma, J.F., 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses, Journal Journal of Soil Science, 50, PP: 11-18.
  26. Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E., and Rezaei-chiyaneh, E., 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L., Acta Physiologiae Plantarum, 37, PP: 55-68.
  27. Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A., and Farjaminezhad, M., 2017. Enhanced production

- of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 53, PP: 104-111.
28. Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, PP: 473-497.
29. Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, *Pharmacognosy Reviews*, 1, PP: 69-79.
30. Noori, M., Zare Mayvan, H., and Mazaheri, A., 2012. Leaf flavonoids of Chrozophora Neck (Euphorbiceae) members in Markazi province using chromatographical methods, *Journal of Medicinal Plants*, 1(41), PP: 118-126 (in Persian).
31. Nour, V., Trandafir, I., and Cosmulescu, S., 2014. Influence of preparing method on antioxidant activity and polyphenols content of green Walnuts comfiture, South-west, *Journal of Horticulture, Biology & Environment*, 5, PP: 83-94.
32. Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., and Abdollahi Mandoulakani, B., 2019. Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschyi* hairy roots elicited by SiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Industrial Crops and Products*, 133, PP: 435-446.
33. Ruiz, A., Ali, L.M., and Cáceres-Vélez, P.R., et al., 2015. Hematotoxicity of magnetite nanoparticles coated with polyethylene glycol: *in vitro* and *in vivo* studies, *Toxicological Research*, 4, PP: 1555-1564.
34. Sakihama, Y., Cohen, M.F, Grace, S.C., and Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology* 177, PP: 67-80.
35. Sharma, M., Sharma, A., Kumar, A., and Basu, S.K., 2011. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus, *Journal of Plant Physiology*, 6, PP: 50-71.
36. Singh, O.S., Pant, N.C., and Laishram, M.L., et al. 2018. Effect of CuO nanoparticles on polyphenols content and antioxidant activity in Ashwagandha (*Withania somnifera* L., Dunal), *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7, PP: 3433-3439.
37. Singh, R., and Lillard, J.r., 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86, PP: 215-223.
38. Soltani Maivan, E., Salami, S., Saboori, A., Radjabian, T., and Fotovvat, M., 2015. 'TLC Fingerprint analysis of phenolic and flavonoid compounds in some Iranian *Salvia* spp. a chemotaxonomic approach', *Taxonomy and Biosystematics*, 7(24), PP: 75-94.
39. Srivastava, S., and Srivastava, A.K., 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, PP: 29-43.
40. Suriyaprabha, R., Karunakaran, G., and Yuvakkumar, R., et al., 2012. Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, PP: 1294-1296.
41. Thiruvengadam, M., Praveen, N., and John, K.M., et al., 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, PP: 545-557.
42. Vandebriel, R.J., and De Jong, W.H., 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles, *Nanotechnology, Science and Applications*, 5, PP: 61-71.
43. Vasconsuelo, A., and Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Journal of Plant Sciences*, 172, PP: 861-875.
44. Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Journal of Current Opinion in Plant Biology*, 5, PP: 218-23.
45. Zhang, B., Zheng, L.P., Yi Li, W., Wen Wang, J., 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles, *Current Nanoscience*, 9(3), PP: 363-370.
46. Zhao, J., Davis, L.C., and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 23, PP: 283-333.
47. Zhu, Y., and Gong, H., 2014. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, PP: 455-472.
48. Žugić, A., Đorđević, S., and Arsić, I., et al., 2014. Antioxidant activity and phenolic

compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, 519–527.  
Serbia, Industrial Crops and Products, 52, PP:

## Effects of Silicon Dioxide Nanoparticles (SiO<sub>2</sub> NPs) Application on Polyphenolic Compounds Content and Antioxidant Capacity in *H. reticulatus* and *H. pusillus* hairy roots

Hedayati A.<sup>1</sup>, Hosseini<sup>1\*</sup>, Maleki R.<sup>2</sup> and Palazon J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Urmia, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Dept. of Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### Abstract

Nanoparticles are used as a new group of elicitors for the production of valuable metabolites. In the present study, the effects of silicon dioxide nanoparticles (SiO<sub>2</sub> NPs) as abiotic elicitor on some phytochemical traits in *H. reticulatus* and *H. pusillus* hairy root cultures were analyzed. Hairy roots were obtained from cotyledon (in *H. reticulatus*) and leaf (in *H. pusillus*) explants inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. The effect of silicon dioxide nanoparticles concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup>) with two exposure times (24 and 48h) on fresh weight, antioxidant capacity and some polyphenol compounds in hairy roots of two *Hyoscyamus* species were investigated. Results showed that the highest hairy roots fresh weight (10.48 g) were found in the medium treated with 25 mg L<sup>-1</sup> SiO<sub>2</sub> NPs at 48 hours of exposure time in *H. pusillus* hairy root cultures. Overall High amount of DPPH (18.05%) and FRAP (6.26 mmol Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup> FW) was observed in *H. reticulatus* hairy roots elicited by 25 and 200 mg L<sup>-1</sup> SiO<sub>2</sub> NPs at 48 and 24h of exposure time, respectively. Rosmarinic acid content (9.02 µg g<sup>-1</sup> FW) with 1.65-fold boost compared to control, was observed in *H. reticulatus* hairy roots culture elicited with SiO<sub>2</sub> NPs (25 mg L<sup>-1</sup>) after 48 h exposure time, while this compound was not detected in *H. pusillus* hairy roots. The results demonstrate that silicon dioxide nanoparticles can be used as effective and abiotic elicitor to increase some polyphenol compound and antioxidant capacity in *H. reticulatus* and *H. pusillus* hairy root cultures.

**Keywords:** Elicitor, Hairy root, *Hyoscyamus*, Polyphenolic compounds, Silicon dioxide nanoparticles