Archive of SID

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره بیست و نهم، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۳۷-۵۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۴/۰۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۱۱

بررسی کالوس‌زایی و توان آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی حاصل از ریزنمونه‌های مختلف گیاه *Teucrium polium*

مرجان جاویدی مقدم، منیره چنیانی *، علی گنجعلی و مهرداد لاهوتی
گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاه دارویی از خانوادهٔ نعناع (Lamiaceae) است. روش کشت بافت این گیاه به سبب کوتاه‌بودن دورهٔ رشد و خطر انقراض آن کارآمد به نظر می‌رسد. این گیاه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، خواصّ درمانی بسیاری دارد. در پژوهش حاضر، اثر محیط‌کشت، غلظت‌های مختلف هورمون D -۴ و ۲ و نوع ریزنمونه بر نرخ کال‌زایی گیاه کلپوره بررسی و مشخّص شد که تیمار مؤثّر برای افزایش وزن تر کالوس، ریزنمونهٔ برگ در محیط‌کشت B5 دارندهٔ غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون D-۴ و ۲ است. در تیمارهای بدون هورمون، درصد القای کالوس نسبت به بقیّه کمتر بود. بیشترین درصد کال‌زایی نیز در محیط‌کشت‌های محتوی مقادیر بیشتری از این هورمون القا شد. بررسی ویژگی‌های زیست‌شیمیایی (محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای دو آزمون DPPH و PPM) نشان داد که میزان فنل کل در کالوس حاصل از ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی در محیط‌کشت B5 بدون هورمون (۶۶/ ۸۲ میلی‌گرم GAE در ۱۰۰گرم FW) بیشتر از بقیّه است. با آزمون DPPH، بیشترین فعّالیت روبشگری رادیکال‌های آزاد، در برگ گیاه جمع‌آوری‌شده از رویشگاه و کالوس حاصل از ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی در محیط‌کشت B5 با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر D-۴ و ۲، مشاهده شد. با بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز مشخّص شد که کالوس جوانهٔ انتهایی محیط‌کشت MS با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر D-۴ و ۲ و برگ و ساقهٔ گیاه جمع‌آوری‌شده از رویشگاه، فعّالیت بیشتری داشتند. این شرایط می‌تواند پیشنهاد استفاده از محیط‌های کشت یادشده را برای افزایش تولید ترکیبات ثانویه با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، توان آنتی‌اکسیدانی، کال‌زایی، کلپوره، هورمون D-۴ و ۲.

مقدمه

گیاهان دارویی، ارزش و اهمّیت خاصّی در تأمین بهداشت و سلامت جوامع از جنبهٔ پیشگیری و درمان بیماری‌ها دارند. بزرگترین بخش بازار گیاهان دارویی دنیا به تولید و عرضهٔ متابولیت‌های ثانوی مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود. بنابراین متابولیت‌های ثانوی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: cheniany@um.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۲۲

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

معمولاً ارزش افزودهٔ بسیاربالایی دارند (Kashfi, 2010). کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* L. گیاهی دارویی از خانوادهٔ نعناع است (Tavakkoli Saberi and Sedaghat, 1993). برگ‌های کلپوره کاربرد غذایی و به‌ویژه دارویی دارند (Rabba'a *et al.*, 2012). این گونهٔ دارویی به صورت خودرو در برخی مناطق ایران از جمله خراسان مشاهده می‌شود. بهره‌برداری‌های بی‌رویهٔ انسان، چرای مفرط دام و همچنین تبدیل‌شدن مراتع به بوم‌نظام‌های زراعی از جمله دلایلی است که کلپوره را در معرض انقراض قرار داده است. بنابراین تمهیدات لازم برای حفظ این گیاه در عرصه‌های طبیعی و راهکارهایی برای تکثیرکردن آن ضروری است (Kochaki *et al.*, 2009). در سال‌های گذشته روش‌های کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر و به‌نژادی بسیاری از گونه‌های گیاهی و تولید ترکیبات ثانوی در گیاهان دارویی تبدیل شده است (Al-Qudah *et al.*, 2011). در یک بررسی درون‌آزمایشگاهی، درصد باززایی و ترکیبات ثانوی گیاه کلپوره از مریستم انتهایی ساقه در محیط‌کشت MS و در حضور ترکیبات هورمونی ۶- بنزیل‌آدنین و ۶- فورفوریل‌آمینوپورین ارزیابی شد (Al-Qudah *et al.*, 2011). سایر پژوهش‌های انجام‌شده برای تولید کالوس یا اندام و ارزیابی محتوای داخلی ترکیبات ثانوی در گونه‌های دیگر تیرهٔ نعناعیان بوده است. از جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد: *Mentha piperita* (Ghanti *et al.*, 2004)، *Salvia fruticosa* Mill (Arikat *et al.*, 2004)، *Salvia officinalis* (Grzegorczyk *et al.*, 2005)، *Ocimum basilicum* (Lukmanul hakim, *et al.*, 2007)، *Zataria mutiflora* (Hasanpour *et al.*, 2007). با توجّه به این که پژوهش‌های اندکی در رابطه با کشت بافت و کال‌زایی گیاه کلپوره انجام شده است، استفاده از روش کشت درون‌آزمایشگاهی می‌تواند برای تسریع و افزایش تولید ترکیبات مؤثّر و دارویی آن مفید باشد.

کلپوره در طبّ سنتی در درمان بیماری‌های مزمن معدی و نیز به صورت ادرارآور، ضدّ فشارخون، ضدّ باکتری، ضدّ نفخ، ضدّ اسهال، ضدّ دیابت و ضدّ تشنّج استفاده می‌شود (Ardestani *et al.*, 2008؛ Hasani-Ranjbar *et al.*, 2010). همچنین عصارهٔ این گیاه در کاهش قند و چربی خون و در درمان سرطان پروستات نیز اهمّیت دارد (Kandouz *et al.*, 2010). بررسی‌ها روی خواص دارویی این گیاه نشان داده است که عصارهٔ آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدّسرطانی بالایی دارد؛ از این رو در صنعت داروسازی و تغذیه، کاربرد وسیعی دارد (Ardestani *et al.*, 2008؛ Goulas *et al.*, 2011). طبق بررسی‌های انجام‌شده، گیاه کلپوره دو دستهٔ مهم از ترکیبات ثانوی شامل ترکیبات فنلی و اسانسی را دربردارد. عصارهٔ حاصل از گیاه کلپوره دربردارندهٔ اپیژنین و روتین است که به سبب خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اثر حفاظتی روی سلول‌های نوع B لوزالمعده دارد (Esmaeili and Sadeghi, 2009). پژوهش‌ها نشان داده است که عصارهٔ کلپوره همچنین دارندهٔ فنیل پروپانوئید گلیکوزیدورباسکوزید، پلیموزوئید، فلاون‌های اپیژنین و مشتقّات آن و فنوکسی‌فلاون است. فعّال‌ترین ترکیب عصارهٔ آن، پلیموزوئید است که شناساگر گونه *T. polium* محسوب می‌شود. ۶۶ تا ۸۰ درصد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این گونه به حضور فنیل پروپانوئیدها و

www.SID.ir

Archive of SID

به‌ویژه حضور پلیموزوئید مربوط است. دی‌فنوکسی‌کوئرستین و رباسکوزید نیز در روبندگی رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Mihajilov-Krstev *et al.*, 2009؛ Goulas *et al.*, 2011؛ Zerroug *et al.*, 2011). برای تعیین فعّالیت روبشگری رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در گیاهان، آزمایش‌های متعدّدی را مانند بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با آزمون PPT (Phosphomolybdenum Test) و بررسی فعّالیت آنتی‌اکسیدانی ویژه با آزمون DPPH (2,2-diphenyl-1 Picrylhydrazyl Test) می‌توان انجام داد (Dicko *et al.*, 2006؛ Matkowski and Wolniak, 2005). هدف از انجام این آزمایش بررسی نرخ کال‌زایی گیاه کلپوره در سطوح مختلف هورمون D-۴ و ۲ و ارزیابی محیط کشت مناسب برای افزایش تولید ترکیبات فنلی و سایر مواد مؤثّر دارویی این گیاه است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی: گیاه کلپوره در شهریور ماه ۱۳۹۲ از ارتفاعات شهرستان بردسکن (استان خراسان رضوی)، جمع‌آوری شد و پس از شناسایی وتأیید آن، پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد از آن استفاده کرد. در ابتدا بذرهای رسیده از گیاه مادری جدا و ضدّ عفونی شد. با توجّه به جوانه‌زنی بسیار اندک بذرها از تیمارهای مختلف برای افزایش قدرت جوانه‌زنی بذرها استفاده شد. در نهایت از هورمون جیبرلیک اسید همراه با استراتیفیکاسیون و خراش در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد به مدّت ۶ روز به صورت بهترین تیمار استفاده شد. سپس بذرها درون پتری‌دیش‌های استریل شده محتوی کاغذ صافی و در ژرمیناتور در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتیگراد و در شرایط همیشه مرطوب قرار گرفتند. با ظاهرشدن ریشه‌چه و ساقه‌چه، دانه‌رست‌های کلپوره به مدّت دو روز زیر نور ۲۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربّع بر ثانیه و دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و در شرایط کاملاً مرطوب، قرار گرفتند تا اندام هوایی آن‌ها، سبز شد و طول ریشه‌چه‌ها افزایش یافت. به این‌ترتیب، دانه‌رست‌ها برای قرارگرفتن در محیط هیدروپونیک محتوی محلول هوگلند (Arnon and Hoagland, 1940) آماده شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتیگراد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

عملیات کشت: در بررسی حاضر، کشت سه نوع ریزنمونهٔ برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه در دو نوع محیط کشت MS و B5 در تیمار با ۵ غلظت هورمون D-۴ و ۲ (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. به این منظور، قطعات ریزنمونه پس از جداسازی از گیاه مادری حاصل از کشت هیدروپونیک و شستشو به مدّت ۵ دقیقه با آب جاری، زیر هود لامینار (مدل JTLVC2، Jaltajhiz، ایران) منتقل و پس از غوطه‌ورشدن ۳۰ ثانیه‌ای در الکل ۷۰درصد، ۵ دقیقه با آب مقطر استریل، شست‌وشو و سپس به مدّت ۳ دقیقه وارد هیپوکلریت سدیم ۱ درصد شدند. در پایان، سه مرتبه با آب مقطر استریل به مدّت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند و سپس روی کاغذ صافی استریل در پتری‌دیش، قرار گرفتند تا رطوبت آن‌ها گرفته شود. سپس ریزنمونه‌ها به‌طور

www.SID.ir

Archive of SID

مساوی به قطعات یک سانتی‌متری برش‌خورده و درون ویال‌های دارندهٔ محیط کشت MS و B5 با غلظت‌های مختلف هورمون D-۴ و ۲ قرارگرفتند. ویال‌های دربردارندهٔ قطعات جداکشت در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتیگراد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی گرفتند و به مدّت ۸ هفته نگهداری شدند. در این مدّت سه بار عملیات واکشت نمونه‌ها انجام شد. پس از متوقّف‌شدن تقریبی رشد کالوس‌ها در پایان هفتهٔ هشتم، درصد کال‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی و برای تعیین نرخ رشد، وزن تر آن‌ها به وسیلهٔ ترازوی دیجیتال (مدل TE313s، Sartorius، آلمان) اندازه‌گیری شد.

عصاره‌گیری: ۰/۵ گرم مادهٔ تازه از هر نمونه (شامل برگ، جوانهٔ انتهایی، ساقه و کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه) برای عصاره‌گیری با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ساییده شد و پس از ریختن درون لولهٔ آزمایش، در بن‌ماری (بن ماری سرولوژی، Kavoosh Mega، ایران) با دمای ۶۰-۵۵ درجهٔ سانتیگراد به مدّت ۳ ساعت قرار گرفت. سپس به مدّت ۱۵ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ (مدل Z230، Berthold Hermle GmbH، آلمان) (۳۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. در پایان، محلول رویی با کاغذ واتمن شمارهٔ یک، صاف و به حجم ابتدایی رسانده شد. عصارهٔ مورد نیاز برای سنجش میزان ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی، بدون فاصله قبل از انجام هر آزمایش تهیّه شد. این عصاره به مدّت یک ماه در دمای ۲۰- درجهٔ سانتیگراد قابل نگهداری است.

تعیین محتوای فنل کل: سنجش میزان ترکیبات فنلی کل با روش Gao و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. به این منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر معرّف فولین - سیوکالچو به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) در هر لولهٔ آزمایش اضافه شد. سپس مخلوط واکنش با ۲ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، رقیق و مخلوط شد. پس از یک مکث ۳ دقیقه‌ای، ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد به آن افزوده شد و پس از یک ساعت وقفه، جذب نوری مخلوط واکنش با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JASCO،UV/Vis1800، آلمان) در طول موج ۷۶۵ نانومتراندازه‌گیری شد. سنجش میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره‌های متانولی استخراج‌شده از کالوس‌های حاصل از سه اندام برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه در دو نوع محیط کشت MS و B5 تیمارشده با غلظت‌های مختلف هورمون D-۴ و ۲ و همچنین سه اندام برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه از گیاه مادری در رویشگاه طبیعی و همچنین گیاهان رشدیافته در محیط هیدروپونیک با سه تکرار برای هر نمونه انجام شد. مقدار کلّ ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها با کمک منحنی استاندارد گالیک اسید، محاسبه و بر حسب معادل میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن تر نمونه تعیین شد.

تعیین فعّالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون DPPH: ابتدا غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ هر نمونهٔ مورد بررسی، تهیّه و از آن به صورت محلول پایه استفاده شد. سپس از محلول پایه، ۱۰ طیف غلظتی ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ... میلی‌گرم در لیتر تهیّه شد. آزمون DPPH با روش Yang و همکاران (۲۰۱۱) و در ظروف ویژهٔ ۹۶ خانه‌ای انجام شد. در هر خانه، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصارهٔ هر یک از نمونه‌ها و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۰۰۸ درصد DPPH (w/v) متانولی به آن اضافه شد. از مخلوط ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر متانول به صورت بلانک و از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۰۸ درصد DPPH برای شاهد استفاده شد. نمونه‌ها به مدّت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفت. پس از گذشت زمان مورد نظر، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه ELISA Reader (مدل Statfax-2100، Bioblock Scientific، امریکا) خوانده شد. به دلیل حساس‌بودن محلول DPPH به نور، این آزمایش در اتاق تاریک انجام شد. شاخص آنتی‌اکسیدانی (Antioxidant Index) بر مبنای رابطهٔ ۱ و ۲ Yang *et al.*, 2011) و برای سه تکرار از هر نمونه محاسبه شد.

رابطهٔ ۱: $AI\ (\%) = (1 - AT / AC) \times 100$

شاخص آنتی‌اکسیدانی (AI): AT: جذب خالص نمونهٔ آزمایش‌شده، AC: جذب شاهد.

رابطهٔ ۲: $AT = AS - AB$

جذب خالص نمونهٔ آزمایش‌شده (AT): AS: جذب خام نمونهٔ آزمایش‌شده، AB: جذب بلانک.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با آزمونPPT: این آزمون با روش Prieto (۱۹۹۹) انجام شد. حجم های مختلف (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر) از عصاره (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) تهیّه و با متانول به حجم ۳۰۰ میکرولیتر رسانده شد. ۳ میلی‌لیتر از محلول معرّف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) نیز به آن‌ها اضافه شد. پس از ۹۰ دقیقه قراردادن در بن‌ماری (مدل بن‌ماری سرولوژی، Kavoosh Mega، ایران)(دمای ۹۵ درجهٔ سانتیگراد)، جذب آن در طول موج ۶۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JASCO،UV/Vis1800، آلمان) خوانده شد. در نهایت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت خاصی (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بر اساس هم‌ارزی با آسکوربیک اسید (بر حسب میلی‌گرم ASA در ۱۰۰ گرم بافت تر نمونه) ارائه و با یک‌دیگر مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۶ انجام شد و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq ۰/۰۵$) استفاده شد و نمودارهای مربوط به وسیلهٔ نرم‌افزار EXCEL Microsoft (Office 2007) رسم شد.

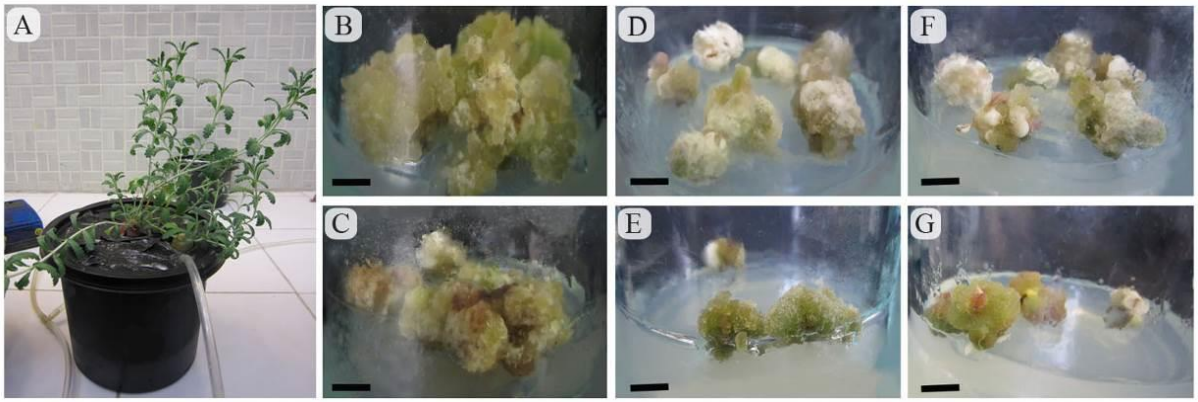
نتایج

نتایج حاصل از تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و اثر متقابل این دو بر وزن تر کالوس و محتوای ترکیبات فنلی کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کلّ نمونه‌ها معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) است. همچنین اثر غلظت هورمون و اثر متقابل غلظت هورمون و محیط کشت، غلظت هورمون و ریزنمونه، غلظت هورمون و محیط کشت و ریزنمونه نیز در هر چهار شاخص نرخ کال‌زایی، وزن تر کالوس، محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل، معنی‌دار بود (جدول ۱). گیاه رشدیافته در شرایط هیدروپونیک و شکل ظاهری کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در شکل (۱) نشان داده شده است. مقایسهٔ شکل ظاهری کالوس‌ها نشان داد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ برگ در مقایسه با کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های جوانهٔ انتهایی و ساقه وضعیت شیشه‌ای و گره‌دار داشتند (شکل ۱). ارزیابی نرخ کال‌زایی در غلظت‌های مختلف هورمون D-۴ و ۲ در

www.SID.ir

Archive of SID

دو محیط‌کشت B5 و MS نشان داد که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون D-۴ و ۲ در محیط MS، بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) برای هر سه ریزنمونهٔ برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه وجود داشت؛ اگر چه افزایش این فرایند در مقایسه با نرخ کال‌زایی ریزنمونه‌های برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون D-۴ و ۲ محیط B5 معنی‌دار نبود (شکل A-۲). بررسی وزن تر کالوس‌های حاصل نشان داد که کالوس برگی محیط‌کشت B5، در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون D-۴ و ۲ بالاترین شاخص را دارند (شکل B-۲). با مقایسهٔ کلّی دو محیط‌کشت، مشخّص شد که محیط‌کشت B5 در تولید کالوس‌های با وزن تر بیشتر و محیط‌کشت MS در روند کال‌زایی بیشتر، موفّق هستند. بررسی تأثیر غلظت هورمون، نوع محیط‌کشت و برهم‌کنش این دو عامل در هریک از کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه به‌طور جداگانه نشان داد که این عوامل بر محتوای فنل کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و توان آنتی‌اکسیدانی ویژهٔ هر یک از کالوس‌ها تأثیر معنی‌دار داشتند (داده‌ها نیامده است).



شکل ۱- نمایی از گیاه رشدیافته در شرایط هیدروپونیک (A)، کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ برگ در محیط‌کشت MS (B) و B5 (C)، کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی در محیط‌کشت MS (D) و B5 (E) و کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ ساقه در محیط‌کشت MS (F) و B5 (G). نماد خطّی بیان‌کنندهٔ یک سانتی‌متر است.

جدول ۱- میانگین مربّعات منابع تغییر مربوط به برخی صفات کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گیاه کلپوره

منبع تغییر	درجهٔ آزادی	نرخ کال‌زایی	وزن تر کالوس	فنل کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل
ریزنمونه	۲	۷۵۵/۸۳۳ ns	۴۷/۵۵۸*	۷۱۲/۵۲۴*	۲۹۱۶/۵۰۲*
محیط‌کشت	۱	۱۰۰/۲۷۸ ns	۲۸/۴۶۲*	۶۴۹/۵۶۴*	۲۸۴۷/۱۵۳*
غلظت هورمون	۴	۱۱۳۲۸/۰۵۶*	۱۲/۲۳۷*	۵۴۵/۱۵۶*	۲۷۸۵/۳۷۴*
محیط‌کشت × ریزنمونه	۲	۱۸۳/۶۱۱ ns	۷/۸۶۱*	۶۵۶/۷۶۲*	۲۸۷۸/۶۸۶*
غلظت هورمون × ریزنمونه	۸	۱۲۰۵/۱۳۹*	۷/۱۰۲*	۶۷۳/۰۷۴*	۲۸۷۸/۸۶۴*
غلظت هورمون × محیط‌کشت	۴	۱۷۴۸/۸۸۹*	۳/۵۵۰*	۶۹۵/۱۹۸*	۲۹۵۰/۰۳۹*
هورمون × محیط‌کشت × ریزنمونه	۸	۱۰۶۱/۳۸۹*	۴/۰۶۳*	۶۰۲/۶۲۷*	۲۸۲۰/۰۷۳*
خطا	۶۰	۴۴۸/۰۵۶	۰/۸۹۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۲

ns و * به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ نبودن معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ درصد ($P\leq$۰/۰۵) است.

www.SID.ir

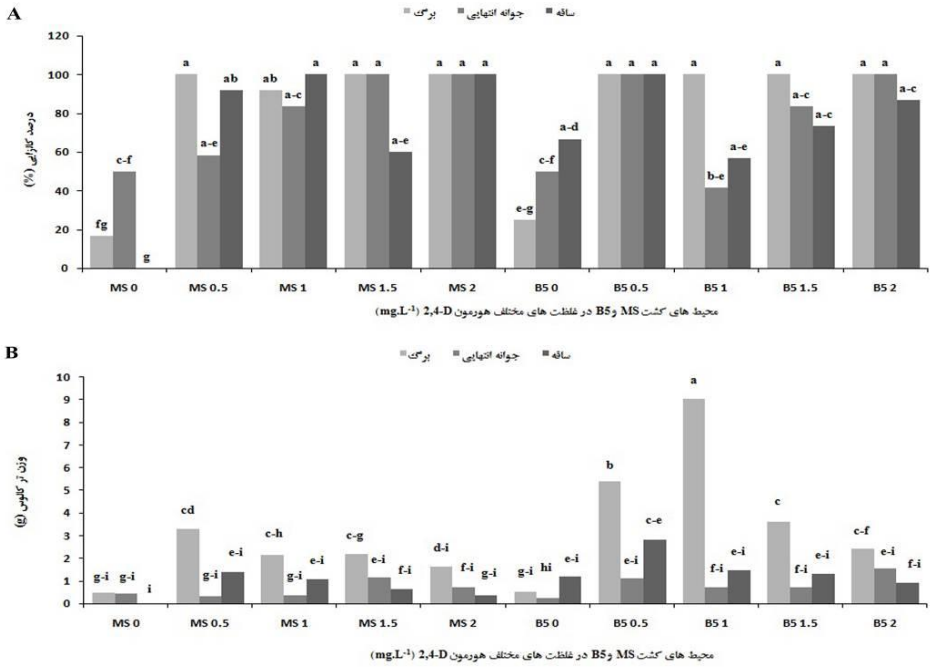
Archive of SID

ارزیابی میزان فنل کلّ کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف در محیط‌های کشت مورد بررسی، نشان‌دهندهٔ موفّق‌بودن محیط کشت B5 نسبت به محیط کشت MS، به طور ویژه در شرایط بدون تیمار هورمونی بود (شکل C و A، B-۳). از سوی دیگر مشخّص شد که کالوس‌های جوانهٔ انتهایی با اختلاف معنی‌داری، فنل کلّ بیشتری نسبت به کالوس‌های برگ و ساقه داشت. نکتهٔ قابل توجّه این بود که با افزایش غلظت هورمون در محیط کشت B5 از محتوای فنل کل در کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ برگ و جوانهٔ انتهایی کاسته شد. به علاوه عصارهٔ اندام‌های مختلف گیاه جمع‌آوری‌شده از رویشگاه طبیعی نسبت به گیاه رشدیافته در محیط هیدروپونیک به صورت معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵)، فنل بیشتری داشت (شکل D-۳). بررسی توان آنتی‌اکسیدانی ویژه نشان داد که بهترین کالوس برگ با فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بالا به محیط کشت MS (غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون D-۴ و ۲)(۰/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) متعلّق بود (شکل A-۴). همچنین بهترین عصارهٔ کالوس جوانهٔ انتهایی برای روبشگری رادیکال‌های آزاد به محیط کشت B5 با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون یاد شده مربوط بود (۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر =IC_{50}) (شکل B-۴). آن‌چه از آزمون ذکرشده روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونهٔ ساقه به‌دست آمد، گویای فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصارهٔ این کالوس‌ها از محیط کشت B5 بدون هورمون بود (۰/۰۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر=IC_{50}) و مشخّص شد که با افزایش غلظت هورمون D-۴ و ۲، IC_{50} افزایش یافت (شکل C-۴). همان‌طور که شکل (۴) نشان می‌دهد، کالوس‌های حاصل از محیط کشت B5 نسبت به MS با تفاوت زیادی، فعّالیت آنتی‌اکسیدانی ویژهٔ بیشتری داشتند. بررسی میانگین داده‌ها نیز نشان داد که به‌ترتیب، عصارهٔ برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقهٔ گیاه جمع‌آوری‌شده از رویشگاه نسبت به گیاه هیدروپونیک، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند (شکل D-۴).

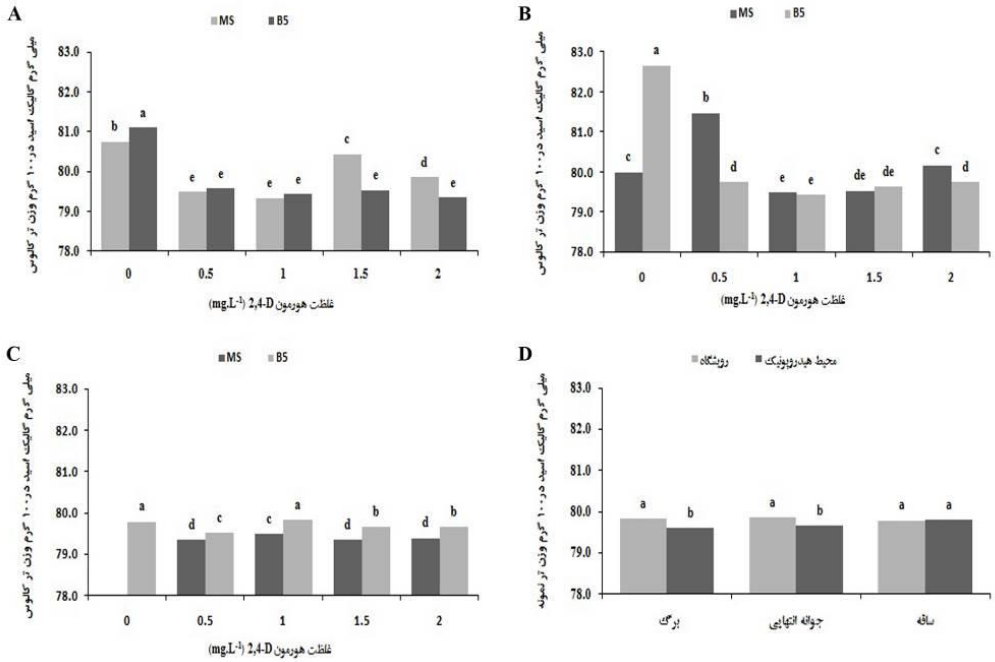
بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز نشان داد که کالوس حاصل از جوانهٔ انتهایی در بهترین شرایط قرار داشت؛ به طوری که تأثیر هورمون در محیط MS (با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر D-۴ و ۲) بیشتر از سایر غلظت‌های هورمونی محیط‌های کشت بود (شکل C و A، B-۵). با مقایسهٔ نمونه‌های حاصل از رویشگاه طبیعی و محیط هیدروپونیک و کالوس‌های شرایط آزمایشگاهی، مشخّص شد که اندام‌های طبیعی گیاهان، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلّ بهتری در مقایسه با کالوس‌ها دارند (شکل D-۵).

www.SID.ir

Archive of SID



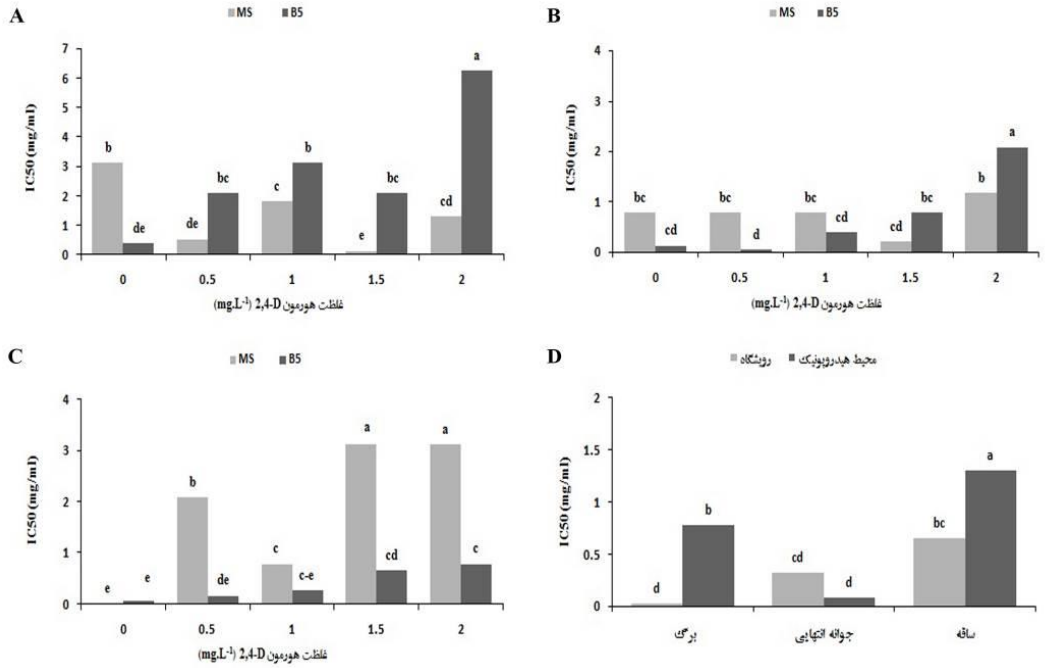
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و ۲ و محیط‌های کشت MS و B5 بر درصد کال‌زایی (A) و وزن تر کالوس (B) ریزنمونه‌های برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقهٔ گیاه کلپوره. میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل یک حرف مشترک دارند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤۰/۰۵).



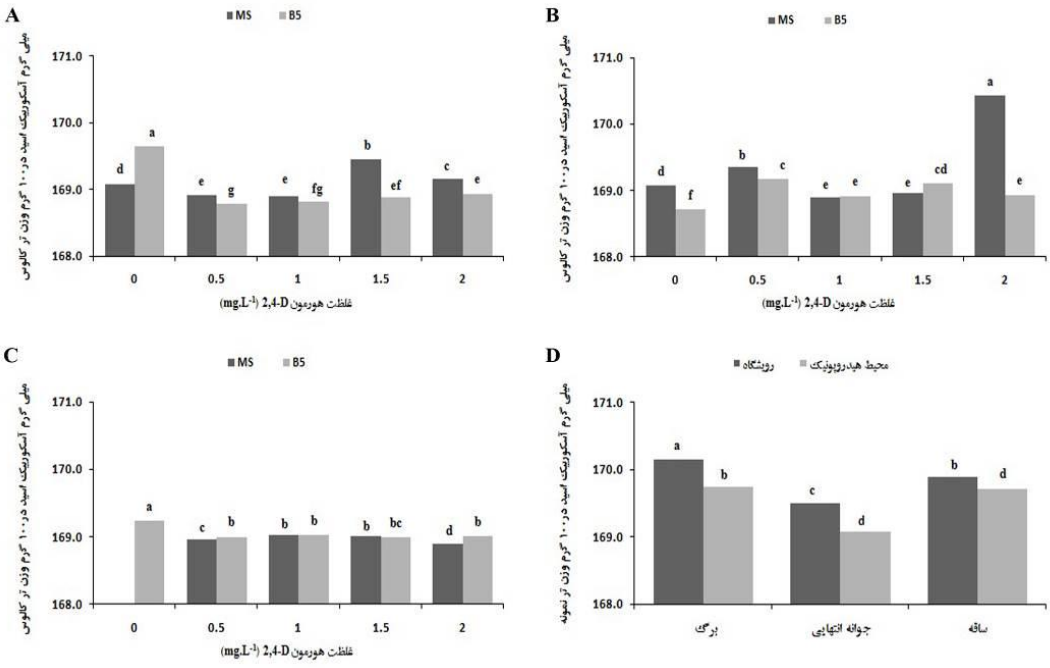
شکل ۳- مقایسهٔ میانگین محتوای ترکیبات فنلی کل در کالوس‌های ریزنمونه‌های برگ (A)، جوانهٔ انتهایی (B) و ساقه (C) گیاه کلپوره در محیط‌های کشت MS و B5 و اندام‌های مختلف گیاه در رویشگاه طبیعی و محیط هیدروپونیک (D). میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل یک حرف مشترک دارند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مقایسهٔ میانگین میزان فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای آزمون DPPH در کالوس‌های ریزنمونه‌های برگ (A)، جوانهٔ انتهایی (B) و ساقه (C) گیاه کلپوره در محیط‌های کشت MS و B5 و اندام‌های مختلف گیاه در رویشگاه طبیعی و محیط هیدروپونیک (D). میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل یک حرف مشترک دارند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤۰/۰۵).



شکل ۵- مقایسهٔ میانگین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر مبنای آزمون PPM در کالوس‌های ریزنمونه‌های برگ (A)، جوانهٔ انتهایی (B) و ساقه (C) گیاه کلپوره در محیط‌های کشت MS و B5 و اندام‌های مختلف گیاه در رویشگاه طبیعی و محیط هیدروپونیک (D). میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل یک حرف مشترک دارند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

گزارش‌ها تأیید کرده‌اند که وجود هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌توانند برای تشکیل کالوس الزامی باشند (Kandouz *et al.*, 2010). در این میان، هورمون‌های گروه اکسین، جایگاه بسیار مهمّی را در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی دارند (Shakeran and Keyhanfar, 2015؛ Hosseini *et al.*, 2015). بررسی‌های مختلف پژوهشگران تأیید می‌کند که هورمون D-۴ و ۲ بر القای تشکیل کالوس، اثر ویژه‌ای دارد (Amiri *et al.*, 2011؛ Davarpanah *et al.*, 2015)؛ به‌طوری که هورمون D-۴ و ۲ از نظر تحریک تولید کالوس نسبت به هورمون NAA موفّق‌تر گزارش شده است (Dixon and Gonzales, 2002). نتایج این پژوهش نشان داد که در هر سه ریزنمونه (برگ، جوانهٔ انتهایی و ساقه)، هر چند با افزایش غلظت هورمون D-۴ و ۲، درصد القای تشکیل کالوس نیز افزایش یافت، ولی محیط بهینه در افزایش وزن تر کالوس‌ها در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون بود. این موضوع می‌تواند نشان دهد که شاید تأثیر مثبت D-۴ و ۲ در القا و رشد کالوس هر گیاه بررسی‌شده، یک حدّ آستانه دارد و افزایش غلظت هورمون بیش از این حد بر میزان تقسیم سلولی اثر بازدارندگی خواهد داشت و در نتیجه کاهش وزن تر و خشک کالوس‌ها را موجب خواهد شد (Pasternak *et al.*, 2000). داورپناه و همکاران (۲۰۱۵) نیز در پژوهش خود بیان کردند که هر چند اجزای غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جایگاه بسیار مهمی در القای کالوس دارند، اما معمولاً محیط دارای ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر D-۴ و ۲ یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، این ویژگی را دارد. از آن‌جا که بیشترین درصد کال‌زایی در ریزنمونهٔ برگ و سپس در ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی مشاهده شد و نیز بیشترین مقدار وزن تر کالوس‌ها از ریزنمونهٔ برگ و سپس ساقه و جوانهٔ انتهایی حاصل شده بود، باید احتمال وجود تعداد متفاوت گیرنده‌های اکسین در بخش‌های مختلف گیاه را در توجیه این موضوع، مرتبط دانست. حاصل بررسی پژوهشگران نیز نشان داده است که گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف گیاهان، متناسب با نوع اکسین، تخصّص‌یافتگی دارند؛ به طوری که تعداد و نوع گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف یک گیاه، متفاوت گزارش شده است (Moore, 1989). نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت B5 در افزایش وزن تر کالوس‌ها به‌طور قابل توجّهی نسبت به محیط کشت MS مؤثّرتر بود. دلایل توجیحی این مشاهده می‌تواند متنوّع باشد که از آن جمله می‌توان به رقیق‌تربودن عناصر معدنی در محیط B5 اشاره کرد. از سوی دیگر، کارایی بهتر نوع آهن به‌کاررفته در محیط کشت B5 (نمک تک‌سدیمی EDTA) نسبت به نوع آهن کاربردی در محیط MS (نمک دوسدیمی EDTA) برای تکثیر و رشد از دلایل دیگر آن شناخته شده است (Jacob and Malpathak, 2005). ویتامین‌های محیط B5 از ویتامین‌های محیط MS متفاوت است و غلظت بالاتری از ویتامین تیامین دارد. تیامین در فرایندهای بیوسنتز و متابولیسم سلولی، جایگاه بسیار مهمی دارد (Willims, 1995)؛ از این رو ویتامین‌های محیط B5 و به‌ویژه تیامین نیز عوامل تأثیرگذار بر موفّقیت این محیط گزارش شده‌اند (White, 1937).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین مقدار فنل در کالوس حاصل از ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی در محیط‌کشت B5 بدون هورمون بود. همچنین مشخّص شد که میزان فنل کل در کالوس‌های حاصل از جوانهٔ انتهایی، بیشتر از برگ و در برگ نیز بیشتر از ساقه بود. در مقایسهٔ اثر محیط‌کشت بر روند افزایشی فنل کل مشاهده شد که کالوس‌های جمع‌آوری‌شده از محیط B5 با اختلاف اندکی نسبت به گیاه کلپوره، بیشترین مقدار را داشتند. بر اساس این بررسی، می‌توان شرایط درون شیشه را زمینهٔ مناسب برای تولید سطوح بالاتر ترکیبات ثانوی از جمله فنل‌ها معرّفی کرد. عوامل مختلفی مقدار ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی را در تأثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به عوامل ژنتیکی، میزان تابش خورشید، شرایط محیطی، آب و هوا، تنش‌ها، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد (Faller and Fialho, 2009؛ Rajaeian *et al.*, 2015). به این ترتیب با کنترل این عوامل در شرایط تنظیم‌شدهٔ آزمایشگاهی می‌توان زمینهٔ تولید بالاتر ترکیبات ثانوی را فراهم کرد.

از آن جا که ترکیبات و متابولیت‌های ثانوی از طریق ساز و کارهای مختلفی به ارائهٔ ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اقدام می‌کنند، واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند پیش‌بینی جامعی از تأثیر تمام شاخص‌های درگیر در عملکردهای آنتی‌اکسیدانی ارائه دهد. در پژوهش حاضر از دو روش PPT و DPPH برای سنجش فعّالیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی نمونه‌ها استفاده شد. آزمون PPT، روشی برای ارزیابی فعّالیت آنتی‌اکسیدانی کل، نشأت‌گرفته از ترکیبات مختلف از جمله فنل‌ها، آسکوربیک اسید، توکوفرول‌ها و کاروتنوئیدها در گیاه است (Abbasi *et al.*, 2010؛ Muanda *et al.*, 2009)؛ در حالی که آزمون DPPH، فعّالیت آنتی‌اکسیدانی ویژهٔ فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها را محاسبه می‌کند (Muanda *et al.*, 2009؛ Nikhat *et al.*, 2009؛ Abbasi *et al.*, 2010). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روند تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلّ عصاره‌ها، کاملاً با روند تغییرات ترکیبات فنل کل متناسب بوده است؛ به‌طوری که بیشتربودن محتوای ترکیبات فنلی، دلیل اصلی بالابودن فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌هاست که از گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار آن‌ها ناشی می‌شود. مجموعهٔ گزارش‌هایی که بر اهمّیت ساختار ترکیبات فنلی و شیوهٔ دخالت آن در فعّالیت آنتی‌اکسیدانی تأکید دارد، بسیار است (Olabinri *et al.*, 2010؛ Stojanovic *et al.*, 2010).

آزمون DPPH به‌طورگسترده برای ارزیابی توانایی ترکیبات مختلف در روبش رادیکال‌های آزاد و سنجش میزان فعّالیت آنتی‌اکسیدانی ویژه آن‌ها به کار می‌رود (Qureshi *et al.*, 2010؛ Koleva *et al.*, 2002). الکترون اضافی موجود در ساختار رادیکال آزاد DPPH، جذب بالایی را در ۵۱۷ نانومتر ایجاد می‌کند و به ایجاد رنگ بنفش منجر می‌شود. این رنگ بنفش هنگام احیای DPPH و جفت‌شدن این الکترون اضافی با هیدروژن و تبدیل آن از رادیکال آزاد DPPH به یک ترکیب احیاشده DPPH-H به رنگ زرد تبدیل می‌شود (Sharma and Bhat, 2009). نتایج این پژوهش نشان داد که برگ جمع‌آوری‌شده از رویشگاه طبیعی و کالوس حاصل از ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی در محیط‌کشت B5 بدون هورمون، بیشترین میزان فعّالیت

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌اکسیدانی ویژه را داشت. همچنین مشاهده شد که با افزایش محتوای فنل کلّ اندازه‌گیری‌شده، خاصیت روبشگری رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد؛ به طوری که این خاصیت در کالوس‌های جوانهٔ انتهایی، بیشتر از برگ و ساقه بود و با نتایج حاصل از سنجش فنل کل، هم‌ارزی داشت. در بسیاری از گیاهان، فعّالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطهٔ مستقیم دارد. عصارهٔ نعناع (*Mentha piperita*) به سبب داشتن ترکیبات فنلی بالا، فعّالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را نشان می‌دهد (Swetie *et al.*, 2007). ثابت شده است که عصارهٔ رزماری (*Rosmarinus officinalis*) نیز فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و این فعّالیت با محتوای ترکیبات فنلی گیاه رابطهٔ مستقیم دارد (Elmasta *et al.*, 2006). Jamshidi و همکاران (۲۰۱۰) و Jafari و همکاران (۲۰۱۵)، عصارهٔ متانولی چند گیاه بومی مازندران را از نظر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که بین توان آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاهان بررسی‌شده، ارتباط مستقیمی وجود دارد. در بررسی فعّالیت آنتی‌اکسیدانی جوی دوسر (*Avena sativa*) با روش DPPH و میزان فنل کل، مشخّص شد که بین میزان ترکیبات فنلی و فعّالیت آنتی‌اکسیدانی رابطهٔ مستقیم وجود دارد (Peterson *et al.*, 2001). فعّالیت آنتی‌اکسیدانی زیرهٔ سیاه (*Carum carvi*) با روش DPPHنیز نشان داد که خاصیت روبشگری رادیکال‌های آزاد آن به ترکیبات فنلی، مربوط است (Bamdad *et al.*, 2006). در چند گزارش بیان شد که ترکیبات فنلی موجود در گیاهان علفی به طور قابل توجّهی به خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها کمک می‌کند (Wu *et al.*, 2006؛ Shan *et al* ., 2005).

نتیجه‌گیری کلّی

اهمّیت دارویی گیاه کلپوره و دورهٔ رویشی کوتاه‌مدّت آن در طول سال از یک‌سو و خطر انقراض این گونهٔ گیاهی به دست انسان و چرای مفرط دام از سوی دیگر، ایجاد تمهیدات لازم برای حفظ و تکثیر آن را ضروری می‌کند. با توجّه به نتایج این پژوهش، بهترین شرایط افزایش درصد جوانه‌زنی بذر این گیاه، استفاده از تیمارهای هم‌زمان فیزیکی و شیمیایی شامل استراتیفیکاسیون و خراش همراه با هورمون جیبرلیک اسید معرّفی می‌شود. محیط‌کشت B5 و هورمون D-۴ و ۲ نیز در افزایش تولید کالوس، تأثیر به‌سزایی داشتند. بهترین محیط‌کشت که در آن بیشترین میزان فنل مشاهده شد، به محیط‌کشت‌های دارای مقدار کمتر از هورمون D-۴ و ۲ مربوط بود. به دنبال آن، روند تغییرات فعّالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل که به‌ترتیب با آزمون‌های DPPH و PPM بررسی شد با روند تغییرات ترکیبات فنلی، متناسب بود. این شرایط می‌تواند پیشنهاد استفاده از محیط‌های کشت ذکرشده را برای افزایش تولید ترکیبات ثانوی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ارائه دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان از حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای تأمین هزینه‌های مالی سپاس‌گزاری می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Abbasi, M. A., Zafar, A., Riaz, T., Rehman, A., Arshad, S., Shahwar, D., Jahangir, M., Siddiqui, S. Z., Shahzadi, T. and Ajaib, M. (2010) Evaluation of comparative antioxidant potential of aqueous and organic fractions of *Ipomoea carnea*. Journal of Medicinal Plants Research 4: 1883-1887.

Al-Qudah, T. S., Shibli, R. A. and Alali, F. Q. (2011) *In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 47: 496-505.

Amiri, S., Kazemitabar, S. K., Ranjbar, G. A. and Azadbakht, M. (2011) *In vitro* propagation and whole plant regeneration from callus in Datura (*Datura stramonium*. L). African Journal of Biotechnology 10: 442-448.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. and Jamshid, S. (2008) Therapeutic effects of *Teucrium polium* extracts on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetes rats. Journal of Medical Food 11: 525–532.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. and Shibli, R. A. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae 100: 193-202.

Arnon, D. and Hoagland, D. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. Journal of Soil Science 50: 463-485.

Bamdad, F., Kadivar, M. and Keramat, J. (2006) Evaluation of phenolic content and antioxidant activity of Iranian caraway in comparison with clove and BHT using model systems and vegetable oil. Food Science Technology 41: 7-20.

Davarpanah, S. J., Lahouti, M. and Karimian, R. (2015) Study of callus initiation and growth crireria at different concentrations of 2,4-D and kinetin in *Taxus baccata* L. embryo culture. Iranian Journal of Plant Biology 7(23): 41-50 (in Persian).

Dicko, M. H., Gruppen, H., Traore, A. S., Voragen, A. G. and Berkel, W. J. H. (2006) Phenolic compounds and related enzymes as determinates of Sorghum for food use. Biotechnology and Molecular Biology Review 1: 21-38.

Dixon, R. A. and Gonzales, R. A. (2002) Plant cell culture. Plant physiology 13: 456-460.

Elmasta, M., Drirtas, I., Isildak, O. and Aboul-Enein, H. Y. (2006) Antioxidant activity of S-Carone isolated from Spearmint (*Mentha Spicata* L.). Liquid Chromato Related Technology 29: 1465-1475.

Esmaeili, M. A. and Sadeghi, H. (2009) Pancreatic B-cell protective effect of rutin and apigenin isolated from *Teucrium Polium*. Pharmacology online 2: 341-353.

Faller, A. L. K. and Fialho, E. (2009) The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research International 42: 210-215.

Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N. and Trajkovski, V. (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during matura-tion. Journal of the Agricultural and Food Chemistry 48: 1485–1490.

Ghanti, K., Kaviraj, C., Venugopal, R., Jabeen, F. and Rao, S. (2004) Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. Indian Journal of Biotechnology 3: 594-598.

www.SID.ir

Archive of SID

Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerothanassis, I. P., Segura-Carretero, A. and Gutiérrez, A. F. (2011) Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical scavenging activity detection. LWT-Food Science and Technology 46: 104-109.

Grzegorczyk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E. and Wysokińska, H. (2005) *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 74: 17-21.

Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B. and Abdollahi, M. (2010) A systematic review of the efficacy and safety of *Teucrium* species; from anti-oxidant to anti-diabetic effect. International Journal of Pharmacology 6: 315–325.

Hasanpour, H., Bernard, F. and shaker, H. (2007). Optimizing callus culture in *Zataria mutiflora* boiss for rosmarinic acid production. Iranian Jornal of Janglands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15: 1-9.

Hosseini, B., Salimi, A. and Sharafi, A. (2015) A survey of the effect of explants type, plant growth regulators and activated charcoal on callus induction in *Papaver bracteatum*. Iranian Journal of Plant Biology 7(25): 29-42 (in Persian).

Jacob, A. and Malpathak, N. (2005) Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 247- 257.

Jafari, N., Naderi, P. and Ebrahimzadeh, M. A. (2015) Evaluation of phenolic content, total flavonoid and survey of antioxidant activity of leaves of *Ficus carica* and *Pterocarya fraxinifolia* trees using spectrophotometry and high performance liquid chromatogragh methods. Iranian Journal of Plant Biology 7(25): 1-16 (in Persian).

Jamshidi, M., Ahmadi, H. R., Rezazadeh, Sh., Fathi, F. and Mazanderani, M. (2010) Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Medical Plant 9: 177-183.

Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chehna, F., Yasmeen, A. and Moustafa, A. E. A. (2010) *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. Journal of Ethnopharmacology 129: 410-415.

Kashfi, A. (2010) Economic comparative advantage and trade cultivation of medicinal plants in Iran and its value on world markets. Journal of Agriculture and Animal Husbandry 2(56): 36 (in Persian).

Kochaki, A. and Nasiri Mahallati, M. (2009) Evaluation of agroecological needs of *Teucrium polium* L. Agricultural Research Magazine of Iran 6(2): 29-41 (in Persian).

Koleva, T. A., De Groot, A. and Evstatieva, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis 13: 8-17.

Lukmanul hakim, F., Gowri Shankar, C. and Girija, S. (2007) Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stem and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. Jornal of Agricultural and Food Chemistry 55: 9109-9117.

Matkowski, A. and Wolniak, D. (2005) Plant phenolic metabolites as the free radical sc

avengers and mutagenesis inhibitors. BMC Plant Biology 5(Suppl 1): S23.

Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Zlatković, B., Ristić, M. and Branković, S. (2009)

www.SID.ir

Archive of SID

Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. Central European Journal of Biology 4: 411-416.

Moore, T. C. (1989) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, New York.

Muanda, F., Kone, D., Dicko, A., Soulimani, R. and Younos, Ch. (2009) Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM) 7: 1-8.

Nikhat, F., Satynarayana, D. and Subhramanyam, E. V. S. (2009) Isolation, characterization and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygium cuminii* (L.) skeel. Asian Journal of Research in Chemistry 2: 218-221.

Olabinri, B. M., Eniyansoro, O. O., Okoronkwo, C. O., Olabinri, P. F. and Olaleye, M. T. (2010) Evaluation of chelating ability of aqueous extract of *Tetracarpidium conophorum* (African walnut) *in vitro*. International Journal of Applied Research in Natural Products 3: 13-18.

Pasternak, T., Miscolzi, P., Ayaydin, F., Dudits, T. and Feher, A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-drived cells of alfalfa. Plant Growth Regulators 32: 129-141.

Peterson, D. M., Emmons, C. L. and Hibbs, A. (2001) Phenolic antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. Cereal Science 33: 97-103.

Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.

Qureshi, M. N., Kuchekar Bhanudansh, S., Logade Nadeem, A. and Haleem, M. (2010) *In vitro* Antioxidant and *In-vivo* epatoprotective activity of *Leucas ciliata* leaves. Records Natural Products 4: 124-130.

Rabba'a, M. M., Shibli, R. A. and Shatnawi, M. A. (2012) Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 110: 371-382.

Rajaeian, S., Ehsanpour, A. A. and Toghyani, A. (2015) Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under *in vitro* salt stress condition. Iranian Journal of Plant Biology 7(26): 1-12 (in Persian).

Shakeran, Z. and Keyhanfar, M. (2015) Callogenesis in root explants of four spcies of the family Solanaceae after inducing by *Agrobacterium rhizogenesis*. Iranian Journal of Plant Biology 7(25): 69-84 (in Persian).

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of the Agricultural and Food Chemistry 53: 7749–7759.

Sharma, O. P. and Bhat, T. K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry 113: 1202-1205.

Stojanovic, G., Stojanovic, I., Stankov-Jovanovic, V., Mitic, V. and Kostic, D. (2010) Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species. Central European Journal of Biology 5: 808-813.

Swetie, R., Raesh, Ch. and Arun, S. (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiation processed lamb meat. Food Chemistry 100: 451-458.

Tavakkoli Saberi, M. and Sedaghat, H. (1993) Medicinal plants. Gulshan publications 23-27 (in

www.SID.ir

Archive of SID

Persian).

White, P. R. (1937) Vitamin B_1 in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiology 12: 803-811.

Willims, R. R. (1995) The chemical microenvironment and its effects. In: Automation and environmental control in plant tissue culture (Eds. Aitken-Christie, J., Kozai, T., and Smith, M. A. L.). 405- 439. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Wu, C. Q., Chen, F., Wang, X., Kim, H. J., He, G. Q., Haley-Zitlin, V. and Huang, G. (2006) Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. Food Chemistry 96: 220-227.

Yang, H., Yuqong Shi, D., Huijing, P. and Xiaobo, L. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhi, China. Journal of Molecules 16: 3444-3455.

Zerroug, M. M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A. and Nicklin, J. (2011) Antibacterial activity of extracts of *Ajuga Iva* and *Teucrium polium*. Advances in Environmental Biology 5: 491-495.

www.SID.ir

Archive of SID

An investigation on callogenesis and antioxidant capacity of different explants of *Teucrium polium*

Marjan Javidi Moghadam, Monireh Cheniany *, Ali Ganjeali and Mehrdad Lahouti
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract
Kalpoureh (*Teucrium polium* L.) as a medicinal plant belongs to family Lamiaceae. This plant has short growth period and endangered, so it seems the method of plant tissue culture is efficient for that. On the other hand *Teucrium polium* with high antioxidant properties has many health benefits. In this study, the effect of culture medium, different concentrations of 2, 4-D and the type of explants on callus induction were evaluated. It was found that effective treatment for more fresh weight of callus was the leaf explants on B5 culture with concentrations 1 and 0.5 mg L^{-1} of 2,4-D. In no hormone treatments, the percentage of callus induction was lower than others and the highest percentage of callus induction was on medium containing higher levels of the hormone. Analysis of biochemical properties (total phenolic content, antioxidant capacity based on two tests; DPPH and PPM) was also concluded that callus of terminal bud on B5 medium with no hormones had the highest total phenol (82.66 mgGAE/100 g FW). Based on DPPH test, the most free radicals scavenging potential was seen for the leaves collected from the habitat and the callus of terminal bud explants on B5 medium with concentration of 0.5 mg L^{-1} 2, 4-D. Investigation on total antioxidant capacity also revealed that callus of terminal bud on MS medium, 2 mg L^{-1} 2,4-D, leaves and stems of plants collected from habitats showed more activities. These conditions can provide the suggestion for the use of these media to produce more secondary metabolites with antioxidant properties.
Key words: Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, Callogenesis, *Teucrium polium*, 2, 4-D.

* cheniany@um.ac.ir

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir