

بررسی الگوی رشد سلولی، فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

عارفه راستگو^۱، یونس پوربیرامی هیر^{۱*}، اسماعیل چمنی^۱، محمدحسین میرجلیلی^۲ و منصور میران^۳

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ گروه علوم باغبانی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، اردبیل، ایران

چکیده

گونه‌های جنس *Salvia* از جمله نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) به‌عنوان غنی‌ترین منابع اسیدهای فنولیک شناخته می‌شوند. اهمیت تجاری این ترکیبات سبب توجه فزاینده به افزایش تولید آن‌ها از طریق فناوری‌های کشت بافت و کشت سلولی شده است. این پژوهش با هدف بررسی الگوی تغییرات زیست‌توده، فعالیت آنزیم‌های کلیدی و سنتز متابولیت‌ها در طی دوره رشد سلولی نوروزک انجام شد. از برگ‌های گیاه نوروزک به عنوان ریزنمونه و از ترکیب هورمون‌های نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین (۱۵BA + ۲۰ NAA) میکرومولار در محیط (MS) به عنوان تیمار بهینه برای رشد سلول در کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شد. به مدت پنج هفته، زیست‌توده و زنده‌مانی سلول، متابولیت‌های فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT و میزان تجمع رزمارینیک اسید ارزیابی گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح (P < ۰/۰۱) و (P < ۰/۰۵) بود. نتایج بررسی‌ها نشان داد که الگوی رشد سلولی سیگموئیدی است و بیشترین زیست‌توده سلول در هفته چهارم (روز ۲۸) به‌دست آمد. درصد زنده‌مانی سلول از حدود ۹۸٪ در هفته اول (روز ۷) به حدود ۸۰٪ در هفته پنجم (روز ۳۵) کاهش یافت. حداکثر فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هفته سوم (روز ۲۱) مشاهده گردید. بیشترین محتوای پروتئین کل و اوج فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT در هفته سوم و چهارم (روز ۲۱ و ۲۸) مشاهده شد که با بیشترین تجمع رزمارینیک اسید (۴۲/۶۹ میلی‌گرم/گرم وزن خشک) در هفته‌های سوم و چهارم همزمان بود. این یافته‌ها می‌تواند پایه‌ای برای بهینه‌سازی تولید رزمارینیک اسید در کشت‌های سلولی از طریق تنظیم هورمون‌ها، بهبود شرایط محیطی و افزودن پیش‌سازها باشد.

واژه‌های کلیدی: رزمارینیک اسید، سوسپانسیون سلولی، فنیل پروپانوئید، نوروزک

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۲۶، بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۳۰، پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۱، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲

* نویسنده مسئول، رایانامه: Younes_ph62@uma.ac.ir



حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. © ۱۴۰۳

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

مقدمه

جنس مریم‌گلی پراکنش وسیعی در سراسر جهان دارند. این جنس بیش از ۹۰۰ گونه دارد و در ایران ۵۸ گونه گیاه علفی، یک ساله و چند ساله در سراسر کشور پراکنده‌اند که برخی گونه آن انحصاری ایران هستند (Modarres et al., 2018). گیاه نوروبوک (*Salvia leriifolia* Benth.)، متعلق به جنس *Salvia* از تیره Lamiaceae می‌باشد. از نظر جغرافیایی در مناطق جنوبی و گرمسیری استان‌های خراسان و سمنان ایران می‌روید (Rechinger, 1982). گزارش‌های مختلفی از اثرات فارماکولوژیکی گیاه نوروبوک وجود دارد، خواص ضدالتهابی، ضد تشنج، آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهنده قند خون و فعالیت‌های بازدارنده استیل کولین استراز گزارش شده است (Sarhadi et al., 2022). بسیاری از این اثرات دارویی به حضور ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود. گونه‌های مختلف سالویا به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع اسیدهای فنولیک شناخته می‌شوند (Petersen, 2013). مهم‌ترین ترکیبات فنلی شناسایی شده در نوروبوک شامل کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، فرولیک اسید، رزمارینیک اسید (RA)، انواع سالویانولیک اسید و لیتوسپرمیک اسید است (Modarres et al., 2018). این ترکیبات همگی مشتقات کافئیک اسید به شمار می‌روند. در رابطه با خواص دارویی مشتقات کافئیک اسید در جنس سالویا گزارش‌های زیادی وجود دارد. به عنوان مثال، (RA) یک مولکول فنولیک است که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضداکسیداتیو و ضدسرطانی این ترکیب معلوم شده است. اثر درمانی رزمارینیک اسید در بهبود آلزایمر و افزایش عملکرد حافظه در مطالعات اخیر ثابت شده است (Hitl et al., 2021). بیوستز این ترکیب پلی‌فنلی، عمدتاً از مسیر فنیل‌پروپانوئیدی است. در مسیر بیوستز رزمارینیک اسید، آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیا لایز (PAL) و آنزیم تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) نقش کلیدی دارند. آنزیم PAL با تبدیل فنیل‌آلانین به اسید سینامیک، مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و تولید پیش‌ساز ۴-کوماریل-CoA را آغاز می‌کند و افزایش فعالیت آن با تجمع بیشتر ترکیبات فنولی و RA همراه است. از سوی دیگر، آنزیم TAT نیز عملکردی

مشابه آنزیم PAL دارد و با تبدیل تیروزین به p-کوماریک اسید، در مسیری موازی پیش‌سازهای لازم را فراهم می‌سازد. فعالیت هماهنگ این دو آنزیم موجب تقویت جریان متابولیکی و افزایش کارایی سنتز اسید رزمارینیک می‌شود (Barros and Dixon, 2020). اهمیت تجاری این ترکیبات متابولیکی منجر به علاقه زیادی به تولید آن و بررسی امکان افزایش تولید آن با استفاده از فناوری کشت‌بافت و کشت سلولی گیاهان در سال‌های اخیر شده است. از آنجا که کالوس و کشت سوسپانسیون اطلاعات کامل ژنتیکی گیاهان کامل را در خود جای داده‌اند، توان بالقوه‌ای برای سنتز متابولیت‌های ثانویه دارند. با این حال، میزان و نوع تولید این ترکیبات به تنظیم بیان ژن، درجه تمایز سلولی و شرایط فیزیولوژیکی و محیطی کشت وابسته است. علاوه‌براین، فناوری‌های کشت‌بافت امکان دستکاری در مسیرهای بیوستز سلول‌های گیاهی برای تولید مشتقات ثانویه را ایجاد می‌کند (Efferth, 2019). کشت سوسپانسیون سلولی امکان بررسی دقیق رفتار فیزیولوژیکی و متابولیکی سلول‌ها را فراهم می‌سازد. مطالعه الگوی رشد سلولی در این سیستم، نه تنها برای درک فرآیند تقسیم و تمایز سلول‌ها اهمیت دارد، بلکه مبنایی برای بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه و طراحی فرآیندهای صنعتی نیز محسوب می‌شود (Santos et al., 2016). رشد سلولی در محیط مایع تحت تأثیر مجموعه‌ای از عوامل محیطی و بیوشیمیایی از جمله ترکیب مواد غذایی، هورمون‌ها، مقدار اکسیژن محلول، pH و میزان هوادهی قرار دارد که هر یک می‌تواند مسیرهای متابولیکی را به‌طور مستقیم تغییر دهد (Georgiev et al., 2009). در این میان، انتخاب ترکیب هورمونی مناسب برای القای کالوس اولیه از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا خصوصیات مورفولوژیکی و سرعت تقسیم سلولی کالوس مستقیماً بر کیفیت و پایداری کشت سوسپانسیون تأثیر می‌گذارد (Efferth, 2019). ترکیب تیمارهای نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین (NAA+BA) از جمله رایج‌ترین ترکیبات مورد استفاده برای القای کالوس در گیاهان هستند و می‌توانند با تنظیم تعادل اکسین و سیتوکینین، مسیرهای مختلفی از رشد

حاضر با هدف بررسی الگوی رشد سلولی نوروک در کشت سوسپانسیون و ارزیابی ارتباط آن با تغییرات فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT و سنتز RA طی مراحل مختلف رشد انجام شد. نتایج این مطالعه می‌تواند مبنایی برای درک بهتر تنظیم مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویدها و بهینه‌سازی سیستم‌های بیوتکنولوژیکی تولید ترکیبات دارویی ارزشمند در این گونه گیاهی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

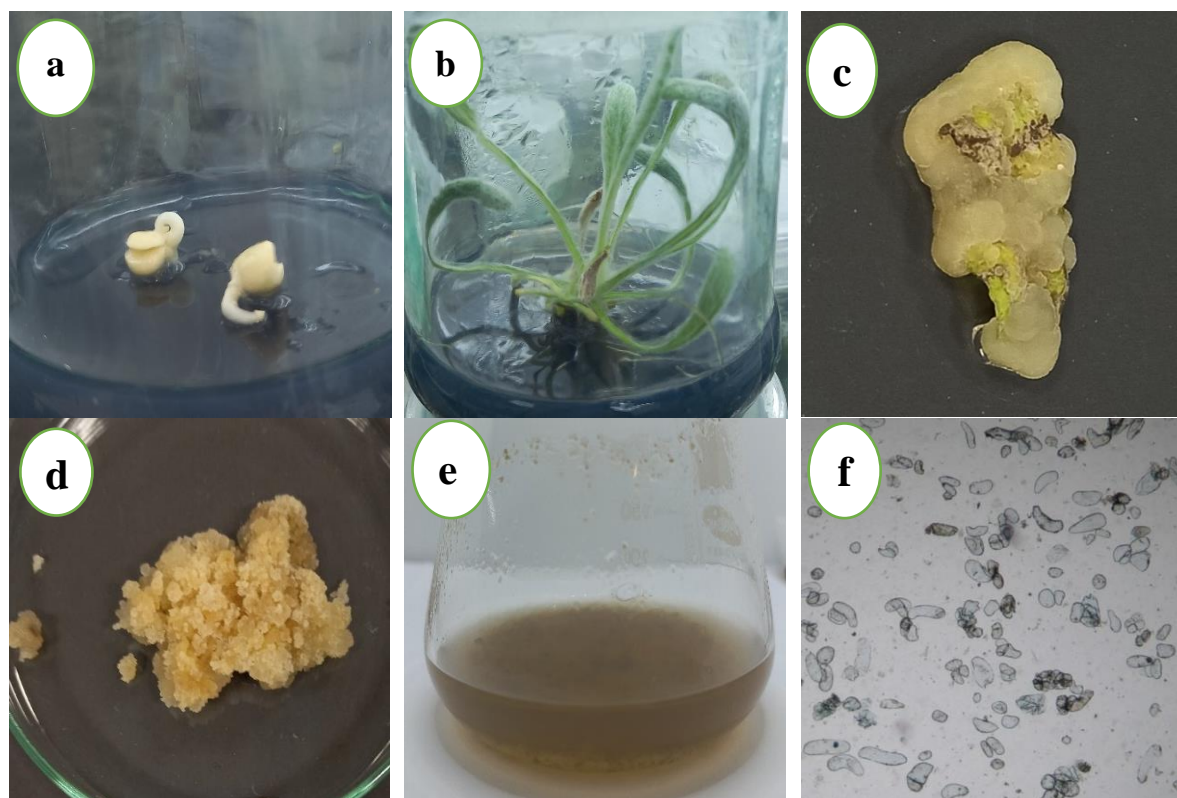
مواد گیاهی: برای انجام این تحقیق، بذره‌های گیاه نوروک (*S. leriifolia*) از منطقه اطراف روستای مزار، شهرستان بجستان در استان خراسان رضوی با مختصات (E ۲۲° ۷۵' ۵۸" و N ۲۰° ۲۹' ۴۳") جمع آوری شد. بذرها توسط کارشناس بخش هرباریوم گیاهی پژوهشکده گیاهان دارویی بهشتی شناسایی شد. مراحل ضدعفونی و جوانه‌زنی مطابق با تحقیق قبلی (بذره‌های استریل در محیط کشت (MS) ۱/۲ پایه (pH= ۵/۸) به همراه هورمون‌های ۵ NAA + ۵ BA میکرومولار و ۱ گرم در لیتر زغال فعال و مستقر شد، هفته اول در تاریکی و سپس شیشه‌های کشت به شرایط ۱۶ و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی با نور فلورسنت (شدت ۳۰۰۰ لوکس) و تاریکی، دمای ۲۴-۲۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۵۰-۶۰٪ منتقل شدند) صورت گرفت (Rastgoo et al., 2025).

تهیه و تکثیر کالوس: براساس نتایج مطالعه اخیر (Rastgoo et al., 2025) از ریزنمونه برگ و ترکیب هورمونی NAA+BA در غلظت‌های (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰) میکرومولار در محیط MS برای القاء و رشد کالوس استفاده گردید. در این آزمایش سطح تیمار ۱۵BA + ۲۰NAA میکرومولار به عنوان تیمار مطلوب برای تکثیر کالوس انتخاب شد (شکل ۱).

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی الگوی رشد و تولید

سلول: جهت استقرار کشت سوسپانسیون سلولی از محیط MS همراه با ۱۵ BA + ۲۰ NAA (میکرومولار)، استفاده شد. محیط آماده شده به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری

سلولی را فعال سازند. در مطالعات متعددی، ترکیب‌های NAA+BA از مؤثرترین تیمارها در القای کالوس در برخی گونه‌های دارویی گزارش شده‌اند. برای مثال، در گیاه *S. leriifolia* و *S. hydrangea* استفاده از NAA به همراه BA موجب القاء حداکثری کالوس با توانایی تقسیم و رشد سلولی بالا در کشت سوسپانسیون سلولی شد (Modarres et al., 2018; Saeedabadi et al., 2025). در بیشتر سیستم‌های کشت سلولی گیاهی، بین رشد سلول‌ها و تولید ترکیبات زیست‌فعال ارتباط نزدیکی وجود دارد. در مرحله اولیه رشد، فعالیت متابولیسم اولیه و سنتز زیست‌توده غالب است، در حالی‌که در مراحل بعدی رشد، به‌ویژه فاز ایستایی، مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با متابولیت‌های ثانویه به‌تدریج فعال‌تر می‌شوند. اما با گذشت زمان، توان سنتز سلول‌ها کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند ناشی از کاهش مواد غذایی یا تفاوت‌های ژنتیکی بین سلول‌ها باشد. در بسیاری از گونه‌ها، گزارش شده است که بیشترین میزان تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی در این مرحله رخ می‌دهد، زیرا سلول‌ها در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی و تنش‌های محیطی، مسیرهای دفاعی خود را فعال می‌کنند (Fazili et al., 2022; Wu et al., 2021). از این‌رو، شناسایی دقیق مراحل مختلف رشد و ارتباط آن‌ها با تغییرات متابولیتی، برای تعیین زمان مناسب برداشت یا القای مسیرهای بیوسنتزی و افزودن محرک‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (Bapat et al., 2023). مطالعات متعددی بر روی کشت سوسپانسیون گونه‌های جنس *Salvia* با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفته است. با این حال، در مورد گیاه نوروک *S. leriifolia* اغلب پژوهش‌ها به بهینه‌سازی شرایط کشت یا اندازه‌گیری نهایی برخی ترکیبات فنلی محدود بوده است و اطلاعات جامعی درباره دینامیک رشد سلولی و تغییرات همزمان فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانویید در طول دوره رشد سلول‌ها در دسترس نیست. به‌ویژه، ارتباط زمان‌مند بین مراحل رشد سلول با فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT و تجمع ترکیبات فنلی در این گونه تاکنون به‌طور جامع بررسی نشده است. از این‌رو، پژوهش



شکل ۱- (a) جوانه‌زنی بذر (b) گیاهچه درون شیشه‌ای نوروزک (c) تشکیل کالوس از ریزنمونه برگ (d) سرعت رشد نسبی کالوس (e) ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی (f) تصاویر میکروسکوپی از زنده‌مانی سلول

سلول‌ها از روش تست رنگ آمیزی با تریپان بلو (Rodriguez-) Monroy and Galindo, 1999) استفاده شد. در این روش ابتدا به میزان ۹۰ میکرولیتر از سلول‌ها در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو به آن اضافه شده و هم‌زده شد. در مرحله بعدی مقداری از نمونه در قسمت‌های مشخص شده هموسایتمتر ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده انجام گرفت. درصد سلول‌های زنده و غیرزنده در حداقل چهار سطح از خانه‌های بزرگ شمارش و از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{alive cell number} / \text{total cell number}) \times 100$$

تهیه عصاره متانولی: نمونه‌های سلول پس از نمونه‌برداری، توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند، ۶۰ میلی‌گرم از نمونه سلول خشک‌شده در ۱۰ میلی‌لیتر (۶mg/ml) متانول خالص با درجه (HPLC) به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد، و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از امواج مافوق

ریخته شد و درب ارلن توسط فویل آلومینیومی و سلفون به طور کامل پوشانده شده و سپس در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه) جهت استریل‌شدن قرار گرفت. سپس حدود ۱/۵ گرم از کالوس نرم در شرایط کاملاً استریل و زیر هود لامینار در ارلن‌ها ریخته شد و سپس درون شیکرانکوباتور مدل (KS 260 control) در تاریکی با دور ۱۰۰ دور در دقیقه (rpm) و دمای اتاق (23 ± 2 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. جهت رسم الگوی رشد از سلول‌های گیاه نوروزک در هر هفته به تعداد پنج تکرار برداشت و میزان وزن تر، خشک و زنده‌مانی سلول‌ها اندازه‌گیری شد، داده‌برداری هر هفته (روز ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵) و به مدت پنج هفته (۳۵ روز) به طول انجامید. جهت اندازه‌گیری وزن تر، با روش فیلترکردن محیط با استفاده از خلا، همچنین برای خشک‌کردن سلول‌ها به منظور اندازه‌گیری وزن خشک و عصاره‌گیری از فریز درایر استفاده گردید.

آزمون زنده‌مانی سلول: برای اندازه‌گیری زنده‌مانی

صوت (Ultrasonic) در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز دستگاه، سونیک گردید. به دنبال آن محلول به دست آمده ۱۵ دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت $4400 \times g$ دور سانتریفیوژ و قسمت رویی عصاره‌ها جداسازی شد. از این عصاره برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنالیز (HPLC) اسیدهای فنولیک استفاده شد.

فنل کل: محتوای فنل کل براساس روش فولین سیوکالچو انجام شد. درون هر چاهک پلیت ۲۵ میکرولیتر از عصاره گیاه، ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو ۱۰٪ و ۱۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (۷/۵۵٪) اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. از غلظت‌های مختلف اسید گالیک (۱۰-۲۰۰) میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (Kamtekar et al., 2014).

فلاونوئید کل: تعیین محتوای فلاونوئید براساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد. طبق این روش برای هر یک از نمونه‌ها، میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره به همراه ۸۰ میکرولیتر آب مقطر و ۶ میکرولیتر سدیم نیتريت ۱۵٪ درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. پس از گذشت ۶ دقیقه، ۶ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۸۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید ۴٪ و ۸ میکرولیتر آب مقطر به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت توسط فویل پوشانده و بر روی شیکر قرار گرفت. جذب محلول‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف روتین (۲۵-۲۰۰) میکروگرم در میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید براساس میلی‌گرم معادل روتین /گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Kamtekar et al., 2014).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: روش ارزیابی میزان مهار رادیکال

آزاد با استفاده از ۲ و ۲ دیفنیل-۱- پیکریل هیدرازیل $2,2\text{-diphenyl-1-picrylhydrazyl}$ (DPPH) انجام شد. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH تهیه شده ($1\text{ mg}/100\text{ ml}$ متانول) را داخل چاهک‌های پلیت ریخته و سپس ۵۰ میکرولیتر از هر عصاره را به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده و میزان جذب آن در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله $I(\%) = (A_0 - A_s)/A_0 \times 100$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزاء واکنش‌گر بدون نمونه) و A_s جذب نمونه بود. سپس نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید (Farhadi et al., 2020).

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل: تعیین غلظت پروتئین کل با روش Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد پروتئین و معرف برادفورد تعیین شد. پس از آماده‌سازی عصاره پروتئینی، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر بافر برادفورد به ۲۵ میکرولیتر عصاره پروتئینی در چاهک پلیت افزوده و مخلوط گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

فعالیت آنزیم PAL و TAT: برای استخراج عصاره آنزیمی مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های سلول در نیتروژن مایع به صورت پودر آسیاب شدند و در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج ۵۰ میلی‌مولار: Tris-HCl ۸/۸ pH، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار b₂-مرکاپتواتانول، حاوی ۲/۵٪ (w/v) PVP (polyvinylpyrrolidone-40) همگن شدند. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مایع رویی فیلتر و به عنوان عصاره خام آنزیمی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) استفاده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۵۰۰ میکرولیتر بافر واکنش ۵۰ میلی‌مولار (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl)، pH ۸/۸ و ۲۵۰ میکرولیتر سوبسترا (۴۰ میلی‌مولار فنیل آلانین، ۱۰۰

سطح زیر منحنی آنها تعیین گردید. در نهایت مقدار رزمارینیک اسید براساس میلی‌گرم بر گرم ماده خشک گیاه محاسبه شد (Ahadi et al., 2023).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه (فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های PAL، TAT و رزمارینیک اسید) و پنج تکرار (وزن تر و خشک سلول) انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS 9.4) انجام شد. داده‌ها توسط تجزیه واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ($P < 0/05$) و ($P < 0/01$) انجام شد.

نتایج و بحث

الگوی رشد سلولی نوروزک: مطالعه منحنی رشد در سیستم‌های کشت سوسپانسیون سلولی، ابزار مهمی برای درک رفتار رشد، زمان‌بندی تولید ریست‌توده و تعیین فازهای متابولیکی سلول‌ها محسوب می‌شود. تحلیل تغییرات وزن تر و خشک سلول‌ها در فواصل زمانی مختلف می‌تواند زمان مناسب برای انجام مداخلاتی همچون افزودن محرک یا پیش‌سازهای متابولیکی را مشخص سازد (Mustafa et al., 2011). در پژوهش حاضر، الگوی رشد سلول‌های گیاه نوروزک طی پنج هفته در محیط‌کشت سوسپانسیون مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱ و شکل ۲). پس از انتقال سلول‌ها به محیط تازه با نسبت هورمونی ۱۵ BA + ۲۰ NAA، نمونه‌برداری در فواصل یک هفته‌ای (هفت روز) انجام شد و داده‌های حاصل برای ترسیم منحنی رشد مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که منحنی رشد دارای الگوی سیگموئیدی چهار مرحله‌ای شامل فازهای تطبیق، لگاریتمی، ایستایی و پیری است. در دو هفته نخست (روز ۱ و ۱۴)، رشد سلول‌ها کند و در مرحله تطبیق (Lag phase) قرار داشتند. از هفته دوم تا چهارم (روز ۱۴ و ۲۸)، سلول‌ها وارد فاز لگاریتمی (Exponential phase) شدند که طی آن تقسیم سلولی و تجمع بیومس به‌طور چشمگیری افزایش یافت. بیشترین میزان رشد در هفته چهارم (روز ۲۸)

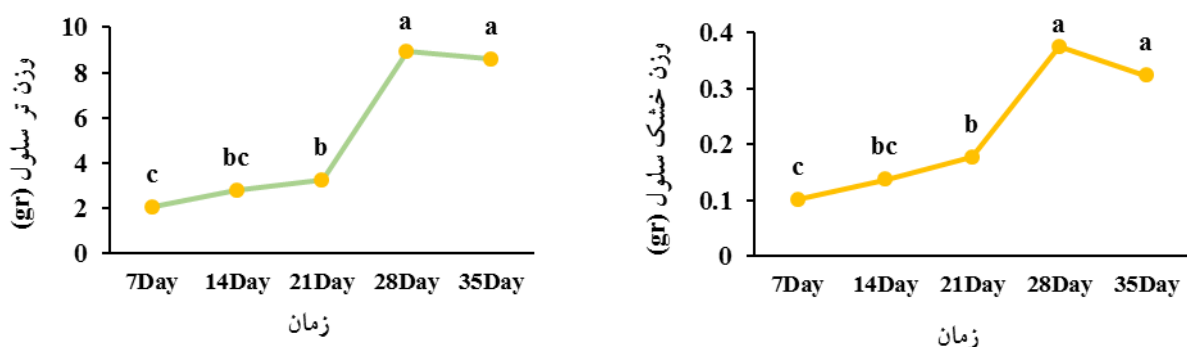
میلی‌مولار (Tris-HCl، pH ۸/۸) اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر (HCl) ۴ مولار پس از انکوباسیون برای پایان دادن به واکنش اضافه گردید و نمونه‌ها در (rpm) ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب در ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر برای تعیین مقدار ترانس سینامیک اسید (TCA) تولیدشده خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد سینامیک اسید محاسبه شد. فعالیت این آنزیم براساس سرعت تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید تعیین می‌شود. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرولیتر از سینامیک اسید تولیدشده در یک دقیقه است. فعالیت ویژه آنزیم به عنوان پروتئین (Imol U/mg) اسید سینامیک بیان شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAT به روش بالا با ماده سوبسترا (۱۰ میلی‌مولار تیروزین، ۱۰۰ میلی‌مولار تریس-HCl، pH ۸/۸) در طول موج ۳۳۳ نانومتر، براساس تبدیل L-تیروزین به ۴-کوماریک اسید با استفاده از منحنی استاندارد کوماریک اسید اندازه‌گیری شد (Babaoglu et al., 2016; Barros and Dixon, 2020).

آنالیز HPLC برای سنجش رزمارینیک اسید: ۲۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی به ستون کروماتوگرافی با مشخصات Sunfire C18 (150 mm × 4.6 mm 3.5μm) با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد متصل به دستگاه HPLC مدل (Waters 2695) و دکتور (USA waters996) تزریق گردید. فاز متحرک حلال شامل فرمیک اسید ۰/۱٪ همراه با آب مقطر مخصوص HPLC (حلال A) و استونیتریل به عنوان فاز آلی (حلال B) که با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه توسط پمپ از ستون عبور می‌کند. دمای ELSD ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار نیتروژن ۲/۲ بار تنظیم شد. برنامه گرادیان با نسبت ۲۰٪A = ۸۰٪B آغاز شد و سپس به ترتیب شامل تغییر از ۲۰٪A به ۳۰٪A طی ۱۰ دقیقه، ۳۰٪A به ۵۰٪A طی ۱۰ دقیقه، حفظ نسبت ۵۰٪A به مدت ۲۰ دقیقه، تغییر از ۵۰٪A به ۱۰۰٪A طی ۲ دقیقه، حفظ ۱۰۰٪A به مدت ۶ دقیقه و در نهایت بازگشت از ۱۰۰٪A به ۲۰٪A طی ۷ دقیقه بود. مقدار هر ماده براساس مقایسه زمان بازداری پیک خروجی آن با پیک استاندارد و

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس وزن تر و خشک سلول و ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروبک در کشت سوسپانسیون سلولی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول	وزن خشک سلول	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
تیمار	۴	۲۳/۱۳**	۰/۰۲۶**	۲۶۸۶**	۳۲۲/۲۹۲*	۱۴۴۳/۷۶۰**
خطا	۱۰	۰/۳۳۰	۰/۰۰۰۳	۱۹۴/۰۵۴	۵۳/۹۷	۱۹/۵۰
ضریب تغییرات	۱۴	۱۱/۶۹	۹/۱۶	۱۰/۵۸	۹/۶۱	۵/۸۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۲- الگوی رشد (وزن تر و خشک) سلول‌های گیاه نوروبک در طی ۵ هفته (۳۵ روز) کشت سوسپانسیون سلولی

مشابهی در سایر گونه‌های دیگر از خانواده نعناعیان مانند ریحان *Ocimum basilicum* گزارش شده است که در طی دوره رشد ۶۰ روزه، رشد سلولی تا هفته چهارم به صورت افزایشی و سپس به دلیل محدودیت‌های محیطی کاهش یافته است (Kumari et al., 2023). در گیاهان دارویی غیر از خانواده نعناعیان نیز روند مشابهی مشاهده شده است. برای نمونه، در سلول‌های *Catharanthus roseus*، منحنی رشد به صورت سیگموئیدی بوده و فاز لگاریتمی در هفته سوم یا چهارم بیشترین زیست‌توده و تولید متابولیت‌های ثانویه را نشان داده است (Linh et al., 2021). این شباهت‌ها بیانگر آن است که رفتار رشد در اغلب کشت‌های سلولی گیاهان دارویی تابع الگوی فیزیولوژیکی مشابهی است که به شرایط محیطی، ترکیب مواد غذایی و غلظت هورمون‌های رشد وابسته است. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین رشد سلولی و تجمع زیست‌توده در هفته چهارم (روز ۲۸) کشت حاصل شده است. بنابراین، این زمان می‌تواند به عنوان مرحله بهینه

ثابت گردید، به طوری که وزن تر سلول‌ها به ۸/۹۳ گرم و وزن خشک به ۰/۳۷۳ گرم رسید. زمان دو برابر شدن سلول‌ها در هفته سوم (روز ۲۱) مشاهده شد. پس از هفته چهارم (روز ۲۸)، رشد به فاز ایستایی (Stationary phase) وارد شد و در هفته پنجم (روز ۲۸ و ۳۵) با کاهش وزن سلولی، سلول‌ها به تدریج وارد فاز پیری (Decline phase) شدند. کاهش رشد در این مرحله احتمالاً ناشی از محدودیت منابع غذایی، تجمع متابولیت‌های بازدارنده و کاهش فعالیت آنزیمی است (Pan et al., 2020). الگوی مشاهده شده در این تحقیق با نتایج گزارش شده در گونه‌های مختلف خانواده نعناعیان و سایر گیاهان دارویی مشابه همخوانی دارد. برای مثال، Heydari و همکاران (۲۰۲۰) در کشت سوسپانسیون *S. nemorosa*، سه فاز مشخص رشد را گزارش کردند و بیشترین زیست‌توده را در هفته چهارم مشاهده نمودند. به طور مشابه، Tavan و همکاران (۲۰۲۳) در گونه *Perilla frutescens* بالاترین میزان بیومس را در هفته سوم و چهارم ثبت کردند. همچنین، نتایج

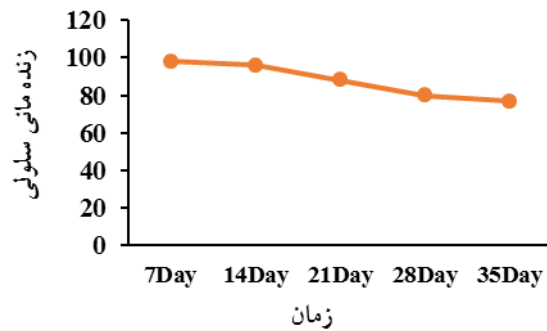
برای اعمال تیمارهای القائی مانند الیستور یا پیش‌سازهای متابولیکی در جهت افزایش سنتز ترکیبات ثانویه در نظر گرفته شود.

زنده‌مانی سلول: بررسی زنده‌مانی سلول‌ها پس از برداشت از کشت استریل در بازه زمانی پنج هفته‌ای (۳۵ روز) نشان داد که درصد زنده‌مانی از حدود ۹۸٪ در هفته نخست (روز ۷) به حدود ۸۰٪ در هفته پنجم (روز ۳۵) کاهش یافت. این نتایج که با شمارش مستقیم سلول‌ها به وسیله هموسایتومتر و استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan Blue Exclusion Assay) تأیید شد (شکل ۳). نشان‌دهنده کاهش تدریجی قابلیت حیاتی سلول‌ها در طول زمان کشت است. پس از هفته دوم (روز ۱۴)، روند زنده‌مانی کاهش معنی‌داری را نشان داد که احتمالاً ناشی از افزایش تراکم سلولی، رقابت برای مواد غذایی و تجمع متابولیت‌های ثانویه یا ترکیبات سمی در محیط‌کشت است (Sahararo et al., 2016). مشاهده کاهش زنده‌مانی پس از فاز رشد لگاریتمی بیانگر آن است که واکشت سلول‌ها باید پیش از ورود به فاز ساکن (stationary phase) انجام گیرد تا از تجمع محصولات جانبی مانند ترکیبات فنولی و بروز قهوه‌ای شدن بافت جلوگیری شود (Babich et al., 2020). گزارش‌های مشابه نیز نشان داده‌اند که واکشت به موقع سلول‌ها منجر به بهبود رشد و افزایش پایداری متابولیسم سلولی می‌گردد (Pan et al., 2020). در مطالعه‌ای بر روی سوسپانسیون سلول‌های *C. roseus*، کاهش زنده‌مانی سلولی پس از هفته دوم به تجمع آلکالوئیدها و محدودیت منابع غذایی نسبت داده شد (Linh et al., 2021) که با یافته‌های حاضر همخوانی دارد. بنابراین، کنترل تراکم سلولی و زمان‌بندی دقیق واکشت از عوامل کلیدی در حفظ فرآیند رشد و جلوگیری از پیری زودرس سلول‌ها در کشت‌های سوسپانسیونی به شمار می‌رود.

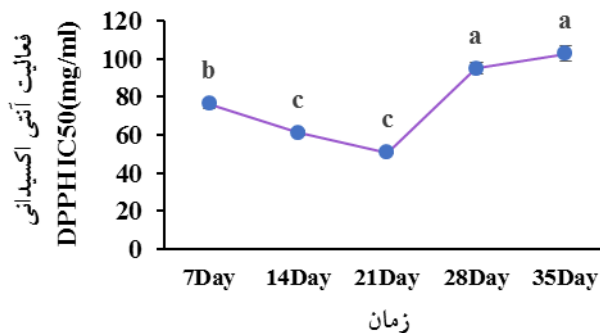
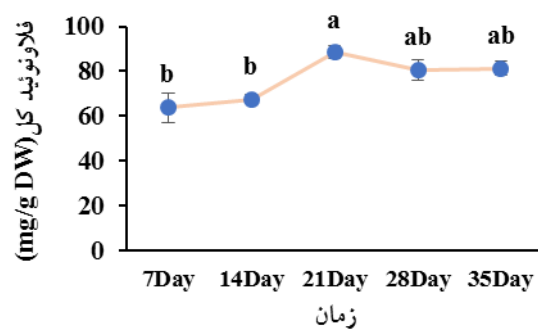
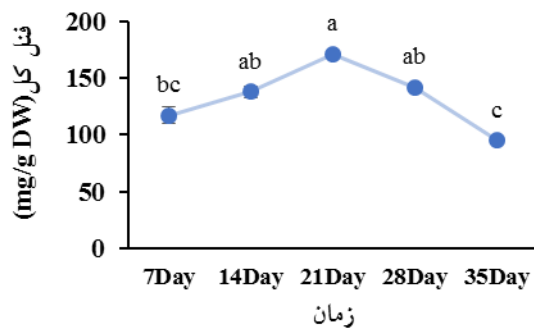
محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول دوره رشد سلولی: در این پژوهش، تغییرات میزان ترکیبات فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی پنج هفته (۳۵ روز) رشد سلول‌های سوسپانسیونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ترکیبات در طول دوره رشد

سلولی تغییرات معنی‌داری را داشتند (۰/۰۱ و ۰/۰۵ < P) (جدول ۱). در هفته‌های اول تا سوم (روز ۷ و ۲۱) میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به طور قابل توجهی افزایش یافت. و سپس در هفته‌های چهارم و پنجم (روز ۲۸ و ۳۵) روندی کاهشی را نشان داد (شکل ۴). حداکثر تولید ترکیب فنل کل ۱۷۰/۹۳ (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)، فلاونوئید کل ۸۸/۵۶ (میلی‌گرم/گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۰/۷۷ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در هفته سوم (روز ۲۱) مشاهده گردید. به نظر می‌رسد بیشترین فعالیت متابولیکی سلول‌ها در این بازه زمانی رخ داده است. در این مرحله، سلول‌ها انرژی و پیش‌سازهای متابولیکی بیشتری برای سنتز ترکیبات ثانویه، به‌ویژه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، در اختیار دارند. افزایش این متابولیت‌ها احتمالاً به دلیل فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئید و افزایش بیان آنزیم‌های کلیدی مانند PAL و چالکون سنتاز (CHS) است که نقش مهمی در بیوسنتز فنول‌ها و فلاونوئیدها دارند (Sharma et al., 2019). با ورود سلول‌ها به مرحله ایستایی (Stationary Phase) در هفته‌های چهارم و پنجم (روز ۲۸ و ۳۵)، میزان این ترکیبات کاهش یافت. این روند نزولی ممکن است ناشی از کاهش تقسیم سلولی، محدودیت منابع غذایی و تجمع متابولیت‌های بازدارنده در محیط‌کشت باشد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی و تغییر در مسیرهای انرژی‌زایی می‌تواند از عوامل کاهش سنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در مراحل انتهایی رشد باشد. نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های پژوهش‌های پیشین بر روی گیاهان دارویی مختلف همخوانی دارد. با توجه به مشاهدات Gadzovska و همکاران (۲۰۱۲) در کشت سلولی *Hypericum perforatum*، گزارش دادند که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در هفته دوم و سوم مرحله رشد بیشینه است و سپس در هفته‌های بعدی کاهش می‌یابد. به‌طور مشابه، در کشت سوسپانسیونی *Capsicum spp.*، بالاترین میزان فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در هفته سوم رشد مشاهده کردند (Ferri et al., 2018).

فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT و بیوسنتز رزمارینیک



شکل ۳- الگوی زنده مانی سلول‌های گیاه نوروزک در طی ۵ هفته (۳۵ روز) کشت سوسپانسیون سلولی



شکل ۴- ارزیابی میزان فنل کل، فلاونوئید کل، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نوروزک در طی ۳۵ روز دوره کشت سوسپانسیون سلولی

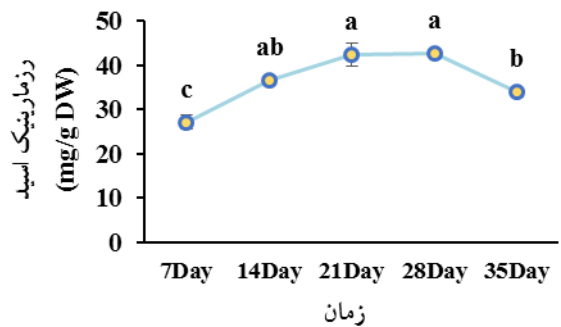
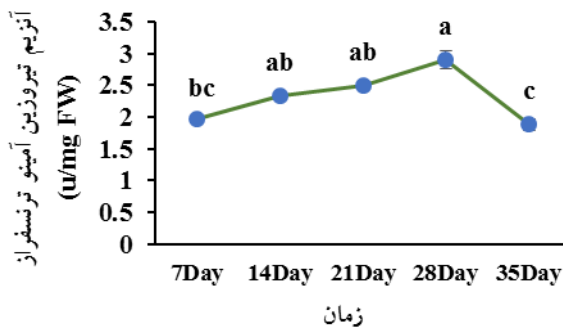
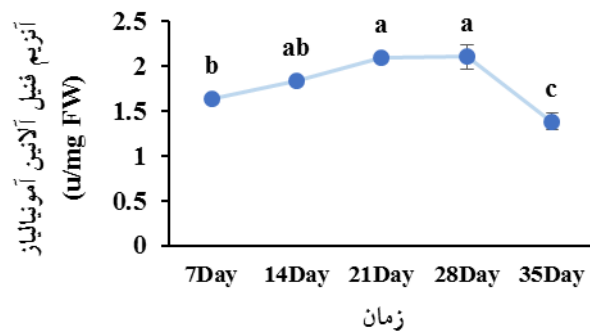
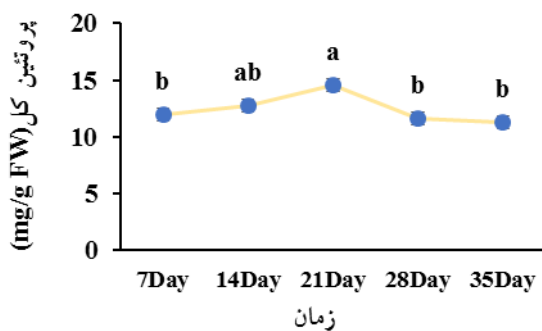
میلی‌گرم پروتئین)، فعالیت آنزیم TAT نیز تا هفته چهارم (روز ۲۸) رشد (۲/۹۰ میکرومول در میلی‌گرم پروتئین)، افزایش یافت (شکل ۵). در ادامه طی هفته‌های چهارم و پنجم (از روز ۲۸ تا ۳۵) فعالیت آنزیمی به طور قابل توجهی تقلیل یافت. کاهش فعالیت‌های آنزیمی در مراحل انتهایی رشد نشان می‌دهد تنظیم بیان این آنزیم‌ها به شدت تحت کنترل وضعیت فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای سلول‌هاست. این یافته با گزارش‌های پیشین در مورد ارتباط بین رشد سلولی و افزایش فعالیت PAL در سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای مطابقت دارد (Sahraroo

اسید در طی دوره رشد سلول‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT، که در مسیر بیوسنتزی اسیدهای فنولیک نقش کلیدی دارند، در طول دوره پنج هفته‌ای رشد (۳۵ روز)، تغییرات معنی‌داری ($P < 0.01$) را تجربه کردند (جدول ۲ و شکل ۵). این تغییرات با مراحل مختلف رشد و تکامل سلول‌ها هم‌خوانی قابل توجهی داشت. در طی هفته‌های اول تا سوم (روز ۷، ۱۴، و ۲۱)، محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم PAL روندی افزایشی نشان دادند (۲/۹۳ میکرومول در

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز، تیروزین آمینو ترانسفراز، پروتئین و رزمارینیک اسید در گیاه نوروزک طی ۵ هفته (۳۵ روز) دوره کشت سوسپانسیون سلولی

میانگین مربعات				درجه	منابع تغییرات
رزمارینیک اسید	فنیل آلانین آمونیا لیا ز	تیروزین آمینو ترانسفراز	پروتئین کل	آزادی	تیمار
۱۲۴/۴۱**	۳/۰۴**	۰/۲۸**	۵/۱۸۶*	۴	تیمار
۶/۵۶۹	۰/۲۹۹	۰/۱۹۶	۰/۹۳۸	۱۰	خطا
۷/۲۱	۱۵/۹۷	۶/۰۵	۷/۵۴	۱۴	ضریب تغییرات

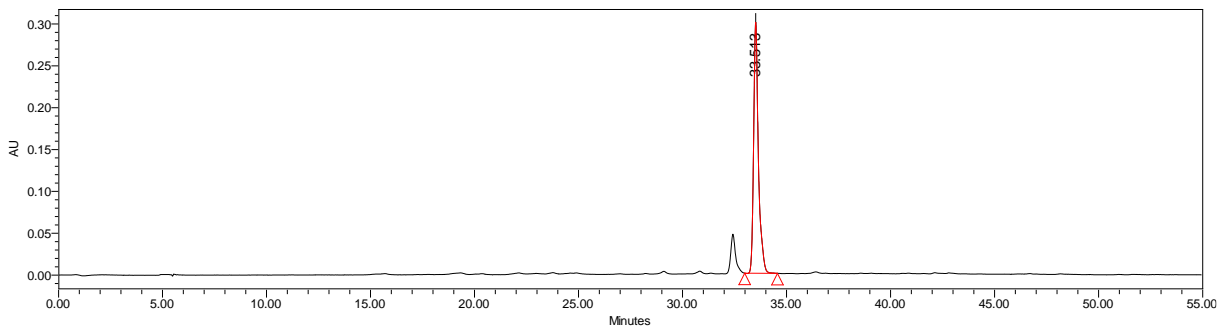
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم وجود اختلاف معنی دار است.



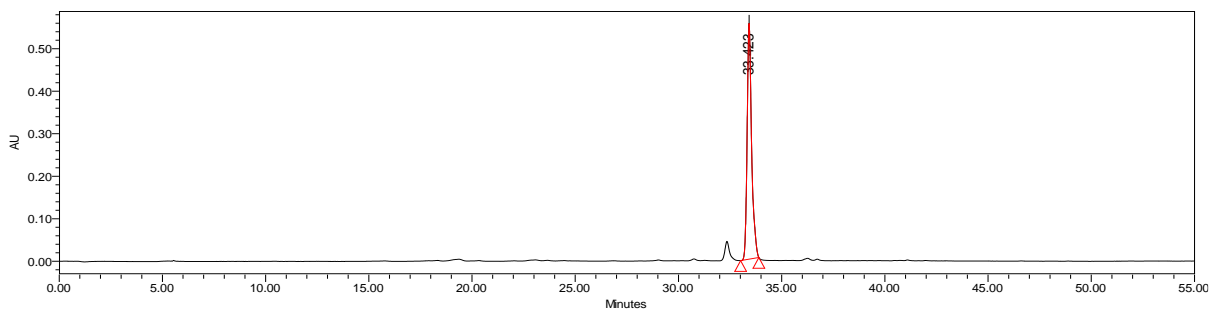
شکل ۵- نمودار ارزیابی محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، تیروزین آمینو ترانسفراز و رزمارینیک اسید در گیاه نوروزک طی پنج هفته (۳۵ روز) دوره کشت سوسپانسیون سلولی

دارند، نقش مستقیمی در افزایش سنتز ترکیبات فنولیکی از جمله RA دارد. این آنزیم‌ها با تبدیل فنیل آلانین و تیروزین به ترکیبات فنولی اولیه، پیش‌سازهای لازم برای تشکیل ۴-کوماویل-CoA را فراهم می‌کنند. در نتیجه، افزایش بیان یا فعالیت آن‌ها موجب تسریع جریان متابولیتی در مسیر بیوسنتزی RA و در نهایت افزایش تجمع این ترکیب در کشت‌های سلولی می‌شود (Khojasteh et al., 2020). مطالعات متعدد در کشت‌های سلولی گیاهان خانواده نعناعیان افزایش فعالیت

(et al., 2016; Khoshokhan et al., 2023). به دنبال تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها، میزان سنتز رزمارینیک اسید نیز در طول دوره رشد نوسانات معناداری نشان داد ($P < 0.01$). بیشترین تجمع رزمارینیک اسید (۴۲/۶۹ میلی گرم در گرم وزن خشک) در هفته‌های سوم و چهارم (روز ۲۱ و ۲۸) مشاهده شد (شکل ۶ و ۷)، که هم‌زمان با بیشینه فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT بود. این نتایج تأیید می‌کند که افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT که در مراحل آغازین مسیر فنیل‌پروپانوئیدی قرار



شکل ۶- کراماتوگرام HPLC رزمارینیک اسید در هفته اول (روز ۷) دوره رشد سلولی گیاه نوروژک



شکل ۷- کراماتوگرام HPLC رزمارینیک اسید در هفته چهارم (روز ۲۸) دوره رشد سلولی گیاه نوروژک

نیز نشان داد که فعالیت آنزیم‌های PAL و TAT با میزان تجمع ترکیبات فنلی، به‌ویژه رزمارینیک اسید، همبستگی بالایی دارد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در هفته‌های سوم و چهارم، هم‌زمان با فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها و بیشینه فعالیت این آنزیم‌ها مشاهده شد. این یافته‌ها تأیید می‌کند که سنتز رزمارینیک اسید عمدتاً در مراحل فعال رشد سلولی رخ می‌دهد و آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید در این بازه زمانی بیشترین فعالیت را دارد. بر این اساس، نتایج حاصل می‌تواند مبنای مناسبی برای توسعه راهبردهای بهینه‌سازی تولید رزمارینیک اسید در سیستم‌های کشت سلولی از طریق تنظیم غلظت هورمون‌ها، بهبود شرایط محیطی و یا افزودن پیش‌سازهای بیوسنتزی فراهم آورد.

آنزیمی و تجمع رزمارینیک را گزارش کرده‌اند. به‌عنوان مثال، Heydari و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی کشت سلولی *S. nemorosa* گزارش کردند که بیشترین تولید رزمارینیک اسید در هفته چهارم رشد سلولی است. در گیاه ریحان نیز بیشترین افزایش رزمارینیک اسید در هفته چهارم کشت گزارش شد (Kumari et al., 2023). همچنین در *P. frutescens* و *S. hydrangea* اوج افزایش فعالیت آنزیم PAL و رزمارینیک اسید هفته سوم رشد بوده است (Tavan et al., 2023; Saeedabadi et al., 2025).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج بررسی الگوی رشد سلولی بیانگر آن بود که بیشترین رشد سلولی و تجمع بیومس در هفته چهارم تا پنجم کشت (روز ۲۸ تا ۳۵) حاصل شد. تغییرات متابولیت‌های فنلی

منابع

- Ahadi, H., Shokrpour, M., Fatahi, R., Naghavi, M. R., & Mirjalili, M. H. (2023). Essential oil, flavonoids and anthocyanins profiling of some Iranian damask rose (*Rosa damascena* Mill.) genotypes. *Industrial Crops and Products*, 205, 117579. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117579>
- Babaoglu Aydas, S., Gençay, O., & Gumuslu, S. (2016). Effects of lead exposure on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in *Brassica oleracea* seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(4), 963-970. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1185634>
- Babich, H., Borenfreund, E., & Stern, A. (2020). The relationship between cell density and cell viability in tissue culture. *Toxicology in Vitro*, 67, 104930. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104930>
- Bapat, V. A., Kavi Kishor, P. B., Jalaja, N., Jain, S. M., & Penna, S. (2023). Plant cell cultures: Biofactories for the production of bioactive compounds. *Agronomy*, 13(3), 858. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030858>
- Barros, J., & Dixon, R. A. (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in Plant Science*, 25(1), 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Farhadi, N., Babaei, K., Farsaraei, S., Moghaddam, M., & Pirbalouti, A. G. (2020). Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. *Industrial Crops and Products*, 152, 112570. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112570>
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: A review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>
- Ferri, M., Manetta, M., Costantino, M., Ferri, S., & Caputo, S. (2018). *Capsicum* spp. in vitro liquid cell suspensions: A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. *Plant Biosystems*, 152(3), 436-444. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1305998>
- Gadzovska-Simic, S., Tusevski, O., Antevski, S., Atanasova-Pancevska, N., Petreska, J., Stefova, M., Kungulovski, D., & Spasenoski, M. (2012). Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 64(1), 113-121. <https://doi.org/10.2298/ABS1201113G>
- Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 809-823. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2049-x>
- Heydari, H. R., Chamani, E., & Esmaeilpour, B. (2020). Cell line selection through gamma irradiation combined with multi-walled carbon nanotubes elicitation enhanced phenolic compounds accumulation in *Salvia nemorosa* cell culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142, 353-367. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01867-6>
- Hitl, M., Stankovic, D., & Zivkovic, S. (2021). Phenolic profile of *Salvia leriifolia* Benth: A potential herbal remedy for Alzheimer's disease. *Molecules*, 26(14), 4015. <https://doi.org/10.1055/a-1301-8648>
- Kamtekar, S., Keer, V., & Patil, V. (2014). Estimation of phenolic content, flavonoid content, and antioxidant capacity of *Salacia chinensis* L. root extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 131-134. <https://doi.org/10.1155/2017/9305047>
- Khoshokhan, F., Babalar, M., Salami, S. A., et al. (2023). An efficient protocol for production of rosmarinic acid in *Salvia nemorosa* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 59, 298-314. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10328-6>
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Alcalde, M. A., Cusido, R. M., Eibl, R., & Palazon, J. (2020). Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid. *Antioxidants*, 9(12), 1273. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>
- Kumari, M., Prasad, A., Mathur, A. K., ur-Rahman, L., Singh, M., & Lal, R. K. (2023). Precursors and elicitor-induced enhancement of cell biomass and phenolic compounds in cell suspensions of Indian basil (*Ocimum basilicum* CIM-Saumya). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(5), 679-693. <https://doi.org/10.1007/s12298-023-01316-6>
- Linh, T. M., Mai, N. C., Hoe, P. T., Ngoc, N. T., Thao, P. T. H., Ban, N. K., & Van, N. T. (2021). Development of a cell suspension culture system for promoting alkaloid and Vinca alkaloid biosynthesis using endophytic fungi isolated from local *Catharanthus roseus*. *Plants*, 10(4), 672. <https://doi.org/10.3390/plants10040672>
- Modarres, F., Zarei, A., & Ebrahimzadeh, H. (2018). Optimization of callus induction and secondary metabolite production in *Salvia leriifolia* under in vitro conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(10), 125-135. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0178-0>
- Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6(6), 715-742.

- Pan, Y., Li, L., Xiao, S., Chen, Z., Sarsaiya, S., & Zhang, S. (2020). Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. *PLoS ONE*, *15*(2), e0220084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220084>
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochemistry Reviews*, *12*, 207-227. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9282-8>
- Rastgoo, A., Chamani, E., Pourbeyrami Hir, Y., Mirjalili, M. H., & Miran, M. (2025). Biochemical response and rosmarinic acid accumulation in callus culture of *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) irradiated with gamma rays. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *161*, 88. <https://doi.org/10.1007/s11240-025-03110-6>
- Rechinger, K. H. (1982). Flora Iranica. Akademische Druk. u. Verlagsanstalt, Graz.
- Rodriguez-Monroy, M., & Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: A comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology*, *24*(10), 687-693.
- Saeedabadi, B., Mirjalili, M. H., Eghlima, G., & Sonboli, A. (2025). *Salvia hydrangea* DC. Ex Benth. (Lamiaceae) cell suspension culture: A novel and promising bioengineering platform for rosmarinic acid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *161*, 58. <https://doi.org/10.1007/s11240-025-03084-5>
- Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M., & Fattahi Moghadam, M. R. (2016). Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: A new in vitro source of rosmarinic acid. *Cytotechnology*, *68*(6), 1415-1424. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9901-x>
- Santos, R. B., Abranches, R., Fischer, R., Sack, M., & Holland, T. (2016). Putting the spotlight back on plant suspension cultures. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00297>
- Sarhadi, A., Esmaeili, H., & Rad, A. (2022). Phytochemical profile and medicinal properties of *Salvia leriifolia*. *Natural Product Research*, *36*(19), 4905-4913. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113310>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of the phenylpropanoid pathway and the role of key enzymes in plant secondary metabolism. *Molecules*, *24*(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Tavan, M., Khorasani, S., & Asghari, G. (2023). Optimization of biomass and phenolic compound accumulation in *Perilla frutescens* cell suspension cultures. *Plant Biotechnology Reports*, *17*(1), 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108151>
- Wu, T., Kerbler, S. M., Fernie, A. R., & Zhang, Y. (2021). Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*, *2*, 100235. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100235>

Investigation of cell growth dynamics, activities of phenylpropanoid pathway enzymes, and rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Salvia leriifolia* Benth.

Arefeh Rastgoo¹, Younes Pourbeyrami Hir^{1*}, Esmail Chamani¹, Mohammad Hossein Mirjalili², Mansour Miran³

¹ Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, 1983969411, Tehran, Iran

³ Department of Pharmaceutical Sciences Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

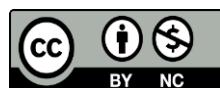
Abstract

Species of the genus *Salvia*, including *Salvia leriifolia* Benth., are recognized as important sources of phenolic acids, which have generated increasing interest in enhancing their production through plant tissue and cell culture technologies. This study aimed to characterize biomass accumulation, key enzymatic activities, and metabolite biosynthesis during the cell growth cycle of *S. leriifolia*. Leaf explants were used to establish cell suspension cultures, and a medium containing 15 μM BA and 20 μM NAA was identified as the optimal hormone treatment for promoting cell proliferation. Over a five-week culture period, cell biomass, total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity (DPPH, IC_{50}), PAL and TAT enzyme activities, and rosmarinic acid content were assessed at weekly intervals. The experiment was conducted in a completely randomized design, and data were analyzed using analysis of variance followed by mean comparison tests. Significant differences were observed among treatments at $p < 0.05$ and $p < 0.01$. The results indicated that the growth curve of the suspension cells followed a typical sigmoidal pattern, with the highest biomass observed at the end of the fourth week (Day 28). Cell viability gradually declined from approximately 98% in the first week (day 7) to nearly 80% by the fifth week (day 35). The maximum levels of total phenolics, total flavonoids, and antioxidant activity were recorded in the third week (day 21). Similarly, total protein content, as well as peak PAL and TAT activities during the third and fourth weeks (days 21 and 28), coincided with the highest accumulation of rosmarinic acid (42.69 mg g^{-1} DW). Overall, these findings provide a solid basis for optimizing rosmarinic acid production in plant cell culture systems through targeted hormonal regulation, improved culture conditions, and supplementation with biosynthetic pathway precursors.

Keywords: Cell suspension culture, Phenylpropanoid, Rosmarinic acid, *Salvia leriifolia*

Received: Nov. 17, 2025; Revised: Jan. 20, 2026; Accepted: Feb. 10, 2026; Published Online: June. 02, 2026

*Corresponding Author: Younes_ph62@uma.ac.ir



Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.