مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) درشرایط کشت درون شیشه‌ای

طاهره میرزایی و خدیجه کیارستمی*

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۱/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۱/۱۶)

چکیده

بادرنجبویه گیاهی دارویی از تیره نعناعیان است و غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است. در مطالعه حاضر با هدف بهینه‌سازی تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این گیاه اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیریافته در شرایط کشت درون شیشه‌ای مطالعه گردید. به این منظور راس نوساقه‌های حاصل از رویش بذر در محیط‌کشت MS (موراشیک و اسکوک) برای تکثیربه محیط‌کشت MS حاوی BAP ۱ mg/l و NAA ۰/۵ mg/l منتقل شدند. پس از گذشت یک ماه نانوذرات نقره با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ppm به محیط‌کشت اضافه شده و شاخص‌های رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH)، سنجش قدرت کاهشی (RP) و سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید و مقادیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نوشاخه‌ها در فواصل زمانی ۱۴ و ۲۸ روز پس از تیمار اندازه‌گیری شدند. نتایج آنالیز رشد نشان داد افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۱ تا ۴ ppm باعث افزایش شاخص‌های رشد (وزن تر و خشک گیاه، طول اندام هوایی و ریشه، تعداد برگ و تعداد انشعابات اندام هوایی) می‌شود و این افزایش ۲۸ روز پس از تیمار مشهود است. تعداد برگ و تعداد انشعابات بیشتر از سایر شاخص‌ها تحت‌تأثیر قرار گرفتند. کمترین مقدار IC_{50}، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت کاهشی و جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید و بیشترین مقدارترکیبات فنلی وفلاونوئیدی در نوشاخه‌های تیمارشده با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۲۸ روز مشاهده شد. به‌طورکلی غلظت‌های بالاتر نانوذرات نقره برای شاخص‌های رشد و غلظت کمتر آن برای تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، نانوذرات نقره، گیاه بادرنجبویه

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی دارویی از خانواده نعناعیان و دارای خواص دارویی متعددی است که اسانس‌ها و ترکیبات فنلی به‌ویژه رزمارینیک اسید، مهم‌ترین ترکیبات دارویی این گیاه را تشکیل می‌دهند (Yosofi *et al.*, 2011). این گیاه از گذشته تا به امروز برای درمان بیماری‌هایی مانند تپش قلب، ضعف حافظه، سردردهای با منشاء عصبی، سرگیجه و خستگی‌های روحی مورد استفاده قرار می‌گیرد (زرگری، ۱۳۶۹). از دیگر اثرات دارویی این گیاه، تعدیل آلزایمر را می‌توان نام برد (Akhoondzadeh *et al.*, 2003). همچنین اثر محافظتی عصاره بادرنجبویه در موش‌هایی با کبد چرب بالا نیز اثبات شده است (Moradkhani *et al.*, 2010). گیاه بادرنجبویه

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

به‌طور معمول از طریق بذر تکثیر می‌شود و تکثیر آن از طریق کشت بذر و خاک با مشکلاتی از قبیل رشد کند گیاهچه در مراحل اولیه رویش، حمله آفات، مصرف زیاد آب و رشد علف‌های هرز همراه است (امیدبیگی، ۱۳۸۳). ریزازدیادی روشی جایگزین برای تکثیر سریع گیاهان یا تکثیر بخش‌های دارویی و مورد استفاده گیاه است. تکثیر نوشاخه‌های گیاه بادرنجبویه در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند روشی جایگزین برای تولید انبوه بخش‌های دارویی آن باشد. ریزازدیادی گیاهان دارویی و کشت درون شیشه‌ای روشی برای تکثیر سریع ژنوتیپ‌های انتخاب شده است. از مزایای کشت درون شیشه‌ای استخراج و خالص‌سازی آسان، تولید ترکیبات در مقادیری که در طبیعت پیدا نمی‌شوند، وابسته‌نبودن به عوامل آب‌وهوایی و فصلی، کنترل بیشتر مسیرهای بیوسنتزی برای دستیابی به ترکیبات شیمیایی در مقادیر مطلوب است (Misawa *et al*., 1994). تکثیر نوساقه‌ها از رئوس و جوانه‌های کناری برای تولید چندین نوساقه با تولید ریشه به‌عنوان یک تکنیک ماندنی برای تکثیر این گیاه شناسایی شده است. تکثیر نوساقه و باززایی گیاه از جداکشت‌ها به وجود غلظت‌های مناسب و ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاه در محیط‌کشت نیاز دارد (Mohebipour *et al*., 2012). دقت در انتخاب نوع تنظیم کننده‌های رشد قابل استفاده و غلظت آنها ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین محتوای متابولیت‌های ثانویه اندام‌های نوپدید نیز تحت‌تأثیر تیمارهای مختلف باید بررسی شود تا تولید گیاهانی با ترکیبات مؤثره بیشتر و کم خطرتر محقق شود. روش کشت‌بافت که می‌تواند امکان باززایی و تکثیر گیاهان را در شرایط آزمایشگاهی و رویشگاه‌های وسیع‌تر فراهم کند می‌تواند با تنظیم محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهم توسط کاربرد هورمون‌ها، جایگزینی مناسب برای روش‌های سنتی تولید عمده این ترکیبات باشد (صبورا و شکری، ۱۳۹۲).

تاکنون از الیسیتورهای مختلف از قبیل سولفات مس، نیترات نقره، کلسیم کلرید، یون نقره، سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر و قارچ‌ها برای افزایش مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاهان استفاده شده است (Yan *et al*., 2005). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های دارویی با بهره‌گیری از الیسیتورها، روشی مناسب برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان است (Dong *et al*., 2010). گزارش‌های متعددی از کاربرد فناوری نانو در کشت‌بافت گیاهی وجود دارد. نانوذرات به‌طور گسترده‌ای برای بهبود جوانه‌زنی، افزایش رشد و تولید محصول، ایجاد تغییرات ژنتیکی، تولید ترکیبات فعال زیستی وحفاظت گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ruttkay-Nedecky *et al*., 2017). نانوذرات نقره یکی از پرمصرف ترین مواد نانو هستند که در محیط‌کشت گیاهان برای القای رشد، از بین بردن آلودگی‌های میکروبی جداکشت و به‌عنوان الیسیتور مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Aghdaei *et al*., 2012). از نانوذرات نقره برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت تعلیقی و کشت اندام‌های گیاهان مختلف نیز استفاده شده است. افزایش محتوای ترکیبات فنلی در نوشاخه‌های رشدیافته وانیل (*Vanilla planifolia*)، تولید آنتوسیانین در دانه‌رست‌های آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، افزایش تولید آرتمیزین در کشت ریشه‌های موئین درمنه (*Artemisia annua*)، افزایش محتوای آتروپین در ریشه‌های موئین تاتوره (*Datura metel*) و افزایش محتوای اسانس در کالوس‌های همیشه‌بهار (*Calendula oficinalis*) در حضور نانوذرات نقره توسط محققین گزارش شده است (Spinoso-Castillo *et al*., 2015; Radomira *et al*., 2017; Shakeran *et al*., 2015; Mohammed *et al*., 2014). استفاده از نانوذرات به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانوی حاکی از آن است که غلظت‌های انتخاب‌شده تأثیر زیادی در تولید متابولیت‌های ثانوی داشته و استفاده از غلظت‌های بیشتر باعث سمیت می‌شود. به‌عنوان مثال در پژوهش‌های پیشین از نانوذرات Al_2O_3 در غلظت ۱۰–۱۰۰µg/ml، از نانوذرات ZnO در غلظت ۲۵–۱۰۰ mg/l و از نانوذرات نقره در غلظت‌های ۱ تا ۱۲۰ mg/l استفاده شده است (Ppborilova *et al*., 2013; Chamani *et al*., 2015; Jamshidi *et al*., 2014). در مطالعات پیشین اثر الیسیتورهایی مانند سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار رزمارینیک اسید در گیاه کامل بادرنجبویه توسط حسن‌زاده و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

همکاران (۱۳۹۵) و همچنین محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه در شرایط کشت درون شیشه‌ای توسط ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۷) بررسی شده است، ولی گزارشی در استفاده از نانوذرات و غلظت مناسب آن برای تحریک رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاه بادرنجبویه ارائه نشده است. لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر، تکثیر و تیمار نوشاخه‌ها: بذرگیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. بذرها پس از شستشو با آب و چند قطره شوینده به‌مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند. سپس درهیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون شده و سه بار با آب‌مقطر سترون شستشو شدند. بذرهای سترون به محیط‌کشت MS بدون هورمون انتقال یافته و در اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۵ ^{o}C در دوره نوری ۱۶ ساعت تحت نور فلورسنت با انرژی ۵۴ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند (Safavi, 2012).

رأس نوساقه‌های ۱۵ روزه حاصل از کشت بذر به طول تقریبی ۰/۵ cm جدا شدند و جهت تکثیر به محیط‌کشت MS حاوی BAP ۱ mg/l و NAA ۰/۵ mg/l منتقل شدند. نوشاخه‌های حاصل پس از گذشت یک ماه که در محیط‌کشت هورمون‌دار حاوی BAP ۱ mg/l و ۰/۵ mg/l رشد کردند، به محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ppm نانوذرات نقره انتقال یافتند. نانوذرات نقره به‌صورت نقره کلوئیدی در ابعاد ۲۰ تا ۳۰ نانومتر از شرکت پیام‌آوران نانو فناوری فردانگر در غلظت ppm ۱۰۰۰ تهیه شد. غلظت‌های ۱، ۲،۳ و ۴ ppm از این محلول تهیه و پس از قرارگرفتن در معرض امواج فراصوت (جهت پخش‌شدن و همگن‌کردن نانوذرات در محلول) به محیط‌کشت اضافه شد. ۱۴ و ۲۸ روز پس از تیمار با نانوذرات نقره، نوشاخه‌ها جمع‌آوری و جهت بررسی شاخص‌های رشد، عصاره‌گیری و سنجش مورد استفاده قرار گرفتند (kalani, 2011).

روش اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: ۱۴ و ۲۸ روز پس از تیمار با نانوذرات نقره نوشاخه‌ها جمع‌آوری شدند و وزن تر و خشک گیاه با استفاده از ترازو (Kern,Kb با دقت 0/001g)، طول اندام هوایی و ریشه (با استفاده از خط‌کش) اندازه‌گیری شد، همچنین تعداد برگ‌ها و انشعابات اندام هوایی شمارش شدند.

سنجش مواد مؤثره، عصاره‌گیری: مقدار ۰/۲گرم از پودر نوشاخه‌های خشک‌شده با ۲۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد به‌مدت ۳ ساعت در بن‌ماری ۷۰ ^{o}C عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل پس از صاف‌شدن تا زمان سنجش در فریزر ۷۰- ^{o}C نگهداری شد (Conde *et al*., 1995).

سنجش ترکیبات فنلی: برای سنجش ترکیبات فنلی به ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره گیاهی ۱/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر، ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولن – سیوکالتو و ۳ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ اضافه شد و بعد از ۹۰ دقیقه جذب در ۷۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر مدل Cecil 9000 series خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های صفر تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گالیک اسید استفاده شد (Lopez- Arnaldos *et al*., 1995).

سنجش ترکیبات فلاونوئیدی: برای تعیین میزان فلاونوئید ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره متانلی به ۰/۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد اضافه گردید و مخلوط شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد اضافه شد و پس از مخلوط‌کردن، محلول با اتانول۹۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید پس از ۳۰ دقیقه جذب در ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Kulisic *et al*., 2008).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد با ۲و۲ دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH): مقداری از عصاره متانلی را خشک کرده و سپس ۰/۰۱ میلی‌گرم از عصاره‌های متانلی خشک‌شده با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

متانول مطلق به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۰/۴ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول مطلق) به آنها اضافه شد و با متانول مطلق به حجم ۳ میلی‌لیتر رسید. پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه درصد مهار رادیکال آزاد (IC_{50}) از فرمول زیر استفاده شد:

$(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$ = درصد مهار رادیکال آزاد

در این فرمول A_{blank} جذب شاهد و A_{sample} جذب محلول حاوی نمونه گیاهی است (Molyneux, 2004).

برای کنترل مثبت از BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) استفاده شد.

سنجش قدرت کاهشی (Reducing power (RP): مخلوط ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره متانولی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲ مولار (با pH معادل ۶/۶) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانیدین ۱٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ °C قرار گرفتند. پس از اتمام انکوباسیون و سردشدن مخلوط، ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰g سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد اضافه گردید و جذب در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از فعالیت احیاکنندگی آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Niciforovica *et al*., 2010).

در این آزمون برای کنترل مثبت از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده شد.

سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید (SOD): مقدار ۹ میلی‌لیتر بافر تریس- HCl ۵۰ میلی‌مولار (با pH معادل ۸/۲) به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۲۵°C نگهداری و ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگالل (۴۵ mM پیروگالل در ۱۰ mM HCl) به آن اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، یک قطره آسکوربیک اسید ۵٪ به مخلوط اضافه گردید. جذب نمونه بعد از ۵ دقیقه در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و به‌عنوان A_0 ثبت شد. برای اندازه‌گیری A_1 بجای آسکوربیک اسید ازعصاره گیاهی و برای اندازه‌گیری A_2 از آب‌مقطر استفاده شد (شاهد). درصد جاروب‌کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Wang, 2017). همچنین بوتیل هیدروکسی تولوئن به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

$(A_0 - (A_1 - A_2)) \times 100 / A_0$ = درصد جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شدند. در صورت معنی‌داربودن تفاوت‌ها در آنالیز واریانس یک طرفه از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. آنالیز آماری به کمک نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

با افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۱ تا ۴ ppm و از ۱۴ تا ۲۸ روز، وزن تر و خشک گیاه، طول اندام هوایی، طول ریشه، تعداد انشعابات و تعداد برگ‌ها افزایش یافت. تعداد برگ و تعداد انشعابات بیشتر از سایر شاخص‌ها تحت‌تأثیر قرار گرفت. به‌نحویکه در غلظت ۴ ppm نانوذرات نقره در روز ۲۸ تعداد برگ‌ها ۲/۹ برابر و تعداد انشعابات ۱/۸ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۱).

نتایج حاصل از تأثیر نانوذرات نقره بر مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نشان داد که با افزایش زمان از ۱۴ به ۲۸ روز مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافت و غلظت ppm ۱ نانوذرات نقره در روز ۲۸ بیشترین تأثیر را در سنتز ترکیبات فنلی (۷/۱۴±۰/۰۵ mg GA/gdw) و فلاونوئیدی (۹/۳۰±۰/۰۵ mg QE/gdw) داشت که به‌ترتیب ۱/۶ و ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. با افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۱ به ppm ۴ روند کاهشی در مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مشاهده شد و در غلظت‌های ۱ و ۲ ppm نانونقره اختلاف معنی‌داری در میزان فلاونوئیدها مشاهده شد اما این اختلاف معنی‌دار در ترکیبات فنلی مشاهده نشد (جدول ۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد نشان داد که با افزودن نانوذرات نقره در همه غلظت‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. بیشترین تأثیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد نوشاخه‌های گیاه بادرنجبویه در تیمار هورمونی BAP ۱ mg/l و NAA ۰/۵ mg/l در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۱۴ و ۲۸ روز

غلظت نانو ذرات نقره (ppm)	زمان برداشت (روز)	وزن تر/گیاه (g)	وزن خشک/گیاه (g)	طول ریشه/گیاه	طول اندام هوایی/گیاه	تعداد انشعابات اندام هوایی/گیاه	تعداد برگ اندام هوایی/گیاه
۰	۱۴	۱/۰۸۳±۰/۰۴^{b}	۰/۰۱±۰/۰۰۵^{f}	۴/۳۳±۰/۰۲^{c}	۰/۵±۰^{c}	۴/۳۳±۰/۵^{d}	۱۹/۲۳±۲/۵^{f}
	۲۸	۱/۳۵±۰/۰۶^{b}	۰/۰۳±۰^{e}	۴/۸۳±۰/۲۸^{c}	۰/۶±۰^{c}	۴/۶۶±۰/۵۷^{d}	۳۴/۶۶±۳/۵^{d}
۱	۱۴	۱/۲۵±۰/۰۵^{b}	۰/۰۴±۰/۰۰۵^{ce}	۵/۳۳±۰/۲^{b}	۱±۰^{bc}	۵/۶۶±۰/۵۷^{c}	۲۶±۲^{e}
	۲۸	۱/۳۶±۰/۰۷^{b}	۰/۰۵±۰/۰۱^{c}	۵/۸۳±۰/۲۸^{b}	۱/۲±۰^{b}	۵/۷۶±۰/۵۶^{c}	۴۰/۳۳±۰/۵۷^{c}
۲	۱۴	۱/۴۴±۰/۰۵^{b}	۰/۰۵±۰/۰۰۱^{c}	۵/۶۶±۰/۰۲^{b}	۱±۰^{bc}	۶±۰^{b}	۳۴±۲^{d}
	۲۸	۱/۸۵±۰/۰۵^{a}	۰/۰۵±۰/۰۰۵^{c}	۵/۸۳±۰/۲۸^{b}	۱/۳±۰^{b}	۶/۲±۰/۰۱^{b}	۴۵/۶۶±۰/۵۷^{b}
۳	۱۴	۱/۷±۰/۰۴^{a}	۰/۰۶±۰/۰۰۵^{c}	۶/۶۶±۰/۰۵^{a}	۱/۵±۰^{b}	۶/۳۳±۰/۵۷^{b}	۴۰±۲^{c}
	۲۸	۱/۹۳±۰/۰۶^{a}	۰/۰۹±۰/۰۰۵^{b}	۶/۸۳±۰/۲۸^{a}	۲/۶۶±۰/۲۸^{a}	۷±۰^{a}	۴۸/۶۶±۰/۵۷^{b}
۴	۱۴	۱/۸۶±۰/۰۴^{a}	۰/۱۲±۰/۰۲^{b}	۶/۵۳±۰/۱۵^{a}	۱/۵±۰/۵^{b}	۶/۶۶±۰/۵۷^{b}	۴۶±۲^{b}
	۲۸	۲/۱±۰/۰۴^{a}	۰/۲۴±۰/۰۱^{a}	۶/۶۶±۰/۲۸^{a}	۳/۳۳±۰/۲۸^{a}	۷/۶۶±۰/۵۷^{a}	۵۵±۱^{a}

حروف مشابه در ستون میانگین، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ (براساس آزمون دانکن) هستند.

جدول ۲- مقایسه مقدار، ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی در نوشاخه‌های گیاه بادرنجبویه در تیمار هورمونی BAP ۱ mg/l و NAA ۰/۵ mg/l در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۱۴ و ۲۸ روز

غلظت نانوذرات	ترکیبات فنلی (mgGA/gdw)		فلاونوئیدها (mgQE/gdw)	
نقره (ppm)	۱۴ روز	۲۸ روز	۱۴ روز	۲۸ روز
۰	۳/۷۲±۰/۰۴^{c}	۴/۴۴±۰/۰۰۷^{c}	۱/۲۷±۰/۰۰۵^{c}	۴/۴۴±۰/۰۰۷^{d}
۱	۵/۴۹±۰/۰۲^{a}	۷/۱۴±۰/۰۵ ^{a}	۷/۱۴±۰/۰۱^{a}	۹/۳۰±۰/۰۵ ^{a}
۲	۵/۱۴±۰/۰۲^{a}	۶/۴۹±۰/۰۰۲^{a}	۳/۰۵±۰/۰۰۵^{b}	۶/۴۹±۰/۰۰۲^{b}
۳	۴/۹۳±۰/۰۰۲^{b}	۶/۲۳±۰/۰۰۴^{ab}	۲/۲۲±۰/۰۰۴^{b}	۶/۲۳±۰/۰۰۴^{b}
۴	۴/۴۸±۰/۰۰۱^{b}	۵/۴۱±۰/۰۰۹^{b}	۱/۸۵±۰/۰۰۳^{c}	۵/۴۱±۰/۰۰۹^{c}

حروف مشابه در ستون میانگین، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ (براساس آزمون دانکن) هستند.

نانوذرات نقره در غلظت ppm ۱ مشاهده شد و با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. به‌طورکلی با افزایش زمان از ۱۴ به ۲۸ روز، روند افزایشی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از غلظت ppm ۱ نانوذرات نقره با افزایش سه برابری نسبت به شاهد در روز ۲۸ مشاهده شد (IC_{50} =۱۹۰ µg/ml) که به فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT بسیار نزدیک بود (IC_{50}=۱۸۰ µg/ml) (جدول ۳).

در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سنجش قدرت کاهشی نیز بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ppm ۱ نانوذرات نقره در روز ۲۸ مشاهده شد (۳۹۰ µM/ASA) که با افزایش ۷/۳ برابری نسبت به شاهد بیشتر از فعالیت اندازه‌گیری‌شده با BHT بود (۲۱۸ µM/ASA). با افزایش غلظت نانوذرات نقره

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

جدول ۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های گیاه بادرنجبویه در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

غلظت نانو ذرات نقره (ppm)	IC_{50} (µg/ml)		RP (µM/ASA)		SOD	
	۱۴ روز	۲۸ روز	۱۴ روز	۲۸ روز	۱۴ روز	۲۸ روز
۰	۵۸۰±۲/۳۵^{a}	۵۶۰±۰/۵۶^{a}	۵۲±۰/۰۹^{d}	۵۳±۰/۲۵^{d}	۲۵±۰/۰۰۵^{e}	۳۰±۰/۰۷^{d}
۱	۲۰۰±۰/۸۴^{e}	۱۹۰±۰/۶۹^{ef}	۳۶۸±۰/۱۵^{a}	۳۹۰±۰/۱۷^{a}	۶۲±۱/۰۶^{b}	۷۴±۰/۹۴^{a}
۲	۲۸۰±۰/۷۹^{c}	۲۶۰±۰/۹۴^{d}	۱۶۱±۰/۰/۲۵^{c}	۱۷۸±۰/۰۸^{c}	۴۸±۰/۶۸^{c}	۵۶±۰/۷۷^{c}
۳	۳۰۰±۰/۴۰^{e}	۲۸۵±۰/۵۳^{c}	۵۲±۰/۰۵^{d}	۵۸±۰/۱۰^{d}	۲۶±۰/۰۷^{e}	۳۵±۰/۰۷^{d}
۴	۳۲۹±۱/۱۸^{b}	۳۱۵±۱/۵۲^{b}	۵۰±۰/۱۰^{d}	۵۴±۰/۰۹^{d}	۲۶±۰/۰۱^{e}	۳۲±۰/۰۱^{d}
BHT	۱۸۰±۲/۱۷^{f}	۱۸۰±۲/۴۰^{f}	۲۱۸±۰/۰۵^{b}	۲۱۸±۰/۰۵^{b}	۵۹±۰/۰۱^{b}	۵۹±۰/۰۱^{a}

حروف مشابه در ستون میانگین، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ (براساس آزمون دانکن) هستند.

از ۱ به ۳و۴ ppm فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت و با نمونه‌های شاهد تفاوتی نداشت (جدول ۳).

استفاده از نانوذرات نقره تا غلظت ppm ۳ موجب افزایش فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید شد و از این نظر در روز ۲۸ مشاهده شد (۷۴٪) که با فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT تفاوت معنی‌داری نداشت (۶۹٪). در این تیمار فعالیت آنتی-اکسیدانی ۲/۴۶ برابر نمونه شاهد بود (جدول ۳).

بحث

براساس یافته‌های این پژوهش، استفاده از غلظت‌های بالاتر نانوذرات نقره (۳ و ۴ ppm) موجب افزایش شاخص‌های رشد به‌ویژه تعداد انشعابات و تعداد برگ‌ها می‌شود. در مطالعات پیشین، اثر مثبت نانوذرات بر القای تشکیل کالوس، باززایی نوشاخه و رشد آن در گیاهان مختلف مطالعه شده است. در انار شیطان (*Tecomella undulata*) استفاده از نانوذرات نقره با غلظت ۱۰ mg/l درصد القای نوشاخه، تعداد نوشاخه‌ها و تشکیل کالوس را افزایش داد (Aghdaei *et al.*, 2012). با افزایش غلظت نانوذرات نقره به ۶۰ mg/l در کشت گره انار شیطان تعداد، طول و درصد نوشاخه‌های تشکیل‌شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Sarmast *et al.*, 2014). همچنین نانوذرات نقره پیری جداکشت‌ها را به تأخیر انداخته و بقای آنها را با فروتنظیمی ژن TuACS افزایش دادند. با این وجود غلظت‌های بیشتر (بالای ۶۰ mg/l) نانوذرات نقره روی باززایی نوشاخه‌ها اثر کاهشی دارد. افزایش رشد دانه‌رست‌های خردل چینی (*Brassica juncea*) تحت تأثیر نانوذرات نقره در غلظت ۵۰ mg/l توسط Aroa و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است. غلظت‌های بالاتر نانوذرات نقره (۱۰۰-۴۰۰ mg/l) روی رشد دانه‌رست‌ها اثر کاهشی دارد. براساس گزارش‌های فوق، غلظت مناسب نانوذرات برای تحت تأثیر قراردادن شاخص‌های رشد گیاهان مختلف یکسان نیست (Ma *et al.*, 2015). اثرات مثبت یا منفی نانوذرات بر گیاه به بستر رشد گیاه، نوع نانوذره، مقدار آن، روش و مدت زمان استفاده و گونه گیاهی بستگی دارد (Ma *et al.*, 2015) که پژوهش‌های فوق با تحقیق حاضر مطابقت دارد.

براساس یافته‌های این پژوهش استفاده از غلظت کم نانو ذرات نقره (۱ ppm) موجب افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌شود که با افزایش غلظت روند کاهشی در تولید این ترکیبات مشاهده شد. استفاده از غلظت‌های مختلف نانوذرات برای تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی توسط محققین نیز مطالعه شده است. به گزارش Chamani و همکاران (۲۰۱۵) انباشتگی ترکیبات فعال زیستی در سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*) به غلظت نانوذرات ZnO در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

محیط‌کشت وابسته بود. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها به‌ترتیب با غلظت ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰ mg /l نانوذرات ZnO بدست آمد. کاهش سنتز ترکیبات فنلی با افزایش غلظت نانوذرات توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در گیاه گل گاو زبان (*Borago officinalis*) با استفاده از غلظت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ppm نانوذرات نقره مشخص شد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره مقدار ترکیبات فنلی کاهش یافت (Seif Sahandi *et al*., 2011).

با توجه به مشاهدات Ghorbanpour و همکاران (۲۰۱۵) در استفاده از غلظت‌های ۲۵ تا ۵۰۰ µg/ml از نانولوله‌های کربنی چند جداره در کشت برگ مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید با بهره‌گیری از ۱۰۰ یا ۲۵۰ µg/ml از نانومواد گزارش شده است. همچنین کمالی‌زاده و همکاران (۱۳۹۴) دریافتند با استفاده از نانوذرات اکسید تیتانیوم در غلظت‌های صفر تا ۱۵۰ ppm بر روی گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) غلظت ۵۰ ppm بیشترین تأثیر را در تولید رزمارینیک اسید دارد. با توجه به مشاهدات Spinoso-Castillo و همکاران (۲۰۱۵) نوشاخه‌های رشدیافته وانیل (*Vanilla planifolia*) در محیط MS همراه با ۵۰ mg /l و ۲۵ نانوذرات نقره افزایش چشمگیری در محتوای ترکیبات فنلی داشته‌اند (Spinoso-Castill *et al*., 2017). تاکنون در مطالعات متعددی به کاربرد نانوذرات نقره همراه با نانوذرات طلا به‌منظور افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اشاره شده است. افزودن نانوذرات طلا و نقره به نسبت ۳:۱ موجب انباشتگی بیشینه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در کشت کالوس نعناع چمنی (*Prunella vulgaris*) شد (kumar *et al*., 2018). با توجه به مشاهدات Ghokhale و همکاران (۲۰۱۰) استفاده از نقره به‌صورت ($AgNO_3$) در کشت‌بافت گیاه انبه (*Orxylum indicum*) و با توجه به نتایج علیرضایی و همکاران (۱۳۹۳) استفاده از نقره به‌صورت نانوذرات نقره در کشت کالوس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای باعث افزایش مقدار فلاونوئیدها شد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

کاهش در مقدار ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت نانوذرات استفاده شده را می‌توان به اثرات سمی نانوذرات نسبت داد. سمیت نانومواد روی گیاهان به غلظت آن، نوع جداکشت و گونه گیاهی بستگی دارد. براساس گزارش‌های موجود افزایش نانوذرات به کشت تعلیقی سلول، با آسیب به DNA و افزایش تولید ROS، اختلال در سنتز کلروفیل، آسیب به غشا و نشت الکترولیت قدرت زنده ماندن سلول‌ها را کاهش می‌دهد (Jamshidi *et al*., 2014). برای تعیین غلظتی از نانوذرات که ضمن تحریک رشد گیاه بر آن اثر سمی نداشته باشد باید مطالعات دقیق‌تری صورت بگیرد. در صورتی که غلظت به‌کاررفته در حد سمی باشد پاسخ‌های گیاه سمیت نانوذرات را کاهش داده یا جذب آنها را کاهش می‌دهد و به این طریق بر محتوای متابولیت‌های ثانوی اثر می‌گذارد.

استفاده از نانوذرات موجب القای گونه‌های فعال اکسیژن می شود (Panda *et al*., 2014). گیاهان برای مقابله با اثر رادیکال‌های آزاد از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنند. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نقش مهمی در سیستم جاروب‌کنندگی ROS دارند (Rice-Evans *et al*., 1996). به همین دلیل هنگام استفاده از نانوذرات در غلظت مناسب مقدار آنها افزایش می‌یابد.

به‌دنبال تغییر در محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با استفاده از غلظت‌های مختلف نانوذرات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد که تغییر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عوامل مختلف از جمله غلظت نانوذرات مورد استفاده بستگی دارد. بررسی اثر نانوذرات نقره در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ mM بر گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) نشان داد با افزایش غلظت نانوذرات نقره فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (Ghanati *et al*., 2014). براساس یافته‌های این پژوهش نیز با افزایش غلظت ذرات نانوذرات نقره از ۱ به ۴ ppm فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت که با نتایج فوق مطابقت دارد. با توجه به اینکه نانوذرات نقره در غلظت‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

پایین با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن دفاع آنتی‌اکسیدانی را فعال کرده و در غلظت‌های بالا با ایجاد عدم‌تعادل بین دفاع آنتی‌اکسیدانی و گونه‌های فعال اکسیژن با ایجاد سمیت خاصیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد، می‌توان از غلظت مناسب نانوذرات نقره به‌عنوان الیسیتور برای القای تولید ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه بادرنجبویه استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج آنالیز رشد نشان داد افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۱ تا ۴ ppm باعث افزایش شاخص‌های رشد (وزن تر و خشک گیاه، طول اندام هوایی و ریشه، تعداد برگ و تعداد انشعابات اندام هوایی) می‌شود و این افزایش ۲۸ روز پس از تیمار مشهود است. تعداد برگ و تعداد انشعابات بیشتر از سایر شاخص‌ها تحت‌تأثیر قرار گرفتند. کمترین مقدار IC_{50}، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت کاهشی و جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در نوشاخه‌های تیمارشده با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۲۸ روز مشاهده شد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان جنبه مثبت تأثیر نانوذرات نقره بر روی رشد گیاه را به‌عنوان هدف استفاده از نتایج این تحقیق برای مطالعات مولکولی و استفاده از بیوتکنولوژی گیاهی جهت تولید گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاو رشد بهینه گیاهان معرفی نمود.

منابع

ابراهیمی، م.، کیارستمی، خ. و ناظم بکائی، ز. (۱۳۹۷) بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌های تکثیرشده گیاه بادرنجبویه درکشت درون شیشه‌ای. یافته‌های نوین در علوم زیستی جلد ۵: ۴۲۷-۴۲۰.

امیدبیگی، ر. (۱۳۸۳) تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات آستان قدس رضوی (به نشر).

حسن‌زاده، ک.، همتی، خ. و علیزاده، م. (۱۳۹۵) اثر کودهای آلی و اسید سالیسیلیک بر عملکرد و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.). نشریه علمی تولید گیاهی ۲۳: ۱۳۰-۱۰۷.

زرگری، ع. (۱۳۶۹) فصلنامه گیاهان دارویی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران.

صبورا، ع. و شکری، م. (۱۳۹۲) بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جوانه‌زنی و ریزازدیادی گیاه دارویی برازمبل در شرایط *in vitro*. زیست‌شناسی گیاهی ایران ۱۸: ۱۱۴-۹۵.

علیرضایی، ف. و کیارستمی، خ. (۱۳۹۳) بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخدوس در شرایط کشت درون شیشه‌ای و اثر نانو نقره و سایر الیسیتورها بر سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهرا، تهران.

کمالی‌زاده، م.، بی‌همتا، ب.، پیغمبری، ع. و هادیان، ج. (۱۳۹۴) اثر سطوح مختلف نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) بر دو ترکیب فنلی مهم در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۱: ۴۳۵-۴۲۸.

Aroa, S., Sharma, P., Kumar, S., Nayan, R., Khana, P. And Zaidi, M. (2012) Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*. Plant Growth Regulation 66: 303-310.

Akhoondzadeh, S., Nooroozian, M., Mohmmafi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. and Khani, M. (2003) *Melissa officinalis* extract in the treatment of patient with mild to moderate Alzheimer's disease: A double blind, randomized, placebo controlled trial. Food Protuguense 6: 625-632.

Aghdaei, M., Sarmast, M. K. and Salehi, H. (2012) Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. Horticultural Science 26: 21-24.

Mohammed-Ameen, A. and Al-Oubaidi, H. (2014) The effect of ($AgNO_3$) NPsonincreasingof secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. in vitro.World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences13: 1146-1155.

Bhat, P. and Bhat, A. (2016) Silver nanoparticles for the enhancement of accumulation of capsaicin in suspension culture of Capsicum sp. Journal of Experimental Sciences 7: 1-6.

Chamani, E., Karimi, M., Ghalehtaki, S., Mohebodini, M. and Ghanbari, A. (2015) The effect of Zinc oxide nano particles and humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss. Iranian Journal of Genetics and Plant breeding 4: 11-19.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

Conde, E., Cadahfa. E. and Garsia –Vallejo, M. C. (1995) HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in Eucalyptus spp. Chromatographia 41: 657-660.

Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondry metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology 148: 99-104.

Ghanati, F., Bakhtiarian, S., Mohamad Parast, B. and Keyhani, M. (2014) Production of new active Phytocompounds by (*Achillea millefolium* L.) after elicitation with silver nanoparticles and Methyl jasmonate. Jornal of Bioscience Biotechnology Research Asia 11: 391-399.

Ghokhale, M. and Bansal, Y. K. (2010) Assessment of secondary metabolites in in vitro regenerated plantlets of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. Plant Tissue Culture and Biotechnology 20: 21-28.

Ghorbanpour, M. and Hadian, J. (2015) Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro.* Science Direct 94: 749-759.

Jamshidi, M., Ghanati, F., Rezaei, A. and Bemani, E. (2014) Change of antioxidant enzymes activity of hazel (*Corylus avellana* L.) cells by AgNPs. Cytotechnology 68: 525-530.

Kalani, M. R., Khosravi, A., Javan, B. and Shahbazi, M. (2011) Polymorphisms of interleukin-1 alpha genes in patients with Chronic Hepatitis B. The Cell Journal-yakhteh 12: 75-76.

Kulisic-Bilusic,T., Katalinic, V., Dragovic-Uzelac, V., Ljubenkov, I., Karisko, A., Dejanovic, B., Jukic, M., Politeo, O., Pifat, G. and Milos, M. (2008) Antioxidant and asetilecolinesterase inhibiting activity of severalaqueous Tea Infusion *in vitro* Food. Biotechnology 46: 368-375.

kumar, V., Kasthuri, S., Prabhu, S., Manogar, P. and Parameswari, V. (2018) Screening and identification of novel inhibitors against human 4-aminobutyrate-aminotransferase: A computational approach. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 5: 210-219.

Li, W., Kioke, K., Asada, Y., Yoshikawa, T. and Nifaido, T. (2005) Rosmarinic acid production by (*Coleus forsholy*) nairy root cultures. Plant Cell Tissue and Organ an Culture 80: 151-155.

Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros Barcelo, A., Calderon, A. A. and Zapata, J. M. (1995) Spectrophoto-ometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe ions. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 351: 311-314.

Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Hosseini, M. S., Bargin, A. F. and Meftahizade, H. (2010) *Melissa officinalis* L. a valuable medicine plant: A review. Journal of Medicinal Plants Research 4: 2753-2759.

Ma, Ch., Chhikara, S., Minocha, R., Long, S., Musante, C., Jason, C., Baoshan Xing, B. and Parkash, D. (2015) Reduced silver nanoparticle phytotoxicity in *Crambe abyssinica* with enhanced glutathione production by overexpressing bacterial γ-glutamylcysteine synthase. Enviromental Science Technology 49: 10117-10126.

Misawa, N., Truesdale, M. R., Sandmann, G., Fraser, P. D., Bird, C., Schuch, W. and Bramley, P. M. (1994) Expression of a tomato cDNA coding for phyotene synthase in *Escherichia coli*, phytoen formation in vivo and in vitro and functional analysis of the various truncated gene products. Journal of Biochemistry 116: 980-985.

Mohebipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motallebiazar, A. and Arefi, H. M. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. Journal of Food, Agriculture and Enviroment 10: 208-286.

Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal Science. Thecnology 26: 211-219.

Niciforovica, N., Mihailivic, V., Maskovic, P., Solugic, S., Stojkovic, A. and Pavlovic –Muratspahic, D. (2010) Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. Food Chemistry Toxicol 48: 3125-3129.

Panda, S., Rath, M. K. and Dhal, N. (2014) Synthesis of silver nano particles from plant extract and its application in cancer treatment: A review. International Journal Plant and Animal and Environmental Science 4: 2231-2240.

Ppborilova, Z., Opatrilova, R. and Babula, P. (2013) Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. Environmental and Experimental Botany 91: 1-11.

Radomira,V., Premysl, L., Radka, P., PetreI, D., Sylva, P., Lenka, La., Alena, G., Katerina, M., Vojtech, K. and Tomas, V. (2017) ZnO nanoparticle effects on hormonal pools in *Arabidopsis thaliana.* Science of The Total Environment 1: 593-594.

Ruttkay-Nedecky, R., Krystofova, O., Nejdl, L. and Adam, V. (2017) Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. Journal of Nanobiotechnology 15: 33-39.

Rice-Evans, C. A., Miller, J. M. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavon oids and phenolic acids. Free Radic Biotechnology Medicine 20: 933-956.

Seif Sahandi, M., Sorooshzadeh, A., Rezazadeh, S. and Naghdibadi, H. A. (2011) Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. Effect of Nano Silver and Silver Nitrate on Seed Yield of Borage 5: 171-175.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

Sarmast, M. K., Niazi, A., Salehi, H. and Abolimoghadam, A. (2014) Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 121: 227-236.

Safavi, K. (2012) Evaluation of using nanomaterial in tissue culture media and biological activity. International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences 25: 13-14.

Spinoso-Castillo, J., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Perez-Sato, J. A. and Morales-Ramos, V. (2015) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanillap lanifolia* Jacks. exAndrews) using at emporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 129: 195-207.

Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, Gh. and Ghanadian, M. (2015) Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. Turkish Journal of Biology 39: 111-118.

Yan, Q., Shi, M. and Wu, J. (2005) Elicitor- enduce rosmarinic acid accumulation and secondry metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Science 170: 853-858.

Yosofi, M., Hojjati, M. R., Moshtaghi, E., Rahimiyan, R., Dawodiyan Dehkordi, A. and Rafieian, M. (2011) The effect of hydro-alcoholic extract of *Melissa officinalis* on learning and spatial memory in Balb/c mice. Medicine Science 13: 51-59.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]

Effect of silver nanoparticles on growth indicators and antioxidant properties of *Melissa officinalis L* in *invitro* culture conditions

Tahereh Mirzaei and Khadijeh Kiarostami*

Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran
(Received: 22/01/2022, Accepted: 05/04/2022)

Abstract

Lemon balm (*Melissa officinalis*) is a medicinal plant belonging to lamiaceae and is rich in antioxidant compounds. with the aim of optimizing the production of antioxidant compounds, in this research, we studied the effect of different concentrations of silver nanoparticles on growth indices and antioxidant activity of proliferated shoots in vitro culture. For this purpose, seedlings of seed germination in MS medium were transferred for propagation to MS culture medium containing 1 mg / l BAP and 0.5 mg / l NAA. after one month, silver nanoparticles with concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4 ppm were added to the culture medium and growth indices, antioxidant activity by free radical scavenging (DPPH), reducing power (RP) and superoxide anion scavenging activity (SOD) and phenolic and flavonoid compounds compositions of the proliferated shoots at 14 and 28 days intervals were measured after treatment. The results of growth analysis showed that increasing the concentration of silver nanoparticles from 1 to 4 ppm increased growth indices (fresh and dry weight of the plant, shoot and root length, number of leaves and number of shoots). This increase was evident 28 days after treatment. The number of leaves and the number of brancheswere affected more than other indices. The lowest amount of IC50, the highest activity reducing power activity (RP) and superoxide anion scavenging activity (SOD), and the highest amount of phenoli and flavonoid compounds were observed in the treated shoots with a concentration of 1 µg / ml silver nanoparticles for 28 days. Generally higher concentrations of silver nanoparticles for growth indices and its lower concentration is suggested to be useful for the production of antioxidant compounds.

Keywords: Antioxidants, flavonoids, *Melissa Officinalis*, Phenolic compounds, Silver nanoparticles

Corresponding author, Email: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-07-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.14.9]