Archive of SID

تأثیر کیتوزان بر ریز ازدیادی، محتوی متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

سمیه جامی[۱]، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی[۱*] و معصومه مدرس[۲]

[۱] زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] مشهد، دانشگاه فرهنگیان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۰

چکیده

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae)، گیاه دارویی با خواص ضددرد، ضدالتهاب، ضددیابت و آنتی‌اکسیدان است. استفاده از الیسیتورهای زیستی همچون کیتوزان یکی از روش های مهم در کشت بافت به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) بر ریزازدیادی و محتوی متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک در شرایط *in vitro* می‌باشد. بدین منظور، جوانه های انتهایی در دو محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر **ایندول۳-بوتیریک اسید** (IBA) و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) به همراه غلظت های مختلف کیتوزان کشت شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز شاخص-های ریز ازدیادی و بیوشیمیایی بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان طول ساقه، ساقه‌زایی و تعداد برگ تحت تأثیر غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. بیشترین محتوی فنل و فلاونوئید تام تحت تأثیر غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد.بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. بیشترین میزان اسیدهای فنولی از جمله گالیک اسید، کافئیک اسید، بنزوئیک اسید و رزمارینیک اسید که در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیترکیتوزان مشاهده شد. به طور کلی، با بهینه سازی غلظت کیتوزان، می توان تولید متابولیت‌های ثانوی ازجمله اسیدهای فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک را افزایش داد.

واژه های کلیدی: کیتوزان، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ریز ازدیادی، گیاه نوروزک.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۸۷ ، پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

مقدمه

نوروزک با نام علمی (*Salvia leriifolia* Benth.) از تیره نعناعیان، بومی مناطق کم ارتفاع گرمسیری جنوب خراسان، سمنان و قسمتی از افغانستان است (۳۳). در سال های اخیرخواص دارویی متعددی مثل اثرات ضد میکروب، ضد قارچ، ضد دیابت، ضد درد و ضد التهاب از این گیاه گزارش شده است (۱۶). بسیاری از خواص دارویی گونه های مختلف *Salvia* به دلیل حضور ترکیبات فنلی از جمله کافئیک اسید و مشتقات کافئیک اسید شامل رزمارینیک اسید، انواع سالویانولیک اسید و لیتوسپرمیک اسید می باشد (۲۲).

خواص دارویی، آنتی اکسیدانی، محافظت کنندگی عصبی در برابر ایسکمی، ضد ویروسی، ضد ترومبوز، کاهش فشار خون مشتقات کافئیک اسید گزارش شده است (۳۴ و ۲۲). رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید در انسان بطور چشمگیری تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپوپروتئین های با وزن کم (LDL) که در بیماری آرتریواسکلروزیس

www.SID.ir

Archive of SID

نقش دارند را کاهش میدهند. فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات در ارتباط با توانایی آن در پایدار نمودن غشاء و بازدارندگی از رادیکال های آزاد است که سبب محافظت از غشاء در مقابل آسیب اکسیداتیو می شود (۳۱).

برداشت بی رویه گیاه نوروزک به دلیل خواص دارویی متعدد، آن را در دسته گیاهان در معرض انقراض قرار داده است. علاوه بر این به دلیل قوه نامیه پایین و درصد جوانه زنی کم، گیاه نوروزک با محدودیت در تکثیر مواجه است (۱۸). بنابراین کشت *in vitro* گیاه نوروزک راه جایگزین جهت افزایش تولید ترکیبات فنلی با ارزش آن می باشد (۲۱ و۲۷).

جستجو در منابع نشان می دهد مطالعات بسیار محدودی در خصوص کشت *in vitro* گیاه نوروزک و تولید اسیدهای فنلی گزارش شده است. ریزازدیادی گیاه نوروزک از طریق کشت جوانه انتهایی و کشت جنین گزارش شده است (۵ و ۶). همچنین اسیدهای فنلی شامل کافئیک اسید، رزمارنیک اسید و سالویانولیک اسید در ریشه، برگ و کالوس گیاه نوروزک اندازه گیری شده است (۲۸).

روشهای مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (۳۲).

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی میباشند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیتهای ثانوی و همچنین تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می شوند (۱). از الیسیتورهای زیستی می توان کیتوزان را نام برد که از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه های قارچی، میگو وخرچنگ می‌باشد و برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیتهای ثانوی در گیاهان دارویی زیادی تایید شده است (۳۵).

افزایش کارآیی مصرف آب (۳)، کاهش صدمه ناشی از تنش ها (۲۳)، افزایش مدت ماندگاری میوه (۱۷) و گل‌ها (۳۸) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (۷ و ۴۰) با مصرف ترکیبات کیتوزانی گزارش شده است.

در سال‌های اخیر، استفاده از این ماده در کشت بافت گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است. افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و محتوای فنل و فلاونوئید تام در کشت سلول کتان سفید تحت تاثیر کیتوزان گزارش شده است (۲). همچنین کیتوزان باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید در ریشه مویین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss) شده است (۴).

باتوجه به اهمیت دارویی، صنعتی و مرتعی این گیاه بومی و در معرض خطر انقراض، استفاده از روش کشت بافت و افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی آن ضروری بنظر می رسد. از این رو تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر کیتوزان بر ریز ازدیادی و محتوی متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک در شرایط *in vitro* انجام گردید.

مواد و روشها

تحقیق حاضر در سال ۱۳۹۶ در دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل اجرا گردید.

جمع آوری بذر ها و کشت جنین گیاه نوروزک: در مرحله اول بذرهای رسیده گیاه از منطقه بجستان واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری و جهت استراتیفیکاسیون به مدت زمان سه هفته در دمای ۴ $^{\circ}C$ نگهداری شدند. به منظور کشت جنین گیاه نوروزک از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به همراه ساکارز ۳۰ $g\ l^{-1}$، گلایسین ۲ $mg\ l^{-1}$، زغال فعال ۲ $g\ l^{-1}$ و آگار l^{-1} ۷ g و ترکیب هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP و NAA استفاده شد (۶). pH محلول ها روی ۵/۸ تنظیم گردید. آنگاه ۲۰CC از محلول به ویال های ۲۰۰CC منتقل گردیده

www.SID.ir

Archive of SID

و در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. ابتدا پوشش روی بذر ها حذف گردید، آنگاه بذر های بدون پوشش جهت استریل کردن به مدت ۳۰ ثانیه در اتانل ۷۰ درصد و به مدت ۵ دقیقه در آب ژاول ۳ درصد قرار داده شدند. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. در مجموع ۱۰۰ ویال تهیه شد و در هر یک از ویال ها یک جنین کشت گردید. جنین ها به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و سپس سه هفته به شرایط ۱۶ساعت روشنایی و دمای ۲۴±۱°C قرار گرفتند.

کشت جوانه انتهایی و تیمار با کیتوزان: برای تهیه ریز نمونه از جوانه انتهایی گیاهچه‌های استریل دوهفته‌ای استفاده شد. جوانه های انتهایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه غلظت های مختلف کیتوزان (۰ ، ۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) کشت شدند. باتوجه به اینکه در تحقیق قبلی از بین تیمارهای مختلف هورمونی، ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP باعث القای بیشترین شاخص های ریزازدیادی شد لذا در تحقیق حاضر از این ترکیب هورمونی استفاده شد (۵). برای تهیه محلول کیتوزان با ویسکوزیته پایین (C3646، شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) ابتدا محلول استیک اسید یک درصد تهیه و سپس محلول کیتوزان دراسید مذکور تهیه شد. پس از حل شدن کامل (۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد)، pH محلول با NaOH به ۵/۷ رسید. سپس محلول کیتوزان کیتین به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد.

بعد از گذشت ۳۰ روز شاخص های ریز ازدیادی از جمله میزان ساقه‌زایی، طول ساقه و تعداد برگ بررسی شد. سپس گیاهچه ها در سایه خشک گردید و پس از پودر شدن عصاره گیری شدند. عصاره‌های به‌دست آمده جهت تعیین محتوی فنل تام، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بررسی گردیدند. همچنین پودر حاصل از گیاهچه‌های ریزازدیادی شده جهت اندازه گیری برخی از اسیدهای فنلی توسط HPLC استفاده شد.

اندازه‌گیری فنل تام: برای تعیین محتوای فنل تام از روش McDonald و همکاران (۲۵) استفاده گردید. پس از تهیه عصاره با حلال متانول ۸۰٪ محتوای فنل تام با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتیو اندازه گیری شد. برای تعیین مقادیر ترکیبات فنلی در لوله آزمایش به ۲۰۰ ماکرولیتر عصاره، ۴۰۰ ماکرولیتر معرف فولین سیکالتو (۱:۹) و ۴۰۰ ماکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه شد.

پس ازگذشت ۳۰ دقیقه میزان جذب نوری محلول در طول موج ۷۶۵ نانومترثبت شد. جهت تعیین محتوای فنل تام، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم گالیک‌اسید تهیه گردید.

اندازه‌گیری محتوی ترکیبات فلاونوئیدی تام: فلاونوئید تام به‌روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه گیری شد. برطبق این روش در لوله ی آزمایش به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره ۱/۵ ماکرولیتر متانول (۹۵٪)، ۱۰۰ مکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪)، ۱۰۰ مکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. محتوای فلاونوئید تام عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (۲۰).

اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH): اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرار پذیری بالا می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

که در بررسی فعالیت **آنتی‌اکسیدانی** عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این روش برای مقایسه اثر آنتی اکسیدانی گیاه عصاره-های تهیه شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان آماده شد. ۲۵۰ ماکرو لیتر از محلول متانولی با ۷۵۰ ماکرولیتر از عصاره ترکیب شد و به شدت هم زده شد.

لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت این مدت میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترومتری خوانده شد. در نمونه کنترل عصاره با ۷۵۰ماکرو لیتر متانول ۸۰ درصد جایگزین شد ودرصد رادیکال های آزاد DPPH توسط عصاره با فرمول ریز محاسبه شد:

درصد مهار رادیکال آزاد = (Ac-As)/Ac×100

که در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (۳۶).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش قدرت احیاء کنندگی آهن (FRAP): فعالیت آنتی اکسیدانی آهن به روش Benzie و Strain (۱۲) صورت گرفت. طبق این روش معرف FRAP ساخته شد که حاوی محلول ۲ و ۴ و ۶ تری پیریدیل تریازین (TPTZ) ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و FeCl3.6H20 ، ۲۰ میلی مولار و بافر استات ۳۰۰میلی مولار با pH =۳/۶ به نسبت (۱۰:۱:۱) است.

به منظور سنجش این ویژگی در لوله آزمایش مقدار ۱میکرو لیتر عصاره به‌همراه۱۵۰۰ میکرو لیتر از معرف اضافه شد. مخلوط فوق ۱۰ دقیقه در حمام آبگرم قرار گرفت. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط نمونه بلانک صفر شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد. فعالیت احیا کنندگی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد $FeSo4.7\ H_2O$ بر حسب میلی مول‌آهن در میلی‌گرم وزن خشک عصاره محاسبه شد.

استخراج و اندازه گیری برخی از اسیدهای فنلی توسط HPLC : به ۱ گرم وزن خشک نمونه، ۶ میلی لیتر متانول اضافه و کاملاً ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. سپس به مدت ۳ ساعت هم زده شد. سوسپانسیون حاصل صاف و تبخیر گردید. به رسوب خشک شده ۴ میلی لیتر استونیتریل اضافه شد.

این مخلوط ۲ الی ۳ دقیقه مخلوط شده و سپس ۲ میلی لیتر n–هگزان اضافه و ۲ دقیقه دیگر مخلوط شد. فاز n–هگزانی خارج و فاز استونیتریلی تبخیر شد. در نهایت عصاره خشک شده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول۸۰ درصد حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه (۱۳۰۰۰ rpm، ۲۵ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ شد و محلول رویی جهت تزریق به دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین مقدار اسیدهای فنلی از روش Owen و همکاران (۳۰)، به کمک دستگاه HPLC (Agilent Technologies 1260 infinity, USA) با دتکتور UV استفاده شد. ستون مورد استفاده C18 (Perfectsil Target ODS-3 (5 µm), 250 × 4.6 mm; MZ Analysentechnik, Mainz, Germany)، فاز متحرک آب بدون یون/ استیک اسید ۲ درصد (حلال A) و متانول (حلال B) با روش گرادیان، باسرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه ، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و طول موج مورد استفاده ۳۳۰ نانومتر بود (جدول ۱).

شناسایی و اندازه گیری اسید های فنلی به کمک مقایسه زمان بازداری نمونه ها با ماده استاندارد (Sigma-Aldrich) صورت گرفت. به عبارت دیگر با رسم منحنی استاندارد اسیدهای فنلی و با استفاده از روش محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام حاصل از HPLC مقدار اسیدهای فنلی تعیین شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- سیستم گرادیان برای آنالیز HPLC

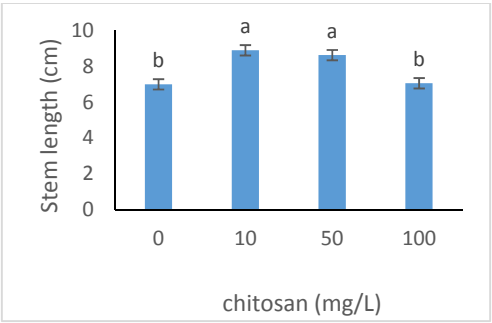
Time (min)	Flow (ml/min)	A%	B%
۰	۱	۶۰	۴۰
۱۷	۱	۵۰	۵۰
۱۸	۱	۴۰	۶۰
۲۵	۱	۶۰	۴۰
۳۰	۱	۶۰	۴۰

A : آب / استیک اسید ۲ درصد B : متانول

تجزیه و تحلیل آماری: برای کاهش خطا، نمونه برداری آزمایش‌ها به صورت ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های آماری بر اساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS با تجزیه‌ی واریانس ANOVA و آزمون دانکن در سطح احتمال آماری $p<0.05$ انجام گرفت.

نتایج

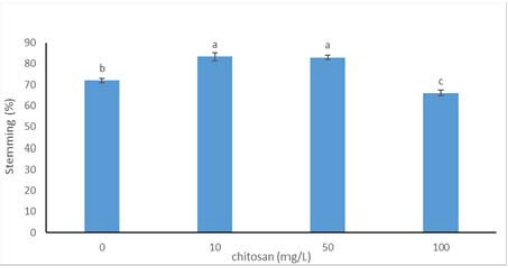
بررسی اثر کیتوزان بر طول ساقه: در بررسی اثر کیتوزان بر شاخص های مورفولوژیکی گیاه نوروزک، نتایج نشان داد که اثر کیتوزان بر طول ساقه گیاه نوروزک معنادار بوده است و طول ساقه گیاه نوروزک به‌طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داشته است و بیشترین طول ساقه در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان حاصل گردید (شکل ۱).



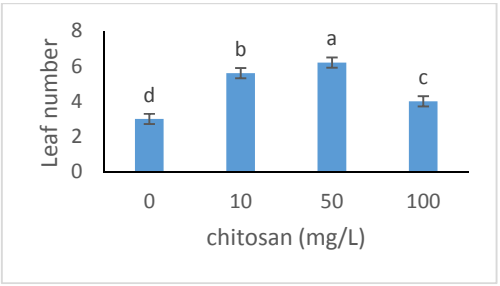
شکل ۱- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر طول ساقه گیاه نوروزک. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی اثر کیتوزان بر تعداد برگ: کیتوزان باعث افزایش معنی دار تعداد برگ گیاهچه های نوروزک شد، به طوری که بیشترین تعداد برگ گیاه نوروزک در غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان حاصل شد (شکل ۳).

بررسی اثر کیتوزان بر ساقه زایی: نتایج نشان داد که اثر کیتوزان بر ساقه‌زایی گیاه نوروزک معنادار بوده و ساقه‌زایی گیاه نوروزک به‌طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داشته است ($p\leq 0.5$). براساس نتایج، بیشترین مقدار ساقه-زایی گیاه نوروزک در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان بدست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر ساقه زایی گیاه نوروزک میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

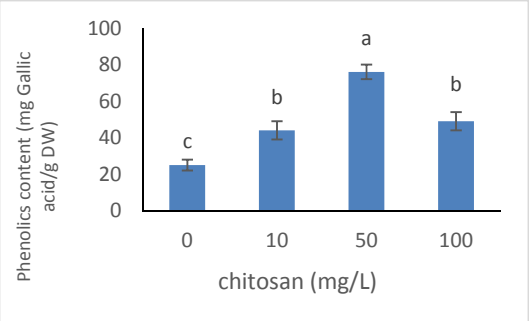


شکل ۳- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر تعداد برگ گیاه نوروزک میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی اثر کیتوزان بر محتوای فنلی تام: تجزیه و تحلیل داده های آماری حاکی از آن است که اثر کیتوزان بر محتوی ترکیبات فنلی معنا دار بوده است ($p\leq 0.5$)، بطوری که بیشترین محتوی ترکیبات فنلی در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان حاصل گردید. کمترین مقدار فنل در گیاه نوروزک برای نمونه شاهد ثبت گردید (شکل ۴).

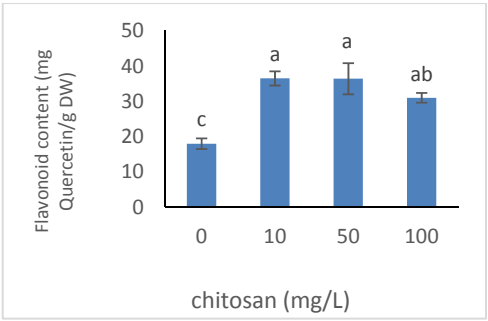
www.SID.ir

Archive of SID



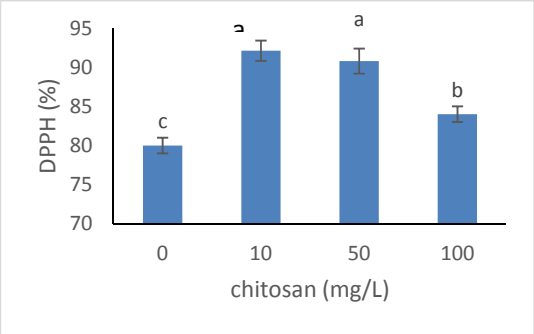
شکل ۴- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر محتوی فنل گیاه نوروزک. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی اثر کیتوزان بر محتوای فلاونوئیدی تام: کیتوزان باعث افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی گردید، به‌طوری‌که بیشترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان بدست آمد (شکل ۵).



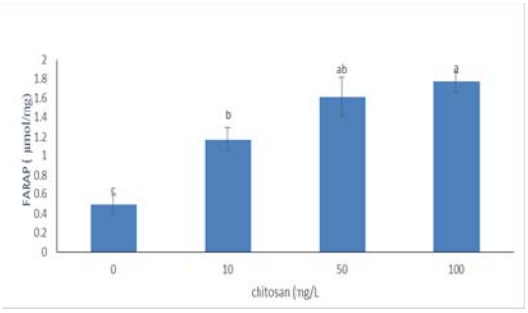
شکل ۵- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر محتوی فلاونوئید گیاه نوروزک. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال DPPH : بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی **به روش مهار رادیکال** DPPH نشان داد فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهچه های نوروزک تحت تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان به طور معنی داری افزایش یافت. بالاترین میزان فعالیت بازدارندگی در غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان حاصل گردید. در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان میزان فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهچه ها نسبت به سایر غلظت ها کاهش یافت ولی همچنان از شاهد بیشتر بود (شکل ۶).



شکل ۶- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک به روش مهار رادیکال DPPH. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP): بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی **به روش** FRAP نشان داد فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهچه های نوروزک تحت تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان به طور معنی داری همانند روش DPPH افزایش یافت. بالاترین میزان فعالیت بازدارندگی در غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان حاصل گردید. کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برای نمونه شاهد ثبت گردید (شکل ۷).



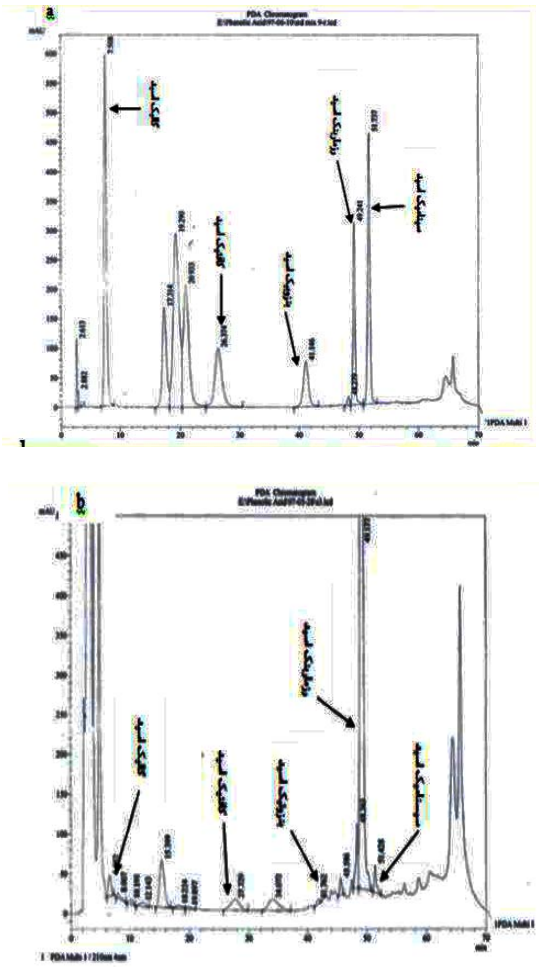
شکل ۷- اثر کیتوزان در غلظت‌های مختلف بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک به روش قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP). میانگین-های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بررسی و ارزیابی ترکیبات فنلی به روش HPLC : نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فنلی موجود در گیاه نوروزک (شکل ۷) نشان داد که محتوی اسیدهای فنلی از جمله گالیک اسید، کافئیک اسید، بنزوئیک اسید و رزمارینک

www.SID.ir

Archive of SID

اسید تحت تأثیرغلظت‌های مختلف کیتوزان به‌طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین محتوی تحت تأثیر ۵۰ میلی گرم بر لیترکیتوزان مشاهده شد (جدول ۲). به طور کلی بیشترین مقدار اسید های فنلی موجود در گیاه مربوط به رزمارینیک اسید بود.



شکل ۸- منحنی کروماتوگرام حاصل از HPLC مقدار اسیدهای فنلی(a منحنی استاندارد و b منحنی نمونه)

بحث

در تحقیق حاضر ریز ازدیادی و تولید ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهچه های نوروزک تحت تاثیر کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد کیتوزان در غلظت‌های پایین بر شاخص های ریزازدیادی اثر مثبت دارد.

جدول ۲- محتوای ترکیبات فنلی (mg/g وزن خشک) گیاهچه های نوروزک تحت تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان

تیمار ترکیبات فنلی	کنترل	کیتوزان (۱۰mg/L)	کیتوزان mg/L) (۵۰	کیتوزان mg/L) (۱۰۰
گالیک اسید	۰/۰۱ c	۰/۰۳ b	۰/۰۵ a	۰/۰۶ a
کافئیک اسید	۰/۰۵ c	۰/۰۸ b	۰/۱۵ a	۰/۱۲ a
بنزوئیک اسید	۰/۰۱ c	۰/۰۱ c	۰/۰۳ b	۰/۰۶ a
رزمارینیک اسید	۴/۲ c	۴/۵ c	۹/۶۴ a	۷/۹۶ b
سینامیک اسید	۰/۰۱ c	۰/۰۳ c	۰/۰۵ b	۰/۱۹۹ a

بیشترین میزان طول ساقه، ساقه‌زایی و تعداد برگ تحت تأثیر غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. محققین دیگر نیز گزارش کرده اند کیتوزان در غلظت های مشخص در هر گیاه باعث القای رشد گیاهچه ها و ریز ازدیادی می شود. به عنوان مثال، گزارش شده است غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر کیتوزان باعث بیشترین میزان ساقه زایی و تعداد برگ در کشت گیاهچه‌های *Grammatophyllum speciosum* شد (۳۷). در پژوهشی کیتوزان در کشت بافت انگور رشد و نمو ریزنمونه‌ها را تحریک نموده و با غلظت ۱/۷۵ درصد سبب افزایش طول ساقه گردید (۹). Heng و همکاران اثر محرک کیتوزان را بر گیاه دارویی *Greek oregano* بررسی نموده و گزارش کردند که طول ساقه گیاه با مصرف محرک کیتوزان افزایش یافت (۱۵). Dzung نیز افزایش طول ساقه قهوه در غلظت ۶۰ppm کیتوزان را گزارش کردند (۱۳). به نظرمی‌رسد عکس العمل گونه های مختلف گیاهی نسبت به کیتوزان بسته به غلظت و وزن مولکولی کیتوزان مورد استفاده متفاوت باشد. به طور کلی نتایج مطالعات نشان می دهد کیتوزان باعث رشد، توسعه سلولی و در نتیجه افزایش عملکرد در گیاه می شود، کیتوزان با استفاده از افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن (نیترات ردوکتاز، گلوتامین و پروتئازسنتتاز) و بهبود انتقال نیتروژن باعث توسعه و رشد می‌شود (۲۹). تا به حال سازوکار عمل کیتوزان روی رشد ناشناخته باقی مانده است. احتمالاً کیتوزان سیگنالی را برای سنتز هورمونهای گیاهی مانند جیبرلین القاء می‌کند و رشد و نمو گیاه را توسط بعضی مسیرهای سیگنالینگ مربوط به بیوسنتز اکسین، از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان، افزایش می‌دهد (۳۷).

کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی بسیاری از گیاهان دارویی در شرایط درون شیشه شده است (۱). براساس نتایج تحقیق حاضر کیتوزان به طور معنی داری محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را نسبت به شاهد افزایش داد. ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می کنند (۱۹ و ۲۶). گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان آزاد می سازند که نقش دفاعی مهمی در برابر الیسیتورها دارند (۱۱ و ۲۴). در پژوهشی که روی گیاه زنیان انجام شد کیتوزان (۲۰۰ppm) میزان ترکیبات فنلی را نسبت به شاهد افزایش داد (۲۶). در پژوهشی دیگر مشخص شد که کیتوزان در کشت سلول کتان سفید سبب افزایش قابل توجهی در محتوای فنلی و فلاونوئیدی شد (۲). نتایج حاصل از بررسی اسیدهای فنلی موجود در گیاه نوروزک نشان داد که بیشترین محتوی اسیدهای فنلی از جمله گالیک اسید، کافئیک اسید، بنزوئیک اسید و رزمارینیک اسید در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیترکیتوزان مشاهده شد. بیشترین محتوی رزمارینیک اسید در ریشه مویین زرین گیاه در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد (۴). هر چند الیسیتورهای زیستی نظیر کیتوزان به طور گسترده در تولید متابولیت‌های ثانوی به‌کار گرفته شده است با این حال مکانیسم اثرالیسیتورهای زیستی بر تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاه به خوبی شناخته نشده است. به طور کلی الیسیتورها با تحریک سیگنالهای سلولی و برهمکنش مولکولی میان گیرنده های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی موجب شناسایی آنها می‌شوند. در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلولهای گیاهی، بیان ژنهای مرتبط در مسیر را تحریک میکنند و موجب سنتز متابولیتهای ثانوی درگیاهان می‌شوند (۴۲). موارد مختلفی از جمله منبع الیسیتور، اختصاصی بودن آن، غلظت الیسیتور، مرحله رشدی گیاه، زمان افزودن الیسیتور و مدت زمانی که گیاه در معرض الیستور قرار میگیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی تأثیر می گذارد (۱۰ و ۳۹).

در تحقیق حاظر کیتوزان فعالیت آنتی اکسیدانی را نیز افزایش داد به طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی تحت تأثیر غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. همچنین گزارش شده است کیتوزان در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر باعث القای بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاهچه‌های *Curcuma manga* گردید (۸).

به طور کلی به نظر می‌رسد کیتوزان از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و جاروب گونه های فعال اکسیژن (ROS)، باعث مقاومت گیاه در مقابل تنش های اکسیداتیو و تحریک رشد گیاه می شود (۱۴ و۴۱).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد کیتوزان با غلظت مناسب (۱۰ تا ۵۰ میلی گرم بر لیتر) به عنوان یک الیسیتور زیستی باعث بهبود ریز ازدیادی گیاهچه‌های نوروزک شد. همچنین کیتوزان در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم باعث القای بیشترین محتوی تولید ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گردید. به نظر می رسد با انتخاب و تعیین الیسیتور مناسب امکان تولید اسیدهای فنلی با ارزشی همچون رزمارینیک اسید از طریق کشت گیاهچه گیاه نوروزک فراهم گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرنت: UOZ-GR-9517-18).

منابع

۱. اسمعیل زاده بهابادی، ص.، شریفی، م. ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت، جلد۴. شماره ۲: ۱۱۹-۱۲۸.

۲. اسمعیل زاده بهابادی، ص.، شریفی، م.، صفایی، ن.، بهمنش، م. ۱۳۹۱. افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و فنیل پروپانوئیدی تحت تاثیر کیتین و کیتوزان در کشت سلول کتان سفید. مجله زیست شناسی گیاهی ایران. جلد ۴، شماره : ۲۶-۱۳.

۳. امیری، ا.، سیروس مهر، ع.، اسمعیل زاده بهابادی، ص. ۱۳۹۴. اثرمحلول پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر عملکرد گیاه گلرنگ در شرایط تنش خشکی. مجله پژوهش های گیاهی. جلد ۲۸، شماره ۴: ۶۲۴-۶۴۷.

۴. ایوبی، ن.، حسینی، ب.، فتاحی، م. ۱۳۹۶. اثر القایی کیتوزان و کلشیسین بر تولید رزمارینیک اسید در ریشه مویین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss). مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. جلد ۳۰، شماره ۱: ۱-۱۳.

۵. مدرس، م، لاهوتی، م.، گنجعلی، ع.، اصیلی، ج. ۱۳۹۱. مطالعه ریزازدیادی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) با استفاده از کشت جوانه انتهایی. مجله زیست شناسی گیاهی، جلد ۴، شماره ۱۴: ۸۹-۱۰۰.

۶. مدرس، م، لاهوتی، م.، گنجعلی، ع.، اصیلی، ج. ۱۳۹۳. بهینه سازی کشت درون شیشه ای جنین زیگوتیک گیاه نوروزک. نشریه علوم باغبانی. جلد ۲۸، شماره ۳: ۳۱۹-۳۲۶.

۷. مهدوی، ب.، مدرس ثانوی، س .م. ع.، آقا علیخانی، م. شریفی م. ۱۳۹۰. اثر غلظتهای مختلف کیتوزان بر جوانه زنی بذر و آنزیمهای آنتی اکسیدانت گلرنگ در شرایط تنش کم آبی مجله پژوهشهای گیاهی، جلد ۲۶ ، شماره ۳: ۳۵۲-۳۶۵.

8. Abraham, F., Bhatt, A., Keng, C.L. Indrayanto, G., Shaida F. 2011. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* in vitro plantlets. African Journal of Biotechnology, 10(40):7787-7795.

9. Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clement, C. and Vernet, G. (2004). Chitosan improves development and protect- *Vitis vinifera* L. Against *Botrytis cinerea*. Plant Cell Report, 22: 608-614.

10. Angelova, Z., Georgiev, S. and Roos, W. 2006. Elicitation of plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment**,** 20 (2):72 – 83.

11. Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. Trends in Plant Science, 9: 26-32.

12. Benzie, I.F.F., Strain, J.J.1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, 299:15-27.

13. Dzung, N.A., V.T. Phuong and T.T. Dzung. 2011. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. Carbohydrate Polymer. 84:751-755.

14. Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, K.S. Jagannatha, R. and Tharanathan, R.N. 2007. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrat, 342: 190-195.

15. Heng, Y., C.F. Xavier, P.C. Lars and G. Kai. 2012. Chitosan Oligosaccharides Promote the Content of Polyphenols in Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). Journal of Agriculture Food Chemistry. 60:136-143.

16. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia H.R., Imenshahidi M.and Bazzaz B.S.F. 2009. Review of the Pharmacological and Toxicological Effects of *Salvia leriifolia*. Iranian Journal of Basic Medicla Science. 12: 1-8.

17. Iriti, M., and Faoro, F. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. Plant Signal Behaviors 4 (1): 66-68.

18. Jalili, A and Jamzad .Z . 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forest and Rangeland. 215.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report, 28: 135-143.

20. Lin, Y.L., Chang Y.Y., Kuo, Y.H. and Shiao M.S.J. 2002. Anti-lipid-peroxidative principles from *Tornefortia sarmentoza*. Natural Product. 65: 745-747.

21. 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.

22. Lu, Y., Foo, L.Y. 2002. Polyphenolics of *Salvia*. Phytochem, 59: 117-140.

23. Malekpoor, F., Pirbalouti, A. G., Salimi, A. 2016. Effect of foliar application of chitosan on morphological and physiological characteristics of basil under reduced irrigation. Research on Crops, 17 (2), 354-359.

24. Mandal, S. 2010. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. Journal of Biotechnology, 9:8038-8047.

25. McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., and Robards, K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73:73-84.

26. Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies. 15 (4): 523 - 30.

27. Modarres M., Esmaeilzadeh Bahabadi S. Taghavizadeh Yazdi, R. 2018. Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. Cytotechnology, 70 (2):741-750.

28. Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Iranshahi, M., 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 & Related Technologies, 37:1721–1730.

29. Mondal, M.A., Malek, M.A., Puteh, A.B, Ismail, M.R., Ashrafuzzaman, M., Naher, L. 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Science. 6 (5): 918-921.

30. Owen, R.W., Haubner. R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2003. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chemical Toxicologyl, 41(5):703-17.

31. Pérez-Fons L, Garzón, M.T, Micol, V. 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. Journal of Agriculture Food Chemistry. 58:161–171.

32. Rao, S. R., Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 20(2): 101-153.

33. Rechinger, K.H. 1982. Flora Iranica, vol 150. Akademische Druck.u.Verlagsanstalt, Graz, Austria.

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

35. Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in Polymer Science, 31 (7): 603-632.

36. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of agricultural and Food chemistry, 40 (6): 945-948.

37. Sopalun, K., Thammasiri, K. Ishikawa, K. 2010. Effects of Chitosan as the Growth Stimulator for *Grammatophyllum speciosum* in Vitro Culture. International Scholarly and Scientific Research & Innovation, 4 (11): 828-830.

38. Uthairatanakij, A., Teixeira, J. A., and Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving *Orchid* production and quality. Science 1: 1- 5.

39. Vasconsuelo, A. Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172: 861-875.

40. Yang Feng, H., Li, J., Wu, J., and Yurong, X. Q. 2009. Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. Plant Growth Regulation 58: 131-136.

www.SID.ir

Archive of SID

41. Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L. 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydrat, 74: 840-844.

42. Zhao, J. Sakai, K. 2003. Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor induced betathujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. Journal of Experimental Botany.4: 647-656.

Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth.

Jami S.[1], Esmaeilzadeh Bahabadi S.[1] and Modarres M.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Faculty of Basic Science, Farhangian University, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Salvia Leriifolia Benth. (Lamiaceae) is a medicinal plant with analgesic, anti-inflammatory, anti-diabetes and antioxidant properties. The use of elicitors such as chitosan in the tissue culture is one of the main methods for increasing the production of secondary metabolites. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of chitosan (10, 50 and 100 mg/L) on micropropagation, secondary metabolites and antioxidant activity of *S. leriifolia* in *in vitro* condition. For this purpose, apical buds were cultivated in two MS culture medium contain 2 mg/L BAP 0.5 mg/L IBA with different concentrations of chitosan. After 30 days, micropropagation and biochemical parameters were investigated. The results showed that the highest stem length, stemming and leaf number were observed in both media under the influence of the concentration of 10 mg/L of chitosan. The highest levels of phenol and flavonoid were observed at the concentration of 50 mg/L of chitosan. The highest antioxidant activity was observed at the concentration of 50 mg/L of chitosan. The amount of phenolic acids, such as gallic acid, caffeic acid, benzoic acid and rosmarinic acid, was significantly increased by the different concentrations of chitosan, so that the highest amount was observed under the influence of 50 mg/L of chitosan. In general, by optimizing the chitosan concentration, it is possible to improve secondary metabolites production, including phenolic acids, and antioxidant properties of *S. leriifolia*.

Key words: Chitosan, Phenolic compounds, Antioxidant Activity, *Salvia leriifolia* Benth.

www.SID.ir