

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

معصومه مدرس^{۱*}، مهرداد لاهوتی^۱، جواد اصیلی^۲، محمد کافی^۴ و علی رضانی^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد^۲ گروه فارماکوتکنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد^۳ گروه زیست‌شناسی، پردیس شهید هاشمی نژاد مشهد، دانشگاه فرهنگیان^۴ گروه فیزیولوژی زراعت،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

چکیده:

نوروزک (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد. این گیاه دارای خواص متعددی از جمله خواص ضد درد، ضد التهاب، آرام بخش، کاهش دهنده قند خون، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان است که از سوی پژوهشگران تایید گردیده است. هدف از این پژوهش القا کالوس از برگ گیاه نوروزک و بررسی تجمع اسیدهای فنولیک در کالوس در مقایسه با برگ گیاه نوروزک در رویشگاه طبیعی می‌باشد. برای این منظور جداکشت برگ بر روی محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D ($0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ mgL}^{-1}$)، کشت داده شد. پس از چهار هفته درصد تولید کالوس و وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمارهای مختلف بررسی گردید و تجمع اسیدهای فنولیک در کالوس‌ها با استفاده از تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بهترین تیمارها جهت القاء و رشد کالوس $3 \text{ mgL}^{-1} 2,4-D + \text{Kin} \text{ mgL}^{-1} + 5 \text{ mgL}^{-1} \text{ BAP} + 5 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$ هستند و میزان تجمع کافینیک اسید و سالیوانولیک اسید B در کالوس‌های حاصل از تیمارهای مذکور به طور معنی‌داری بیشتر از برگ گیاه بود. بیشترین میزان رزمارینیک اسید از عصاره حاصل از کالوس در تیمار $5 \text{ mgL}^{-1} \text{ BAP} + 5 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$ به دست آمد که حدود ۳ برابر بیشتر از برگ بود.

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

مقدمه:

برگ نوروزک در دوز 500 mg/kg قابل مقایسه با دوز 5 mg/kg دیازپام، گزارش شده است (Hosseinzadeh and Lary, 2000). مقابله عصاره گیاه با التهاب‌های مزمن از نظر کارآیی مشابه با داروی دیکلوفناک می‌باشد (Hosseinzadeh and Yavary, 1999). همچنین تاثیر عصاره آبی و الکلی برگ نوروزک در جلوگیری

نوروزک (*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 نوروزک وجود دارد. فعالیت ضد درد و آرام بخش عصاره

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

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

مواد و روش‌ها:

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

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

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

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

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

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

رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدها در انسان به طور چشم‌گیری تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با وزن کم (LDL) که در بیماری آرترواسکلروزیس نقش دارند را کاهش می‌دهند (Liu and Liu, 2002).

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

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

مقدار 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 قرار گرفت. در مرحله بعد حلال توسط روتاری حذف گردید و pH عصاره روی ۲ تنظیم شد. سپس اتیل استات در ۵ مرحله به آن اضافه شد و فاز اتیل استاتی جدا و تبخیر گردید. عصاره حاصل در متانل حل شد و در دمای ۵۰ °C خشک گردید (Dong et al., 2010).

محلول استوک ۵mg/ml از استانداردهای کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیوانولیک اسید B (Sigma-Aldrich co.UK) در محلول اتانل/آب (۷۰ v/v : ۳۰) تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استانداردهای کافئیک اسید و سالیوانولیک اسید B و غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رزمارینیک اسید از استوک تهیه شد و برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

جهت جداسازی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک از کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC (Knauer, Germany) مجهز به پمپ ۱۰۰۰، دکتور ۲۸۰۰UV (Knauer smartline) و PDA و نرم‌افزار کروم‌گیت (Chromgate) استفاده شد. فاز ساکن ستون با مشخصات (5 μm, Macherey-Nagel) C₁₈ به ابعاد (۱۵۰×۴/۶mm)، فاز متحرک آب و اسید فسفریک ۰/۱٪ و متانول به صورت گرادیان با جریان فاز مایع یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول موج مورد استفاده ۳۳۰ نانومتر، طول زمان انجام HPLC ۳۰ دقیقه، حجم عصاره تزریق شده ۲۰ میکرولیتر و دمای آن ۲۰ درجه

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

تعیین مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای القاء

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

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

تعیین غلظت اسیدهای فنولیک در برگ و کالوس

گیاه نوروبک: به منظور تعیین غلظت کافئیک اسید،

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

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

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

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر جدا کشت برگ: نتایج محاسبه درصد کال‌زایی بعد از ۳۰ روز نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰٪) در تیمارهای BAP 5 mg l^{-1} NAA + 5 mg l^{-1} BAP و 6 mg l^{-1} NAA + 6 mg l^{-1} BAP وجود داشت (جدول ۲).

نتایج آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک متعلق به تیمار BAP 5 mg l^{-1} NAA + 5 mg l^{-1} بود که به لحاظ آماری با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P \leq 0.05$) (جدول ۲).

نتایج تعیین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از برگ در مقایسه با برگ نوروژک در رویشگاه طبیعی: با توجه به این‌که در تیمار 2,4-D + 1 mg l^{-1} KIN وزن کالوس حاصل از جداکشت برگ به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت ($P \leq 0.05$) و از طرف دیگر درصد کال‌زایی نیز در این تیمار بالاتر بود، این کالوس برای بررسی میزان اسیدهای فنولیک انتخاب شد. همچنین کالوس حاصل از برگ در محیط BAP 5 mg l^{-1} + NAA 5 mg l^{-1} در مقایسه با دیگر تیمارها دارای درصد کال‌زایی و وزن تر و خشک بیشتری بود، بنابراین میزان اسیدهای فنولیک در این کالوس بررسی گردید (جدول ۳). نتایج آنالیز عصاره‌های حاصل از برگ و کالوس‌ها توسط HPLC نشان داد میزان کافئیک اسید در هر دو کالوس نشان

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

آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت و برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای JMP و MSTATC استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) صورت گرفت.

نتایج:

جداکشت برگ در هیچ کدام از محیط کشت‌های حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های BAP و IBA کالوس تولید نکرد. نتایج نشان داد القاء کالوس از جداکشت برگ در اغلب تیمارها انجام نشد و جداکشت‌ها تنها در دو تیمار 2,4-D + 1 mg l^{-1} KIN و 2,4-D + 1 mg l^{-1} KIN + 3 mg l^{-1} تولید کالوس نمودند. نتایج محاسبه درصد کال‌زایی بعد از ۳۰ روز نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۷۶/۲۷٪) در تیمار 2,4-D + 1 mg l^{-1} KIN + 3 mg l^{-1} وجود داشت (جدول ۱).

آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک نیز مربوط به تیمار مذکور بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار KIN 1 mg l^{-1} + 2,4-D + 4 mg l^{-1} نشان داد ($P \leq 0.05$).

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

نوع تیمار	درصد کالزایی	وزن تر کالوس (g)	وزن خشک کالوس (g)	خصوصیات بافت کالوس
BAP0+NAA0	d	c	c	-
BAP1+NAA0.5	d	c	c	-
BAP0.5+NAA1	d	c	c	-
BAP1+NAA1	d	c	c	-
BAP2+NAA1	d	c	c	-
BAP1+NAA2	d	c	c	-
BAP2+NAA2	d	c	c	-
BAP3+NAA2	d	c	c	-
BAP2+NAA3	d	c	c	-
BAP3+NAA3	d	c	c	-
BAP4+NAA3	d	c	c	-
BAP3+NAA4	d	c	c	-
BAP4+NAA4	d	c	c	-
BAP5+NAA4	d	c	c	-
BAP4+NAA5	d	c	c	-
BAP5+NAA5	100 ^a	4/356 ^a	0/379 ^a	زرد، نرم
BAP5+NAA6	95 ^b	2/42 ^b	0/197 ^b	زرد، نسبتاً نرم
BAP6+NAA5	89/5 ^c	2/95 ^b	0/22 ^b	زرد، نرم
BAP6+NAA6	100 ^a	2/36 ^b	0/193 ^b	زرد، متراکم

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

جدول ۳- مقایسه میانگین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از برگ و برگ گیاه نوروک.

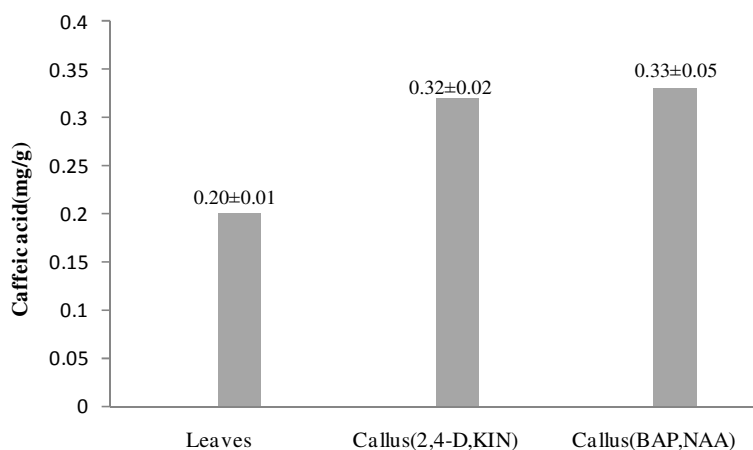
نمونه گیاهی	کافئیک اسید (mg/g)	رزمارینیک اسید (mg/g)	سالوانولیک اسید B (mg/g)
کالوس برگ (2,4-D-KIN)	0/32 ± 0/02 ^a	3/57 ± 0/14 ^c	0/48 ± 0/02 ^a
کالوس برگ (BAP-NAA)	0/33 ± 0/05 ^a	16/72 ± 1/19 ^a	0/41 ± 0/08 ^a
برگ در رویشگاه طبیعی	0/20 ± 0/01 ^b	4/65 ± 0/09 ^b	0/13 ± 0/02 ^b

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می باشد.

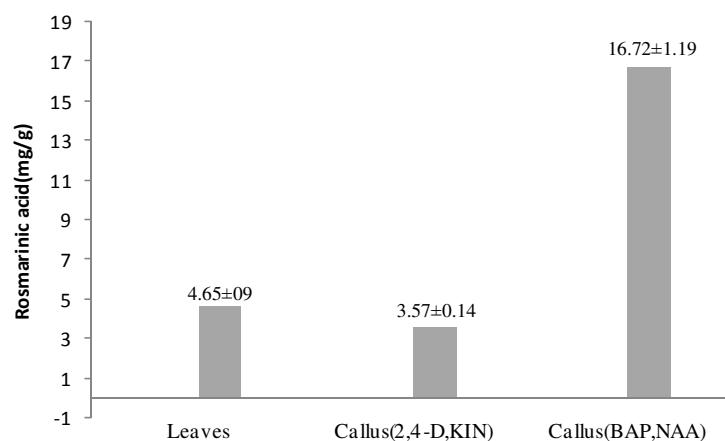
داد میزان کافئیک اسید در هر دو کالوس به طور معنی‌داری بیشتر از برگ نوروک بود ($P \leq 0/05$). میزان کافئیک اسید در دو کالوس تفاوت معنی‌داری نداشت. (شکل ۱). میزان رزمارینیک اسید در کالوس حاصل از برگ در تیمار BAP

5 mg l^{-1} NAA + 5 mg l^{-1} به میزان $16/72 \text{ mg/g}$ بود که به ترتیب حدود ۳ تا ۴ برابر برگ و کالوس برگ در تیمار 1 mg l^{-1} KIN + 3 mg l^{-1} 2,4-D می باشد. به علاوه میزان رزمارینیک اسید در کالوس حاصل از برگ در حضور

داد میزان کافئیک اسید در هر دو کالوس به طور معنی‌داری بیشتر از برگ نوروک بود ($P \leq 0/05$). میزان کافئیک اسید در دو کالوس تفاوت معنی‌داری نداشت. (شکل ۱). میزان رزمارینیک اسید در کالوس حاصل از برگ در تیمار BAP



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

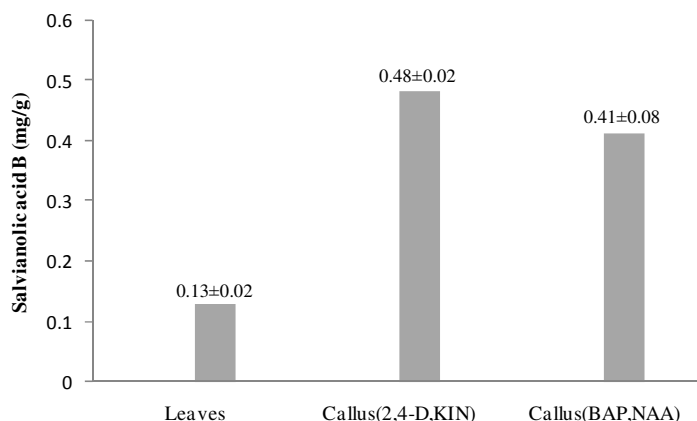


شکل ۲ - مقایسه محتوی رزمارینیک اسید در برگ گیاه نوروبزک و کالوس‌های حاصل از برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D + KIN و BAP + NAA حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث:

در این تحقیق مناسب‌ترین تیمار جهت تولید کالوس از جداکشت برگ تیمار BAP 5 mg l⁻¹ + NAA 5 mg l⁻¹ بود. همچنین جداکشت برگ در محیط کشت حاوی هورمون های KIN 1 mg l⁻¹ + 2,4-D 3 mg l⁻¹ بیشترین درصد کال زایی و وزن خشک را داشت. در توافق با نتایج این تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۲) الفاء کالوس از برگ *S. splendens* را در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های بین ۴ تا ۵ میلی

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



شکل ۳ - مقایسه محتوی سالیوانولیک اسید B در برگ گیاه نوروبزک و کالوس‌های حاصل از برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D + KIN و BAP + NAA حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

متفاوت جداکشت‌های مختلف گیاه نوروبزک نسبت به اکسین‌های NAA و 2,4-D و IBA در ارتباط با این مسئله باشد. در این تحقیق کالوس‌های با وزن خشک بیشتر و درصد کال‌زایی بالاتر حاصل از جداکشت برگ گیاه نوروبزک انتخاب شده و محتوی سه اسید فنولیک کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیوانولیک اسید B در آنها توسط تکنیک HPLC اندازه‌گیری گردید. همچنین غلظت اسیدهای فنولیک مذکور در مقایسه با برگ گیاه نوروبزک در رویشگاه طبیعی مقایسه شد. براساس نتایج این پژوهش کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیوانولیک اسید B در همه کالوس‌ها تولید گردید بیشترین اسید فنولیک تولید شده در کالوس‌ها رزمارینیک اسید بود. میزان کافئیک اسید در همه کالوس‌ها در محدود ۰/۳۲ تا ۰/۳۳ mg/g به دست آمد در حالی که میزان آن در برگ نوروبزک ۰/۲۰ mg/g بود. گزارش‌های بسیار کمی در مورد تولید کافئیک اسید در کالوس گیاهان مختلف وجود دارد. بر طبق گزارش Santos-Gomes و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان تولید کافئیک اسید در کالوس حاصل از میان‌گره *S. officinalis* در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP به میزان ۰/۰۸ mg/g بود که بسیار کمتر از میزان تولید شده در کالوس‌های گیاه نوروبزک می‌باشد.

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

در این ارتباط DE-Ekhamkul و Eill (۱۹۸۵) گزارش کردند که افزودن هورمون NAA به کشت سلولی *S. officinalis* نه تنها سبب افزایش سنتز رزمارینیک اسید می شود بلکه مدت زمان سنتز آن را نیز افزایش می دهد. از طرف دیگر Hung و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند وجود هورمون 2,4-D در محیط کشت سلول های *S. miltiorrhiza* سبب کاهش تولید رزمارینیک اسید و افزایش BAP در محیط کشت باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید گردید. همچنین براساس گزارش Sakakibara (2006) غلظت بالای سیتوکینین ها از جمله BAP، انتقال دهنده های نیترات را مهار می کند. بنابراین نیترات در سلول کاهش می یابد. کمبود نیترات سبب افزایش بیان ژن های مسیر فنیل پروپانوئیدی در نتیجه تولید بیشتر اسیدهای فنولیک می شود. با توجه به موارد ذکر شده احتمالاً وجود توأم هورمون BAP و NAA در محیط کشت سبب افزایش تولید اسیدهای فنولیک در شرایط مذکور نسبت به حضور هورمون 2,4-D شده است.

نتیجه گیری:

به طور کلی بر اساس نتایج این تحقیق، جداکشت برگ گیاه نوروبزک در تیمار BAP 5 mg l^{-1} + NAA 5 mg l^{-1} می تواند به طور مؤثری برای القاء کالوس با درصد کالزایی بالا و تولید اسیدهای فنولیک در محیط درون شیشه ای مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از معاونت محترم علمی و فن آوری ریاست جمهوری، بخش حمایت از توسعه فناوری های راهبردی به واسطه پشتیبانی مالی از انجام این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

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

بیشترین میزان رزمارینیک اسید $16/72 \text{ mg/g}$ در کالوس حاصل از برگ نوروبزک در محیط کشت MS حاوی BAP 5 mg l^{-1} + NAA 5 mg l^{-1} به دست آمد که میزان آن بین ۳ تا ۴ برابر کالوس برگ در تیمار 1 mg l^{-1} 2,4-D + 3 mg l^{-1} و برگ گیاه بود. قابل ذکر است Karam و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس حاصل از برگ *S. fruticosa* را در محیط کشت حاوی MS حاوی هورمون های TDZ و IAA را چندین برابر میزان رزمارینیک اسید موجود در برگ و ریشه *S. fruticosa* گزارش کردند. همچنین طبق گزارش Kintzios و همکاران (۲۰۰۳) میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس های *S. officinalis* و *S. fruticosa* در محیط کشت MS حاوی KIN و 2,4-D به ترتیب $29/0 \text{ g/l}$ و $25/9 \text{ g/l}$ بود. حداکثر تولید رزمارینیک اسید در کالوس های *S. officinalis* حاصل از هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی هورمون های 2,4-D، BAP و NAA بین $11/21$ تا $15/77 \text{ mg/g}$ گزارش شده است (Grzegorzczuk et al., 2005).

بیشترین میزان سالیوانولیک اسید B در کالوس حاصل از برگ در محیط کشت MS حاوی KIN و 2,4-D تولید گردید که میزان آن $0/48 \text{ mg/g}$ ($0/09$) بود که بیشتر از سه برابر برگ گیاه نوروبزک می باشد. در توافق با نتایج ما میزان تولید سالیوانولیک اسید B در کالوس *S. miltiorrhiza* در محیط کشت حاوی BAP و JBA، $0/1$ وزن خشک بود (Morimoto, 1994).

این تحقیق نشان داد تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان تولید رزمارینیک اسید در جداکشت های یکسان تأثیرگذار هستند به طوری که میزان تولید رزمارینیک اسید در جداکشت برگ در حضور هورمون های BAP و NAA نسبت به هورمون های KIN و 2,4-D $4/68$ برابر بیشتر بود.

منابع:

شکوهی زاده، ح. (۱۳۷۵) مطالعه اثرات پایین آورندگی قند خون برگ ودانه نوروبزک بر موش سفید کوچک.

- Huang, L., Liu, D. and Hu, Z. (2000) Effects of phytohormones on growth and content of depsides in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2:1-4.
- Karam, N.S., Jawad, F. M., Arikat, N. S. and Shibli, R. A. (2003) growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73: 117-121
- Kintzios, S., Nikolaou, A. and Skoula, M. (1999) Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports* 18: 462 – 466.
- Liu, H., Guoping, Z., Guozheng, S., Songlin, R. and Qiaojuan, F. (2012) Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Seeds of *Salvia splendens*. *International Journal of Agriculture and Biology* 14:445-452.
- Liu, Y. L. and Liu, G. T. (2002) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by salvianolic acid-A. *Acta Pharmacological Sinica Journal* 37: 81-85.
- Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Iranshahi, M. and Sahebkar, A. (2013) Simultaneous determination of phenolic acids in *Salvia leriifolia* Benth. using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. *Liquid chromatography and related techniques*. (in press)
- Moore, T.C. (1989) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-verlag 14: 234-242.
- Morimoto, S., Goto, Y. and Shoyama, Y. (1994) Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Natural Products* 57: 817-823.
- Rechinger, K.H. (1982) *Flora Iranica*. N. 150, Academiche Druk. Pennsylvania, USA.
- Ren-Wang, J., Kit-Man, L., Po-Ming, H., Thomas, C.W., Mak, K.S. and Kwok-Pui, F. (2005) Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry* 12: 237-246.
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes- Ferreira M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal Plant Physiology* 160: 1025– 1032.
- Shimojo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., Shimizu, T. and Shirasawa, T. (2010) Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 88: 896-904.
- مدرس، م. و ابریشم‌چی، پ. (۱۳۸۷) بررسی تاثیر زمان برداشت بر فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروبوک (*Salvia leriifolia*). *مجله علمی پژوهشی علوم دانشگاه تربیت معلم* ۸: ۳۴۳-۳۵۶.
- مدرس، م. و ابریشم‌چی، پ. (۱۳۸۹) بررسی فعالیت ضد باکتریایی ریشه گیاه نوروبوک (*Salvia leriifolia*) در مراحل مختلف رشد و نمو. *مجله زیست شناسی ایران* ۲۳: ۷۰۷-۷۱۷.
- مدرس، م. ابریشم‌چی، پ. اجتهادی، ح. و رضانی، ع. (۱۳۸۶ a) تکثیر گیاه نوروبوک با استفاده از کشت رویان. *فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران* ۱۵: ۱۴۱-۱۲۹.
- مدرس، م. ابریشم‌چی، پ. فرحوش، ر. و اجتهادی، ح. (۱۳۸۶ b) بررسی تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه و برگ نوروبوک (*Salvia leriifolia*) در مراحل رشد و نمو. *مجله علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران* ۲۳: ۲۹۴-۲۸۵.
- De-Eknamkul, W. and Ellis, B.E. (1985) Effects of auxins and cyto kinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. *Plant Cell Reports* 4: 50-53.
- Dong, Y. B., Liu, Z. S. Liang, and Wang, W. L. (2010) Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrasonic Sonochemistry* 17: 61-65.
- Duzzo Gamaro, G., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P. and Ardenghi, P. (2011) Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol* 10:1-6.
- Grzegorzcyk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E. and Wysokinska, H. (2005) *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 74: 17-21.
- Hosseinzadeh, H. and Lary, P. (2000) The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. *Phytotherapy Research* 14:384-387.
- Hosseinzadeh, H. and Yavary, M. (1999) Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 9: 60-61.
- Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M. H. and Hosseini, E. (2000) Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 10:63-64.

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

^{1,3*}Modarres. M, ¹Lahooti. M, ²Asili. J, ⁴Kafi. M and ¹Ramazani, A.

^{1*}Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.

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

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

⁴Department Of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad

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

Abstract:

Salvia leriifolia is a medicinal plant from Lamiaceae family native to Khorasan and Semnan Provinces. This plant has medicinal properties such as antinociceptive, anti-inflammatory, antidiabetic, antimicrobial and Antioxidant which all have been confirmed by researchers. In this research, callus induction was established for production of phenolic acids. For this purpose, the leaf explants were cultured in MS medium supplemented with 2,4-D (0,1,2,3,4 mgL⁻¹), KIN (0,0.3,1mgL⁻¹), BAP (0,1,2,3,4,5,6 mgL⁻¹) and NAA (0,1,2,3 mgL⁻¹). Accumulation of phenolic acids was measured after 4 weeks of culture by HPLC. Results showed that the best treatments for callus induction and growth were at the BAP5 mgL⁻¹+NAA5mgL⁻¹ and 2, 4- D 3 mgL⁻¹ + KIN1mgL⁻¹. Accumulation of caffeic acid and salvianolic acid B in calli was higher than leaves of *Salvia leriifolias*. The highest rosmarinic acid concentration was found in the treatment BAP 5mgL⁻¹+NAA5mgL⁻¹ that were about 3 times higher than in leaves.

Key Words: Callus, Phenolic acids, *Salvia leriifolia*.

* Corresponding author: M_modarres 70@yahoo.com