بررسی اثر الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید بر درصد زنده مانی سلول و میزان متابولیتهای ثانویه بتاکاریوفیلن و ایزوپولگون در کشت سلولی پونه (*Mentha pulegium*)

الهه درویشی[۱]، دانیال کهریزی[۱*]، صحبت بهرامی نژاد[۱] و محسن منصوری[۲]

[۱] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲۷

چکیده

کشت بافت و سلول گیاهی به عنوان یک روش پایدار برای بررسی متابولیتهای ثانویه گیاهی به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. به دلیل جایگاه مهم پونه (*Mentha pulegium*) در صنایع غذایی، دارویی و بهداشت، کشت سلولی آن به منظور بررسی تأثیر غلظتهای مختلف الیسیتورهای عصاره مخمر و اسید سالیسیلیک بر درصد زنده مانی سلولها و میزان متابولیتهای ثانویه ایزوپولگون و بتاکاریوفیلن انجام شد. از محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر بدون افزودن آگار به همراه غلظتهای مختلف الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید استفاده شد. پس از گذشت ده روز، میزان این دو متابولیت ثانویه با استفاده از GC-MS و درصد زنده مانی سلولها به وسیله تست تترازولیوم مورد بررسی قرار گرفت. در کشت سلولی، با افزایش غلظت هر دو نوع الیسیتور درصد زنده مانی سلولها کاهش و میزان متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن نسبت به گیاه طبیعی به طور معنی داری افزایش یافت (بیشترین مقدار این متابولیت، در کشت سلول حاوی ۸۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد). با توجه به اینکه افزایش مقدار متابولیتهای ثانویه هدف اصلی کشت سلول گیاهی است، استفاده از غلظتهای بالای الیسیتور برای افزایش بتاکاریوفیلن با وجود کاهش زنده مانی سلولها توجیه می‌شود. مقدار ایزوپولگون در گیاه طبیعی بیشتر از کشت سلول بود همچنین در کشت سوسپانسیون سلولی، با افزایش غلظت محرک عصاره مخمر و سالسیلیک اسید، میزان ایزوپولگون کاهش یافت بنابراین کشت سلول حاوی این دو الیسیتور به منظور افزایش این متابولیت ثانویه توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: پونه، کشت سلول، ایزوپولگون، بتاکاریوفیلن، زنده مانی سلول.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۲۲۲۳۵، پست الکترونیکی: dkahrizi@yahoo.com

مقدمه

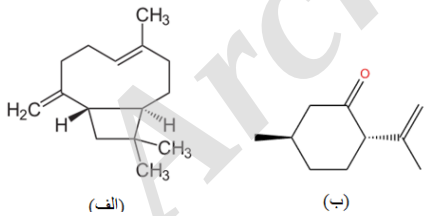
انسانها از دیرباز از گیاهان، به عنوان دارو در درمان بیماریها استفاده می‌کردند و در واقع گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی و از جمله ذخایر طبیعی در جهان هستند که به منظور تولید دارو به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته-اند (۹). گیاهان دارویی گیاهانی هستند که مواد مؤثره با ارزش دارویی تولید می‌کنند که این مواد مؤثره به صورت مستقیم یا غیرمستقیم اثر درمانی داشته و به عنوان دارو استفاده می‌گردند (۵). با وجود پیشرفتهای چشمگیر در زمینه سنتز مصنوعی مواد مؤثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی، تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند مانند برخی از داروهای سرطانی است. این دسته از مواد یا به طور کلی ساختار شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و

Archive of SID

www.SID.ir

یا به دلیل برخورداری از ساختار پیچیده، هزینه سنتز شیمیایی آنها بسیار بالاست. مواد مؤثره (متابولیتهای ثانویه) موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از حالت زیستی برخوردارند، لذا در بدن انباشته نمی‌شوند و اثرات جانبی از خود به جای نمی‌گذارند و این امر سبب برتری آنها نسبت به داروهای شیمیایی شده است (۹ و۱۶). اما مشکلاتی بر سر راه استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماریها وجود دارد از جمله: غلظت پایین ترکیبات دارویی در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، سرعت پایین تولید متابولیتهای ثانویه، تخریب روزافزون مراتع و نابودی گونه‌های متنوع گیاهی، مشکلات مرتبط با اصلاح و اهلی نمودن وکشت زراعی و گسترده این گیاهان (۲۴ و ۲۵). از این رو روشهایی که بتواند سبب کاهش این محدودیتها شوند و همچنین شناسایی، تولید و افزایش ترکیبات ثانویه را در گیاهان دارویی موجب گردند در حال گسترش می‌باشد. راهکارهای کشت سلول و بافت، مهندسی ژنتیک، استفاده از نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای مؤثر در تولید متابولیتها و افزایش بیان ژن قادر است کارآیی گیاهان را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد (۷، ۲۴، ۲۵ و ۲۹). کشت سلولهای گیاهی به عنوان یک روش پایدار در زمینه بررسی متابولیتهای گیاهی به طور گسترده در تولید مواد مؤثره با ارزش در اکثر گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است که با استفاده از آن، تولید با سرعت بالا وهزینه کم در محیطی کنترل شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی انجام می‌گیرد (۷، ۱۳، ۱۸، ۲۷، ۳۲، ۳۳ و ۳۶).

گیاه دارویی پونه (*Mentha pulegium*) از خانواده *Lamiaceae* به دلیل کاربردهای فراوان در صنایع دارویی، غذایی و ... جایگاه ویژه‌ای دارد. پونه گیاهی است علفی و بوته‌ای به ارتفاع تا ۶۰ سانتیمتر که به صورت خودرو در بسیاری از دشتها و اطراف جریانهای آبی می‌روید و تمام اعضای هوایی گیاه خاصیت دارویی دارند از گیاه پونه به عنوان دارویی با اثرات ضد درد، ضد باکتری، قارچ‌کش، مقوی معده، ضد نفخ، ضد اسپاسم و ضد التهاب و... استفاده می‌شود (۸). این گیاه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد و به همین دلیل رادیکالهای آزاد را به دام انداخته و با حذف اثرمولکولهای فعال و آسیب رسان به DNA و پروتئینها اثر خود را اعمال می‌کند (۲۶ و ۳۴). ترکیبات اصلی پونه شامل آلفا پینن، بتا پینن، لیمونن، منتون، منتول، پولگون، ایزوپولگون و بتاکاریوفیلن می‌باشد. در این تحقیق میزان دو ماده مؤثره بتاکاریوفیلن و ایزوپولگون (شکل ۱) در کشت سلولی پونه مورد بررسی قرار گرفت. ایزوپولگون یکی از متابولیتهای ثانویه مهم گیاه پونه است که علاوه بر پونه در اسانس گیاهان دیگری نظیر زنجبیل و نعناع و ... وجود دارد. در صنعت از ایزوپولگون به عنوان عطر گیاهی و طعم دهنده استفاده می‌شود، همچنین به دلیل سمی بودن ایزوپولگون درغلظتهای بالا، به عنوان ترکیب آنتی باکتریال کاربرد دارد (۱۵، ۳۰ و ۳۱). متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن به دلیل داشتن خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد افسردگی، ضد اضطراب و ... در صنایع دارویی کاربرد فراوان دارد. بتاکاریوفیلن به صورت آگونیست گیرنده نوع دو کانابینویید عمل می‌کند. این ماده در گیاهان زیادی از جمله شاهدانه، رزماری میخک، پونه و ... وجود دارد (۱۴، ۲۰ و ۲۳).



(الف) (ب)

شکل ۱- ساختار شیمیایی (الف) بتاکاریوفیلن و (ب) ایزوپولگون (http://www.chemsynthesis.com)

با توجه به کاربردهای فراوان و اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی در صنایع، امروزه کشت سلول گیاهی به منظور افزایش کمیت و کیفیت متابولیتهای ثانویه گیاهان دارویی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. شرایط محیط کشت نظیر دما، نور، pH و اکسیژن تأثیرات مهمی بر رشد سلولها و تجمع متابولیتهای ثانویه دارند (۴). همچنین استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

الیسیتورهای زنده با منشای قارچی، باکتریایی و مخمر و الیسیتورهای غیر زنده نظیر پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئینها، اشعه ماورابنفش، نمک فلزات سنگین، آنزیمهای غیر فعال شده و بعضی از ترکیبات شیمیایی با مکانیسم عمل متفاوت (مانند: جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، نیترات، اسید سیتریک و...) به منظور افزایش تولید ترکیبات ثانویه در کشت سلول و بافت گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳ و ۳۶). در این مطالعه، در کشت سلول از دو الیسیتور عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید در غلظتهای متفاوت به منظور افزایش متابولیتهای ثانویه استفاده شد.

به دلیل کاربردهای متعدد گیاه پونه در صنایع غذایی و دارویی، و همچنین اهمیت کشت بافت و سلول گیاهی برای افزایش متابولیتهای ثانویه گیاهی و خارج از فصل رشد گیاه، در این تحقیق، کشت سلول پونه به منظور بررسی تأثیر غلظتهای مختلف الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان دو ماده مؤثره ایزوپولگون و بتا کاریوفیلن و همچنین درصد زنده مانی سلولها صورت گرفت.

مواد و روشها

القای کالوس و کشت سلول: برای تهیه محیط کشت پایه سوسپانسیون سلولی، بهترین محیط کشت کالوس زایی بدون افزودن آگار مورد استفاده قرار گرفت. از قطعات کالوس تولید شده از ریز نمونه های ساقه، برگ و ریشه مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین کالوسها به منظور کشت سلول، از ریز نمونه ساقه در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر به دست آمدند. این کالوسها بسیار ترد و شکننده و به رنگ کرمی روشن بودند و به منظور کشت سوسپانسیون سلولی به محیط کشت مایع حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر منتقل شدند. pH محیط کشت توسط pH متر و با استفاده از اسید HCL و باز NaOH روی ۵/۸ تنظیم شد. کالوسهای سفید و ترد که برای کشت سلول مناسب بودند به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع، در شرایط کاملاً استریل (زیر هود لامینار) اضافه شدند. از الیسیتورعصاره مخمر با غلظتهای ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر و الیسیتور سالسیلیک اسید با غلظتهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر لیتر (با توجه به غلظتهای مورد استفاده از این الیسیتورها در مقالات مختلف به منظور کشت سلولی گیاهان مختلف) در این آزمایش استفاده گردید که بعد از اتوکلاو شدن، زیر هود بیولوژیکی به ارلن محیط کشت سلولی حاوی سلولهای پونه اضافه شدند و درب ارلنها با فویل آلومینیومی پوشیده و با چسب پارافیلم درزگیری شده و روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱±۲۵ قرار داده شدند و بازکشت آنها به محیط کشت مایع تازه حاوی همان غلظت الیسیتور، هر ۱۴ روز یکبار انجام گرفت.

اندازه گیری متابولیتهای ثانویه: برای بررسی اثر محرکهای مختلف بر میزان متابولیتهای ثانویه از دستگاه GC-MS استفاده شد که درصد دقیق مواد مؤثره را مشخص می‌کند. بعد از گذشت ده روز از کشت کالوسها در محیط کشت سوسپانسیون، سلولهای پونه با استفاده از کاغذ صافی از محیط کشت سوسپانسیون جدا شدند و با استفاده از فریزدرایر به مدت ۲۴ ساعت آبگیری شده و سپس با دستگاه میکروکلونجر اسانس گیری شدند. اسانس حاصل از سلولهای پونه، با دستگاه GC-MS مورد ارزیابی و تجزیه قرار گرفت. به منظور ارزیابی مواد مؤثره اسانس، از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Hewlett-Packard-5890 دارای سیستم تله یونی استفاده گردید که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتی گراد برای تولید منبع یون تنظیم گردید. رقیق کردن نمونه‌ها به روش شکافت با نسبت ۱:۱۰۰ انجام شد. ستون موئینه به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲ میلی متر و ضخامت فیلم ۲۵ میکرومتر و ذرات از جنس متیل سیلیکون کراس لینک شده می‌باشند. دتکتور از نوع انتخاب‌گر جرمی (HP-5970 mass-selective detector-

Archive of SID

www.SID.ir

(USA) می‌باشد. برنامه حرارتی از ۱۰۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با تغییرات ۴ درجه در دقیقه استفاده شد. با استفاده از این دستگاه، مواد بر اساس تعداد اتمهای تشکیل دهنده و متناسب با وزن مولکولی از هم جدا می‌شوند. غلظت دقیق مواد مختلف با این دستگاه مشخص می‌شود. در واقع این دستگاه در جهت شناسایی و تعیین کمیت ترکیبات موادی که حالت فرار دارند (مانند اسانسهای گیاهی با نقطه جوش پایین) به کار می‌رود (۲۷).

بررسی قدرت زنده مانی سلولها: به منظور بررسی میزان زنده مانی سلولها از تست تترازولیوم استفاده شد. برای این تست از تری فنیل تترازولیوم کلراید استفاده گردید. تترازولیوم ماده بیرنگ در شرایط اکسید بوده و به محض احیاء شدن به رنگ صورتی یا قرمز در می‌آید (۲۸). از این ویژگی محلول تترازولیوم برای آزمایش زنده مانی سلولها استفاده می‌شود. در تست تترازولیوم، از غلظت ۶ میلی‌گرم بر لیتر تترازولیوم استفاده شد. بعد از گذشت ده روز از کشت سلول، ۰/۷۵ میلی لیتر از محیط کشت سوسپانسیون که حاوی سلول است با ۱/۵ میلی لیتر از محلول تترازولیوم ترکیب شده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس چند قطره از این محیط کشت مایع حاوی سلولهای پونه روی لام قرار داده شده و با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۷۶۰ مورد بررسی قرار گرفتند. سلولهای زنده که کاملاً قرمز رنگ شدند شمارش شده (نسبت سلولهای زنده به مرده در هر لام زیر میکروسکوپ مشاهده شد) و اعداد به دست آمده با نرم افزار SAS مورد تجزیه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار و سه تکرار بود. به منظور تجزیه داده‌ها از نرم افزار SAS و برای مقایسه میانگین از روشن LSD استفاده شد.

نتایج و بحث

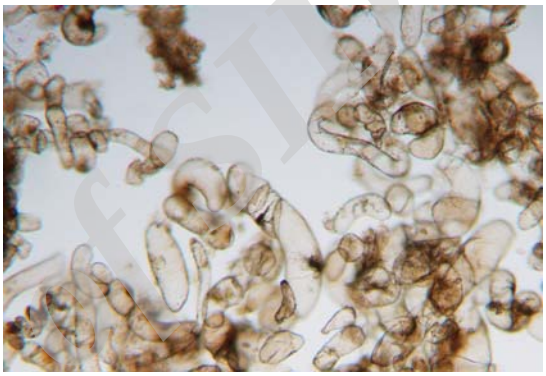
با توجه به کاربردهای فراوان و اهمیت اقتصادی گیاه دارویی پونه (*Mentha pulegium*) در صنایع، با استفاده از کشت سلول گیاهی می‌توان کمیت و کیفیت متابولیتهای ثانویه این گیاه دارویی را به میزان قابل توجهی افزایش داد. در این تحقیق از دو الیسیتور سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر در کشت سلولی پونه به منظور افزایش متابولیتهای ثانویه و بررسی تأثیر این دو الیسیتور روی درصد زنده مانی سلولهای پونه استفاده شد. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی است که می‌تواند به عنوان تنظیم کننده رشد عمل نماید زیرا باعث بروز تنش در گیاهان و القای مسیرهای بیوسنتزی تولید متابولیتهای ثانویه جهت مقابله با تنش می‌شود. امروزه کاربرد سالیسیلیک اسید به عنوان یکی از هورمونهای گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان به تنشها به اثبات رسیده است (۲۱). مطالعات متعدد نشان داده است که سالیسیلیک اسید به عنوان یک عامل تنشی در تحریک تولید بسیاری از متابولیتهای ثانویه مثل ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها مؤثر می‌باشد (۲۲). باتوجه به اینکه مخمر یک موجود زنده می‌باشد، استفاده از عصاره مخمر در محیط کشت سوسپانسیون سلولی می‌تواند به عنوان یک تنش زیستی برای سلولهای کشت داده شده تلقی گردد و با توجه به اینکه متابولیتهای ثانویه همیشه و در همه بخشهای گیاه تولید نمی‌شوند بلکه به سرعت در پاسخ به تنشهای زیستی مثل آلودگیهای میکروبی و حمله حشرات و همچنین در پاسخ به تنشهای غیر زیستی مثل سرما، گرما، آسیب فیزیکی و فشار شدید اسمزی تولید می‌شوند (۱ و۳۵)، بنابراین ممکن است مخمر با ایجاد تنش، بر تولید متابولیتهای ثانویه مؤثر باشد. در مطالعات بسیاری، از عصاره مخمر برای افزایش میزان متابولیتهای ثانویه استفاده شده است.

بررسی زنده مانی سلولها: آزمون تترازولیوم ابزاری دقیق و سریع برای تخمین قابلیت حیات است. اساس این آزمون تمایز سلولهای مرده و زنده براساس میزان تنفس نسبی آنها در شرایطی است که آب جذب کرده باشند. با توجه به

Archive of SID

www.SID.ir

اینکه سلولهای زنده دارای تنفس بوده و در طول تنفس یونهای+H تولید می‌نماید و موجب احیای محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید شده (۲۸) و در نتیجه سلولهای زنده قرمز رنگ و مشخص می شوند (شکل ۲). نتایج حاصل از تست تترازولیوم و بررسی درصد زنده مانی سلولها، در محیط کشت سوسپانسیون نشان داد که با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، پس از گذشت ده روز از کشت سلولها، تفاوت بسیار معنی‌داری در قدرت زنده مانی سلولها در غلظتهای مختلف الیسیتور وجود دارد.



شکل ۲- نمایی از سلولهای گیاه پونه بعد از اضافه کردن تترازولیوم

با توجه به جدول مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با غلظتهای الیسیتور متفاوت (جدول ۲)، بیشترین قدرت زنده مانی سلولها در محیط کشت بدون الیسیتور دیده شد و کمترین درصد زنده‌مانی هم در تیمارهای مخمر با غلظت ۸۰ و سالیسیلیک اسید با غلظت ۸ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. در واقع با افزایش غلظت هر دو نوع الیسیتور، درصد زنده مانی سلولها کاهش یافت. لازم به ذکر است تا به حال تست تترازولیوم و بررسی زنده مانی سلولهای پونه در کشت سوسپانسیون، انجام نگرفته است و این تحقیق اولین بار است که در کشت سلول گیاه پونه انجام شده است، اما در برخی گیاهان این آزمون انجام شده است.

اسمعیل زاده بهابادی و رضایی نودهی (۱۳۹۳) تأثیر محرک سالیسیلیک اسید بر زنده مانی سلولهای گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که قدرت زنده مانی سلولها درتیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های حاوی الیسیتور بود (۱)، که این نتیجه مطابق با نتیجه به دست آمده در این تحقیق و درصد زنده مانی سلولهای گیاه پونه در کشت سوسپانسیون می‌باشد. سالیسیلیک اسید در غلظتهای بالا باعث تخریب غشای سلولی و مرگ سلول می‌شود. همچنین باعث تولید پراکسید هیدروژن می‌شود و مطالعات نشان داده است که بین گونه های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد (۲ و ۱۹).

کاظمی (۱۳۹۳) تأثیر محرک سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر و اسید سیتریک را بر زنده مانی سلولهای گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) مورد بررسی قرار داد و گزارش کرد که قدرت زنده مانی سلولها درتیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های حاوی الیسیتور بود (۱۰).

تحصیلی (۱۳۹۳) کشت سلولی کتان سفید (*Linum album.*) را مورد بررسی قرار داد و از اجزای جدا شده قارچ *Fusarium graminearum* به عنوان الیسیتور استفاده کرد و گزارش کرد که قدرت زنده مانی سلولها در نمونه های حاوی الیسیتور کمتر از تیمار شاهد بود (۶).

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد زنده مانی سلولها در کشت سوسپانسون حاوی غلظتهای مختلف الیسیتور در گیاه پونه (*Mentha pulegium*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد زنده مانی سلول
تیمار	۸	۷۰۱/۱۱**
خطا	۱۸	۱۷/۶۴
ضریب تغییرات		۵/۸۷

** تفاوت بسیار معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی سلولها در کشت سوسپانسیون گیاه پونه (*Mentha pulegium*) حاوی غلظتهای مختلف الیسیتور

محرکهای محیط کشت (mg/l)	درصد زنده مانی سلولها
مخمر ۲۰	۸۴/۹۶۷^{ab}
مخمر ۴۰	۷۶/۶۶۷^{bcd}
مخمر ۶۰	۶۷/۱۶۷^{d}
مخمر ۸۰	۵۱/۸۳۳^{e}
SA۲	۸۰/۰۳۳^{bc}
SA۴	۷۴/۵۳۳^{cd}
SA۶	۶۹/۳۳۳^{d}
SA۸	۴۵/۶۳۳^{e}
Free	۹۳/۸۶۷^{a}

اعدادی که دارای حروف مشابه هستند در سطح ۱ درصد با یکدیگر اختلاف ندارند.

SA: سالیسیلیک اسید، Free : محیط کشت مایع فاقد الیسیتور

در تمامی مطالعات ذکر شده، درصد زنده‌مانی سلولها با افزایش غلظت الیسیتور در محیط کشت به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارند. در واقع کاهش درصد زنده مانی سلولها در محیط کشت سلولی حاوی الیسیتور، می‌تواند به دلیل ایجاد تنش زیستی توسط الیسیتورها باشد. هر چه غلظت الیسیتورها افزایش یابد شدت تنش زیستی بیشتر و مرگ سلولی افزایش می‌یابد.

بررسی میزان متابولیتهای ثانویه: تا به حال، در حوزه کشت سلول و بررسی متابولیتهای ثانویه پونه آزمایشات کمی صورت گرفته است. در مورد کشت سلول پونه و بررسی متابولیتهای ثانویه ایزوپولگون و بتا کاریوفیلن در پونه هیچ نتیجه‌ای در دست نیست. در واقع این تحقیق برای اولین مرتبه در مورد بررسی این دو متابولیت ثانویه در کشت سلول گیاهی صورت گرفته است.

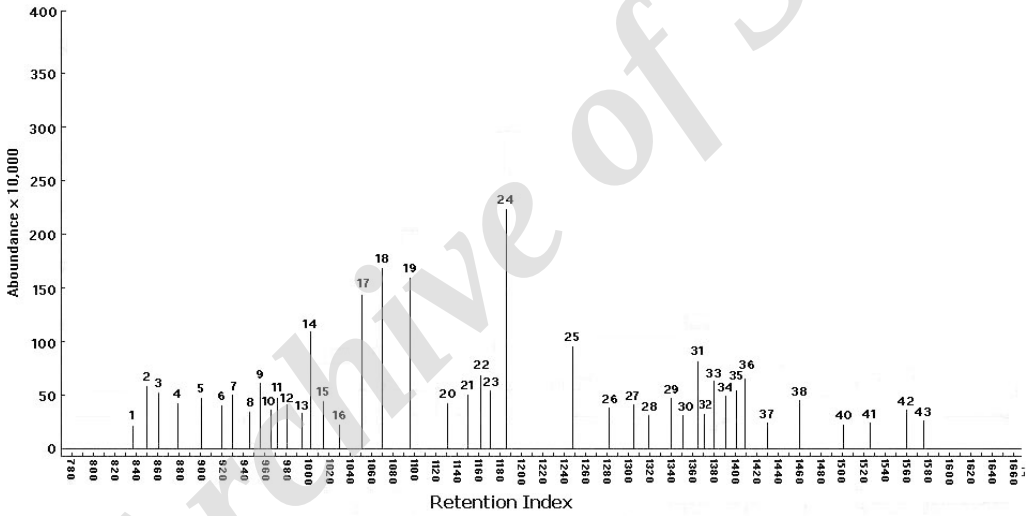
گیاهان قابلیت فرار از تنشهای مختلف را ندارند، اما مکانیسمهایی جهت شناسایی و مواجهه با انواع تنشها و افزایش سازگاری و تحمل برای به حداقل رساندن آسیب را دارند. تولید و افزایش متابولیتهای ثانویه، تعادل اسمزی، فعال شدن برخی آنزیمهای خاص، تغییر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و ... از جمله این مکانیسمها هستند(۱۱ و ۱۲). در کشت سلول گیاهی نیز از الیسیتورهای مختلف به منظور ایجاد تنش برای افزایش متابولیتهای ثانویه گیاهی استفاده می‌شود. در این تحقیق برای بررسی اثر محرکهای مختلف بر میزان متابولیتهای ثانویه گیاه دارویی پونه از دستگاه GC-MS استفاده شد و درصد دقیق مواد مؤثره در کشت سلولی مشخص شد. شناسایی هر ترکیب بر اساس زمان باز داری و جرم ثبت شده آن‌ها انجام گردید (شکل ۳ و جدول ۳). با توجه به جدول ۴ اثر سطوح مختلف الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید در محیط کشت بر ترکیبات مؤثره ایزوپولگون و بتا کاریوفیلن، مشخص شد که بین سطوح مختلف محرک در محیط کشت برای صفت درصد متابولیتهای ثانویه، تفاوت بسیار معنی داری وجود دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- مقدار به دست آمده دو متابولیت ثانویه بتا کاریوفیلن و ایزوپولگون در کشت سلولی پونه با استفاده از دستگاه GC-MS در تکرار اول، SA: سالیسیلیک اسید، Free: محیط کشت سلولی فاقد الیسیتور

محرکها در کشت سلولی (mg/l)	β-caryophyllene (٪)	Isopulegone (٪)
Free	۱/۳	۸/۳
مخمر ۲۰	۰/۸	۷/۸
مخمر ۴۰	۰/۸	۷/۵
مخمر ۶۰	۰	۶/۹
مخمر ۸۰	۱/۶	۵/۷
SA ۲	۰/۸	۷/۷
SA ۴	۱	۶/۳
SA ۶	۰/۹	۵/۲
SA ۸	۱/۳	۵/۹
گیاه طبیعی	۱/۱	۷/۷



شکل ۳ – طیف نگاری جرمی توده سلولی حاصل از کشت سلول پونه (*Mentha p.*) حاوی ۲mg/l الیسیتور سالیسیلیک اسید، شناسایی هر ترکیب بر اساس زمان باز داری و جرم ثبت شده آن‌ها انجام گردید، بتا کاریوفیلن با اندیس بازداری ۱۴۳۱ (پیک شماره ۳۷)، ایزوپولگون با اندیس بازداری ۱۰۷۰ (پیک شماره ۱۸)

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف الیسیتور بر ترکیبات مؤثره گیاه پونه (*Mentha p.*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	β-caryophyllene	Isopulegone
الیسیتور	۹	۰/۵۳۳ **	۳/۳۷۴ **
خطا	۲۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷
انحراف معیار		۷/۱۴۱	۱/۲۴

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

Archive of SID
www.SID.ir

در این تحقیق، کمترین میزان ماده مؤثره ایزو پولگون در اسانس سلولها (۵/۲۱ درصد) در کشت سلولی حاوی الیسیتور سالیسیلیک اسید با غلظت mg/l ۶ و بیشترین مقدار این ماده (۸/۲۸ درصد) در کشت سلولی بدون الیسیتور مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف الیسیتور بر ترکیبات مؤثره گیاه پونه (Mentha p.)

محرکها (mg/l)	β-caryophyllene (٪)	Isopulegone (٪)
Free	۱/۲۸ b	۸/۲۸ a
مخمر ۲۰	۰/۸ e	۷/۷۸ b
مخمر ۴۰	۰/۸۱ e	۷/۵ c
مخمر ۶۰	۰/۸۹ e	۶/۸۹ d
مخمر ۸۰	۱/۵۹ a	۵/۶۹ f
SA ۲	۰/۸۲ e	۷/۷ b
SA ۴	۱ cd	۶/۲۶ e
SA ۶	۰/۸۷ e	۵/۲۱ g
SA ۸	۱/۳ b	۵/۸۶ f
گیاه طبیعی	۱/۱۱ c	۷/۷۱ b

اعدادی که دارای حروف مشابه هستند در سطح ۱ درصد با یکدیگر اختلاف ندارند

SA: سالیسیلیک اسید، Free : محیط کشت مایع فاقد الیسیتور

تجزیه رگرسیون نشان داد که میزان این ماده مؤثره و محرک سالسیلیک اسید داری رابطه رگرسیونی X ۰/۸۰۶-۷/۹۰۵= Y و ضریب تبیین ۶۴ درصد بوده است. ضریب تبیین نشان می‌دهد که ۶۴ درصد از تغییرات مقدار متابولیت ثانویه ایزوپولگون در کشت سلولی، مربوط به الیسیتور سالسیلیک اسید بوده است در واقع غلظتهای بالای سالیسیلیک اسید باعث ایجاد تنش و تغییر در مسیر سنتزی و کاهش میزان این متابولیت ثانویه شده است اما عوامل دیگری غیر از الیسیتور بر میزان متابولیت ثانویه تأثیر دارد. ۳۶ درصد از تغییرات مقدار ایزوپولگون در کشت سلولی، می‌تواند مربوط به سایر شرایط محیطی مانند دما، نور، pH و ... باشد. همچنین تجزیه رگرسیون نشان داد که میزان ماده مؤثره و محرک عصاره مخمر داری رابطه رگرسیونی X ۰/۹۵۷-۸/۶۸۴= Y و ضریب تبیین ۹۱ درصد بوده است که نشان می‌دهد ۹۱ درصد از تغییرات این ماده مربوط به تغییرات غلظت الیسیتور عصاره مخمر است. در واقع با افزایش غلظت محرک عصاره مخمر و سالسیلیک اسید، میزان این ماده مؤثره کاهش یافته است. لازم به ذکر است که مقدار ایزوپولگون در گیاه طبیعی بیشتر از کشت سلول بود بنابراین کشت سلول به منظور تولید این متابولیت ثانویه توجیه خاصی ندارد بلکه تخلیص این متابولیت از گیاه طبیعی راحتتر و مناسب‌تر به نظر می‌رسد. همچنین ممکن است استفاده از سایر محرکهای زنده و غیر زنده، نتایج دیگری در مورد مقدار این متابولیت ثانویه درکشت سلول، در مقایسه با گیاه طبیعی داشته باشد که نیاز به انجام تحقیقات بیشتر دارد.

با توجه به جدول ۵ میزان متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن در الیسیتور عصاره مخمر با غلظت ۸۰mg/l بیشتر از سایر محرکها و گیاه طبیعی بود (۱/۵۹ درصد). با افزایش غلظت هر دو نوع الیسیتور افزایش تولید بتاکاریوفیلن مشاهده شد. میزان این متابولیت ثانویه در کشت سلولی بیشتر از گیاه طبیعی بود. پس استفاده از غلظتهای بالای این محرکها برای افزایش میزان بتا کاریوفیلن توصیه می‌شود. با توجه به

Archive of SID

www.SID.ir

اهمیت و کاربردهای بتاکاریوفیلن در صنایع دارویی (با خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد افسردگی، ضد اضطراب و ...)، کشت سلول پونه به منظور افزایش مقدار این متابولیت ثانویه توصیه می‌شود.

لازم به ذکر است با وجود اثر منفی غلظتهای بالای الیسیتورهای مورد استفاده در این تحقیق بر درصد زنده مانی سلولها در کشت سوسپانسیون سلولی، کمیت متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن نسبت به گیاه طبیعی به طور معنی دار افزایش یافته است و این افزایش متابولیت ثانویه به دلیل ایجاد تنش در محیط رشد سلولی و تحریک سلول برای ساخت این متابولیت در پاسخ به تنش می‌باشد (۲۱ و ۲۲). در واقع با ایجاد تنش تعدادی از سلولها از بین می-روند اما به دلیل اینکه هدف اصلی از کشت سلول، افزایش متابولیت ثانویه است و این نتیجه در غلظتهای بالای الیستورها با وجود کاهش درصد زنده مانی سلولها به دست آمده است، استفاده از غلظتهای بالا را توجیه می‌کند. مسیر سنتزی متابولیت بتاکاریوفیلن فعال شده است اما در مورد ایزوپولگون نتیجه عکس مشاهده شد و با توجه به فقدان مطالعات و تحقیقات در مورد این متابولیت، برای بررسی علت این نتیجه، بررسیهای بیشتری باید صورت گیرد.

کاظمی در سال ۱۳۹۳ تأثیر محرک سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر و اسید سیتریک را در کشت سلولی گیاه دارویی زیره سبز (Cuminum cyminum L) بررسی کرد و نشان داد که متابولیتهای ثانویه این گیاه در کشت سلولی حاوی الیسیتورهای ذکر شده به طور معنی‌داری بیشتر از شرایط کشت سلولی بدون الیسیتور و گیاه طبیعی بود و مؤثر بودن این الیسیتورها برای ایجاد تنش زیستی و افزایش متابولیتهای ثانویه گیاهی را گزارش کرد (۱۰).

درویشی و همکاران افزایش تعدادی از متابولیتهای ثانویه پونه را در سال ۲۰۱۶ در کشت سلولی حاوی دو الیسیتور عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید گزارش کردند (۱۷)، اما در مورد این دو متابولیت ثانویه هیچ گزارشی در دست نیست، بنابراین برای اثبات نتایج حاصل از این تحقیق و یافتن بهترین الیسیتور و بهترین غلظت آنها نیاز به بررسی شرایط مختلف آزمایشگاهی و غلظتهای مختلف این الیسیتورها و الیسیتورهای مختلف ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری کلی: استفاده از غلظتهای بالای دو الیسیتور سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر، درصد زنده مانی سلولها را کاهش داد اما میزان متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن نسبت به گیاه طبیعی به طور معنی داری افزایش یافت و این نتیجه، استفاده از غلظتهای بالای این الیسیتورها را توجیه می‌کند. زیرا هدف اصلی کشت سلول گیاهی، افزایش مقدار متابولیتهای ثانویه است. اما در مورد ایزوپولگون با افزایش غلظت الیسیتورها، هم درصد زنده مانی سلولها و هم میزان این متابولیت ثانویه کاهش یافته است و همچنین میزان ایزوپولگون در گیاه طبیعی بیشتر از کشت سلول بود. بنابراین استفاده از کشت سلول به منظور افزایش این متابولیت با این دو الیسیتور توصیه نمی‌شود. با توجه به اهمیت این دو متابولیت ثانویه در صنعت و با توجه به اینکه هیچ تحقیقی در مورد کشت سلول گیاهی به منظور افزایش این دو متابولیت صورت نگرفته است، برای یافتن بهترین شرایط و نوع و غلظت الیسیتور، به بررسیها و مطالعات بیشتر نیاز می باشد.

منابع

۱- اسمعیل زاده بهابادی، ص.، رضایی نودهی، آ .۱۳۹۳ . افزایش تولید تری گونلین تحت تأثیر سالیسیلیک اسید در کشت سلولی شنبلیله (*Trigonella foenum- graecum*). مجله سلول و بافت. جلد ۵. شماره ۲. صفحه ۱۶۵-۱۷۲.

۲- اسمعیل زاده بهابادی، ص.، شریفی، م. ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت. جلد ۴. صفحه ۱۲۸-۱۱۹.

Archive of SID
www.SID.ir

۳- آشتیانی، س.، حسنلو، ط.، بی‌همتا، م. ۱۳۸۸. به کارگیری عصاره مخمر به عنوان یک راهکار به منظور افزایش محتوای فلاونولیگنان ها در کشت تعلیقی سلولی گیاه خار مریم از طریق مکانیزم تحریک. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره صفحه۳۲. ۱۱۹-۱۰۸.

۴- اصغری، غ.، قاسمی، ن.، شفیعی، م. ۱۳۸۱. تاثیر نور، دما و pH بر تولید، فلاونولیگنان‌ها در کشت سلولی گیاه خار مریم. پژوهش در علوم پزشکی. شماره ۴. صفحه ۱۰۲-۱۰۰.

۵- امیدبیگی، ر. ۱۳۷۴ . تولید و فرآوری گیاهان دارویی .جلد دوم. انتشارات آستان قدس رضوی.

۶- تحصیلی، ژ. ۱۳۹۳. تأثیر اجزای دیواره قارچ فوزاریوم (*Fusarium graminearum*) بر بیوسنتز لیگنانها و فعالیت و بیان ژن آنزیمهای کلیدی در گیاه *Linum album*. پایان نامه دکترا. دانشگاه تربیت مدرس.

۷- حبیبی خانیانی، ب.، معینی، ا.، عبدالهی، م. ۱۳۸۴ . تولید متابولیتهای ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلولهای گیاهی .فصلنامه گیاهان دارویی .سال چهارم .شماره ۱۴. صفحه ۱-۶.

۸- طهوری، ه. ۱۳۸۹. دایره المعارف گیاهان دارویی. انتشارات پدیده دانش. ۵۲۰ صفحه.

۹- قاسمی، ع. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر(شناخت و بررسی اثرات آنها). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد.

۱۰- کاظمی، ن. ۱۳۹۳. القاء کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد. موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه.

۱۱- میرزایی، م.، معینی، ا.، قناتی، ف. ۱۳۹۲. اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه های کلزا (*Brassica napus*). مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۶. شماره ۱. صفحه ۹۸-۹۰.

۱۲- نورانی آزاد، ح.، کفیل زاده، ف. ۱۳۹۰. تأثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه های فتوسنتزی و برخی آنزیمها در گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L). مجله زیست شناسی ایران. شماره ۶. صفحه ۸۵۸-۸۶۷

13-Alfermann, AW., Petersen, M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 43:199-205.

14-Bahi, A., Al Mansouri, Sh., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain, M., Ojha Sh. 2014. β-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. Physiology and Behavior. 135: 119–124.

15-Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A., Feio, S., Tomi, F., Casanova, J. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. Flavor and Fragrance Journal. 22:139–144.

16-Chavala, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publisher. Enfield, USA. 363.

17- Darvishi, E., Kahrizi, D., Bahraminejad, S., Mansouri, M. 2016. *In vitro* induction of α-pinene, pulegone, menthol, menthone and limonene in cell suspension culture of pennyroyal (Mentha pulegium). Cellular and Molecular Biology. 62 (3): 7-9.

18-Dornenburg, H., Knorr, D. 1996. Production of the phenolic flavor compounds with cultured cell and tissue of *Vanilla planifolia* species. Food Biotechnology.10:75-92.

19-Gao, CJ., Xing, D., Li, LL. and Zhang, LR. 2008. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C over exposure. Planta. 227: 755-767.

20-Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105 (26): 9099–9104.

21- Haynes, W. M. 2011. CRC Handbook of Chemistry and Physics (92nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. 3: 306-311.

22- Kang, S., Jung, H., Bahk. J. and Yang, J. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of *PMT* and *H6H* in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science.; 166: 745-751.

23-Katsuyama, S., Mizoguchi, H., Kuwahata H. 2013. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β-caryophyllene-induced antinociception. European Journal of Pain. 17 (5): 664–675.

24-Kumar, J., Gupta, P.K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports. 2: 93-112.

25-Mulabagal, V., Tsay, H.S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering Research. 2: 29-48.

Archive of SID

www.SID.ir

26-Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. 2010. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha species*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 7: 203-209.

27-Obata, T. Schoenefeld, S., Krahnert, I., Bergmann, S., Scheffel, A. and Fernie, A. 2013. Gas-Chromatography Mass- Spectrometry (GC-MS) Based Metabolite Profiling Reveals Mannitol as a Major Storage Carbohydrate in the Coccolithophorid Alga Emiliania huxleji. Metabolites, 3: 168- 184.

28-Romijn, J. C., Verkoelen, C. F., Schroeder, F. H. 2006. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: Establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. The Prostate.12: 99-110.

29-Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America. 98: 367-372.

30-Stofberg, J., Grundschober, F. 1987. Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. Perfum Flavorist. 12- 27.

31-Stofberg, J., Kirschman, J.C. 1985. The consumption ratio of flavoring materials: A mechanism for setting priorities for safety evaluation. Food Chem. Toxicol. 23: 857–860.

32-Tripathi, L., Tripathi, JN. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2: 243-253.

33-Verpoorte, R., Memelink, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Curr Opin Biotechnol. 13(2): 181-7.

34-Weiss, JF., Landauer, MR. 2003. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. Toxicology. 1: 1-20.

35-Wink, M. 2010. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second edition. Inc. New Delhi, India. 20-30.

36-Zhao, J., Davis, LC., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23(4): 283–333.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of yeast extract and salicylic acid elicitors effects on percentage of cell survival and the amount of beta-caryophyllene and isopulegone secondary metabolites in Pennyroyal (*Mentha pulegium)* cell culture

Darvishi E.[1], Kahrizi D.[2], Bahraminejad S.[2] and Mansouri M.[3]

[1] Biotechnology Dept., Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

[2] Agronomy of and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

[3] Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

Plant tissue and cell culture is being used as a stable method to investigate plant secondary metabolites widely. Because of the important position of Pennyroyal (*Mentha pulegium*) in food industries, sanitary and pharmaceutical fields, cell culture is done to investigate effectiveness of different concentrations of yeast extract and salicylic acid on the cell survival and the amount of β-Caryophyllene and Iso-Pulegone secondary metabolites. MS medium with 1 mg/l 2,4-D without agar was used with different concentrations of yeast extract and salicylic acid to investigate amount of secondary metabolites. after ten days, the amount of these two secondary metabolites were investigated by GC-MS and the cell survival was investigated by tetrazolium test. In the cell culture, percentage of cell surviving was decrease by increasing density of two elicitors and amount of β-Caryophyllene secondary metabolite significantly increased compared to the natural plants (maximum amount of this metabolite was obtained in the cell culture containing yeast extract 80 mg/l). Given that increasing the amount of secondary metabolites is the main purpose of the plant cell culture, the use of high concentrations of elicitor to increase β-Caryophyllene is justified despite the decrease in cell viability. Percentage of Iso-Pulegone secondary metabolite was in the natural plant more than the cell culture and also in the cell suspension culture, amount of this metabolite was decrease by increasing density of yeast extract and salicylic acid elicitors, thus cell culture containing these two elicitors is not recommended to increase amount of this secondary metabolite.

Key words: *Mentha pulegium*, cell culture, Iso-pulegone , β-Caryophyllene, cell survival.

Archive of SID

www.SID.ir