تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و کیتوزان بر میزان ترکیبات فنلی در کالوس و گیاهچه‌های کامل درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss)

غلامرضا اصغری[1*]، رسول قاسمی[2]، مهدی یوسفی[2] و نگین مهدی نژاد[3]

[1] مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، [2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران و [3] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۰ ، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹)

چکیده:

گیاه درمنه کوهی از گیاهان دارویی است که دارای ترکیبات ارزشمندی مانند ترکیبات ترپنی و فنلی است. کشت گیاه با انتقال دانه رستهای حاصل از بذرهای استریل به محیط MS ایجاد شد والقا کالوس با انتقال قطعاتی از گیاهچه‌ها به محیط MS با تیمار هورمونی (NAA=2mg/ml , 2,4-D=2mg/ml , Kin=2mg/ml) صورت گرفت.گیاهچه‌ها و کالوس‌ها به طور جداگانه تحت ۹ تیمار هورمونی شامل غلظت‌های مختلف ۲و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید، کینتین و غلظتی ثابت از نفتالین استیک اسید قرار گرفتند. همچنین گیاهچه‌ها با اسید سالیسیلیک و کیتوزان به عنوان محرک تیمار شدند. حضور فنولیک‌های تام، تانن‌های کندانسه، تانن‌های تام، فنولیک‌های غیر تانئی و فلاونوییدهای تام در کالوس و گیاهچه‌ها به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. در گیاهچه‌های تحت تیمار ، فنولیک‌ها و تانن‌های تام و ترکیبات فنلی غیر تانئی در تیمار با کیتوزان مقادیر بیشتری را نشان دادند اما در مورد فلاونوییدهای تام بیشترین نتیجه در تیمار با اسید سالیسیلیک مشاهده گردید. بررسی گیاهچه‌های تحت تیمار با مقادیر مختلف هورمونی ، افزایش را در انواع ترکیبات فنلی نشان داد ولی میزان فلاونوییدهای تام در تمام تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافته بود. در بررسی کالوسهای تحت تیمار با مقادیر مختلف هورمونی افزایش در میزان فنولیکها و تانن‌های تام دیده شد. به نظر می‌رسد تأثیر عوامل هورمونی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی گیاه درمنه کوهی بستگی به نوع و غلظت هورمون و همچنین نوع کشت گیاه دارد.

کلمات کلیدی: درمنه کوهی، کشت درون شیشه، ترکیبات فنلی، تیمارهای هورمونی، اسید سالیسیلیک، کیتوزان.

مقدمه:

گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss.) از خانواده *Asteraceae* در بخش قابل توجهی از پوشش گیاهی فلات ایران حضور دارد (Mozaffarian, 1996). این جنس به دلیل دارا بودن ترکیبات مهم دارویی از جمله کومارین‌ها ، سزکویی‌ترپنوییدها ، فنول‌ها ، استیلن‌ها و منوترپنوییدها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. برخی از گونه‌های گیاه به عنوان داروی ضد مالاریا، ضد باکتری، ضدقارچ، سایتوتوکسیک و آنتی اکسیدان مطرح می‌باشند (Iranshahi *et al.*, 2007). ترکیبات فنلی در گیاهان به واسطه فعالیت آنتی اکسیدانی قوی و ویژگی دارویی مورد توجه خاص محققین می‌باشند (Salah, *et al.*, 1995). لازم به ذکر

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: asghari@pharm.mui.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

است که اغلب ترکیبات فنلی دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می‌باشند. در ارتباط با خاصیت آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها گزارش‌های فراوانی مبنی بر القاء تجمع ترکیبات فنلی و فعالیت پراکسیدازی آنها در گیاهان تحت تیمارها و تنش‌های مختلف از جمله تنش فلزات سنگین وجود دارد. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی به خاطر توان باند شدن این مواد با یون‌های آهن و مس می‌باشد. آنها می‌توانند با کلات نمودن یون آهن، سبب غیر فعال شدن آهن و مهار واکنش فیتون که اصلی ترین منبع تولید رادیکالهای آزاد است، شوند. از دیگر دلایل آنتی اکسیدان بودن ترکیبات فنلی، می‌توان به مهار پراکسیداسیون لیپید به وسیله به دام اندازی رادیکال الکوکسیل لیپید اشاره نمود که این خاصیت به ساختار مولکول، تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل مولکول مربوط می‌شود (Van Acker, *et al.,* 1996). استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت سلول، در تولید بیشتر متابولیت‌ها مؤثر می باشد (Wang *et al.,* 2004). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که حذف 2,4-D از محیط کشت و جایگزینی آن با تنظیم کننده‌هایی مثل نفتالن استیک اسید (NAA) یا اندول استیک اسید (IAA) بر افزایش تولید نیکوتین در تنباکو و شیکونین در کشت *L.minus* مؤثر بوده است (Fukui *et al.,* 1983, Sahai and Shuler 1984).

تحریک تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Haplopappus gracilus* با استفاده از کینتین گزارش شده است (Zhang W and Furuzaki, 1999).

در مطالعات متعددی از اسید سالیسیلیک به عنوان الیسیتور در افزایش تولید متابولیت‌ها استفاده شده است. در یک بررسی با اضافه کردن اسید سالیسیلیک، تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون *Taxsus baccata* چندین برابر نسبت به محیط شاهد افزایش نشان داده است (Khosroushahi *et al.,* 2006). طی مطالعات انجام شده بر روی کشت ریشه مویین *Atropa belladonna* استفاده از الیسیتور اسید سالیسیلیک منجر به آزاد سازی تروپان آلکالوئیدها در محیط کشت تا ۳۵ درصد کل آلکالوئیدها شده است (Kung *et al.,* 2001). در یک مطالعه دیگر تاثیر اسید سالیسیلیک در کشت ریشه مویین گیاه *Brugmansia saureolens* از خانواده سیب زمینی انجام شد. نتایج این بررسی افزایش ده برابری تولید آلکالوئیدها را نشان داد (Rawia and Michael, 2004).

به دلیل اهمیت این گیاه به واسطه ترکیبات شیمیایی مؤثر آن بررسی تأثیر مواد هورمونی بر متابولیت‌ها و ترکیبات شیمیایی گیاه از اهداف این پژوهش است. عوامل هورمونی یکی از مهمترین عوامل تأثیر گذار بر ترکیبات گیاه می‌باشند، لذا بررسی تأثیرات عوامل هورمونی بر گیاه و شناخت محیط کشت مناسب از این نظر و همچنین بررسی تأثیر محرک‌های مختلف برمهمترین ترکیبات فنلی گیاه درمنه کوهی از اهداف این پژوهش می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

کشت درون شیشه: بذرهای گیاه درمنه کوهی از شرکت پاکان بذر تهیه شد. بذر گیاه تحت شرایط ضدعفونی شده در زیر کابینت لامینار ایرفلو، ابتدا با اتانول ۹۶ درجه به مدت ۳ دقیقه و بعد با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۹ دقیقه استریل شد. سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به پتری دیش‌های استریل منتقل گردید. پتری دیش‌های حاوی دانه‌های استریل در اتاق کشت در تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ایجاد دانه‌رست، آنها به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) جامد فاقد هورمون جهت ایجاد گیاهچه منتقل شدند. به منظور تشکیل کالوس دانه‌رست ها به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) جامد دارای هورمون شامل (NAA=2mg/ml, 2,4-D=2mg/ml, Kin=2mg/ml) منتقل شدند. پس از تشکیل گیاهچه و کالوس به منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف قطعه‌ای ۲ سانتیمتری از گیاهچه و قطعه‌ای از کالوس به قطر ۱ سانتیمتر به محیط کشت شامل تیمارهای مختلف که در جدول ۱ نشان داده شده است منتقل شدند. کلیه تیمارها در ۳ تکرار انجام گرفت. نمونه‌های تیمار شده پس از یک ماه برداشت و آنالیز شدند. کالوس گیاه و کشت درون شیشه‌ای گیاه با انتقال دانه‌رست‌های رشد یافته به ظروف کشت جامد ایجاد شد. تیمارها در دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتیگراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در محیط‌های کشت

Treatments	NAA	2,4-D	Kinetin	Salicylic acid	Chitosan
A	۱	۰/۵	۰/۱	۰	۰
B	۱	۱	۰/۱	۰	۰
C	۱	۲	۰/۱	۰	۰
D	۱	۰/۵	۰/۲	۰	۰
E	۱	۱	۰/۲	۰	۰
F	۱	۲	۰/۲	۰	۰
G	۱	۰/۵	۰/۰۵	۰	۰
H	۱	۱	۰/۰۵	۰	۰
I	۱	۲	۰/۰۵	۰	۰
J	۰	۰	۰	۱mM	۰
K	۰	۰	۰	۰	۱۰۰mg/L
L	۰	۰	۰	۱mM	۱۰۰mg/L
M	۰	۰	۰	۰	۰

دراتاق رشد نگهداری شدند. واکشت کالوس هر چهار هفته یکبار با انتقال قطعه شاداب و تازه کالوس به محیط کشت تازه و واکشت گیاه با انتقال بخشی از اندام هوایی به محیط کشت جدید صورت گرفت (Dehshahri *et al.,* 2012).

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: فنولیک‌های تام و تانن‌های تام با روش فولین‌سیوکالتو اندازه‌گیری شدند (۱۳). مقدار ۱۰۰mg نمونه با ۱۰ سی‌سی استن ۷۰٪ به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و عصاره‌گیری شد. به ۵۰ میکرولیتر از عصاره بدست آمده که حجم آن با آب مقطر به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد ، ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو یک نرمال و ۱/۲۵ سی‌سی از محلول سدیم کربنات ۲۰٪ اضافه کرده و بعد از طی زمان ۴۰ دقیقه‌ای در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون هر یک از مقادیر ۱۰۰ ، ۹۰، ۸۰، ۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۰ میکرولیتر از محلول استاندارد اسید تانیک (۰/۱mg/ml) را با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میکرو لیتر رسانده و به هر یک ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو یک نرمال و ۱/۲۵ سی‌سی از محلول سدیم کربنات ۲۰٪ اضافه و بعد از طی زمان ۴۰ دقیقه‌ای در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از منحنی و معادله خط بدست آمده میزان ترکیبات فنلی محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان تانن‌ها: برای اندازه‌گیری تانن‌های تام از همان روش فنولیک‌های تام استفاده شد با این تفاوت که به عصاره اولیه ۱۰۰ mg PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) برای جذب تانن‌ها، اضافه گردید و در نتیجه نمونه‌های بدست آمده فقط حاوی ترکیبات فنلی ساده بودند. پس از اندازه‌گیری از طریق محاسبه، تانن‌های کل آنها گزارش شد:

تانن‌های تام(٪)= فنولیک‌های غیر تانني(٪)–فنولیک‌های تام(٪)

اندازه‌گیری میزان تانن‌های متراکم: اندازه‌گیری تانن‌های متراکم (پروآنتوسیانیدین‌ها) با روشی انجام گرفت که در آن به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استنی آماده شده، ۳ سی‌سی مخلوط بوتانل – اسیدکلریدریک ۳۷٪ به نسبت ۵ : ۹۵ اضافه گردید و در نهایت مقدار ۰/۱ سی‌سی از محلول ۲٪ فریک آمونیوم سولفات در اسیدکلریدریک ۲ نرمال افزوده شد، بعد از مخلوط کردن محتویات لوله‌ها، مدت یک ساعت آنها را در بن‌ماری جوش قرار داده و سپس جذب آنها در ۵۵۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید (Porter *et al.,* 1986)..

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی غیر تانئی: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی غیر تانئی وقتی به عصاره اولیه، ماده PVPP را اضافه کنیم، تمامی تانن‌ها به آن باند شده و پس از سانتریفوژ از نمونه خارج می‌گردند، در نتیجه آن چه که اندازه‌گیری می‌شود ترکیبات فنلی ساده‌اند (Makkar *et al.*, 1993).

اندازه‌گیری میزان فلاونوییدها: اندازه‌گیری فلاونوییدهای تام با استفاده ازروش آلومینیوم کلراید انجام پذیرفت. به این صورت که به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۲۰٪ اضافه گردید. سپس ۲ قطره اسید استیک گلاسیال و در نهایت حجم هر لوله با متانول به ۳ سی‌سی رسید. بعد از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در برابر بلانک در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (بلانک برای هر نمونه به همان ترتیب آماده گردید در حالی که فقط $AlCl_3$ نداشت). منحنی کالیبراسیون با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰، ۲۰ ، ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول استاندارد کوئرستین (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) رسم گردید (El-Sayed, and Abdel-Hameed, 2009).

روش‌های آماری: تمام داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار می‌باشد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شدند. برای بررسی آزمون ANOVA و پس آزمون TUKEY استفاده شد و P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

تأثیر تیمارهای هورمونی بر میزان ترکیبات فنلی، تانن‌ها، تانن‌های متراکم، ترکیبات فنلی غیر تانئی و فلاونوییدها در گیاه کشت شده در شیشه در جدول ۲ و در کالوس گیاه در جدول ۳ ارائه شده است. طبق جدول ۲ بیشترین مقدار فنولیک‌های تام در تیمار G و کمترین آن در تیمار E مشاهده گردید. در مورد تانن‌های تام بیشترین میزان در تیمار G و کمترین آن در تیمار I بدست آمد. بررسی تانن‌های متراکم، کمترین مقدار را در تیمار I و شاهد نشان داد و این در حالی بود که مقادیر در بقیه تیمارها به هم نزدیک بود. در مورد فنولیک‌های غیر تانئی هم مقادیر بسیار نزدیک به هم بودند. با مقایسه میزان فلاونوییدها در تیمارهای مختلف مشخص شد که این شاخص در همه تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافته است.

طبق جدول ۳ و در مقایسه بین گروهی، بیشترین مقدار فنولیک‌های تام مربوط به تیمار A و کمترین آن مربوط به تیمار H بود. مشاهده مقادیر تانن‌های تام نشان داد که بیشترین میزان آن در تیمار D و کمترین در تیمارهای I و H بوده است. اما در بررسی مقادیر تانن‌های متراکم، فنولیک‌های غیر تانئی و فلاونوییدها، تفاوت چندانی بین تیمارهای مختلف دیده نشد.

مطابق با آنچه در جدول ۴ به چشم می‌خورد، در مورد فنولیک‌ها و تانن‌های تام مقادیر در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد افزایش یافته بودند. همچنین در میزان فنولیک‌های غیر تانئی هم نسبت به شاهد افزایش نسبی مشاهده گردید.

در بررسی مقادیر بدست آمده برای تانن‌های متراکم، تفاوت چندانی با شاهد دیده نشد. اما بیشترین مقدار فلاونوییدها در تیمار با اسید سالیسیلیک و کمترین مقدار آن در تیمار با مخلوط اسید سالیسیلیک و کیتوزان بدست آمد. در ضمن تفاوت میزان ترکیبات فنلی گزارش شده برای شاهد در جداول ۲ و ۴ مربوط به تفاوت نسل مورد استفاده برای تیمار می‌باشد.

اثر اسید سالیسیلیک و کیتوزان فقط بر روی گیاهچه‌های درمنه بررسی گردید.

بحث:

همان طور که در جدول شماره ۲ مشاهده میشود در بررسی گیاهچه‌های تیمار شده با ترکیب‌های هورمونی مختلف، بیشترین میزان فنولیک‌های تام در تیمار با ترکیب هورمونی G (NAA=1mg/l, 2,4-D=0.5mg/l, Kin=0.05mg/l) بدست آمد، همچنین مقدار فنولیک‌های تام در این ترکیب بیشترین اختلاف معنی‌دار را با ترکیب E (NAA=1mg/l, 2,4-D=1mg/l, Kin=0.2mg/l) نشان داد. لازم به ذکر است که در اندازه‌گیری تانن‌های تام نیز همین نتایج بدست آمد. به نظر می‌رسد که افزایش هم‌زمان غلظت کینتین و اکسین باعث تغییر در میزان تانن‌ها و در نتیجه در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

جدول ۲- تأثیر تیمارهای هورمونی بر میزان ترکیبات فنلی در گیاه درمنه کوهی کشت شده در شیشه

تیمارها	فلاونوییدهای تام (%)	فنولیک‌های غیر تانئنی (%)	تانن‌های متراکم (%)	تانن‌های تام (%)	فنولیک‌های تام (%)
A	۰/۱۶ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۶۳ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۷۴ ± ۰/۰۲^{a}	۱/۱۰ ± ۰/۲۳^{abcde}	۴/۷۴ ± ۰/۲۲^{abcde}
B	۰/۱۴ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۴۶ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۸۰ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۲۷ ± ۰/۰۵^{abcde}	۴/۷۴ ± ۰/۰۶^{abcde}
C	۰/۱۳ ± ۰/۰۱^{a}	۳/۷۲ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۷۷ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۷۵ ± ۰/۲۲^{abcde}	۴/۴۸ ± ۰/۲۲^{abcde}
D	۰/۱۳ ± ۰/۰۰^{a}	۳/۶۵ ± ۰/۰۶^{a}	۰/۷۴ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۰۱ ± ۰/۳۰^{abcde}	۴/۶۶ ± ۰/۲۴^{abcde}
E	۰/۱۴ ± ۰/۰۱^{a}	۳/۴۸ ± ۰/۰۲^{c}	۰/۷۰ ± ۰/۰۵^{a}	۰/۵۸ ± ۰/۰۸^{a}	۴/۰۶ ± ۰/۱۰^{a}
F	۰/۱۷ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۷۶ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۶۷ ± ۰/۰۷^{a}	۰/۵۴ ± ۰/۱۱^{abcde}	۴/۳۰ ± ۰/۰۹^{abcde}
G	۰/۲۱ ± ۰/۰۵^{a}	۳/۵۹ ± ۰/۰۶^{f}	۰/۷۱ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۴۳ ± ۰/۱۰^{b}	۵/۰۲ ± ۰/۱۶^{b}
H	۰/۱۸ ± ۰/۰۱^{a}	۳/۵۶ ± ۰/۰۴^{e}	۰/۷۰ ± ۰/۰۲^{a}	۰/۵۶ ± ۰/۱۲^{ca}	۴/۱۲ ± ۰/۱۰^{ca}
I	۰/۱۹ ± ۰/۰۳^{a}	۳/۶۴ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۴۷ ± ۰/۰۴^{b}	۰/۴۴ ± ۰/۵۶^{da}	۴/۰۸ ± ۰/۵۶^{da}
شاهد	۰/۴۰ ± ۰/۰۸^{b}	۳/۳۴ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۴۸ ± ۰/۰۵^{bc}	۰/۸۵ ± ۰/۳۴^{ea}	۴/۲۰ ± ۰/۳۵^{ea}

در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی می‌باشد.

جدول ۳- تأثیر تیمارهای هورمونی بر میزان ترکیبات فنلی در کالوس‌گیاه درمنه کوهی

تیمارها	فلاونوییدهای تام (%)	فنولیک‌های غیر تانئنی (%)	تانن‌های متراکم (%)	تانن‌های تام (%)	فنولیک‌های تام (%)
A	۰/۱۷ ±۰/۰۱^{a}	۳/۷۶ ± ۰/۰۸^{a}	۰/۹۲ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۴۵ ± ۰/۱۴^{a}	۵/۲۲ ± ۰/۱۹^{a}
B	۰/۲۰ ± ۰/۰۳^{a}	۳/۶۷ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۹۱ ± ۰/۰۱ ^{a}	۱/۰۶ ± ۰/۱۵^{b}	۴/۷۳ ± ۰/۱۶^{b}
C	۰/۱۶ ± ۰/۰۰^{a}	۳/۶۷ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۸۸ ± ۰/۰۱ ^{a}	۱/۴۶ ± ۰/۰۸^{ad}	۵/۱۴ ± ۰/۰۸^{ad}
D	۰/۲۲ ± ۰/۰۷ ^{a}	۳/۶۷ ± ۰/۰۵^{a}	۰/۹۴± ۰/۰۳ ^{a}	۱/۴۸ ± ۰/۰۳^{a}	۵/۱۶ ± ۰/۰۷^{a}
E	۰/۱۵ ± ۰/۰۰^{a}	۳/۶۷ ± ۰/۱۱^{a}	۰/۸۶ ± ۰/۰۲ ^{a}	۱/۳۸ ± ۰/۰۸^{ab}	۵/۰۶ ± ۰/۰۳^{ab}
F	۰/۱۷ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۶۸ ± ۰/۰۸^{a}	۰/۹۱ ± ۰/۰۶ ^{a}	۱/۱۳ ± ۰/۱۳^{bcdef}	۴/۸۱ ± ۰/۱۰^{bcdef}
G	۰/۱۵ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۶۲ ± ۰/۰۴^{a}	۰/۸۹ ± ۰/۰۱ ^{a}	۱/۲۱ ± ۰/۱۶^{bcdef}	۴/۸۳ ± ۰/۱۳^{bcdef}
H	۰/۱۷ ± ۰/۰۱^{a}	۳/۵۹ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۸۹ ± ۰/۰۵ ^{a}	۰/۹۷ ± ۰/۱۸^{e}	۴/۵۶ ± ۰/۲۱^{e}
I	۰/۱۵ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۶۶ ± ۰/۱۰^{a}	۰/۸۹ ± ۰/۰۳ ^{a}	۰/۹۴ ± ۰/۰۶^{f}	۴/۶۰ ± ۰/۰۶^{f}

در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی می‌باشد.

جدول ۴- تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر ترکیبات فنلی گیاه کشت شده در شیشه

تیمارها	فلاونوییدهای تام (%)	فنولیک‌های غیر تانئنی (%)	تانن‌های متراکم (%)	تانن‌های تام (%)	فنولیک‌های تام (%)
اسید سالیسیلیک	۰/۴۳ ± ۰/۰۲^{a}	۳/۵۸ ±۰ /۱۰^{a}	۱/۱۰ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۳۷ ± ۰/۲۲^{a}	۴/۹۴ ±۰/۲۲^{a}
کیتوزان	۰/۳۶ ± ۰/۰۴^{ab}	۳/۷۸ ± ۰/۰۴^{b}	۱/۱۱ ± ۰/۰۱ ^{a}	۱/۶۵ ±۰ /۲۴ ^{a}	۵/۴۳ ± ۰/۲۶^{a}
سالیسیلیک+کیتوزان	۰/۲۹ ± ۰/۰۴^{b}	۳/۶۸ ± ۰/۰۹^{ab}	۱/۰۷ ± ۰/۰۳^{a}	۱/۴۵ ± ۰/۲۳^{a}	۵/۱۴ ± ۰/۳۲^{a}
شاهد	۰/۳۳ ± ۰/۰۴^{ab}	۳/۳۳ ± ۰/۰۱^{c}	۱/۱۱ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۷۲ ± ۰/۰۷^{b}	۴/۰۵ ± ۰/۰۸^{b}

در هر ستون حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی می‌باشد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

میزان ترکیبات فنلی شده است. تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویی گیاه *Panax ginsing*، بعد از تیمار با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، افزایش یافتند. افزودن بنزیل آمینو پورین (BA) و کینتین (Kin) به محیط کشت باعث افزایش توده تولید شده و بیوسنتز ترکیبات فنلی در ریشه‌های مویی شد. افزودن اکسین به ریشه‌هایی که محتوی اسید جیبرلیک و سیتوکینین‌ها بودند موجب افزایش ترکیبات فنلی گردید. به علاوه 1mg/L کینتین، بیوسنتز ترکیبات فنلی را افزایش داد (Jeong *et al.*, 2007).

تانن‌ها به دو بخش قابل هیدرولیز و تانن‌های متراکم تقسیم می‌شوند. در بررسی میزان تانن‌های متراکم این نتیجه بدست آمد که تیمارهای تمام ترکیب‌های هورمونی دارای اختلاف معنی دار با شاهد می‌باشند. ولی بیشترین میزان در تیمار B (NAA=1mg/l, 2,4-D=1mg/l, Kin=0.1mg/l) و کمترین مقدار در تیمار I (NAA=1mg/l, 2,4-D=2mg/l, Kin=0.05mg/l) می‌باشد. نکته جالب توجه در تیمار مذکور تأثیر کاهش کینتین و افزایش اکسین در میزان تانن‌های متراکم می‌باشد. نتایج در جدول ۲ قابل مشاهده است.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود اندازه‌گیری فنل‌های غیرتاننی نشان داد که بیشترین اختلاف معنی دار را تیمارهای B(NAA=1mg/l , 2,4-D=1mg/l , Kin=0.1mg/l) ، E (NAA=1mg/l, 2,4-D=1mg/l, Kin=0.2mg/l) و F(NAA=1mg/l, 2,4-D=2mg/l, Kin=0.2mg/l) با دیگر تیمارها داشتند. این در حالی است که بیشترین میزان این نوع از فنل‌ها در تیمار F (NAA=1mg/l, 2,4-D=2mg/l, Kin=0.2mg/l) و کمترین آن در تیمار شاهد و پس از آن در تیمار B (NAA=1mg/l, 2,4-D=1mg/l, Kin=0.1mg/l) مشاهده گردید. به نظر می‌رسد که کاهش همزمان غلظت کینتین و اکسین باعث تغییر در میزان ترکیبات فنلی غیرتاننی شده است. همچنین فلاونوییدهای تام در همه تیمارها با شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان دادند ضمن اینکه بیشترین میزان در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمارهای C (NAA=1mg/l, 2,4-D=2mg/l, Kin=0.1mg/l) و D (NAA=1mg/l, 2,4-D=0.5mg/l, Kin=0.2mg/l) تولید شد. به نظر می‌رسد که استفاده از کینتین و اکسین باعث تغییر در میزان ترکیبات فلاونوییدی در تمام تیمارها شده است. گزارش شده است که سیتوکینین با القای تمایز در سلول‌ها منجر به افزایش تولید ترکیبات در بافت‌ها می‌شود (Verma and Sen, 2009).

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در بررسی کالوس‌های تیمار شده با ترکیب‌های هورمونی مختلف این نتیجه بدست آمد که میزان فنولیک‌های تام در تیمار با ترکیب A(NAA=1mg/l, 2,4-D=0.5mg/l, Kin=0.1mg/l) با تعداد بیشتری از ترکیب‌ها، اختلاف معنی‌دار دارند و ضمناً بیشترین میزان فنولیک‌های تام در تیمار با همین ترکیب هورمونی مشاهده گردید. همچنین میزان تانن‌های متراکم و فنل‌های غیرتاننی در تیمارهای مختلف، هیچ اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. همچنین در میزان فلاونوییدهای تام تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ارزیابی میزان تانن‌های تام تیمارهای مختلف نشان داد که بیشترین مقدار در تیمار با سیستم هورمونی D ثبت شد. با توجه به عدم تغییر غلظت تانن‌های متراکم به نظر می‌رسد این تغییرات مربوط به تغییر در غلظت تانن‌های قابل هیدرولیز باشد.

همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، بیشترین مقدار فلاونوییدها در تیمار با اسید سالیسیلیک و کمترین مقدار آن در تیمار با مخلوط اسید سالیسیلیک و کیتوزان بدست آمد. نشان داده شده است که محرک‌های مختلف می‌تواند تأثیر متفاوتی در تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشد. استفاده از محرک متیل جاسمونات در کشت ریشه‌های مویین گیاه کتان (*Gossypium barhadens*)، تولید گوسیپول (gossypol) تا ۸ برابر و ۶- متیل گوسیپول تا ۲ برابر در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافت، درحالی‌که اسید سالیسیلیک تأثیری بر تولید متابولیت‌های ذکر شده نداشته است (Frankfater and Dowd, 2009). نکته جالب توجه این که ارزیابی میزان تانن‌های متراکم نشان داد که بین تیمارها هیچ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود در مقایسه تیمار مربوط به اسید سالیسیک و تیماری که در آن مخلوط اسید سالیسیک و کیتوزان استفاده شده بود تفاوت معنی‌دار در میزان فلاونوییدهای تام مشاهده گردید. گزارش شده است که اسید سالیسیلیک باعث افزایش سنتز کاروتنوئید و گزانتوفیل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

ولی کاهش میزان سطح پیگمان‌های کلروفیل در گیاهان گندم و لوبیا می‌شود (Anandhi, and Ramanujam, 1997). کاربرد اسید سالیسیلیک در محیط کشت *Thymus membranaceus*، موجب افزایش در میزان فنولیک‌ها گردید (Tortosa *et al.,* 2012). تجمع ترکیبات فنلی در انگور پس از کاربرد اسید سالیسیلیک نیز گزارش شده است (Chen *et al.,* 1993). نشان داده شده است که اسید سالیسیلیک موجب افزایش تولید آتروپین در کشت سلولی گیاه داتورا و تولید گلیسیریزین در کشت ریشه گیاه شیرین بیان شده است (Shabani *et al.,* 2009, Zanganeh *et al.*, 2010).

گزارش شده است که استفاده از مخلوط کیتوزان و پکتین و یا کیتوزان به تنهایی باعث افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه (آنتراکینون‌ها، فلاونوییدها و فنولیک‌ها) می‌شود ولی رشد ریشه را مهار می‌کند. حداکثر تولید متابولیت‌های ثانویه در غلظت ۰/۲ mg/ml کیتوزان مشاهده شد که نتیجه آن ۵۲/۴۵ mg/g وزن خشک (DW) فنولیک‌ها (البته وقتی که ۰/۲ mg/ml کیتوزان مخلوط با ۰/۲ mg/ml پکتین باشد) و ۷۵/۳۲ mg/g وزن خشک فلاونوییدها می‌باشد. کاربرد غلظت بیشتر کیتوزان، مقادیر را کم می‌کند (Vasconsuelo *et al.,* 2003, Abdullahil *et al.,* 2012). به نظر می‌رسد مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات فنلی در گیاه درمنه کوهی فعال بوده تا عوامل هورمونی، اسید سالیسیلیک و کیتوزان بتواند بر آنها تأثیر گذاشته و باعث تولید میزان متفاوتی از آنها گردد.

نتیجه‌گیری کلی:

در مقایسه کلی بین گیاهچه‌های درمنه کوهی و کالوس آن، افزایش نسبی در مقادیر فنولیک‌ها و تانن‌های متراکم در کالوس‌ها مشاهده گردید، در حالی که مقادیر مربوط به فنولیک‌های غیر تانني و فلاونوییدها در گیاهچه‌های درمنه کوهی و کالوس آن چنین افزایشی را نشان نداد.

تقدیر و تشکر:

هزینه‌های این تحقیق توسط معاونت امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین شده است که بدین وسیله قدردانی می‌شود.

منابع:

Abdullahil, B., Kabir, S. H., Lee, E. J. and Paek, K. Y. (2012) Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). Australian Journal of Crop Science 6:1349-1355.

Anandhi, S. and Ramanujam, M. P. (1997) Effect of salicylic acid on black gram (*Vigna mungo*) cultivars. Indian Journal of. Plant Physiology 2: 138-141.

Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D. F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systematic acquired resistance by salicylic acid. Science 262: 1883-93.

Dehshahri, S. H., Afsharypuor, S., Asghari, G.and Mohagheghzadeh, A. (2012) Determination of volatile glucosinolate degradation products in seed coat, stem and *in vitro* cultures of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences 7:51-56.

El-Sayed, S. and Abdel-Hameed, E. S. (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. Food Chemistry 1271-1277.

Fukui, H., Yoshikawa, N. and Tabata, M. (1983) Induction of shikonin formation by agar in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension culture. Phytochemistry 22: 2451-2453.

Frankfater, C. R. andDowd, M. K. (2009) Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots. Plant Cell Tissue Organ Cultures 98: 341-349.

Jeong, G. T., Woo, J. C. and Park, D. H. (2007) Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Biotechnology and Bioprocess Engineering 12:86-91.

Iranshahi, M., Emami, S. A. and Mahmoud-Soltant, M. (2007) Detection of sesquiterpene lactons in ten *Artemisia* species population of Khorasan provinces. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 10: 183-188.

Khosroushahi, A. V., Valizadeh, M., Gasempour. A., Khosroushahi, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. and Omidi, Y. (2006) Improved taxol production by combination of inducing factor in suspension culture of *Taxus baccata*. Cell Biology Interaction 30:262-9.

Kung, T. A., Lee, H., Hirano, T., Yamakawa, T., Yasuo, I., koichiro S. (2001) Responses of Transformed

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]

activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food chemistry 130:362-369.

Van Acker, S. A. B. E., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, E. H., Van Bennekm, W. P., Van der, W. J. F. and Jijgh Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology Medicine 20: 331–34.

Vasconsuelo, A., Giuletti, A. M., Picotto, G., Talou, J. R. and Boland, R. (2003) Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. Plant Sciences 165:429-436.

Verma, P. and Sen, N. L. (2009) The impact of plant growth regulators on growth and biochemical constituents of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 14: 144 – 153.

Wang, Y.,Yuan, Y. and Wn. J. (2004) Induction studing of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Taxane Production in suspension of *Taxus chinensis* var. Mairei. Biochemical Enginering Journal 19:259-265.

Zanganeh, V., Asghari, G. and Ehsanpour, A. A. (2010) Influence of salicylic acid on atropine production in *Datura metel* L. callus culture. Pharmaceutical Sciences 16:29-36.

Zhang, W. and Furuzaki, S. (1999) Production of anthocyanins by plant cell cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering 4: 231-252.

Root Culture of Atropa Belladonna to Salicylic Acid Stress 91: 586-589.

Makkar, H. P. S., Blummel, M., Borowy, N. K. and Becker, K. (1993) Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of Sciences, Food and Agriculture 61:161-63.

Mozaffarian, V. (1996) A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser, Tehran.

Rawia, Z. and Michael, W. (2004) Induction of tropan alkaloid formation in transformed root culture of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Z. Nuturforsch 59 C: 863-867.

Sahai, O. and Shuler, M. L. (1984) Enviromental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum.* Biotechnology and Bioengineering 26: 111-120.

Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. and Rice-Evans, C. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archive Biochemistry and Biophysics 322: 339–342.

Shabani, L., Ehsanpour, A., Asghari, G. and Emami, J. (2009) Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology 56: 621-626.

Tortosa, V. P., Orenes, A. L., Perez, A. M., Ferrer, M. A. and Calderon, A. A. (2012) Antioxidant

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.10.3.2]