بهینه‌سازی کشت کالوس برگ گیاه *Salvia leriifolia* برای تولید اسیدهای فنولیک

معصومه مدرس[۱و۳*]، مهرداد لاهوتی[۱]، جواد اصیلی[۲]، محمد کافی[۴] و علی رمضانی[۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد [۲] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد[۳] گروه زیست شناسی، پردیس شهید هاشمی نژاد مشهد، دانشگاه فرهنگیان [۴] گروه فیزیولوژی زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۱۹)

چکیده:

نوروزک (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد. این گیاه دارای خواص متعددی از جمله خواص ضد درد، ضد التهاب،آرام بخش،کاهش دهنده قند خون، ضد میکروب وآنتی‌اکسیدان است که از سوی پژوهشگران تایید گردیده است. هدف از این پژوهش القا کالوس از برگ گیاه نوروزک و بررسی تجمع اسیدهای فنولیک در کالوس در مقایسه با برگ گیاه نوروزک در رویشگاه طبیعی می‌باشد. برای این منظور جداکشت برگ بر روی محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D (۰، ۲، ۳، ۴ mgL^{-1}) و KIN (۰، ۰/۵، ۱ mgL-1) و نیزBAP و NAA (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ ، ۶ mgL^{-1})کشت داده شد. پس از چهار هفته درصد تولید کالوس و وزن تر و خشک کالوس ها در تیمارهای مختلف بررسی گردید و تجمع اسیدهای فنولیک در کالوس‌ها با استفاده از تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بهترین تیمارها جهت القاء و رشد کالوس ۳mgl^{-1} 2,4-D + Kin۱mgL^{-1} و ۵ mgl^{-1} BAP + ۵ mgl^{-1} NAA هستند و میزان تجمع کافئیک اسید و سالویانولیک اسید B در کالوس‌های حاصل از تیمارهای مذکور به طور معنی‌داری بیشتر از برگ گیاه بود. بیشترین میزان رزمارینیک اسید از عصاره حاصل از کالوس در تیمارBAP ۵ mgl^{-1} + ۵ mgl^{-1} NAA به دست آمد که حدود ۳ برابر بیشتر از برگ بود.

کلمات کلیدی: اسیدهای فنولیک ، کالوس ، نوروزک (*Salvia leriifolia*) .

مقدمه:

نوروزک (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان و سمنان می باشد (Rechinger, 1982) و دارای خواص متعدد دارویی است. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. فعالیت ضد درد و آرام بخش عصاره برگ نوروزک در دوز ۵۰۰ mg/kg قابل مقایسه با دوز ۵ mg/kg دیازپام، گزارش شده است(Hosseinzadeh and Lary, 2000). مقابله عصاره گیاه با التهاب‌های مزمن از نظر کارآیی مشابه با داروی دیکلوفناک می‌باشد (Hosseinzadeh and Yavary , 1999). همچنین تاثیر عصاره آبی و الکلی برگ نوروزک در جلوگیری

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی:M_modarres 70@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش گزارش شده است که کارآیی آن مشابه داروی سوکرالفت (sucralfate) است (Hosseinzadeh *et al.*, 2000). عصاره دانه و برگ قند خون موش‌های دیابتی را کاهش می‌دهند (شکوهی زاده، ۱۳۷۵). همچنین عصاره‌های برگ و ریشه آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی (مدرس و همکاران،b ۱۳۸۶) بوده و خواص ضد باکتری آنها تایید شده است. (مدرس و ابریشم‌چی، ۱۳۸۷؛ مدرس و ابریشم چی، ۱۳۸۹).

گونه‌های مختلف جنس *Salvia* به عنوان منبع غنی از پلی فنل‌ها به شمار می‌روند. مهمترین اسیدهای فنولیک دارویی در جنس *Salvia* از گروه مونومرها، دایمرها، تریمرها وتترامرهای کافئیک اسید می‌باشند که شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید، انواع سالویانولیک اسید و اسید لیتوسپرمیک می‌شوند (Liu and Liu, 2002).

گزارش‌های زیادی در رابطه با خواص دارویی مشتقات کافئیک اسید وجود دارد، به عنوان مثال خواص آنتی اکسیدانی، محافظت کنندگی عصبی در برابر ایسکمی، ضد ویروسی، ضد ترومبوز، کاهش دهنده فشار خون و ضد سرطانی این ترکیبات معلوم شده است (Ren-Wang *et al.*, 2005). کافئیک اسید دارای خواص ضد التهابی و ضد توموری می‌باشد (Duzzo Gamaro *et al.*, 2011). **همچنین** اثر درمانی رزمارینیک اسید در بهبود آلزایمر القا شده با آمیلوئید بتا و افزایش عملکرد حافظه ثابت شده است (Shimojo *et al.*, 2010).

رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدها در انسان به طور چشم‌گیری تولید رادیکال آزاد واکسیداسیون لیپوپروتئین های با وزن کم (LDL) که در بیماری آرتریواسکلروزیس نقش دارند راکاهش می‌دهند (Liu and Liu, 2002).

گزارش‌هایی در مورد تولید اسیدهای فنولیک در کالوس برخی از گونه‌های جنس *Salvia* گزارش شده است. به عنوان مثال در کالوس گونه *S. fruticosa* رزمارینیک اسید تولید شده است(Karam *et al.*, 2003).

علاوه بر این در کالوس *S. officinalis* بیست نوع از ترکیبات فنولیک شناسایی شد و مقدار رزمارینیک اسید تولید شده در آن نسبت به دیگر ترکیبات فنلی بیشتر بود (Santos-Gomes *et al.*, 2003).

اگر چه در برخی گونه‌های Salvia اسیدهای فنولیک در کشت بافت تولید شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای جهت تولید کالوس و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کشت بافت گیاه نوروزک صورت نگرفته است. شناسایی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک مشتق از کافئیک اسید، شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در برگ و ریشه *Salvia leriifolia* قبلا توسط نویسندگان مقاله انجام شده است (Modarres *et al.*, 2013). هدف از این پژوهش القا کالوس از برگ گیاه نوروزک و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کالوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

آماده سازی مواد گیاهی: بذر و برگ گیاه نوروزک از منطقه کوه‌سنگی مشهد واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شده و برگ‌ها در دمای محیط خشک شدند. بذرها جهت استریفیکاسیون به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به جوانه‌زنی بسیار کم بذرها در شرایط درون شیشه‌ای از کشت جنین برای به دست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد.

برای کشت جنین، از محیط کشت MS (Murashige and Skoog,1962) حاوی ساکارز (۳۰ g/L)، گلایسین (۲ mg/lit)، زغال فعال (۲ g/lit) و آگار(۷ g/lit) استفاده شد. PH محلول روی ۵/۸ تنظیم شد (مدرس و همکاران، a ۱۳۸۶). در ادامه ۲۰ cc از محیط کشت به ویال های ۲۰۰ cc منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند.

ابتدا پوشش روی بذرها حذف شد و جهت ضدعفونی به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و ۵ دقیقه در آب ژاول ۳٪

Archive of SID

www.SID.ir

قرار گرفتند و ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. سپس رویان چند میلی‌متری با دقت از میان دولپه خارج شده و در سطح محیط کشت قرار گرفت. رویان‌ها ابتدا به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و سپس به شرایط ۱۶ و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی(۴۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه) و تاریکی و دمای ۲۴±۱°C منتقل شدند. از برگ گیاهچه‌های دو هفته‌ای جهت ریز نمونه استفاده شد.

تعیین مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای القاء کالوس از برگ: به منظور دسترسی به بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس از برگ گیاه سه آزمایش مختلف طراحی گردید. در آزمایش اول ترکیبی از هورمون های BAP با غلظت‌های (۳، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰ $mg\ l^{-1}$) و IBA با غلظت‌های (۲، ۱، ۰/۵ و ۰ $mg\ l^{-1}$) در مجموع ۱۳ تیمار برای القای کالوس از برگ به کار گرفته شد. در آزمایش دوم به محیط کشت MS ترکیبی از هورمون‌های 2,4-D در غلظت‌های (۵، ۴، ۳، ۲، ۱ و ۰ $mg\ l^{-1}$) و KIN در غلظت (۱، ۰/۵ و ۰ $mg\ l^{-1}$) (در مجموع ۶ تیمار) اضافه شد و القای کالوس از برگ در آنها مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش سوم ۱۹ تیمار شامل هورمون‌های NAA و BAP با غلظت‌های (۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱و ۰ $mg\ l^{-1}$) به صورت توأم، در محیط کشت MS برای القای کالوس از برگ بررسی گردیدند.

جداکشت‌ها در ویال‌های ۲۵۰ CC حاوی ۲۰ CC محیط کشت، در شرایط استریل کشت گردیدند. از هر تیمار ۲۰ تکرار و در هر تکرار دو جداکشت، کشت گردید. محیط کشت‌ها به شرایط تاریکی و دمای ۲۴±۱°C منتقل شدند. پس از چهار هفته، وزن تر کالوس‌ها و نیز وزن خشک آنها (پس از فریزدرای شدن به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۲۰°C-)، اندازه‌گیری شد. همچنین درصد کال‌زایی برای هر تیمار و جداکشت محاسبه گردید.

تعیین غلظت اسیدهای فنولیک در برگ و کالوس گیاه نوروزک: به منظور تعیین غلظت کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در کالوس‌ها، ابتدا بیشترین درصد کال‌زایی و وزن خشک کالوس در تیمارهای مختلف در هر آزمایش تعیین شد. سپس مناسب ترین کالوس به لحاظ بیشترین درصد کال‌زایی و وزن خشک، برای سنجش اسیدهای فنولیک انتخاب شد. هر یک از نمونه‌های کالوس پس از خشک شدن توسط فریزدرای، از نظر میزان اسیدهای فنولیک در مقایسه با برگ گیاه نوروزک در رویشگاه طبیعی بررسی گردیدند.

مقدار ۰/۵ گرم از برگ یا کالوس های خشک شده پس از پودر شدن، با۲۰ میلی‌لیتر اتانل ۶۰ درجه مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکاتور قرار گرفت. در مرحله بعد حلال توسط روتاری حذف گردید و pH عصاره روی ۲ تنظیم شد. سپس اتیل استات در ۵ مرحله به آن اضافه شد و فاز اتیل استاتی جدا و تبخیر گردید. عصاره حاصل در متانل حل شد و در دمای ۵۰ °C خشک گردید (Dong *et al*., 2010).

محلول استوک۵mg/ml از استانداردهای کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB (Sigma-Aldrich co.UK) در محلول اتانل/آب (v/v ۷۰ : ۳۰) تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استانداردهای کافئیک اسید و سالویانولیک اسید B و غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رزمارینیک اسید از استوک تهیه شد و برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

جهت جداسازی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک از کروماتوگرافی با کارآیی بالا(Knauer,Germany) HPLC مجهز به پمپ ۱۰۰۰، دتکتور ۲۸۰۰UV (Knauer smartline) PDA و نرمافزار کروم‌گیت (Chromgate) استفاده شد. فاز ساکن ستون با مشخصات (C_{18} (5µm, Macherey-Nagel به ابعاد (۱۵۰×۴/۶mm)، فاز متحرک آب و اسید فسفریک ۰/۱٪ و متانول به صورت گرادیان با جریان فاز مایع یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول موج مورد استفاده ۳۳۰ نانومتر، طول زمان انجام HPLC ۳۰ دقیقه، حجم عصاره تزریق شده ۲۰ میکرولیتر و دمای آن ۲۰ درجه

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه‌ی درصد کال‌زایی و خصوصیات کالوس‌های حاصل از برگ در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D و Kin.

نوع تیمار	درصد کال‌زایی	وزن تر کالوس(g)	وزن خشک کالوس(g)	خصوصیات بافت کالوس
2,4-D 0+Kin0	۰[c]	۰[c]	۰[c]	–
2,4-D 1+Kin 0.3	۰[c]	۰[c]	۰[c]	–
2,4-D 1+Kin 1	۰[c]	۰[c]	۰[c]	–
2,4-D 2 +Kin 1	۰[c]	۰[c]	۰[c]	–
2,4-D 3 +Kin 1	۷۶/۲۷[a]	۰/۶۹۸[a]	۰/۰۷۸[a]	کرم رنگ، متراکم
2,4-D 4 +Kin 1	۷۵/۸۲[a]	۰/۵۷۲[b]	۰/۰۶۱[b]	کرم رنگ، متراکم

واحد هورمون‌ها بر حسب میلی‌گرم در لیتر است. داده‌ها میانگین ۵ تکرار می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می باشد.

درجه سانتی‌گراد بود (Modarres *et al.*, 2013). میزان هر یک از اسید فنولیک تولید شده به ازای میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک محاسبه گردید.

آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت و برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای JMP و MSTATC استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) صورت گرفت.

نتایج:

جداکشت برگ در هیچ کدام از محیط کشت‌های حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های BAP و IBA کالوس تولید نکرد. نتایج نشان داد القاء کالوس از جداکشت برگ در اغلب تیمارها انجام نشد و جداکشت‌ها تنها در دو تیمار ۲,4-D + ۱ mgl^{-1} KIN و ۳ mgl^{-1} ۲,4-D+ ۱ mgl^{-1} KIN ۴ mgl^{-1} تولید کالوس نمودند. نتایج محاسبه درصد کال زایی بعد از ۳۰ روز نشان داد که بیشترین درصد کال زایی (۷۶/۲۷ ٪) در تیمار ۲,4-D + ۱ mgl^{-1} KIN ۳ mgl^{-1} وجود داشت (جدول۱).

آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک نیز مربوط به تیمار مذکور بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار KIN ۱ mgl^{-1} +۲,4-D ۴ mgl^{-1} نشان داد ($P\leq$ ۰/۰۵).

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر جدا کشت برگ: نتایج محاسبه درصد کال‌زایی بعد از ۳۰ روز نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰٪) درتیمارهای BAP ۵ mgl^{-1} NAA + ۵ mgl^{-1} و BAP ۶ mgl^{-1} NAA + ۶ mgl^{-1} وجود داشت (جدول۲).

نتایج آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک متعلق به تیمار BAP ۵ mgl^{-1} NAA + ۵ mgl^{-1} بود که به لحاظ آماری با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P\leq$ ۰/۰۵) (جدول ۲).

نتایج تعیین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از برگ در مقایسه با برگ نوروزک در رویشگاه طبیعی: با توجه به این‌که در تیمار ۲,4-D + ۱ mgl^{-1} KIN ۳ mgl^{-1} وزن کالوس حاصل از جداکشت برگ به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت($P\leq$ ۰/۰۵) و از طرف دیگر درصد کال‌زایی نیز در این تیمار بالاتر بود، این کالوس برای بررسی میزان اسیدهای فنولیک انتخاب شد. همچنین کالوس حاصل از برگ در محیط BAP ۵ mgl^{-1} + NAA ۵ mgl^{-1} در مقایسه با دیگر تیمارها دارای درصد کال زایی و وزن تر و خشک بیشتری بود، بنابراین میزان اسیدهای فنولیک در این کالوس بررسی گردید (جدول ۳). نتایج آنالیز عصاره‌های حاصل از برگ و کالوس‌ها توسط HPLC نشان داد میزان کافئیک اسید در هر دو کالوس نشان

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه‌ی درصد کال‌زایی و خصوصیات کالوس‌های حاصل از برگ در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های BAP و NAA.

نوع تیمار	درصد کال‌زایی	وزن تر کالوس(g)	وزن خشک کالوس(g)	خصوصیات بافت کالوس
BAP0+NAA0	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP1+NAA0.5	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP0.5+NAA1	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP1+NAA1	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP2+NAA1	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP1+NAA2	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP2+NAA2	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP3+NAA2	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP2+NAA3	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP3+NAA3	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP4+NAA3	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP3+NAA4	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP4+NAA4	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP5+NAA4	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP4+NAA5	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	–
BAP5+NAA5	۱۰۰^{a}	۴/۳۵۶^{a}	۰/۳۷۹^{a}	زرد ، نرم
BAP5+NAA6	۹۵^{b}	۲/۴۲^{b}	۰/۱۹۷^{b}	زرد ، نسبتا نرم
BAP6+NAA5	۸۹/۵^{c}	۲/۹۵^{b}	۰/۲۲^{b}	زرد ، نرم
BAP6+NAA6	۱۰۰^{a}	۲/۳۶^{b}	۰/۱۹۳^{b}	زرد ، متراکم

واحد هورمون‌ها بر حسب میلی‌گرم در لیتر است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می باشد.

جدول۳- مقایسه میانگین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از برگ و برگ گیاه نوروزک.

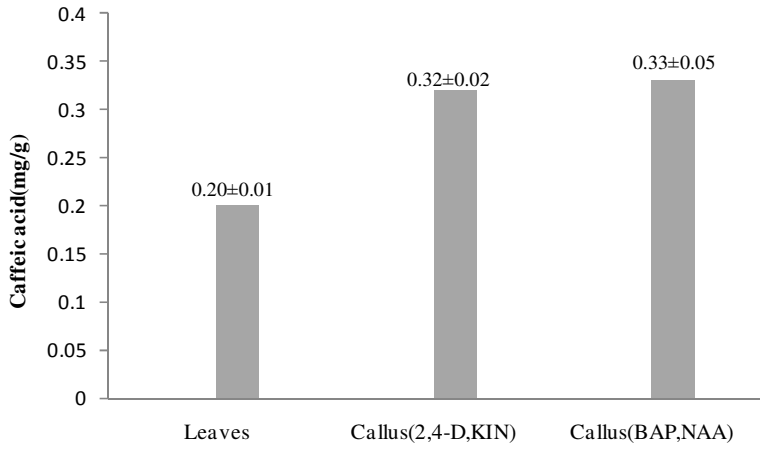
نمونه گیاهی	کافئیک اسید (mg/g)	رزمارینیک اسید (mg/g)	سالویانولیک اسید B (mg/g)
کالوس برگ (2,4-D-KIN)	۰/۳۲ ±۰/۰۲^{a}	۳/۵۷ ±۰/۱۴^{c}	۰/۴۸ ±۰/۰۲^{a}
کالوس برگ (BAP-NAA)	۰/۳۳ ±۰/۰۵^{a}	۱۶/۷۲ ±۱/۱۹^{a}	۰/۴۱ ±۰/۰۸^{a}
برگ در رویشگاه طبیعی	۰/۲۰ ±۰/۰۱^{b}	٤/٦٥ ±۰/۰۹^{b}	۰/۱۳ ±۰/۰۲^{b}

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

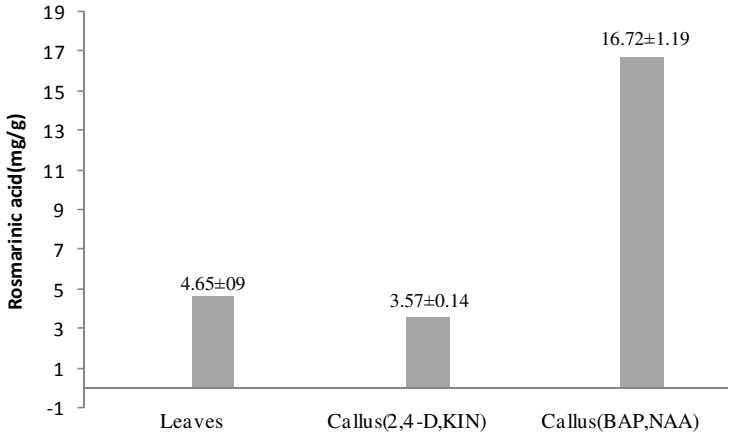
داد میزان کافئیک اسید در هر دو کالوس به طور معنی‌داری بیشتر از برگ نوروزک بود ($P\leq$ ۰/۰۵). میزان کافئیک اسید در دو کالوس تفاوت معنی‌داری نداشت. (شکل۱). میزان رزمارینیک اسید در کالوس حاصل از برگ در تیمار BAP ۵ mgl^{-1} NAA + ۵ mgl^{-1} به میزان ۱۶/۷۲ mg/g بود که به ترتیب حدود ۳ تا ۴ برابر برگ و کالوس برگ در تیمار ۳ mgl^{-1} 2,4-D + ۱ mgl^{-1} KIN می‌باشد. به علاوه میزان رزمارینیک اسید در کالوس حاصل از برگ در حضور

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مقایسه محتوی کافئیک اسید در برگ گیاه نوروزک و کالوس‌های حاصل از برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D + KIN و NAA + BAP حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



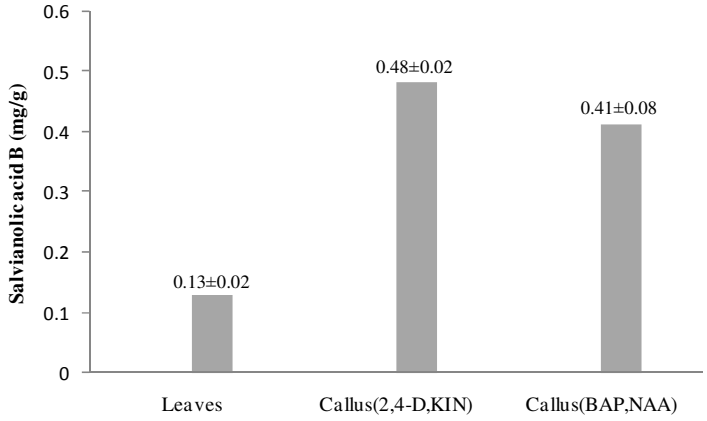
شکل ۲ - مقایسه محتوی رزمارینیک اسید در برگ گیاه نوروزک و کالوس‌های حاصل از برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D + KIN و NAA + BAP حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

هورمون‌های KIN و 2,4-D به طور معنی‌داری کمتر از برگ بود (شکل ۲). همچنین میزان سالویانولیک اسیدB در هر دو کالوس به طور معنی‌داری بیشتر از برگ نوروزک بود به طوری که میزان آن در کالوس‌ها ۳ تا ۴ برابر برگ نوروزک بود اما بین میزان سالویانولیک اسید B در دو کالوس تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P\leq ۰/۰۵$) (شکل۳).

بحث:

در این تحقیق مناسب‌ترین تیمار جهت تولید کالوس از جداکشت برگ تیمار BAP mgl^{-1} ۵ + NAA mgl^{-1} ۵ بود. همچنین جداکشت برگ در محیط کشت حاوی هورمون های KIN mgl^{-1} ۱ + 2,4-D mgl^{-1} ۳ بیشترین درصد کال زایی و وزن خشک را داشت. در توافق با نتایج این تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۲) القاء کالوس از برگ *S. splendens* را در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های بین ۴ تا ۵ میلی

www.SID.ir



شکل۳ – مقایسه محتوی سالویانولیک اسید B در برگ گیاه نوروزک و کالوس‌های حاصل از برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D + KIN وBAP + NAA حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

گرم در لیتر BAP و NAA را گزارش کردند. بر اساس گزارش Kintzios و همکاران (۱۹۹۹) نیز القاء کالوس از برگ *S. officinalis* در حضور هورمون‌های BAP و NAA در غلظت‌های بین ۵-۴ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت. همچنین بر اساس گزارش مذکور جداکشت برگ *S. officinalis* در نسبت‌های برابر KIN و 2,4-D کالوس تولید نمود در حالی که جداکشت برگ *S. fruticoza* در تمام ترکیب‌های مختلف KIN و 2,4-D و نیز BAP و NAA با درصد کال‌زایی بالا تولید کالوس داشت. این مطلب نشان می‌دهد القاء کالوس علاوه بر نوع و غلظت هورمون‌ها، به ژنوتیپ گونه گیاهی نیز بستگی دارد. در تحقیق حاضر ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های IBA و BAP تأثیری بر کال‌زایی در جداکشت‌های برگ نوروزک نداشتند. بررسی‌ها نشان داده است که اکسین‌های مختلف در رونویسی از ژن‌ها و افزایش میزان mRNA نقش دارند. ولی تنظیم افزایش mRNA در سلول مستقیماً به نوع اکسین بستگی دارد. علاوه بر این معلوم شده است که گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف گیاهان برای نوع اکسین، تخصص یافتگی دارند. همچنین تعداد و نوع گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف یک گیاه ممکن است متفاوت باشند (Moore, 1989). بنابراین احتمال دارد که پاسخ متفاوت جداکشت‌های مختلف گیاه نوروزک نسبت به اکسین‌های NAA و 2,4-D و IBA در ارتباط با این مسئله باشد.

در این تحقیق کالوس‌های با وزن خشک بیشتر و درصد کال‌زایی بالاتر حاصل از جداکشت برگ گیاه نوروزک انتخاب شده و محتوی سه اسید فنولیک کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در آنها توسط تکنیک HPLC اندازه‌گیری گردید. همچنین غلظت اسیدهای فنولیک مذکور در مقایسه با برگ گیاه نوروزک در رویشگاه طبیعی مقایسه شد. براساس نتایج این پژوهش کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در همه کالوس‌ها تولید گردید بیشترین اسید فنولیک تولید شده در کالوس‌ها رزمارینیک اسید بود. میزان کافئیک اسید در همه کالوس‌ها در محدود ۰/۳۲ تا ۰/۳۳ mg/g به دست آمد در حالی که میزان آن در برگ نوروزک ۰/۲۰ mg/g بود. گزارش‌های بسیار کمی در مورد تولید کافئیک اسید در کالوس گیاهان مختلف وجود دارد. بر طبق گزارش Santos-Gomes و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان تولید کافئیک اسید در کالوس حاصل از میان گره *S. officinalis* در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP به میزان ۰mg/g ۰۰۸/ بود که بسیار کمتر از میزان تولید شده در کالوس‌های گیاه نوروزک می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین میزان رزمارینیک اسید ۱۶/۷۲ mg/g در کالوس حاصل از برگ نوروزک در محیط کشت MS حاوی BAP ۵ mgl^{-1} NAA + ۵ mgl^{-1} به دست آمد که میزان آن بین ۳ تا ۴ برابر کالوس برگ در تیمار ۱mgl^{-1} 2,4-D + ۳ mgl^{-1} و برگ گیاه بود. قابل ذکر است Karam و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس حاصل از برگ *S. fruticosa* را در محیط کشت حاوی MS حاوی هورمون‌های TDZ و IAA را چندین برابر میزان رزمارینیک اسید موجود در برگ و ریشه *S. fruticosa* گزارش کردند.

همچنین طبق گزارش Kintzios و همکاران (۲۰۰۳) میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس‌های *S. officinalis* و *S. fruticosa* در محیط کشت MS حاوی KIN و 2,4-D به ترتیب ۲۹/۰g/l و ۲۵/۹g/l بود. حداکثر تولید رزمارینیک اسید در کالوس‌های *S. officinalis* حاصل از هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP،2,4-D و NAA بین ۱۱/۲۱ تا۱۵/۷۷ mg/g گزارش شده است (Grzegorczyk *et al*., 2005).

بیشترین میزان سالویانولیک اسیدB در کالوس حاصل از برگ در محیط کشت MS حاوی KIN و2,4-D تولید گردید که میزان آن ۰/۴۸ mg/g (۰/۰۹٪) بود که بیشتر از سه برابر برگ گیاه نوروزک می‌باشد. در توافق با نتایج ما میزان تولید سالویانولیک اسید B در کالوس *S. miltiorrhiza* در محیط کشت حاوی BAP و IBA، ۰/۱٪ وزن خشک بود (Morimoto, 1994).

این تحقیق نشان داد تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان تولید رزمارینیک اسید در جداکشت‌های یکسان تأثیرگذار هستند به طوری که میزان تولید رزمارینیک اسید در جداکشت برگ در حضور هورمون‌های BAP و NAA نسبت به هورمون‌های KIN و 2,4-D ۴/۶۸ برابر بیشتر بود.

در این ارتباط DE-Ekhamkul و Eill (۱۹۸۵) گزارش کردند که افزودن هورمون NAA به کشت سلولی *S. officinalis* نه‌تنها سبب افزایش سنتز رزمارینیک اسید می‌شود بلکه مدت زمان سنتز آن را نیز افزایش می‌دهد. از طرف دیگر Hung و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند وجود هورمون 2,4-D در محیط کشت سلول‌های *S. miltiorrhiza* سبب کاهش تولید رزمارینیک اسید و افزایش BAP در محیط کشت باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید گردید. همچنین براساس گزارش Sakakibara (2006) غلظت بالای سیتوکینین‌ها از جمله BAP، انتقال دهنده‌های نیترات را مهار می‌کنند. بنابراین نیترات در سلول کاهش می‌یابد. کمبود نیترات سبب افزایش بیان ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی درنتیجه تولید بیشتر اسیدهای فنولیک می‌شود. با توجه به موارد ذکر شده احتمالاً وجود توأم هورمون BAP و NAA در محیط کشت سبب افزایش تولید اسیدهای فنولیک در شرایط مذکور نسبت به حضور هورمون 2,4-D شده است.

نتیجه گیری:

به طور کلی بر اساس نتایج این تحقیق، جداکشت برگ گیاه نوروزک در تیمار BAP ۵ mgl^{-1} NAA + ۵ mgl^{-1} می‌تواند به طور مؤثری برای القاء کالوس با درصد کال‌زایی بالا و تولید اسیدهای فنولیک در محیط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از معاونت محترم علمی و فن‌آوری ریاست جمهوری، بخش حمایت از توسعه فناوری‌های راهبردی به واسطه پشتیبانی مالی از انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

پایان نامه برای دریافت دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

منابع:

شکوهی زاده ، ح. (۱۳۷۵) مطالعهٔ اثرات پایین آورندگی قند خون برگ ودانهٔ نوروزک بر موش سفید کوچک.

Archive of SID

www.SID.ir

مدرس، م. و ابریشم‌چی، پ. (۱۳۸۷) بررسی تاثیر زمان برداشت بر فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*). مجله علمی پژوهشی علوم دانشگاه تربیت معلم ۸: ۳۴۳-۳۵۶.

مدرس، م. و ابریشم‌چی، پ. (۱۳۸۹) بررسی فعالیت ضد باکتریایی ریشه گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) در مراحل مختلف رشد ونمو. مجله زیست شناسی ایران ۲۳: ۷۱۷-۷۰۷.

مدرس، م. ابریشم‌چی، پ. اجتهادی، ح. و رمضانی، ع. (a ۱۳۸۶) تکثیر گیاه نوروزک با استفاده از کشت رویان. فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۵: ۱۴۱-۱۲۹.

مدرس، م. ابریشم‌چی، پ. فرهوش، ر. و اجتهادی، ح. (b ۱۳۸۶) بررسی تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه و برگ نوروزک (*Salvia leriifolia*) در مراحل رشد و نمو. مجله علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۳: ۲۹۴-۲۸۵.

De-Eknamkul, W. and Ellis, B.E. (1985) Effects of auxins and cyto kinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Reports 4: 50–53.

Dong, Y. B., Liu, Z. S. Liang, and Wang, W. L.(2010) Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. Ultrasonic Sonochemistry 17: 61–65.

Duzzo Gamaro, G., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P. and Ardenghi, P. (2011) Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. ISRN Pharmacol 10:1-6.

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

Hosseinzadeh, H. and Lary, P. (2000) The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research 14:384-387.

Hosseinzadeh, H. and Yavary, M. (1999) Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 9: 60-61.

Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M. H. and Hosseini, E. (2000) Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 10:63-64.

Huang, L., Liu, D. and Hu, Z. (2000) Effects of phytohormones on growth and content of depsides in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells. Journal of Chinese Medicinal Materials 2:1-4.

Karam, N.S., Jawad, F. M., Arikat, N. S. and Shibli, R. A.(2003) growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 73: 117-121

Kintzios, S., Nikolaou, A. and Skoula, M. (1999) Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. Plant Cell Reports 18: 462 – 466.

Liu, H., Guoping, Z., Guozheng, S., Songlin, R. and Qiaojuan, F. (2012) Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Seeds of *Salvia splendens*. International Journal of Agriculture and Biology 14:445-452.

Liu, Y. L. and Liu, G. T. (2002) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by salvianolic acid-A. Acta Pharmacological Sinica Journal 37: 81-85.

Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Iranshahi, M. and Sahebkar, A. (2013) Simultaneous determination of phenolic acids in *Salvia leriifolia* Benth. using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. Liquid chromatography and related techniques. (in press)

Moore, T.C. (1989) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-verlag 14: 234-242.

Morimoto, S., Goto, Y. and Shoyama, Y.(1994) Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. Journal of Natural Products 57: 817-823.

Rechinger, K.H. (1982) Flora Iranica. N. 150, Academishe Druk. Pennsylvania, USA.

Ren-Wang, J., Kit-Man, L., Po-Ming, H., Thomas, C.W., Mak, K.S. and Kwok-Pui, F. (2005) Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. Current Medicinal Chemistry 12: 237-246.

Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annual Review of Plant Biology 57: 431–449.

Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes- Ferreira M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). Journal Plant Physiology 160: 1025– 1032.

Shimojo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., Shimizu, T. and Shirasawa, T. (2010) Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Neuroscience Research 88: 896-904.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimizing leaf callus culture in *Salvia leriifolia* for phenolic acids production

[1,3*]Modarres. M, [1]Lahooti. M, [2]Asili. J, [4]Kafi. M and [1]Ramazani, A.

[1*]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.

[2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.

[3] Department of Biology, Shahid Hasheminejad campus, Mashhad, Farhangian University,

[4]Department Of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 8 April 2013 ; Accepted: 9 June 2013).

Abstract:

Salvia leriifolia is a medicinal plant from Lamiaceae family native to Khorasan and Semnan Provinaces. This plant has medicinal properties such as antinociceptive, anti-inflammatory, antidiabetic, antimicrobial and Antioxidant which all have been confirmed by researchers. In this research, callus induction was established for production of phenolic acids. For this purpose, the leaf explants were cultured in MS medium supplemented with 2,4-D (0,1,2,3,4 mgL^{-1}), KIN (0,0.3,1mgL^{-1}), BAP (0,1,2,3,4,5,6 mgL^{-1}) and NAA (0,1,2,3 mgL^{-1}). Accumulation of phenolic acids was measured after 4 weeks of culture by HPLC. Results showed that the best treatments for callus induction and growth were at the BAP5 mgl^{-1}+NAA5mgl^{-1} and 2, 4- D 3 mgl^{-1} + KIN1mgl^{-1}. Accumulation of caffeic acid and salvianolic acid B in calli was higher than leaves of *Salvia leriifolias*. The highest rosmarinic acid concentration was found in the treatment BAP 5mgl^{-1}+NAA5mgl^{-1} that were about 3 times higher than in leaves.

Key Words: Callus, *P*henolic acids*, Salvia leriifolia.*

Archive of SID

* Corresponding author: M_modarres 70@yahoo.com

www.SID.ir