دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، صفحه ۲۴۴- ۲۳۱ (۱۳۹۵)

بررسی محتوای ترکیب ویتافرین A در توده‌های مختلف و کشت‌های درون شیشه‌ای گیاه پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)

عبدالرضا باقری[۱*]، محرم ولی‌زاده[۲]، احمد شریفی[۳] و کالاسیلوی سنتیل[۴]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

پست الکترونیک: abagheri@um.ac.ir

۲- استادیار، گروه تولید و فرآوری گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، ایران

۳- مربی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی واحد مشهد، ایران

۴- استادیار، بخش بیوشیمی، بیوتکنولوژی و بیوانفورماتیک، دانشگاه آناشیلینگام، کمباتور، هند

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

در طی سال‌های اخیر گیاه پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)، از خانواده سیب‌زمینیان (Solanaceae)، به‌دلیل دارا بودن ترکیب‌های لاکتون‌های استروئیدی موسوم به ویتانولیدها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از میان ویتانولیدها، ترکیب ویتافرین A به‌دلیل داشتن ویژگی بازدارندگی رشد تومورهای سرطانی در صنایع دارویی از ارزش قابل توجهی برخوردار می‌باشد. در این پژوهش محتوای ترکیب بیولوژیکی ویتافرین A در ریشه ۵ توده مختلف گیاه پنیرباد *W. coagulans* و کشت‌های درون شیشه‌ای آن مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بذرهای توده‌های وحشی در شرایط کنترل‌شده کشت شد. برای القای سوسپانسیون سلولی، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار و ترکیب هورمونی ۲،۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (۲mg/l2,4-D) همراه با (۰/۵mg/l) کاینتین (Kin) کشت شدند. برای ریشه‌زایی، دیسک‌های برگی در محیط کشت ½MS همراه با ۱mg/l ایندول بوتیریک اسید (IBA) کشت و محتوای ویتافرین A با استفاده از روش TLC و HPLC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب ویتافرین A در تمام توده‌ها حضور داشته (۴۴/۵۴µg/g DW-۲۱/۰۱) و میان توده‌های مختلف نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار ویتافرین A (۴۴/۵۴±۱/۸۷) در توده USB005 (هیدوچ) مشاهده شد که این توده برای مطالعات درون شیشه‌ای مورد گزینش قرار گرفت. محتوای ویتافرین A در کشت ریشه‌های درون شیشه‌ای در هفته چهارم ۲۱/۴۰±۱/۶۷µg/g DW و در هفته هشتم، پس از دومین واکشت، ۶۶/۷۳±۰/۸۶µg/g DW بود که در مقایسه با کشت سوسپانسیون سلولی (۶/۶۲±۲/۰۱µg/g DW) افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). به‌طور کلی، محتوای ویتافرین A در کشت ریشه‌های مویین بیش از ۱/۵ برابر مقادیر موجود در ریشه گیاه کامل و بیش از ۱۰ برابر مقادیر آن در کشت سوسپانسیون سلولی بوده، که بیانگر توانمندی قابل توجه کشت ریشه‌های مویین در تولید انبوه این ترکیب بیولوژیک می‌باشد.

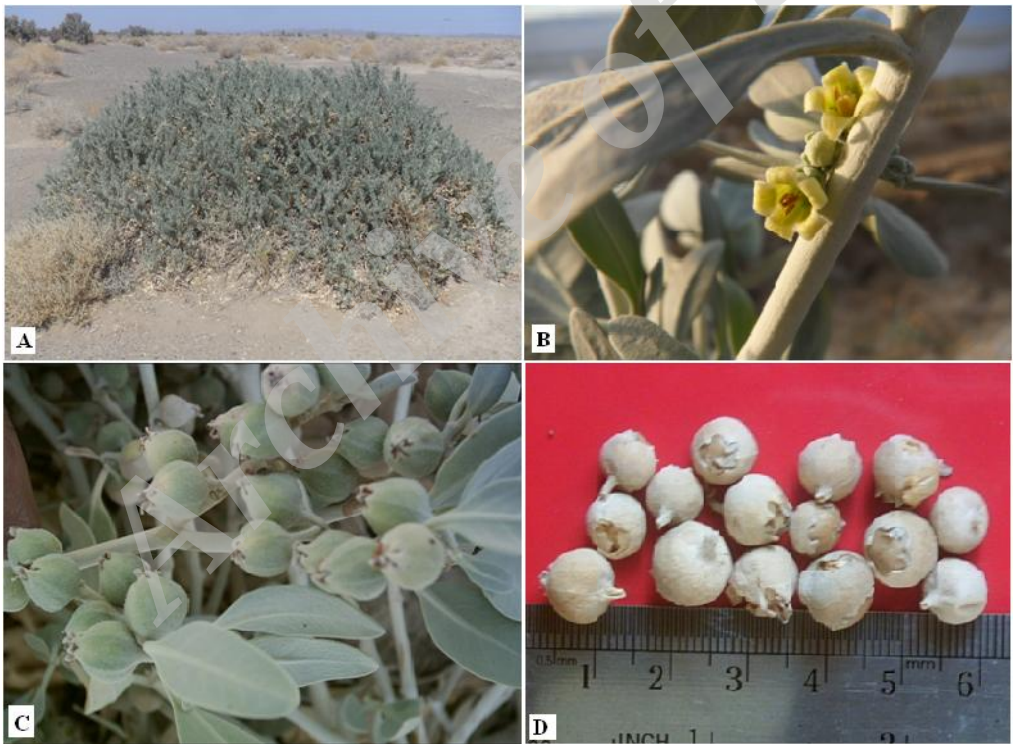
واژه‌های کلیدی: پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)، درون شیشه‌ای، سوسپانسیون سلولی، ویتافرین A، HPLC.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جنس *Withania*، متعلق به خانواده سیب‌زمینیان (Solanaceae)، دارای ۲۳ گونه بوده که از میان آنها دو گونه *W. somnifera* و *W. coagulans* در رویشگاه‌های طبیعی ایران حضور داشته و از لحاظ ارزش دارویی حائز اهمیت می‌باشد (Mirjalili *et al.*, 2009؛ Jain *et al.*, 2011). در این میان گونه *W. coagulans* با نام فارسی پنیرباد گسترش بسیار محدودی داشته و از نظر پراکنش به‌طور عمده در پاکستان، شمال‌غربی هند، افغانستان و در ایران منحصراً در مناطق محدودی از رویشگاه‌های طبیعی استان سیستان و بلوچستان دیده می‌شود (Valizadeh & Valizadeh., 2011). این گیاه به‌صورت بوته‌ای و با ارتفاع ۱۲۰-۳۰ سانتی‌متر، برگ‌های نسبتاً گوشتی، گل‌هایی به رنگ زرد و میوه‌هایی از نوع سته و به رنگ کرم یا قهوه‌ای دیده می‌شود (شکل ۱). از نظر فارماکولوژیکی این گونه دارای اثرات بیولوژیکی است، به طوری که قسمت‌های مختلف این گیاه دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضداسترس، ضدتومور، اثرات ضدمیکروبی و ضدتشنجی می‌باشد (Hemalatha *et al.*, 2004؛ Bharti *et al.*, 2012). بیشترین خواص دارویی این گونه به‌دلیل وجود لاکتون‌های استروئیدی موسوم به ویتانولیدها می‌باشد. مهمترین انواع ویتانولیدهای موجود در این گونه، ویتافرین A (Withaferin A)، ویتانولید A (Withanolide A) و ویتانون (Withanon) (شکل ۲) گزارش شده‌است (Rahman *et al.*, 2003).



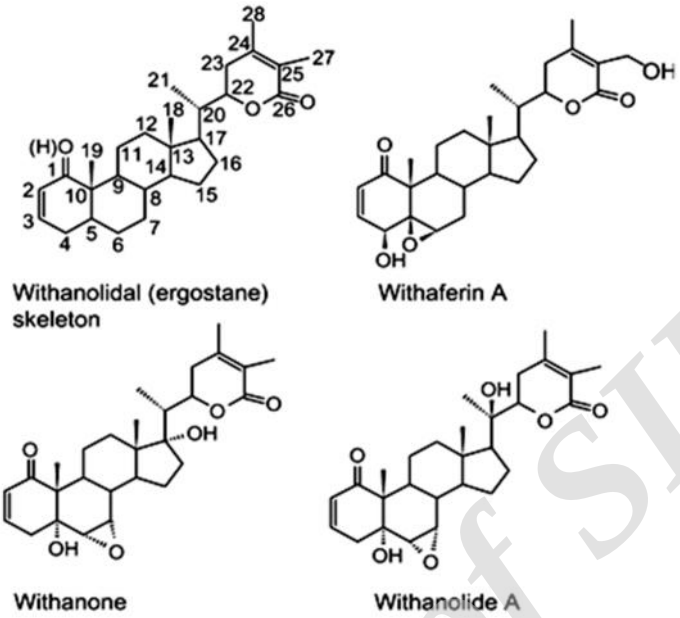
شکل ۱- مشخصات ظاهری بوته گیاه چند منظوره پنیرباد (*W. coagulans*) در رویشگاه‌های منطقه بلوچستان

A: استقرار بوته در مناطق گرم و خشک، B: شکل ظاهری گل‌ها، C: تشکیل میوه از نوع سته، D: میوه رسیده گیاه

ویتافرین A اولین گروه از ترکیب‌های ویتانولیدی است که در سال ۱۹۶۵ از گونه *W. somnifera* و *W. coagulans* جداسازی و شناسایی شده‌است (Lavie *et al.*, 1965). تولید این ماده بیولوژیک با ارزش محدود به

Archive of SID
www.SID.ir

برخی از جنس‌های گیاهی از خانواده سیب‌زمینیان بوده و در این میان گونه *W. coagulans* محتوی انواع متنوعی از ویتانولیدها می‌باشد (Chaurasiya *et al.*, 2009).



شکل ۲- ساختار شیمیایی برخی از ویتانولیدهای مهم موجود در گیاه پنیرباد (*W. coagulans*)

در میان تمامی ویتانولیدهای شناسایی شده، ویتافرین A به‌عنوان ترکیبی بسیار فعال علیه سلول‌های سرطانی عمل می‌کند (Vyas & sing, 2014؛ Patel *et al.*, 2013). گزارش‌های اختصاصی در مورد اثر ضدسرطانی ترکیب ویتافرین A روی رده سلول‌های مختلف سرطانی در شرایط آزمایشگاهی این امیدواری را برای معرفی ترکیب دیگری از منابع گیاهی برای کنترل سلول‌های سرطانی بوجود آورده‌است (Vanden Berghe *et al.*, 2012). علاوه بر این، با شناسایی برخی ویژگی‌های نروفارماکولوژیکی ویتافرین A، مشخص شده‌است که این ترکیب می‌تواند در درمان اختلالات عصبی مانند آلزایمر و پارکینسون نیز مورد استفاده قرار گیرد (Kaileh *et al.*, 2007؛ Sangwan *et al.*, 2007).

به‌طور معمول جمعیت‌های طبیعی ویتانیا به‌وسیله انتشار و رویش بذر تکثیر می‌شوند که با توجه به طولانی بودن دوره بلوغ آنها، برای برداشت اندام دارویی و استخراج مواد مؤثره آنها به یک دوره زمانی ۴ تا ۶ ساله نیاز است. علاوه‌بر این، در گیاهان طبیعی مقادیر ویتانولیدها و به‌ویژه ویتافرین A در مقادیر بسیار جزئی و در ریشه و برگ گیاه وجود داشته و تغییرات شرایط محیطی و همچنین دگرگرده‌افشان بودن آنها نیز باعث تغییر در تیپ شیمیایی آنها در مناطق مختلف و از یک گیاه به گیاه دیگر می‌شود (Mirjalili *et al.*, 2009). از این‌رو با توجه به ضرورت تولید یکنواخت و مطلوب ترکیب‌های ویتانولیدی در این گیاهان، استفاده از شرایط درون شیشه‌ای اعم از کشت سلول، ریشه و شاخساره که از یک سیستم قابل کنترل برای عوامل مختلف برخوردار هستند بیش از پیش مورد استفاده قرار گرفته است (Ray & Jha, 2001). بنابراین تلاش در راستای دستیابی به مقادیر قابل توجه ویتانولیدها با رویکردهای تولید درون شیشه‌ای این ترکیب‌های با ارزش ضروری به‌نظر می‌رسد. امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر فناوری زیستی در تولید کم هزینه و پایدار مواد مؤثره دارویی مورد توجه قرار گرفته است. طی دو دهه گذشته برای تولید سریع و انبوه بسیاری از متابولیت های ثانویه، به‌ویژه برای انواع

Archive of SID

www.SID.ir

با اثرات دارویی ارزشمند که در منابع گیاهی به مقدار ناچیزی وجود دارند از روش‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت استفاده شده‌است (Ramachandra & Ravishankar, 2002). کشت در شرایط درون شیشه‌ای این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید این متابولیت‌های با ارزش تحت شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاه‌تری انجام شود (Mulabagal *et al.*, 2004). البته تاکنون مطالعات گسترده‌ای در خصوص تولید درون شیشه‌ای ویتانولیدها از گونه *W. coagulans* و به‌ویژه *W. somnifera* در سایر کشورها انجام شده است (Chitturi *et al.*, 2010؛ Sharada *et al.*, 2007؛ Wasnik *et al.*, 2009). به‌عنوان مثال، Wadegaonkar و همکاران (۲۰۰۶) با ریشه‌زایی مستقیم و کشت ریشه‌های تولید شده گونه *W. somnifera* در محیط کشت مایع MS موفق به تولید ترکیب‌های ویتانولوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای شده‌اند. مقادیر ویتانولیدهای تولید شده از این ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان مزرعه‌ای افزایش قابل توجهی داشت. تولید ویتافرین A با کشت ریشه‌های *W. coagulans* در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA توسط Abouzid و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده‌است. تراریختی قطعات برگ گونه *W. somnifera* با استفاده از باکتری *A. tumefaciens*، نژاد C58C1 نیز ریشه‌های با قابلیت تولید ویتانولید A و ویتافرین A تولید کرده است (Mirjalili *et al.*, 2009). بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که بهره‌گیری از کشت‌های درون شیشه‌ای، از توانمندی قابل توجهی در راستای تولید سریع و کم هزینه ویتانولیدهای موجود در گونه پنیرباد برخوردار است. از این رو، با توجه به ارزش قابل توجه ویتانولیدهای این گونه گیاهی در پزشکی و داروسازی و از طرفی عدم وجود مطالعات گسترده در داخل کشور، این ضرورت احساس می‌شود که تحقیقات گسترده و بنیادی در این زمینه انجام شود. این تحقیق برای اولین بار و با هدف بررسی امکان تولید ویتافرین A از توده های مختلف گیاه دارویی پنیرباد در شرایط سوسپانسیون سلولی و ریشه‌های درون شیشه‌ای در کشور انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه گیاهچه استریل

بذرهای مورد استفاده در این پژوهش از رویشگاه‌های طبیعی استان سیستان و بلوچستان و با مشخصات مندرج در جدول ۱، در تیرماه سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری و در شرایط کنترل‌شده کشت شد. پس از گذشت ۴۵ روز از رشد گیاهان، ریشه‌ها از خاک خارج و پس از شستشو با آب، به مدت ۱۲ روز و در شرایط سایه و دمای آزمایشگاه خشک، پودر و تا زمان استخراج ترکیب ویتافرین A در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به‌منظور تولید گیاهچه‌های درون شیشه ای، بذرهای بهترین توده از نظر مقادیر کمّی ویتافرین A، پس از استریل کردن، در لوله‌های کشت ۲۵×۱۵۰mm حاوی محیط کشت ½MS، با ۰/۸٪ آگار و بدون ساکارز کشت و pH محیط قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. پس از گذشت حدود ۶ هفته گیاهچه‌های حاصل به‌عنوان مواد اولیه برای القای کالوس، تولید ریشه درون شیشه‌ای و تهیه کشت سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌های بذر گیاه پنیرباد (*W. coagulans*)

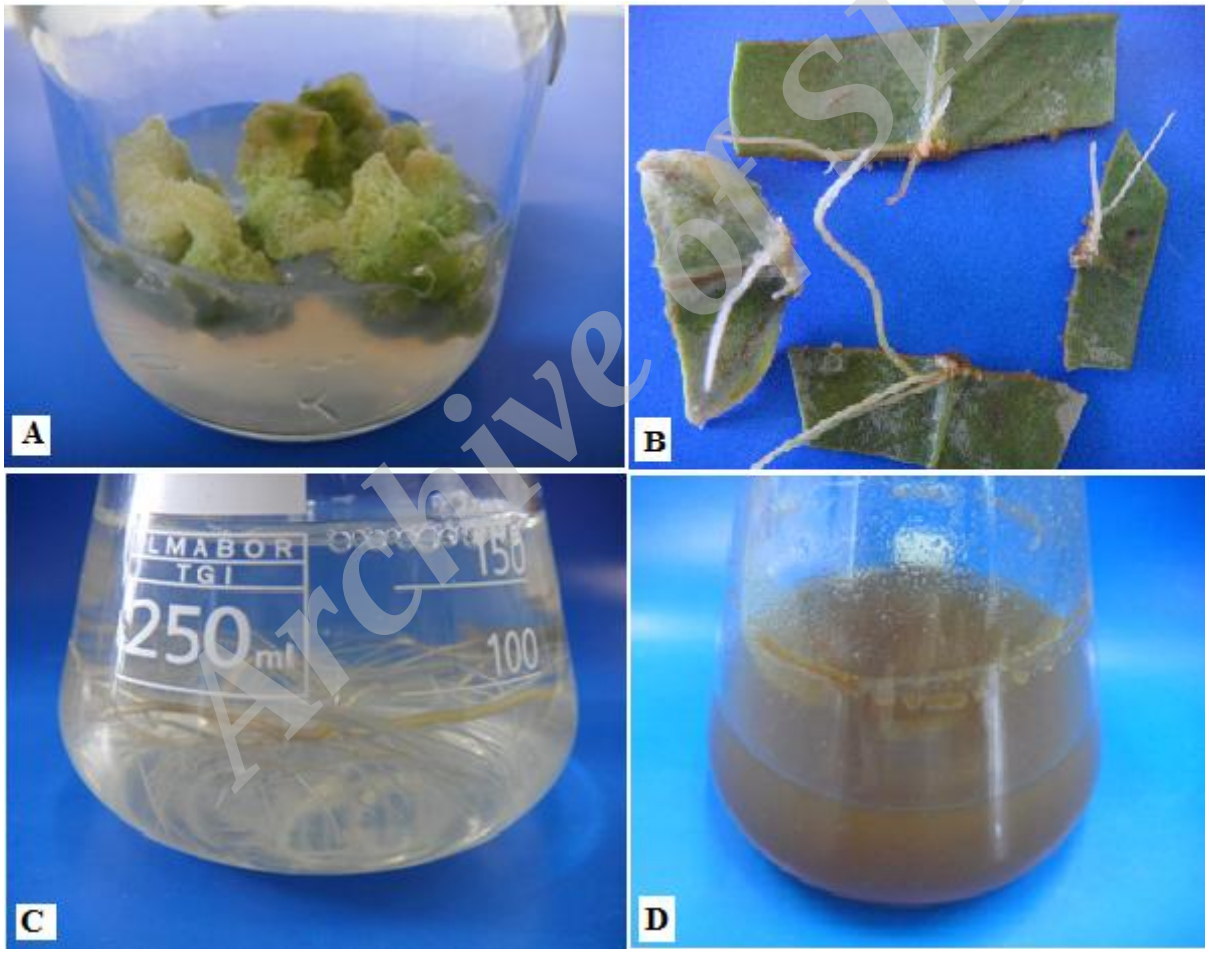
توده	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
USB001	کوهک	۰۶۳° ۱۷′ ۲۱/۵″	۲۷° ۱۰′ ۳۶/۵″	۸۹۳
USB002	اسفندک	۰۶۲° ۸۴′ ۰۱/۷″	۲۷° ۱۰′ ۴۶/۲″	۱۰۳۵
USB003	سیرکان	۰۶۲° ۵۹′ ۵۶/۶″	۲۶° ۸۶′ ۶۹/۹″	۱۲۳۵
USB004	ناهوک	۰۶۲° ۳۶′ ۴۹/۸″	۲۷° ۶۲′ ۸۸/۲″	۱۲۷۲
USB005	هیدوچ	۰۶۲° ۱۰′ ۰۶/۵″	۲۷° ۰۰′ ۵۳/۶″	۱۲۳۱

Archive of SID
www.SID.ir

القای کالوس و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

به‌منظور القای کالوس، ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت پایه MS حاوی ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار و ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) همراه با Kin (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شد (Valizadeh & Valizadeh, 2011). نمونه‌های کشت شده در اتاق رشد قابل کنترل از نظر دما و نور قرار گرفتند. در این شرایط دمای اتاقک در ۱±۲۵°C، دوره نوری تاریکی/روشنایی ۱۶/۸ ساعت و شدت نور حدود ۲۰۰۰ لوکس تنظیم شد.

برای استقرار سیستم کشت سوسپانسیون سلولی، ۲ گرم از کالوس‌های نرم و مناسب به ارلن‌های کشت با ظرفیت ۲۵۰ml که حاوی ۵۰ml محیط کشت MS مایع با همان ترکیب هورمونی مورد استفاده برای القای کالوس بود منتقل و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm نگهداری و در فاصله زمانی هر ۴ هفته واکشت شدند. پس از گذشت حدود ۲ ماه، کشت‌های مورد بررسی فیلتر و سلول‌های حاصل در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد.



شکل ۳- القای کالوس (A) و ریشه از ریزنمونه برگ (B) توده USB005 گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) در محیط کشت MS حاوی ۲mg/L هورمون IBA. کشت ریشه در محیط کشت مایع (C)، کشت سوسپانسیون سلولی (D)

Archive of SID
www.SID.ir

القای ریشه درون شیشه‌ای

به‌منظور القای مستقیم ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های برگ گیاهچه‌های استریل توده (هیدوچ) USB005 استفاده شد. بدین منظور ریزنمونه‌های برگی به قطعات کوچک تقسیم شده و در محیط کشت ½ MS حاوی ۰/۸٪ آگار، ۱٪ ساکارز همراه با غلظت‌های مختلف هورمون IBA و NAA کشت شدند (جدول ۲). پس از گذشت ۴ هفته، ریشه‌های القای شده (شکل ۳B) مورد ارزیابی قرار گرفته و مناسب‌ترین نمونه‌ها به محیط کشت مایع با همان ترکیب قبلی منتقل و در شرایط تاریکی روی شیکر با سرعت ۶۰ دور در دقیقه نگهداری شد (شکل ۳C). تعویض محیط کشت مایع هر یک ماه انجام گردید. پس از گذشت ۴ و ۸ هفته از کشت (دومین واکشت) ریشه‌ها از محیط کشت برداشت و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد.

استخراج و آنالیز ویتافرین A

به‌منظور استخراج ترکیب بیولوژیک ویتافرین A، از روش Sangwan و همکاران (۲۰۰۷) همراه با کمی تغییرات استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر ریشه گیاه، سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی و همچنین ریشه‌های بدست‌آمده از محیط کشت مایع با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول: آب (۲۵:۷۵) به‌صورت هموژنیزه در آمده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفت. در ادامه محلول رویی جمع‌آوری شده و با استفاده مقادیر هم حجم از *n*–هگزان به ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد چربی‌زدایی شد. در نهایت پس از حذف حلال *n*–هگزان، روی محلول باقی‌مانده برابر هم حجم آن کلروفرم افزوده شد. مخلوط حاصل نیز به مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و در ادامه بخش کلروفرمی با استفاده از قیف جداکننده از بخش متانولی جدا شد. به‌منظور وجود احتمال تراوش بخشی از ترکیب ویتافرین A، پس از صاف کردن و تغلیظ محیط کشت‌های مورد نظر، برابر هم حجم آن کلروفرم به آن اضافه شد. بخش‌های کلروفرمی جمع‌آوری شده برای هر نمونه و محیط کشت مربوطه روی هم اضافه شده و در شرایط خلأ تبخیر شد. در نهایت عصاره حاصل در ۵ میلی‌لیتر متانول به‌صورت محلول درآمده و پس از عبور دادن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر برای آنالیز بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون TLC و HPLC

به‌منظور جداسازی اجزای مختلف عصاره به روش TLC، مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده همراه با استاندارد ویتافرین A روی صفحات سیلیکاژل 60 F_{254} (Merck) به ابعاد ۱۰×۲۰ بارگذاری شد. صفحات به داخل تانک اشباع شده با فاز متحرک منتقل و پس از صعود حلال، صفحه از تانک خارج و پس از خشک شدن با استفاده از معرف وانیلین–اسید سولفوریک (۱۰٪) اسپری شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Chitturi *et al.*, 2010). در این تحقیق از حلال کلروفرم: متانول با نسبت ۹۵ به ۵، به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. تمامی مواد و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک (Merck) و ترکیب ویتافرین A از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد.

پس از تأیید اولیه حضور ترکیب دارویی ویتافرین A در نمونه‌های مورد بررسی، از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) به‌منظور بررسی مقادیر کمّی استفاده شد. دستگاه HPLC مورد استفاده از نوع KNAUER مدل WellChrom با ستون ODS-3 C_{18} با قطر ذرات ۵µ و ابعاد ۴/۶–۲۵۰ mm مجهز به دتکتور UV (229nm) بود. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد (با غلظت ۱۰۰µg/ml، ۵۰، ۲۰،۱۰، ۵) و عصاره‌های مختلف به دستگاه تزریق و با فاز متحرک متانول: آب با نسبت ۴۳:۵۷ و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون دستگاه عبور و در نهایت در طول موج ۲۲۹ نانومتر شناسایی گردید. نتایج بدست‌آمده شامل سطح زیر منحنی‌های نمونه‌ها و زمان ماندگاری (Rf) هریک با در نظر گرفتن ۳ تکرار ثبت شد. مقادیر کمّی ترکیب ویتافرین A در نمونه‌های مورد

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی نیز با استفاده از معادله خط حاصل از غلظت‌های معین ویتافرین A استاندارد محاسبه شد.

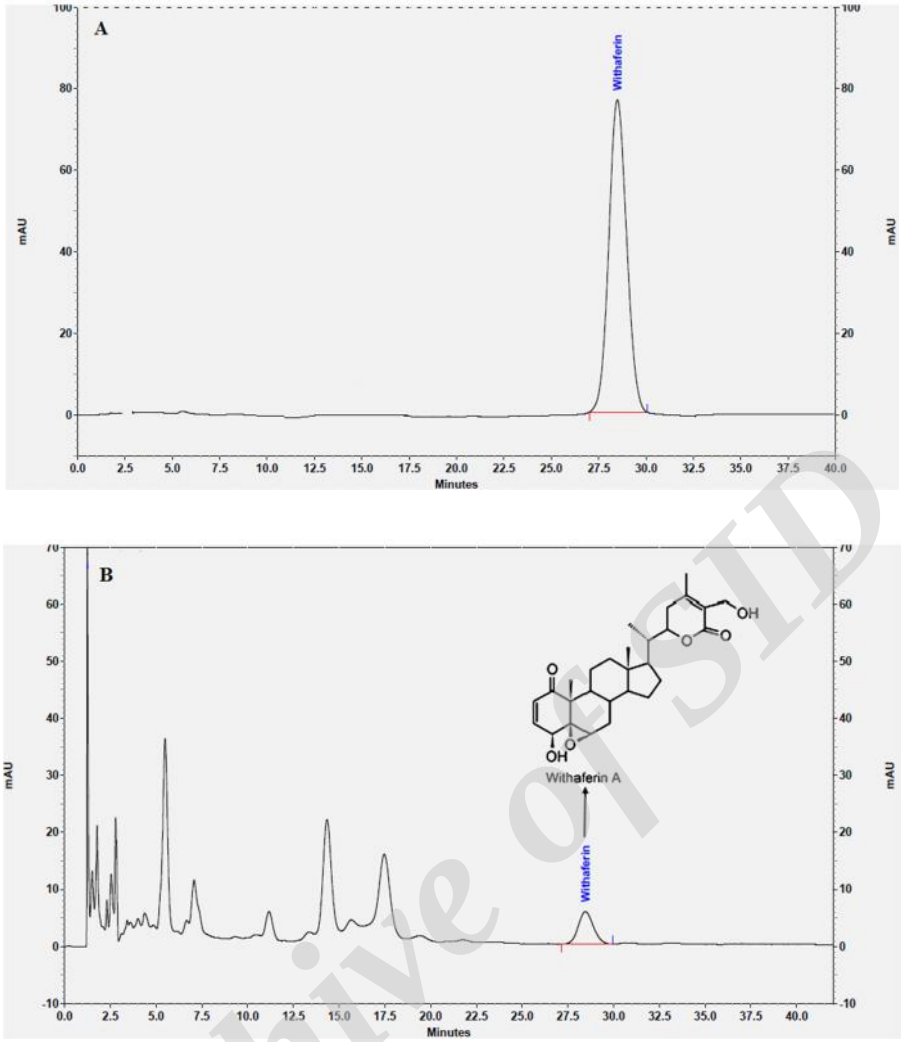
نتایج

در این پژوهش محتوی ترکیب بیولوژیک ویتافرین A در ۵ توده مختلف پنیرباد (جدول ۱) و همچنین امکان تولید آن در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ارزیابی مقدماتی این ترکیب با روش TLC بیانگر حضور ترکیب دارویی ویتافرین A در تمامی توده‌های مورد بررسی و تولید آن در شرایط درون شیشه‌ای بود (شکل ۴). با مراجعه به الگوهای باندی شکل ۴، ترکیب بیولوژیک ویتافرین A در زمان بازدارندگی ۰/۴۷ جداسازی و با کمک ویتافرین استاندارد که تحت شرایط یکسان در همان صفحه بارگذاری شده بود به رنگ بنفش شناسایی شد. عصاره حاصل از سوسپانسیون سلولی و ریشه مویین به همراه ریشه گیاه مادری دارای زمان ماندگاری (Rf) مشابه با ویتافرین A استاندارد بوده که نشان‌دهنده حضور این ترکیب بیولوژیکی در کشت‌های درون شیشه‌ای است. بررسی کروماتوگرام مربوط به آنالیز نمونه ویتافرین استاندارد و عصاره‌های مورد بررسی به روش HPLC نیز نشان داد که ترکیب ویتافرین A دارای زمان ماندگاری ۲۷ دقیقه و ۳۰ ثانیه می‌باشد (شکل ۵).

شکل ۴- الگوی TLC عصاره‌های مختلف مورد بررسی

WA: ویتافرین **A** استاندارد، ۴-۱: به‌ترتیب ریشه توده‌های **USB001,002,003, 004**، ۵: سوسپانسیون سلولی، ۶: ریشه‌های درون شیشه‌ای پس از ۴ هفته، ۷: ریشه‌های درون شیشه‌ای پس از ۸ هفته

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵- کروماتوگرام مربوط به نمونه ویتافرین استاندارد (**A**) و نمونه حاصل از سوسپانسیون سلولی (**B**)

نتایج بدست‌آمده از آنالیز نمونه‌ها با روش HPLC و تجزیه واریانس داده‌های حاصل از مقادیر کمّی ویتافرین A اختلاف معنی‌داری را در بین توده‌های مورد بررسی نشان داد ($P<۰/۰۵$). میانگین محتوای ویتافرین A در توده‌های مختلف ۳۳/۲۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک (µg/g DW) مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار این ترکیب به‌ترتیب متعلق به نمونه USB005 (۱/۸۷±۴۴/۵۴) و USB004 (۱/۱۵±۲۱/۰۱) بود (شکل ۶).

به‌منظور بررسی امکان تولید ترکیب بیولوژیکی ویتافرین A در شرایط درون شیشه‌های، اقدام به القای کالوس از ریزنمونه برگ، تهیه سوسپانسیون سلولی و کشت ریشه‌های مویین از توده USB005 شد. برای القاء و تولید کالوس مناسب برای کشت سوسپانسیون سلولی از روش Valizadeh و Valizadeh (۲۰۱۱) و برای القای ریشه از ریزنمونه برگ نیز از محیط کشت MS ½ همراه با غلظت‌های ۲-۰/۵ mg/l از هورمون IBA و NAA استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی کشت ریشه‌های درون شیشه‌ای اختلاف معنی‌داری را بین نوع هورمون و غلظت‌های مختلف بکار رفته نشان داد ($P<۰/۰۵$). به‌طوری که بیشترین درصد القای کالوس برای هر دو نوع هورمون NAA و IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و به‌ترتیب ۴۵/۳۳٪ و ۱۰۰٪ مشاهده شد

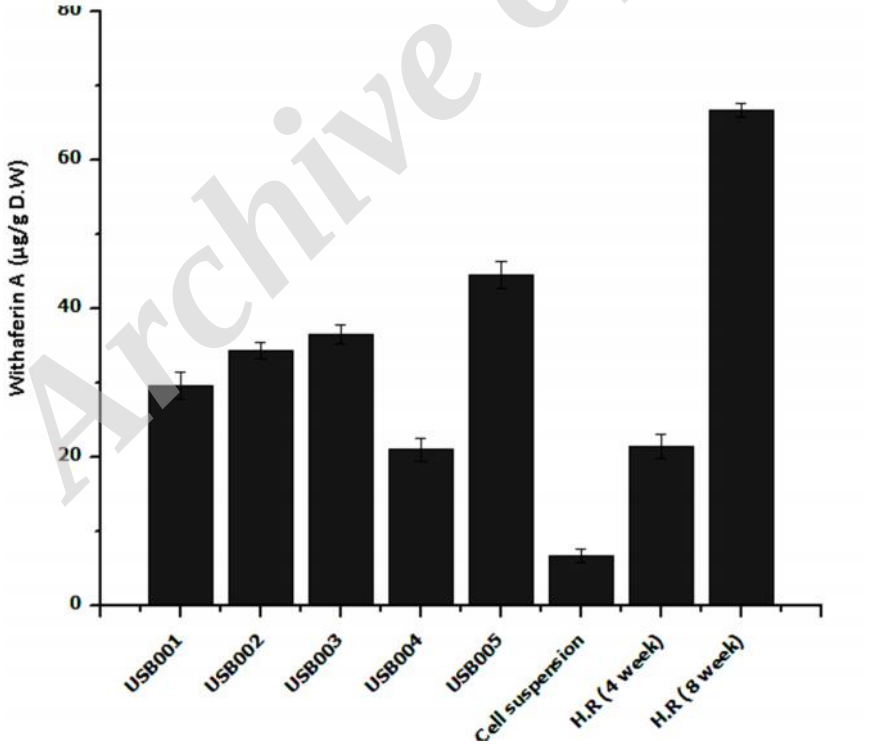
Archive of SID
www.SID.ir

(جدول ۲). حداکثر تعداد ریشه در ریزنمونه (۱۰/۶۶±۲/۰۸) و طول ریشه (۸/۲۶±۱/۱۵cm) نیز با بکارگیری غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA القاء شد که هر دو مورد در مقایسه با مؤثرترین غلظت هورمون NAA (۱mg/l) در حدود ۳ برابر بود (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف دو تنظیم‌کننده رشد NAA و IBA بر القای ریشه، تعداد ریشه‌های القاء شده در هر ریزنمونه و طول ریشه از ریزنمونه برگ گیاه *W. coagulans*

تنظیم‌کننده رشد (mg/l)	القاء ریشه (٪)	تعداد ریشه/ریزنمونه	طول ریشه (cm)
شاهد (بدون هورمون)	–	–	–
NAA (۰/۵)	۳۴/۶۶	۲/۶۶±۰/۶۶ de*	۲/۷۳±۰/۸۷ cd
NAA (۱)	۴۵/۳۳	۳/۵۶±۰/۵۷ cd	۲/۳۰±۰/۶۵ d
NAA (۲)	۲۴	۱/۶۶±۰/۵۷ ef	۱/۹۳±۰/۴۰ d
IBA (۰/۵)	۸۱/۶۶	۴/۶۰±۰/۵۴ c	۳/۸۰±۰/۲۰ c
IBA (۱)	۹۵/۶۶	۱۰/۶۶±۲/۰۸ a	۸/۲۶±۱/۱۵ a
IBA (۲)	۱۰۰	۸±۱/۰۰ b	۵/۳۳±۰/۶۱ b

*: نتایج براساس میانگین±SE مربوط به ۳ تکرار نشان داده شده است. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.



شکل ۶- مقایسه میانگین محتوای ترکیب ویتافرین A در ریشه توده‌های مختلف (USB001-5)، ریشه‌های مویین (H.R) و سوسپانسیون سلولی توده USB005 (هیدوچ) گیاه *W. coagulans*

مقادیر براساس SE±میانگین نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از آنالیز کمّی ویتافرین A در انواع کشت‌های درون شیشه‌ای نشان داد که بین مقادیر کمّی این ترکیب در کشت ریشه‌های مویین و سوسپانسیون سلولی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). با وجود عدم تولید مقادیر قابل توجه ویتافرین A در سیستم کشت سوسپانسیون سلولی (۵/۲۷±۱/۹۴ µg/g DW)، تولید این ترکیب در ریشه‌های القاء شده، در پایان دوره ارزیابی، در مقایسه با ریشه گیاه کامل بیش از دو برابر افزایش داشته است (شکل ۶). البته دوره‌های مختلف کشت از نظر زمانی نیز اختلاف معنی‌داری را در کشت ریشه‌های مویین نشان داد. کشت‌های ۸ هفته‌ای با تولید ۶۶/۷۳±۰/۸۶µg/g DW از ترکیب ویتافرین A، در مقایسه با هفته چهارم (۲۱/۴۰±۱/۶۷µg/g DW) بیش از ۳ برابر افزایش نشان داد.

بحث

گیاه پنیرباد گونه‌ای دوپایه و دگرگشن است که این پدیده همراه با تغییرات شرایط محیطی باعث تغییر در تیپ‌های شیمیایی و تفاوت در مقادیر کمّی و کیفی ترکیب‌های دارویی این گیاه می‌شود. علاوه‌بر این نسبت انواع ویتانولیدهای موجود در این گیاه و مقادیر کمّی آنها تحت تأثیر شرایط اکولوژیکی، مراحل رشدی، سن اندام گیاهی، نوع اندام مورد استفاده و نوع شیموتایپ گیاهی قرار می‌گیرد (Sangwan *et al.*, 2007). در پژوهش حاضر، به‌منظور دستیابی به پتانسیل واقعی و ارزیابی دقیق‌تر تنوع توده‌های مختلف از نظر توان تولید ترکیب بیولوژیکی ویتافرین A، اقدام به کشت گیاه در شرایط کنترل شده و حذف شرایط تأثیرگذار بر مقادیر کمّی این ترکیب ازجمله شرایط اکولوژیکی، سن اندام و همچنین زمان برداشت شد. بنابراین می‌توان استنباط کرد که تنوع مشاهده شده در بین توده‌های مختلف به‌طور عمده ژنتیکی است، ولی در عین حال توصیه می‌شود که به‌منظور مطالعه دقیق‌تر، توده‌ها و مقادیر ویتافرین A در چند سال و چند مکان مورد ارزیابی قرار گیرد.

تاکنون فقط یک مورد گزارش در مورد بررسی محتوای ترکیب ویتافرین A در جمعیت‌های گیاه دارویی پنیرباد در ایران انجام شده است. Mirjalili و همکاران (۲۰۰۹) محتوای کمّی ترکیب ویتافرین A را در جمعیت‌های مختلف پنیرباد مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که این ترکیب بیولوژیکی فقط در ریشه ۲ نمونه از ۲۰ جمعیت مورد بررسی و در مقادیر ۳/۷–۸/۷µg/g DW حضور داشته و سایر نمونه‌ها فاقد ویتافرین A بودند. این تفاوت در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر، ممکن است به‌دلیل تفاوت توده‌های مورد بررسی و در نتیجه وجود تنوع قابل ملاحظه در توده‌های گیاه پنیرباد از نظر مقادیر کمّی ترکیب ویتافرین A باشد. نتایج این پژوهش بیانگر وجود تنوع قابل توجهی در مورد مقادیر کمّی ترکیب بیولوژیکی ویتافرین A در بین توده‌های مورد بررسی بود، که این امر ضرورت بکارگیری روش‌های گزینشی و به‌نژادی را در راستای دستیابی به ژنوتیپ‌های برتر از نظر توان تولید این ماده بیولوژیکی با ارزش دو چندان می‌کند. در این میان، انتخاب در بین جمعیت‌های وحشی یا توده‌های بومی می‌تواند به‌عنوان یکی از رایج‌ترین روش اصلاحی بکار رود، زیرا گونه سنتی پنیرباد هنوز اهلی نشده و به‌نظر می‌رسد که دارای تنوع قابل توجهی در این مورد باشد. علاوه بر این، این گونه به‌وسیله بذر تکثیر شده و به‌دلیل طولانی بودن دوره بلوغ آن برداشت اندام دارویی آن نیازمند یک دوره زمانی ۶–۴ ساله است. در این میان استفاده از سیستم کشت درون شیشه‌ای دارای توانمندی قابل توجهی در کنترل عوامل متأثرکننده محیطی بوده و رویکردی مناسب در تولید یکنواخت و مطلوب ترکیب‌های ویتانولوئیدی می‌باشد.

نتایج مربوط به القای ریشه‌زایی مستقیم از ریزنمونه برگ نشان داد که علاوه‌بر نوع اکسین بکار رفته (IBA و NAA)، غلظت این هورمون‌ها نیز بر درصد القای ریشه، تعداد ریشه و طول آنها مؤثر است. در این پژوهش بکارگیری هورمون IBA مؤثرتر از NAA بوده و مشاهده شد که از میان غلظت‌های مختلف IBA، غلظت یک میلی‌گرم در لیتر مؤثرتر از سایر

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌ها می‌باشد. القای ریشه از ریزنمونه‌های مختلف در گونه‌های *Withania* توسط محققان متعددی گزارش شده‌است. Wadegaonkar و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از ریزنمونه برگ و محیط کشت ½MS و غلظت‌های مختلف هورمون IAA و IBA مشاهده کردند که بیشترین درصد القای ریشه در محیط کشت حاوی ۹/۸۵ میکرومولار IBA همراه با ۲/۸۵ میکرومولار IAA بدست آمد. Sivanesan و Murugesan (۲۰۰۸) با استفاده از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در شاخساره‌های *W. somnifera* و با استفاده از نصف غلظت نمک‌های مورد استفاده در محیط کشت MS، ۱۰۰٪ ریشه‌زایی را گزارش کردند. Siddique و همکاران (۲۰۰۴) نیز با استفاده از غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA توانستند به‌ترتیب ۷۵، ۹۰ و ۸۵ درصد ریشه‌زایی را در *W. somnifera* القاء کنند. گزارش شده‌است که درصد القای ریشه درون شیشه‌ای در گونه‌های *W. somnifera* و *W. coagulans* با افزایش سطح هورمون IBA از ۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر، افزایش قابل توجهی را از خود نشان می‌دهد (Kumar *et al.*, 2011؛ Valizdeh & Valizadeh, 2011)، که این با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت می‌کند.

تولید ترکیب ویتافرین A در کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه‌های مویین، توان کاربردی کشت بافت را در راستای تولید درون شیشه‌ای این ترکیب بیولوژیکی ارزشمند تأیید می‌کند. با توجه به نتایج این پژوهش، افزایش بیش از ۱۰ برابر تولید در کشت ریشه‌ها (۴/۱±۷۳/۶۷) در مقایسه با سوسپانسیون سلولی (۲/۰۱±۱۷/۶۱) بیانگر برتری کشت‌های تمایزیافته در تولید این ترکیب دارویی است. تحقیقات نشان داده‌است که سطح تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های تمایزیافته ازجمله شاخساره و ریشه بیشتر از بافت‌های تمایزنیافته بوده و علاوه‌بر این کشت‌های شاخساره و ریشه در مقایسه با کشت‌های سلولی و کالوس دارای ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی بیشتری می‌باشند (Ramachandra & Ravishankar, 2002). تولید ویتافرین A در کشت ریشه‌های درون شیشه‌ای، که به روش غیرتراریختی تولید شده‌اند، توسط محققان دیگری نیز گزارش شده‌است. Abuzid و همکاران (۲۰۱۰) با کشت ریشه‌های غیرتراریخته حاصل از گیاهچه‌های استریل *W. coagulans* در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ mg/l از هورمون IBA موفق به تولید ویتافرین A شدند. علاوه‌بر این نامبردگان گزارش کردند که با افزایش سن کشت‌های ریشه مویین از یک هفته به سه هفته، محتوای ترکیب ویتافرین A از ۱/۸۳ به ۱۱/۶۵µg/g FW (بیش از ۶ برابر) افزایش از خود نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز محتوای ترکیب ویتافرین A در کشت‌های ۸ هفته‌ای (۶۶/۷۳±۰/۸۶ µg/g DW) در مقایسه با هفته چهارم (۲۱/۴۰±۱/۶۷ µg/gDW) بیش از ۳ برابر افزایش نشان داد که با نتایج گزارش اخیر مطابقت می‌کند.

حضور ویتانولیدها در کشت‌های تمایزیافته بیانگر فعالیت طبیعی آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیب‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد (Sharada *et al.*, 2007). در این میان، نوع ریزنمونه تأثیر قابل‌توجهی در تولید ویتانولیدها دارد. به‌عنوان مثال، Sharada و همکاران (۲۰۰۷) با کشت ریزنمونه‌های مختلف گونه *W. somnifera* نشان دادند که بیشترین و کمترین مقدار کمّی ویتانولیدها به‌ترتیب در کشت‌های حاصل از ریزنمونه برگی و انتهای شاخساره تولید شد. Jain و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش دو برابری بیوسنتز ویتافرین A و۱۰ برابری ویتانون را در گیاهان باززایی شده از ریزنمونه‌های برگ گیاه *W. coagulans* گزارش کرده‌اند.

تولید محدود این ترکیب در کشت سوسپانسیون سلولی احتمالاً به‌دلیل ارتباط فرایند تولید با مراحل تمایز مورفولوژیکی است. بررسی تولید ترکیب ویتافرین A در کشت کالوس، شاخساره و سوسپانسیون سلولی از گیاه *W. somnifera* نشان داده‌است که کمترین میزان این ترکیب در کشت‌های سوسپانسیون سلولی تولید شد (Sabir *et al.*, 2007) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. Sharada و همکاران (۲۰۰۷) با شناسایی ویتانولید A، ویتافرین A، ویتانولید B و ویتانولید E در مراحل مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

رشدی در کشت درون شیشه‌ای ارتباط نزدیکی را بین تولید ویتانولیدها و تمایز مورفولوژیکی گزارش کردند. با وجود قابل توجه نبودن مقادیر کمّی ویتافرین A در کشت سوسپانسیون سلولی به نظر می‌رسد که نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و حتی استفاده از القاگرهای (Elicitors) مختلف زیستی و غیرزیستی تولید این ترکیب را می‌تواند متأثر کند (Chitturi *et al*., 2010). به‌عنوان مثال، استفاده از محرک استات سدیم و موالونولاکتون در کشت سوسپانسیون سلولی به‌ترتیب منجر به افزایش ۱۰ و ۱۴ برابری تولید ویتافرین A در کشت‌های *W. coagulans* شده است (Chitturi *et al*., 2010). از این‌رو پیشنهاد می‌گردد تأثیر القاگرهای مختلف زیستی و غیرزیستی نیز در راستای افزایش تولید درون شیشه‌ای ویتافرین A مورد ارزیابی قرار گیرد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که نتایج این تحقیق نشان‌دهنده توان قابل توجه توده‌های مختلف گیاه سنتی پنیرباد در تولید ترکیب ویتافرین A است. از طرف دیگر، وجود تفاوت معنی‌دار در مقادیر کمّی ترکیب ویتافرین در نمونه‌های کشت شده، در شرایط یکسان و کنترل شده نیز احتمالاً به‌دلیل وجود تنوع ژنتیکی قابل بهره‌برداری در این گیاه بوده، بنابراین به‌نظر می‌رسد که امکان دستیابی به ژنوتیپ‌های برتر از نظر تولید این ترکیب بیولوژیکی با انتخاب ژنوتیپ برتر از میان انبوه توده‌های وحشی وجود دارد. علاوه‌بر این، کشت ریشه‌های مویین، در مقایسه با گیاهان کامل و کشت‌های سوسپانسیون سلولی، توان قابل توجهی در تولید این ترکیب از خود نشان می‌دهد. با وجود این به‌نظر می‌رسد که بهره‌گیری از انواع محیط کشت‌های مختلف، دوره‌های طولانی‌تر کشت و محرک‌های زیستی و غیرزیستی نیز رویکردی قابل توجه در افزایش تولید ترکیب بیولوژیکی ویتافرین A در شرایط درون شیشه‌ای داشته باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. از این‌رو، نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا کمال سپاس و تشکر را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌دلیل تأمین هزینه‌های مربوط به اجرای پژوهش حاضر اعلام کنند.

منابع مورد استفاده

- Abouzid, S.F., El-Bassuony, A.A., Nasib, A., Khan, S., Qureshi, J. and Choudhary, M.I., 2010. withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 3(1): 23-27.
- Bharti, S.K., Kumar, A., Sharma, N.K., Krishnan, S., Gupta, A.K. and Padamdeo, S.R., 2012. Antidiabetic effect of aqueous extract of *Withania coagulans* flower in Poloxamer-407 induced type 2 diabetic rats. Journal of Medicinal Plants Research, 6(45); 5706-5713.
- Chaurasiya, N.D., Sangwan, R.S., Misra, L.N., Tuli, R. and Sangwan, N.S., 2009. Metabolic clustering of a core collection of Indian ginseng *Withania somnifera* Dunal through DNA, isoenzyme, polypeptide and withanolide profilediversity. Fitoterapia, 80(8): 496-505.
- Chitturi, D., Venisetty, R.K., Molmoori, R.K., Kokate C.K. and Apte S.S., 2010. Enhanced bioproduction of withaferin A from suspension cultures of *Withania somnifera*. Annals of Biological Research, 1(2): 77-86.
- Hemalatha, S., Wahi, A.K., Singh, P.N. and Chansouria, J.P.N., 2004. Hypoglycemic activity of *Withania coagulans* Dunal in streptozotocin induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 93(2-3): 261-264.
- Jain, R., Sinha, A., Jain, D., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L., 2011. Adventitious shoot regeneration and *in vitro* biosynthesis of steroidal lactones in *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 105: 135-140.
- Kaileh, M., Berghe, W.V., Heyerick, A., Horion, J., Piette, J., Libert, C., Keukeleire, D.D., Essawi, T. and Haegeman, G., 2007. Withaferin A strongly elicits IKKb hyperphosphorylation, concomitant with potent inhibition of its kinase activity. The Journal of Biological Chemistry, 282: 4253-4264.
- Kumar, O.A., Jyothirmayee, G. and Tata, S.S., 2011. Multiple shoot regeneration from nodal explants of ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2(4): 636-640.
- Lavie, D., Glotter, E. and Shvo, Y., 1965. Constituents of *Withania somnifera*-III -The side chain of

Archive of SID
www.SID.ir

- Sharada, M., Ahuja, A., Suri, K.A., Vij, S.P., Khajuria, R.K., Verma, V. and Kumar, A., 2007. Withanolide production by *in vitro* cultures of *Withania somnifera* and its association with differentiation. Biologia Plantarum, 51: 161-164.
- Siddique, N.A., Bari, M.A., Shahnewaz, S., Rahman, M.H., Hasan, M.R., Khan, M.S.I. and Islam, M.S., 2004. Plant regeneration of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha) from nodal segments derived callus an endangered medicinal plant in Bangladesh. Journal of Biological Science, 4(2): 219-223.
- Sivanesan, I. and Murugesan, K., 2008. An efficient regeneration from nodal explants of *Withania somnifera* Dunal. Asian Journal of Plant Science, 7(6): 551-556.
- Valizadeh, J. and Valizadeh, M., 2011. Development of efficient micropropagation protocol for *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. African Journal of Biotechnology, 10(39): 7611-7616.
- Vanden Berghe, W., Sabbe, L., Kaileh, M., Haegeman, G. and Heyninck, K., 2012. Molecular insight in the multifunctional activities of withaferin A. Biochemical Pharmacology, 84: 1282-1291.
- Vyas, A.R. and Singh, S.V., 2014. Molecular targets and mechanisms of cancer prevention and treatment by withaferin a, a naturally occurring steroidal lactone. AAPS Journal, 16(1): 1-10.
- Wadegaonkar, P.A., Bhagwat, K.A. and Rai M.K., 2006. Direct rhizogenesis and establishment of fast growing normal root organ culture of *Withania somnifera* Dunal. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 84: 223-225.
- Wasnik, N.G., Muthusamy, M., Chellappan, S., Vaidhyanathan, V., Pulla, R., Senthil, K. and Yang, D.C., 2009. Establishment of *in vitro* root cultures and analysis of secondary metabolites in Indian ginseng-*Withania somnifera*. Korean Journal of Plant Research, 22(6): 584-591.

withaferin A. Journal of Organic Chemistry, 30(6): 1774-1776.
- Mirjalili, M.H., Fakhr-Tabatabaei, S.M., Bonfill, M., Alizadeh, H., Cusido, R.M., Ghassempour, A.R. and Palazon, J., 2009. Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures. England Life Science, 9(3): 197-204.
- Mulabagal, V., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. and Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin, 45: 1-22.
- Patel, K., Singh, R.B. and Patel, D.K., 2013. Pharmacological and analytical aspects of withaferin A: A concise report of current scientific literature. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2(3): 238-243.
- Rahman, A., Shahwar, D., Naz, A. and Choudhary, M.I., 2003. Withanolides form *Withania coagulans*. Phytochemistry, 63(4): 387-390.
- Ramachandra, R.S. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.
- Ray, S. and Jha, S., 2001. Production of withaferin A in Shoot culture of *Withania somnifera*. Planta Medica, 67(5): 432-436.
- Sabir, F., Sangwan, N.S., Chaurasiya, N.D., Misra, L.N. and Sangwan, R.S., 2007. *In vitro* withanolide production by *Withania somnifera* L. cultures. Zeitschrift fur Naturforschung C; 63(5-6):409-412.
- Sangwan, R.S., Chaurasiya, N.D., Lal, P., Misra, L., Uniyal, G.C., Tuli, R. and Sangwan, N.S., 2007. Withanolide A biogeneration in *in vitro* shoot cultures of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal), a main medicinal plant in Ayurveda. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 55(9): 1371-1375.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of withaferin A content in different accessions and in *in vitro* cultures of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal

A. Bagheri[1*], M. Valizadeh[2], A. Sharifi[3] and K. Senthil[4]

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, E-mail: abagheri@um.ac.ir
2- Department of Medicinal Plants, College of Agriculture, High Educational Complex of Saravan, Iran
3- Department of Plant Tissue Culture and Micropropagation, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioinformatics, Avinashilingam Institute of Home Science and Higher Education for Women, Tamil Nadu, India

Received: July 2014 Revised: April 2015 Accepted: May 2015

Abstract

In recent years, *W. coagulans* (Stocks) Dunal (Fam. Solanaceae) has gained much attention, owing to the presence of a large number of steroidal lactones known as withanolides. Out of the several withanolides isolated from *W. coagulans*, the biological compound, withaferine A is pharmacologically important that due to the significant and specific therapeutic action in cancer, Parkinson and Alzheimer's disease. The present study was, therefore, undertaken to make an assessment of withaferin A content in the roots of different accessions of *W. coagulans* and in *in vitro* cultures. The seeds of five wild accssesion (USB001-5) were sown in greenhous. The cell suspension cultures were initialized from leaf explants derived callus on Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with 30 gL^{-1} sucrose (w/v), 2.0mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin (Kin). Adventitious roots were induced directly from leaf segments on half strength MS medium (0.8% agar) with 2 mgl^{-1} indole-3-butyricacid (IBA) and 30 gl^{-1} sucrose. The withaferin A content was evaluated by TLC and HPLC method using standard withaferin-A compound. The results showed the presence of withaferin A in all accessions (21.01-44.54 µg/g D.W). In addition, there was significant differences among accession (P<0.05). USB005 was found to have the highest withaferin A content (44.54µg/g D.W) and was selected for *in vitro* study. The results of *in vitro* study showed that withaferin A accumulation was higher in adventitious roots (21.40±1.67 in 4 weeks and 66.73±0.86 in 8 weeks old cultures) compared to cell suspension culture (6.62±2.01). Nearly, adventitious root having withaferin A content 10 and 1.5-fold higher when compared with the cell suspension and *in vivo* roots, respectively. Thus, our study demonstrates the *in vitro* root cultures potential for large-scale production of withaferin A.

Keywords: *Withania coagulans* (Stocks) Dunal, *in vitro* culture, cell suspension, withaferin A, HPLC.

Archive of SID

www.SID.ir