

القاء كالوس و توليد اسيدهای فنوليك در كشت كالوس مريستم انتهایی و رويان گیاه نوروزك (*Salvia leriifolia* Benth.)

معصومه مدرس^{*۱}

*۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

پست الکترونیک: m.modarres@cfu.ac.ir ; m_modarres70@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

نوروزك (*Salvia leriifolia* Benth.) از خانواده نعناعیان، دارای خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد دیابت و آنتی‌اکسیدان است. به منظور القاء كالوس از مريستم انتهایی و رويان گیاه نوروزك برای توليد اسيدهای فنوليك آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. جداكشت‌های مريستم انتهایی و رويان بر روی محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های مختلف از مواد تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) با KIN (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و نیز BAP (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) با NAA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت داده شد. پس از چهار هفته درصد توليد كالوس، وزن تر و خشك كالوس‌ها بررسی گردید و تجمع اسيدهای فنوليك با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. بهترین تیمار برای القاء و رشد كالوس از مريستم انتهایی و رويان 2,4-D، ۲ میلی‌گرم بر لیتر با Kin ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. میزان تجمع کافئیک اسید در كالوس‌های رويان در این تیمار به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ گیاه بود و میزان رزمارینیک اسید توليد شده قابل مقایسه با برگ بود. بیشترین میزان سالویانولیک اسید B از عصاره حاصل از كالوس مريستم انتهایی بدست آمد که حدود سه برابر بیشتر از برگ گیاه نوروزك بود.

واژه‌های کلیدی: کافئیک اسید، رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید B، كالوس.

مقدمه

(Lary, 2000). مقابله عصاره گیاه با التهاب‌های مزمن از نظر کارآیی مشابه با داروی دیکلوفناک (Diclofenac) می‌باشد (Hosseinzadeh & Yavary, 1999). همچنین تأثیر عصاره آبی و الکلی برگ نوروزك در جلوگیری از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش گزارش شده‌است که کارآیی آن مشابه داروی سوکرافت (sucralfate) است (Hosseinzadeh et al., 2000). همچنین عصاره‌های برگ و ریشه آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Modarres et al., 2007b) است. قابل ذکر است که خواص ضد میکروبی

نوروزك (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد (Rechinger, 1982) و دارای خواص متعدد دارویی است. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزك وجود دارد. فعالیت ضد درد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروزك در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قابل مقایسه با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازپام (Diazepam) گزارش شده‌است (Hosseinzadeh &

سالیانولیک اسیدها در گونه *S. miltiorrhiza* سبب ممانعت از تشکیل لخته خون و کاهش محتوی آندوتلین پلاسما بعد از ایسکمی مغزی می‌شوند (Ren-Wang et al., 2005).

سالیانولیک اسید B سلول‌ها را در مقابل آسیب‌های القاء شده توسط استرس اکسیداتیو محافظت کرده و نقش مؤثری در پیشگیری از سرطان دارد. به‌علاوه دارای اثرات ضد فیروز بوده و برای درمان آرتريت روماتوئید، بیماری‌های مغزی-عروقی (cerebrovascular disorders) و بیماری‌های قلبی-عروقی (cardiovascular disease) بکار می‌رود. قابل ذکر است که تحقیقات انجام شده روی خواص دارویی اسیدهای فنولیک رزمارینیک اسید و سالیانولیک اسید B در سطح مکانیسم‌های مولکولی بررسی شده است (Bulgakov et al., 2012).

گزارش‌هایی در مورد تولید اسیدهای فنولیک در کالوس برخی از گونه‌های جنس *Salvia* وجود دارد. به‌عنوان مثال در کالوس گونه *S. fruticosa* رزمارینیک اسید تولید شده است (Karam et al., 2003). علاوه بر این در کالوس *S. officinalis* ترکیب‌های فنولیک از جمله کافئیک اسید و رزمارینیک اسید شناسایی شد (Santos-Gomes et al., 2003). همچنین در کالوس و کشت سوسپانسیون گونه *S. miltiorrhiza* ترکیب‌های کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیانولیک اسید B تولید شده است (Wu et al., 2016; Dong et al., 2010; Krajewska-Patan et al., 2007).

اخیراً شناسایی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک مشتق از کافئیک اسید، شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیانولیک اسید B در برگ و ریشه *Salvia leriifolia* انجام شده است (Modarres et al., 2014). اگرچه در برخی گونه‌های *Salvia* اسیدهای فنولیک در کشت بافت تولید شده است اما تا کنون مطالعه‌ای برای القاء کالوس و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کشت بافت گیاه نوروک که گیاهی بومی و در معرض خطر انقراض می‌باشد (Jalili & Jamzad, 1999) انجام نشده است. تنها پژوهش انجام شده مربوط به القاء کالوس از برگ نوروک و بهینه‌سازی آن به منظور تولید اسیدهای فنولیک است که در آزمایشگاه ما انجام شد و از بین

ریشه و برگ این گیاه روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* بررسی شده است که عملکرد آن مشابه برخی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Modarres & Abrishamchi, 2011; Modarres & Abrishamchi, 2009).

گونه‌های مختلف جنس سالیانولیک به‌عنوان منبع غنی از پلی‌فنل‌ها به‌شمار می‌روند. مهم‌ترین اسیدهای فنولیک دارویی در جنس سالیانولیک از گروه مونومرها (Monomer)، دایمرها (Dimer)، تریمرها (Trimer) و تترامرهای (Tetramer) کافئیک اسید (Caffeic acid) می‌باشند که شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید (Rosmarinic acid) و انواع سالیانولیک اسید (Salvianolic acid) می‌شوند (Lu & Foo, 2002).

گزارش‌های زیادی در رابطه با خواص دارویی مشتقات کافئیک اسید وجود دارد، به‌عنوان مثال خواص آنتی‌اکسیدانی، محافظت‌کنندگی عصبی در برابر ایسکمی (Ischemia)، ضد ویروسی، ضد ترومبوز (Thrombosis)، کاهش‌دهنده فشار خون و ضد سرطانی این ترکیب‌ها 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 القاء شده با آمیلوئید بتا (Amyloid) و افزایش عملکرد حافظه ثابت شده است (Shimojo et al., 2010).

رزمارینیک اسید و سالیانولیک اسیدها در انسان به‌طور چشمگیری تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدهای با وزن کم که در بیماری آرتریواسکلروزیس (Arteriosclerosis) نقش دارند را کاهش می‌دهد (Liu & Liu, 2002).

اثرات حفاظتی سالیانولیک اسیدها در مقابله با صدمات ناشی از ایسکمی در مغز موش ثابت شده است. به‌علاوه این ترکیب‌ها می‌توانند عملکرد یادگیری و حافظه را پس از ایسکمی به‌طور چشمگیری بهبود بخشند. همچنین

به محیط کشت MS، تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) در غلظت‌های (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و KIN (Kinetin) در غلظت (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد (جدول ۳ و ۵) و القای کالوس در آنها مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم ۱۳ تیمار شامل تنظیم‌کننده‌های رشد NAA (Naftalen acetic acid) در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (Benzylaminopurine) با غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) به صورت توأم، در محیط کشت MS برای القای کالوس از جداکشت‌های مذکور بررسی گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای حاوی هورمون‌های BAP و NAA

BAP0, NAA0	
BAP2, NAA0.5	BAP0.5, NAA0.5
BAP2, NAA1	BAP0.5, NAA1
BAP2, NAA1.5	BAP0.5, NAA1.5
BAP3, NAA0.5	BAP1, NAA0.5
BAP3, NAA1	BAP1, NAA1
BAP3, NAA1.5	BAP1, NAA1.5

از هر تیمار ۲۰ تکرار و در هر تکرار دو جداکشت، کشت شد. محیط کشت‌ها به شرایط تاریکی و دمای $24 \pm 1^\circ\text{C}$ منتقل شدند. پس از چهار هفته، وزن تر و خشک کالوس‌ها (پس از یخ زدن و خشک شدن در خلأ (Freeze dry): توسط دستگاه (Zirbus-technology- Germany)) به مدت ۳۶ ساعت در دمای 20°C ، اندازه‌گیری شد. همچنین درصد کالزایی برای هر تیمار و جداکشت برای ۵ تکرار محاسبه گردید.

به منظور تعیین غلظت کافیتیک 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 مناسب‌ترین کالوس به لحاظ بیشترین درصد کالزایی و وزن خشک، برای سنجش اسیدهای فنولیک انتخاب شد. هر یک از نمونه‌های کالوس پس از خشک شدن

۳۸ تیمار، بهترین تیمار برای تولید رزمارینیک اسید از برگ نوروژک بدست آمد (Modarres et al., 2013). هدف از این پژوهش القاء کالوس از مریستم انتهایی و رویان گیاه نوروژک و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از آنها در مقایسه با برگ گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذر و برگ گیاه نوروژک از منطقه کوهسنگی مشهد واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شده و برگ‌ها در سایه و دمای ۲۴ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. بذرها برای سرمادهی به مدت سه هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به جوانه‌زنی بسیار کم بذرها در شرایط درون شیشه‌ای از کشت رویان برای بدست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد.

برای کشت رویان، از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلایسین، ۲ گرم بر لیتر زغال فعال و ۷ گرم بر لیتر آگار استفاده شد. pH محلول روی ۵/۸ تنظیم شد (Modarres et al., 2007a). در ادامه ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند.

برای کشت رویان، ابتدا پوشش روی بذرها حذف شد و برای استریل شدن به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و ۵ دقیقه در آب زاول ۳٪ 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 بعد به شرایط ۱۶ و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی (۴۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه) و تاریکی و دمای $24 \pm 1^\circ\text{C}$ منتقل شدند. از مریستم انتهایی گیاهچه‌های ده روزه و نیز از رویان جدا شده از بذر برای ریزنمونه استفاده شد.

به منظور دسترسی به بهترین ترکیب هورمونی برای القای کالوس دو آزمایش جداگانه طراحی گردید. در آزمایش اول

استفاده ۳۳۰ نانومتر، طول زمان انجام HPLC، ۳۰ دقیقه، حجم عصاره تزریق شده ۲۰ میکرولیتر و دمای آن ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (Modarres *et al.*, 2013). میزان هر یک از فنولیک اسید تولید شده به ازای میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک محاسبه گردید. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای JMP و MSTATC استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن (P ۰/۰۵) انجام گردید.

نتایج

نتایج کالزایی در مریستم انتهایی

نتایج بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و Kin بر جداگشت مریستم انتهایی نشان داد، القاء کالوس از جداگشت مریستم انتهایی ۱۰ روز پس از کشت انجام شد. محاسبه درصد کالزایی پس از چهار هفته نشان داد که بیشترین درصد کالزایی (۹۴/۷۱٪) مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود و کالوس‌ها همگی کرم رنگ و نرم بودند.

بیشترین وزن تر و خشک نیز مربوط به تیمار مذکور بود که تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (P ۰/۰۵) (جدول ۲ و ۳ و شکل ۱). در محیط کشت MS بدون هورمون جداگشت مریستم انتهایی کالوس تولید نکرد.



شکل ۱- کالوس حاصل از کشت مریستم انتهایی در تیمار

۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D

توسط فریزدرای، از نظر میزان اسیدهای فنولیک در مقایسه با برگ گیاه نوروبزک در رویشگاه طبیعی مقایسه شدند.

استخراج عصاره فنلی

۰/۵ گرم از برگ یا کالوس‌های خشک شده پس از پودر شدن، با ۲۰ میلی‌لیتر اتانل ۶۰ درجه مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکاتور [Sonicator (Ultrasonic homogenizer)] قرار گرفت. در مرحله بعد حلال توسط دستگاه تبخیرگردان (Rotary-evaporator) حذف گردید و pH عصاره روی ۲ تنظیم شد. سپس اتیل استات (Ethyl acetate) در ۵ مرحله به آن اضافه شد و فاز اتیل استاتی جدا و تبخیر گردید. عصاره حاصل در متانول حل شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (Dong *et al.*, 2010).

آماده‌سازی استانداردها

محلول استوک (Stock) ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از استانداردهای کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید (Sigma-Aldrich co.UK) در محلول اتانل/آب (۷۰:۳۰ v/v) تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استانداردهای کافئیک اسید و سالویانولیک اسید 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.

شرایط کروماتوگرافی

برای جداسازی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC High performance liquid chromatography) (Knauer, Germany) مجهز به پمپ ۱۰۰۰، دتکتور PDA۲۸۰UV (Knauersmartline) و نرم‌افزار کروم گیت (Chromgate) استفاده شد. فاز ساکن ستون با مشخصات C18 (5μm, Macherey-Nagel) به ابعاد (۱۵۰×۴/۶mm)، فاز متحرک آب و اسید فسفریک ۰/۱٪ و متانول به صورت گرادپان با جریان فاز مایع یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول موج مورد

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات کالوس‌های مریستم انتهایی گیاه نوروژک

مجموع مربعات		درجه	منابع تغییر
وزن خشک	وزن تر	آزادی	
۰/۰۳۰۲۵۴ *	۳/۸۴۴۲۷ *	۶	تیمارها
۰/۰۰۰۱۳۰	۰/۰۰۹۷۸	۲۸	خطا
۱۵/۲۴	۱۱/۹		ضریب تغییرات

* معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

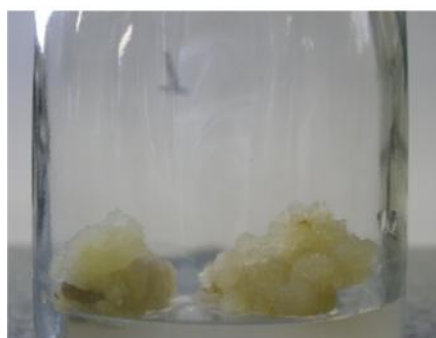
جدول ۳- مقایسه درصد کال‌زایی و خصوصیات کالوس‌های حاصل از جداکشت مریستم انتهایی در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D و Kin

وزن خشک کالوس (g)	وزن تر کالوس (g)	درصد کال‌زایی	نوع تیمار
۰ c	۰ c	۰	2,4-D 0+Kin0
۰/۰۴۸ c	۰/۴۹ c	۸۸/۸۸	2,4-D1+Kin0.3
۰/۰۲۶ c	۰/۲۵۱ c	۷۰/۰۰	2,4-D 2+Kin 0.3
۰/۰۱۹ c	۰/۱۹۲ c	۵۵/۲۵	2,4-D 3+Kin 0.3
۰/۰۳۰ c	۰/۳۲۳ c	۸۹/۵۶	2,4-D1+ Kin 1
۰/۲۲۶ a	۲/۲۸۱ a	۹۴/۷۱	2,4-D 2 +Kin 1
۰/۱۰ b	۱/۴۴۳ b	۷۸/۵۷	2,4-D 3 +Kin 1

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۴ و ۵ و شکل ۲). (P ۰/۰۵)

روی‌ان گیاه نوروژک در محیط‌های حاوی هورمون‌های BAP و NAA کالوس تولید نکرد و در همه تیمارهای مذکور کشت روی‌ان منجر به تولید گیاهچه گردید.



شکل ۲- کالوس حاصل از کشت جنین در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D

کشت مریستم انتهایی در محیط کشت حاوی هورمون‌های BAP و NAA (جدول ۳) بعد از یک هفته منجر به اندام‌زایی شد.

نتایج کال‌زایی در روی‌ان

کشت روی‌ان در اغلب محیط‌های کشت، گیاهچه تولید کرد. در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، روی‌ان‌ها تولید کالوس کردند. نتایج محاسبه درصد کال‌زایی بعد از چهار هفته نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۸۲/۳۵٪) در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D وجود داشت. همچنین نتایج آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک متعلق به تیمار مذکور بود که به لحاظ آماری با تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات کالوس‌های رویان گیاه نوروزک

مجموع مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
وزن خشک	وزن تر		
۰/۰۰۲۲۵۰ *	۰/۲۵۹۲۱۰ *	۱	تیمارها
۰/۰۰۰۲۶۶	۰/۰۰۱۰۷۱	۸	خطا
۲۱/۴۵	۸/۳۲		ضریب تغییرات

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۵- مقایسه درصد کالزایی کالوس‌های حاصل از رویان در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D و KIN

وزن خشک کالوس (g)	وزن تر کالوس (g)	درصد کالزایی	نوع تیمار
.	.	.	2,4-D 0+Kin0
.	.	.	2,4-D 1+Kin0.3
.	.	.	2,4-D 2+Kin 0.3
.	.	.	2,4-D 3+Kin 0.3
.	.	.	2,4-D 1+Kin 1
۰/۰۵۲ a	۰/۵۵۵ a	۸۲/۳۵	2,4-D 2 +Kin 1
۰/۰۲۴ b	۰/۲۳۲ b	۳۳/۳۳	2,4-D 3 +Kin 1

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

که سالویانولیک اسید B در کالوس مریستم انتهایی به میزان ۳/۳ برابر گیاه نوروزک بود، در حالیکه میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید آن کمتر از گیاه کامل بود. نتایج سنجش اسیدهای فنولیک در کالوس رویان نشان داد که مقدار کافئیک اسید در کالوس به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاه کامل بود، در حالیکه میزان رزمارینیک اسید در کالوس و گیاه نوروزک تفاوت معنی‌داری نداشت. در این کالوس، میزان سالویانولیک اسید B ناچیز بود (جدول ۶ و ۷).

نتایج تعیین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از مریستم انتهایی و رویان در مقایسه با برگ نوروزک در رویشگاه طبیعی کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های مریستم انتهایی و رویان در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، با توجه به وزن بیشتر و درصد کالزایی بالاتر ($P < 0.05$) برای تعیین غلظت اسیدهای فنولیک انتخاب شدند. غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌ها در مقایسه با برگ گیاه نوروزک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد

جدول ۶- تجزیه واریانس میزان اسیدهای فنولیک در کالوس‌های مریستم انتهایی، رویان و برگ گیاه نوروزک

مجموع مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
سالویانولیک اسید	رزمارینیک اسید	کافئیک اسید		
۰/۲۱۹۷۰۰*	۰/۹۴۲۵۰*	۰/۰۴۲۷۰۰*	۲	کالوس‌های مریستم انتهایی رویان و برگ
۰/۰۰۰۲۶۷	۰/۱۱۳۳۳	۰/۰۰۲۵۶۷	۶	خطا
۷/۵۲	۷/۳۹	۲۲/۳۷		ضریب تغییرات

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از مریستم انتهایی، رویان و برگ گیاه نوروبزک

نمونه گیاهی	کافئیک اسید (mg/gDW)	رزمارینیک اسید (mg/gDW)	سالویانولیک اسید B (mg/gDW)
کالوس رویان	۰/۳۹ a	۵/۳ a	۰ c
کالوس مریستم انتهایی	۰/۱۷ b	۳/۷ b	۰/۵۲ a
برگ	۰/۲ b	۴/۶۵ a	۰/۱۳ b

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

نتایج این پژوهش در مورد بررسی کالزایی رویان مشابه با پژوهش Liu و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد. در پژوهش مذکور رویان‌ها در دو وارته مختلف از گونه *S. splendens* در تیمارهای حاوی BAP و NAA تولید گیاهچه نمودند، در حالیکه در حضور هورمون 2,4-D کالوس تولید کردند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که برای تولید کالوس از رویان، وجود هورمون 2,4-D ضروریست (Vikrant, 2003). البته یافته‌های مشابهی نیز در مورد گیاه *Benincasa hispida* گزارش شده‌است (Thomas & Sreejesh, 2004).

باززایی از مریستم انتهایی در حضور هورمون‌های BAP و NAA توسط Chalabian و Ourmazd (۲۰۰۶) در گونه *S. nemoroza* نیز گزارش شده‌است. همچنین کالوس‌های حاصل از رویان و مریستم انتهایی هر دو کرم‌رنگ و ترد بودند و از نظر ظاهری شباهت زیادی داشتند. بررسی‌ها نشان داده است که 2,4-D از سنتز کلروفیل و تولید پروتوکلروفیلید (Protochlorophyllide) ۶۵۲ ممانعت می‌کند. تأثیر مشابهی هم توسط کلرامفنیکل (chloramphenicol) گزارش شده‌است. بنابراین ممکن است 2,4-D به‌طور مستقیم از طریق سنتز پروتئین پلاستییدی بازدارنده‌ای که مثل کلرامفنیکل عمل می‌کند سبب ممانعت از سنتز ALA (Amino levulinic acid) شده و از این طریق از سنتز کلروفیل جلوگیری کند (Shewry et al., 1971). به این ترتیب در این تحقیق ایجاد کالوس‌های کرم‌رنگ از مریستم انتهایی و رویان در محیط کشت واجد 2,4-D که در برابر نور نیز سبز نشدند قابل توضیح می‌باشد.

بررسی‌ها نشان داده‌است که اکسین‌های مختلف در رونویسی از ژن‌ها و افزایش تراز mRNA نقش دارند، ولی تنظیم افزایش mRNA در سلول به‌طور مستقیم 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 رویان در گیاه نوروبزک نسبت به اکسین‌های NAA و 2,4-D در ارتباط با این مسئله باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در هر دو نوع کالوس تولید گردید و سالویانولیک اسید B در کالوس حاصل از رویان وجود نداشت. در همه کالوس‌ها بیشترین اسید فنولیک تولید شده رزمارینیک اسید بود. میزان کافئیک اسید در همه کالوس‌ها در محدوده ۰/۱۷۵ تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در گرم بدست آمد، در حالیکه میزان آن در برگ نوروبزک ۰/۲ میلی‌گرم در گرم بود. گزارش‌های بسیار کمی در مورد تولید کافئیک اسید در کالوس گیاهان مختلف وجود دارد. طبق گزارش Santos-Gomes و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان تولید کافئیک اسید در کالوس حاصل از میان‌گره *S. officinalis* در محیط کشت MS به میزان ۰/۰۰۸ میلی‌گرم در گرم بود که کمتر از میزان تولید شده در کالوس‌های گیاه نوروبزک می‌باشد. همچنین طبق گزارش Kintzios و همکاران (۱۹۹۹) میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس‌های *S. officinalis* و *S. fruticosa* در محیط کشت MS حاوی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد که امکانات لازم را برای پیشبرد این پروژه فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Bulgakov, V.P., Inyushkina, Y.V. and Fedoreyev, S.A., 2012. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32: 203-217.
- Dong, U., Guowei, W. and Zongsuo, L., 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*, 148: 99-104.
- 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. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 61-65.
- DuzzoGamaro, 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. *International Scholarly Research Notices: Pharmacology*, 10: 1-6.
- 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.
- Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. *Red Data Book of Iran*. Research Institute of Forest and Rangeland, 215p.
- 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.
- Krajewska-Patan, A., Dreger, M., Górska-Paukszta, M., M cisz, A., Mielcarek, S., Baraniak, M., Buchwald, W., Marecik, R., Grajek, W. and Mrozikiewicz, P.M., 2007. *Salvia miltiorrhiza* KIN و 2,4-D به ترتیب ۲۹ گرم بر لیتر و ۲۵/۹ گرم بر لیتر بود. در این پژوهش میزان رزمارینیک اسید در کالوس‌های حاصل از رویان و مریستم انتهایی به ترتیب ۰/۵۲٪ و ۰/۳۷٪ بود، در حالیکه در کشت کالوس *S. miltiorrhiza* میزان رزمارینیک اسید در کالوس برگ و ساقه به ترتیب ۰/۲۸٪ و ۱/۲۷٪ گزارش شده است (Wu *et al.*, 2016). در توافق با نتایج ما میزان تولید سالویانولیک اسید B در کالوس *S. miltiorrhiza* (Morimoto *et al.*, 1994) در حالیکه Wu و همکاران (۲۰۱۶) میزان تولید سالویانولیک اسید B را در کالوس‌های برگ و ساقه *S. miltiorrhiza* به ترتیب به میزان ۰/۰۷٪ و ۰/۸۷٪ گزارش کردند.
- از آنجا که کافئیک اسید پیش‌ساز رزمارینیک اسید و رزمارینیک اسید پیش‌ساز سالویانولیک اسید B می‌باشد (Petersen, 2013) احتمالاً این واکنش‌ها در مریستم انتهایی با سرعت بیشتری انجام شده‌است، زیرا پس از چهار هفته از میزان کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در کالوس کاسته شده و میزان سالویانولیک اسید B بیشتری تولید شده‌است. در حالیکه در کالوس رویان تجمع کافئیک اسید و رزمارینیک اسید و عدم تولید سالویانولیک اسید B مشاهده شد. دلیل احتمالی این امر ممکن است تفاوت در بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مربوط به مسیر سنتزی اسیدهای فنولیک در جداکشت‌های مختلف باشد.
- به‌طور کلی براساس نتایج این تحقیق، کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های رویان و مریستم انتهایی گیاه نوروژک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN می‌تواند به‌طور مؤثری برای القاء کالوس با درصد کالزایی بالا و تولید اسیدهای فنولیک در محیط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان و کارکنان محترم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده داروسازی

- Salvia miltiorrhiza*. Journal of Natural Products, 57: 817-823.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
 - Ourmazd, P. and Chalabian, F., 2006. Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(2): 69-79.
 - Petersen, M., 2013. Rosmarinic acid, new aspects. Phytochemistry Reviews, 12: 207-227.
 - Rechinger, K.H., 1982. Flora Iranica. N.150 Labiatae. Tab 582 (Tabulate). Graz-Austria: AkademischeDruk-u,Verlagsantalt, 439p.
 - 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.
 - 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 of Plant Physiology, 160: 1025-1032.
 - Shewry, P.R., Pinfield, N.J. and Stobart, A.K., 1971. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyle)-trimethylammo chloride on chlorophyll synthesis in barley leaves. Planta, 101: 352-359.
 - 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.
 - Thomas, T.D. and Sreejesh, K.R., 2004. Callus induction and plant regeneration from cotyledoary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.). Scientia Horticulturae Journal, 100: 359-367.
 - Vikrant, R.A., 2003. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalumscrobiculatum*. Biologia Plantarum, 46: 297-300.
 - Wu, C.F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A.R. and Efferth, T., 2016. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acutelymphoblastic leukemia cells. Food chemistry, 201: 292-297.
 - Bunge in vitro cultivation in callus cultures. Herba Polonica Journal, 53: 88-96.
 - 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 Pharmaceutica Sinica B, 37: 81-85.
 - Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia*. Phytochemistry, 59: 117-40.
 - Modarres, M. and Abrishamchi, P., 2009. The effect of harvesting time on the antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. Leaf extract. Journal of Science Tarbiat Moallem University, 8(4): 343-356.
 - Modarres, M. and Abrishamchi, P., 2011. Antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. root extract in different stages of growth and development, 23(5): 707-717.
 - Modarres, M., Abrishamchi, P., Ejtehadi, H. and Ramezani, A., 2007a. Propagation of *Salvia leriifolia* by embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15(2): 129-141.
 - Modarres, M., Abrishamchi, P., Farhoosh R. and Ejtehadi, H., 2007b. Variation of antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. root and leaf extracts during the different stages of plant growth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23(3): 285-294.
 - Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Iranshahi, M. and Sahebkar, A., 2014. Simultaneous determination of Rosmarinic acid, Salvianolic acid B and Caffeic acid in *Salvia leriifolia* Benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. Journal of liquid chromatography and related techniques, 37(12): 1721-1730.
 - Modarres, M., Lahooti, M., Asili, J., Kafi, M. and Ramazani, A., 2013. Optimizing leaf callus culture in *Salvia leriifolia* for phenolic acids production. Journal of Plant Process and Function, 2(4): 65-74.
 - 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

Callus induction and phenolic acids production in apical meristem and embryo callus culture of *Salvia leriifolia* Benth.

M. Modarres^{1*}

^{1*}- Corresponding author, Department of Biology, Farhangian University, Tehran, Iran
E-mail: m_modarres70@yahoo.com, M.modarres@cfu.ac.ir

Received: April 2016

Revised: December 2016

Accepted: December 2016

Abstract

Salvia leriifolia Benth., belonging to Lamiaceae, has antinociceptive, anti-inflammatory, antidiabetic and antioxidant properties. In order to callus induction from apical meristem and embryo of *salvia leriifolia* to produce phenolic acids, an experiment was carried out in a completely randomized design. The apical meristem and embryo explants were cultured in MS medium supplemented with 2,4-D (0, 1, 2, 3mg/L), KIN (0, 0.3, 1mg/L), BAP (0, 0.5, 1, 2, 3mg/L) and NAA (0, 0.5, 1, 1.5mg/L). The fresh and dry weights were evaluated and accumulation of phenolic acids was measured after four weeks of culture by HPLC. The best treatments for callus induction and growth was at the 2,4-D 2mg/L and KIN 1mg/L. Accumulation of caffeic acid in embryo callus was higher than that of leaves of *Salvia leriifolias* and concentration of rosmarinic acid was comparable to the leaves. The highest salvianolic acid B concentration was found in callus of apical meristem that was about four times higher than that of leaves.

Keywords: Caffeic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, callus.