Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

تأثیر نور، فنیل آلانین و کافئیک اسید بر تولید اسیدهای فنولیک در کشت سوسپانسیونی گیاه نوروزک

معصومه مدرس[1]* و زیبا قسیمی حق[2]

[1] گروه زیست شناسی، پردیس شهید هاشمی نژاد، دانشگاه فرهنگیان خراسان رضوی، مشهد، ایران

[2] گروه باغبانی و گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰٤/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰۸/۰۳)

چکیده:

در این پژوهش، در دو آزمایش مستقل تاثیر نور و تاثیر فنیل‌آلانین و کافئیک اسید بر رشد سلول‌ها و تجمع اسیدهای فنولیک در کشت سوسپانسیونی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) مورد بررسی قرار گرفت. جدا کشت برگ گیاه نوروزک در محیط کشت MS حاوی BAP و NAA با غلظت ۵ mg/l جهت القاء کالوس کشت داده شد. استقرار کشت سوسپانسیونی با انتقال ۰/۵ g کالوس حاصل از برگ به همان محیط مایع انجام شد. ۱۵روز بعد از کشت، میزان بیومس و میزان اسیدهای فنولیک در عصاره اتانلی توسط تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد رشد سلول‌ها در شرایط نوری بیش از ۲/۵ برابر شرایط تاریکی بود و میزان تجمع کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در مقایسه با تاریکی افزایش معنی‌دار داشت. افزودن فنیل‌آلانین و کافئیک اسید در شرایط نوری نشان داد که ۱۰ mg/l فنیل‌آلانین، تجمع کافئیک اسید (به میزان ٤ برابر)، رزمارینیک اسید (به میزان ٤ برابر) و سالویانولیک اسید B (به میزان ۱/٦ برابر) را در مقایسه با شاهد افزایش داد در حالی‌که رشد سلول‌ها و میزان اسیدهای فنولیک با افزودن کافئیک اسید کاهش یافت و با افزایش غلظت منجر به سیاه شدن محیط کشت و مرگ سلولی شد. این پژوهش به درک ما از چگونگی پاسخ متابولیت‌های ثانویه به نور و پیش ساز ها و بهبود تولید متابولیت‌های هدف کمک خواهد کرد .

کلمات کلیدی: نوروزک، اسید های فنولیک، نور، فنیل آلانین

مقدمه:

نوروزک (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان رضوی و بخشی از استان سمنان است(Rechinger, 1982). براساس پژوهش‌های صورت گرفته مشخص شده است که عصاره آبی و الکلی برگ و ریشه گیاه نوروزک دارای اثرات دارویی متعددی در موش است. ازجمله این اثرات می‌توان به خاصیت محافظت‌کنندگی عصبی در برابر کم خونی‌های موضعی در مغز موش (Sadeghnia *et al.*, 2003) ، اثر مشابه با داروی دیکلوفناک در مقابله با التهاب مزمن (Hosseinzadeh and Yavary, 1999) و جلوگیری از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش مشابه با داروی سوکرالفت (sucralfate) اشاره نمود (Hosseinzadeh *et al.*, 2000). هم‌چنین مشخص شده است بخش‌های مختلف این گیاه می‌تواند به عنوان داروی مسکن و

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m_modarres70@yahoo.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

خواب‌آور قابل مقایسه با دیازپام عمل نماید (Hosseinzadeh and Lary, 2000)، بعلاوه این گیاه ضد سرطان بوده و می‌تواند در درمان آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد (Loizze *et al.*, 2009).

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 هستند که شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید، انواع سالویانولیک اسید و لیتوسپرمیک اسید می‌شوند (Lu and Foo, 2002).

مسیر فنیل پروپانوئیدی یکی از مهم‌ترین مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه است و تعداد زیادی از ترکیبات پلی فنلی مهم مثل کافئیک اسید را تولید می‌کند که نقش مهمی در رشد و نمو و مقاومت به بیماری‌ها دارند (Chen *et al.*, 2007). سنتز پلی فنل‌ها توسط مسیر فنیل پروپانوئیدی و از اسید آمینه فنیل آلانین شروع می شود. در این مسیر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) نقش کلیدی داشته و با تبدیل اسید آمینه فنیل آلانین به سینامیک اسید، مسیر فنیل پروپانوئیدی را به راه می‌اندازد (MacDonald and D'Cunha, 2007).

کافئیک اسید (3,4-dihydroxy cinamic acid) در گونه‌های جنس Salvia به عنوان واحد ساختمانی تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانویه به حساب می‌آید این متابولیت‌ها از ترکیبات مونومر بسیار ساده تا ترکیبات بسیار پیچیده چند واحدی را شامل می‌شوند (Lu and Foo, 2002).

رزمارینیک اسید، استرِ دی هیدروکسی فنیل-3,4) (dihydroxyphenyl و کافئیک اسید است که به ترتیب از طریق مسیر مشتق از تیروزین و مسیر فنیل پروپانوئیدی ساخته می‌شود (Petersen and Simmonds2003). اتصال دو ملکول رزمارینیک اسید منجر به تولید سالویانولیک اسید B می‌شود (Di *et al* 2013) (شکل ۱).

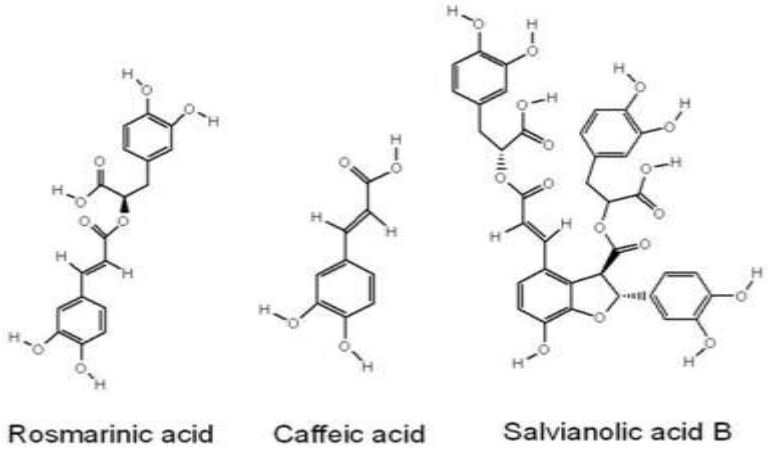
گزارش‌های زیادی در رابطه با خواص دارویی مشتقات کافئیک اسید وجود دارد، به عنوان مثال خواص آنتی اکسیدانی، ضد ویروسی، کاهش دهنده فشار خون و ضد سرطانی این ترکیبات معلوم شده است (Ren-Wang *et al.*, 2005). کافئیک اسید دارای خواص ضد التهابی و ضد توموری می‌باشد (Duzzo Gamaro *et al.*, 2011) و اثر درمانی رزمارینیک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

اثرات حفاظتی سالویانولیک اسیدها در مقابله با صدمات ناشی از ایسکمی در مغز موش ثابت شده است. بعلاوه این ترکیبات می‌توانند عملکرد یادگیری و حافظه را پس از ایسکمی بطور چشمگیری بهبود بخشند. همچنین سالویانولیک اسیدها در گونه *S. miltiorrhiza* سبب ممانعت از تشکیل لخته خون و کاهش محتوی آندوتلین پلاسما بعد از ایسکمی مغزی می‌گردند (Ren-Wang *et al.*, 2005).

سالویانولیک اسید B دارای اثرات ضد سرطان و ضد فیبروز بوده و برای درمان آرتریت روماتوئید، بیماری‌های مغزی-عروقی (cerebrovascular disorders) و بیماری‌های قلبی- عروقی (cardiovascular disease) به‌کار می‌رود. قابل ذکر است تحقیقات انجام شده روی خواص دارویی اسیدهای فنولیک، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در سطح مکانیسم‌های ملکولی بررسی گردیده است (Bulgakov *et al.*,2012) .

گزارش‌هایی در مورد تولید اسیدهای فنولیک در کشت سوسپانسیونی برخی از گونه‌های Salvia وجود دارد. تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیونی و نیز کشت بخش‌های مختلف گونه *S. officinalis* انجام شده است (Santos-Gomes *et al.*, 2003; Hippolyte *et al.*, 1992). هم‌چنین در کشت سوسپانسیونی وکشت ریشه گونه *S. fruticosa* نیز رزمارینیک اسید تولید شده است (Karam *et al.*, 2003). از راهکارهای مختلفی می‌توان برای تقویت تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی استفاده کرد که از این روش‌ها می‌توان به گزینش لاین‌های سلولی با تولید بالا، تغییر عناصر غذایی و هورمون‌های محیط کشت ، بهینه سازی ترکیب محیط کشت و شرایط کشت، افزودن پیش سازها به محیط کشت و نیز تیمار با الیسیتورها و

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021



شکل ۱- ساختار شمیایی رزمارینیک اسید، کافئیک اسید و سالویانولیک اسید B

کاربرد استرس‌های زنده و غیر زنده اشاره نمود که با هدف کاربرد تجاری انجام می‌شود. تلاش برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی ازطریق کاربرد پیش ماده در بسیاری از موارد مؤثر بوده استHippolyte و همکاران (۱۹۹۲) از نخستین کسانی بودند که در آزمایش‌های خود از پیش ساز فنیل آلانین استفاده کردند و میزان بالایی از رزمارینیک اسید را در کشت سلولی *Salvia officinalis* تولید کردند.

براساس مطالعات انجام شده تاکنون تاثیر نور و پیش‌ساز های فنیل‌الانین و نیز کافئیک اسید بر کشت سوسپانسیونی گیاه نوروزک صورت نگرفته است. از این رو در این پژوهش دو آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی طراحی گردید . در ابتدا اثر نور به عنوان محرک فتوسنتز وتولید اسید های آمینه، بر تجمع اسید های فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله دوم با توجه به نتایج مرحله اول، تاثیر پیش سازهای فنیل آلانین و کافئیک اسید بر تولید اسید های فنولیک کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در کشت سوسپانسیونی گیاه نوروزک انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

آماده سازی مواد گیاهی: بذرهای گیاه نوروزک از منطقه کوهسنگی مشهد واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شده و جهت استریفیکاسیون به مدت سه هفته در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. با توجه به جوانه زنی بسیار کم بذرها در شرایط درون شیشه‌ای، از کشت جنین برای بدست آوردن گیاهچه های استریل استفاده شد (مدرس و همکاران، ۱۳۸٦)

القاء کالوس: جهت القای کالوس از برگ گیاه، در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ساکارز ($۳۰gl^{-1}$)، گلایسین ($۲ mgl^{-1}$) و آگار($۷gl^{-1}$) استفاده شد. هورمونهای NAA وBAP با غلظت $۵ mg\ 1^{-1}$ بصورت توام، به محیط کشت MS افزوده شدندو pH آنها روی ۵/۸ تنظیم شد. محیط کشت‌ها به شرایط تاریکی و دمای ۲٤±۱°C منتقل شدند. کالوس های بدست آمده پس از چهار هفته واکشت شدند (مدرس و همکاران، ۱۳۹۲).

کشت سوسپانسیونی: کشت سوسپانسیونی با انتقال ۰/۵ گرم از کالوس ها به ارلن مایرهای با حجم ۱۰۰ CC که هرکدام حاوی ۳۰ CC محیط کشت القای کالوس مایع بودند، استقرار یافت . سپس کشت‌ها روی شیکر با ۱۲۵ r.p.m ، دمای ۱±۲٤ و تاریکی قرار داده شدند(مدرس و همکاران، ۱۳۹۲).

بررسی تاثیر نور بر رشد سلول ها و تولید اسید های فنولیک: در مرحله اول به منظوربهینه سازی شرایط اولیه کشت آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی اجرا شد. هر ارلن به عنوان یک تکرار و ٦ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. جهت اعمال تیمارها، در شرایط دمای ۱±۲٤ درجه سانتی‌گراد، تعداد ٦ ارلن مایر در تاریکی گذاشته شد و ٦ ارلن به فتوپریود

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

۱٦ ساعت نور(٤۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد. واکشت سلول ها هر ۱۲ روز یکبار انجام گرفت.

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنیل‌آلانین وکافئیک اسید بر رشد سلول‌ها و تولید اسیدهای فنولیک: در مرحله دوم با بدست آمدن بهترین شرایط نوری کشت(مرحله اول)، به منظور بررسی اثر فنیل‌آلانین و کافئیک اسید بر رشد سلول‌ها و تجمع اسیدهای فنولیک در کشت سوسپانسیون سلولی، آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار(غلظت های صفر و ۱۰ و۲۰ میلی گرم در لیتر از هر پیش‌ساز) و ٤ تکرارانجام شد. فنیل‌آلانین و کافئیک اسید در ابتدای کشت به محیط کشت‌ها افزوده شدند و کشت‌ها به شرایط دمای ۱±۲٤ و فتوپریود ۱٦ ساعت نور(٤۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. پس از ۱۵ روز سلول‌ها توسط کاغذ صافی از محیط کشت‌ها جداسازی گردیدند و پس از خشک شدن توسط فریزدرایر(به مدت ۳٦ ساعت)، توزین شده و از نظر رشد سلول‌ها و میزان اسیدهای فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

به منظور تعیین غلظت کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در سلول‌ها، مراحل زیر انجام شد:

استخراج عصاره فنلی: ۰/۵ گرم از سلول‌ها پس از پودر شدن، با۲۰ میلی لیتر اتانل ٦۰ درصد 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).

آماده سازی استانداردها: محلول استوک ۵ mg/ml از استانداردهای کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB (Sigma-Aldrich co.UK) در محلول اتانل/ آب (v/v ۳۰:۷۰) تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ٤۰ میکروگرم در میلی لیتر از استانداردهای کافئیک اسید و سالویانولیک اسیدB و غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از رزمارینیک اسید از استوک تهیه شد و برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط کروماتوگرافی: جهت جداسازی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک از کروماتوگرافی با کارایی بالا HPLC (Knauer,Germany) مجهز به پمپ ۱۰۰۰، دتکتور PDA ۲۸۰۰UV (Knauer smartline) و نرم افزار کروم گیت(Chromgate) استفاده شد. فاز ساکن ستون با مشخصات C_{18} (5µm, Macherey-Nagel) به ابعاد (۱۵۰×٤/٦mm)، فاز متحرک آب و اسید فسفریک ۰/۱٪ و متانول به صورت گرادیان با جریان فاز مایع یک میلی لیتر 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 سانتیگراد بود (modarres *et al.*, 20014). میزان هر یک از اسیدهای فنولیک تولید شده به ازای میلی گرم در یک گرم وزن خشک محاسبه گردید.

داده های حاصل از آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزارآماریJMP و MSTAT-C تجزیه شدند. مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۹ و ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

اثر نور بر رشد سلول‌ها: در این پژوهش ابتدا شرایط نور و تاریکی برای کشت بهینه سازی شد سپس اثر فنیل آلانین وکافئیک اسید بر رشد سلول‌ها و تجمع اسیدهای فنولیک انتخابی مورد بررسی قرار گرفت . بر طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر نور بر رشد سلول‌ها ($P\leq۰/۰۵$) معنی‌دار بود. شکل ۲ تأثیر نور را بر رشد سلول‌ها به صورت وزن خشک نشان می‌دهد. نور رشد سلول‌ها را بطور معنی‌داری نسبت به شرایط تاریکی افزایش داد بطوری که رشد سلول‌ها در شرایط نوری بیش از ۲/۵ برابر شرایط تاریکی بود (شکل ۲).

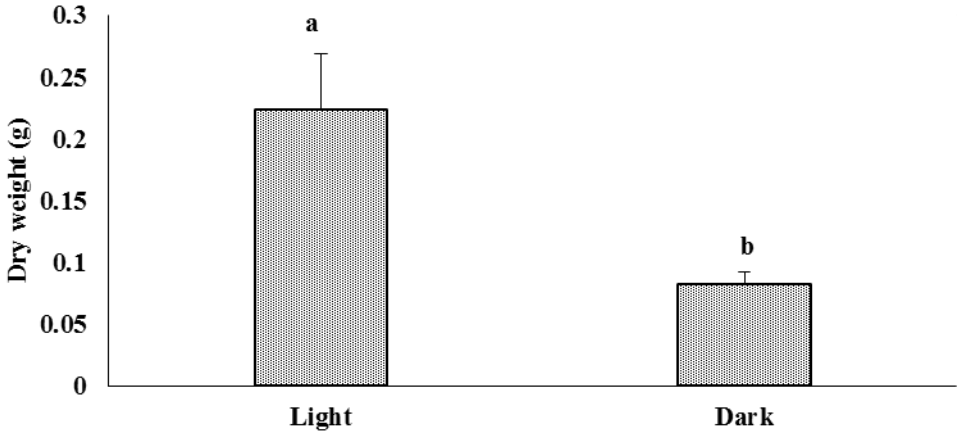
اثر نور برتولید کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B: بر طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای نور و تاریکی بر وزن خشک، کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در کشت سوسپانسیون نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن خشک	کافئیک اسید	رزمارینیک اسید	سالویانولیک اسید
تیمارها(نور و تاریکی)	۱	۰/۰۳۰۲٤٦**	۰/۱۹۲۹٦۳**	۰/۰۳۳۷٤۸۸**	۰/۱٤٥۷۰٤**
خطا	٤	۰/۰۰۰۲٥۰	۰/۰۰٤۷۷۰	۰/۰۲۰۱۸۸	۰/۰۱۱۹۱٦
ضریب تغییرات		۱۰/۳۳	۱٤/٥٦	۱۱/۲٦	۱٦/۹٥

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، * اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪، ns عدم اختلاف معنی‌دار



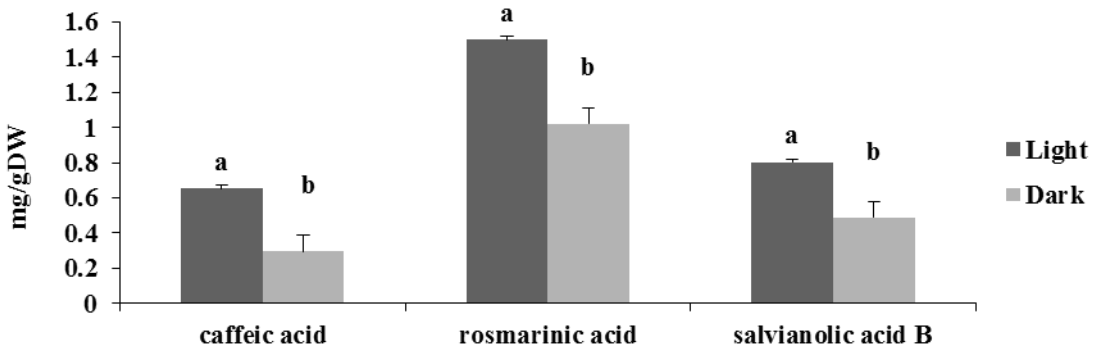
شکل ۲- تاثیر نور بر رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک. حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است.

اثر نور بر تولید کافئیک اسید (P≤ ۰/۰۱)، رزمارینیک اسید (P≤ ۰/۰۱) و سالویانولیک اسیدB (P≤ ۰/۰۱) معنی‌دار بود. نور بطور معنی‌داری بر تجمع کافئیک‌اسید، رزمارینیک‌اسید و سالویانولیک‌اسید B تاثیر افزایشی داشت. در شرایط نوری میزان تجمع کافئیک اسید ۲ برابر و سالویانولیک اسیدB حدود ۱/٥ برابر بیشتر از شرایط تاریکی بود (شکل ۳).

اثر فنیل آلانین و کافئیک اسید بر رشد سلول‌ها: بر طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) افزودن فنیل آلانین و کافئیک اسید بر رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک معنی‌دار بود (P≤ ۰/۰۱). نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های mg/l ۱۰ و۲۰ فنیل آلانین به محیط کشت نشان داد، رشد سلول‌ها با غلظت mg/l ۱۰ فنیل آلانین نسبت به شاهد تفاوتی نداشت در حالیکه با افزودن غلظت mg/l ۲۰ فنیل آلانین و غلظت‌های mg/l ۱۰ و۲۰ کافئیک اسید به محیط کشت، رشد سلول‌ها بطور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ٤). همچنین وجود کافئیک اسید در غلظت mg/l ۲۰ در محیط کشت منجر به سیاه شدن محیط کشت و از بین رفتن سلول‌ها شد.

اثر فنیل آلانین و کافئیک اسید بر تولید کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B: بر طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر فنیل آلانین و کافئیک اسید بر تجمع هرسه اسید فنولیک (کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B) معنی‌دار بود (P≤ ۰/۰۱). افزودن mg/l ۱۰ فنیل آلانین به محیط کشت پس از ۱٥ روز سبب افزایش معنی‌دار کافئیک اسید شد (P≤ ۰/۰۱) بطوری که میزان آن ٤ برابر گروه شاهد بود درحالیکه افزودن mg/l ۲۰ فنیل آلانین و هر دو غلظت کافئیک اسید به محیط کشت بر تجمع کافئیک اسید نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نداشت (P≤ ۰/۰۱) (شکل ٥).

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

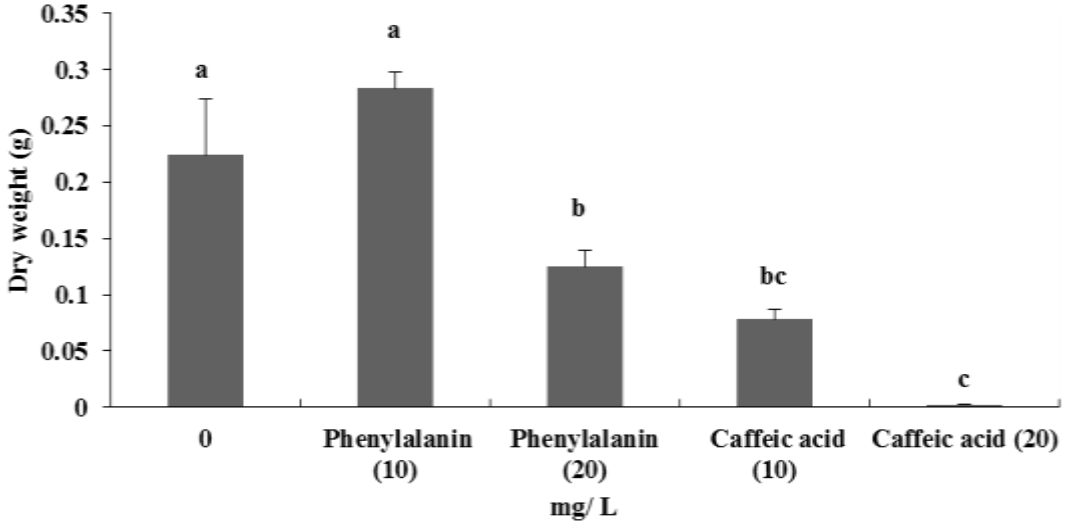


شکل ۳- تاثیر نور بر تجمع کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک. حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است.

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای فنیل الانین و کافئیک اسید بر وزن خشک، کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در کشت سوسپانسیون نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن خشک	کافئیک اسید	رزمارینیک اسید	سالویانولیک اسید
تیمارها	٤	۰/۰۳۸**	۳/٤۰٤ **	۱۸/۲۳**	۰/۸۳۷**
خطا	۱۰	۰/۰۰۲	۰/۱۳۲	۰/۰۵۰	۰/۰۲۱
ضریب تغییرات		۱٤/۰٦	۲۰/۲۵	۱۲/۰۵	۲٤/۵۹

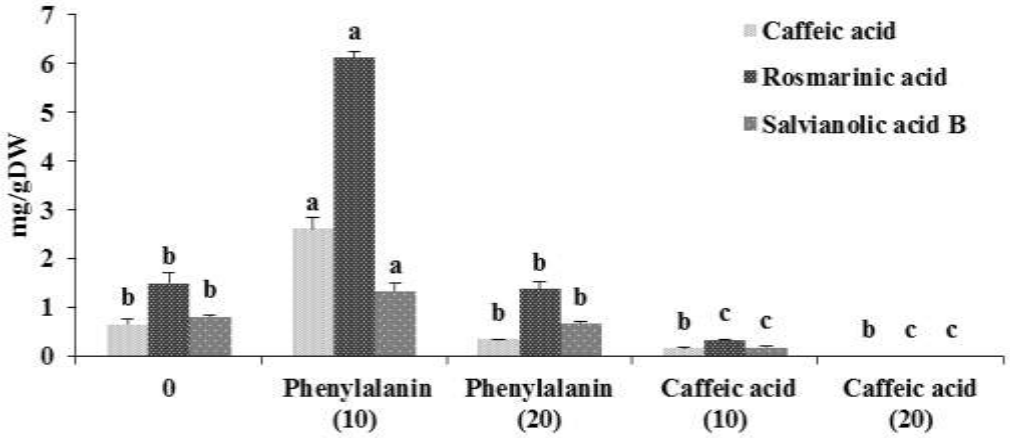
** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪؛ * معنی دار در سطح احتمال ۵٪؛ ns عدم اختلاف معنی‌دار



شکل ٤- تاثیر فنیل آلانین و کافئیک اسید بر رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک. حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است.

میزان رزمارینیک‌اسید تحت تاثیر افزودن ۱۰ mg/l فنیل آلانین به محیط کشت بطور معنی‌داری افزایش یافت($P\leq ۰/۰۱$) و به ٦/۲ mg/g DW رسید در حالی که در همین زمان در گروه شاهد ۱/۵ mg/g DW بود. میزان رزمارینیک اسید در

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021



شکل ۵- تاثیر فنیل آلانین و کافئیک اسید بر تجمع کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B **در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک. حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است.**

سلول‌هایی که در محیط حاوی ۲۰ mg/l فنیل آلانین بودند نسبت به شاهد تغییری نداشت. میزان رزمارینیک اسید تحت تاثیر افزودن کافئیک اسید به محیط کشت بطور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت بطوری که در غلظت ۲۰ mg/l این ماده تولید نشد (شکل ٤).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سالویانولیک اسید B نشان داد که سلول‌هایی که در محیط تیمار شده با ۱۰ mg/l فنیل آلانین رشد کرده بودند، سالویانولیک اسید B در آنها بطور معنی‌داری نسبت به شاهد بیشتر بود ($P\leq$ ۰/۰۱). افزودن ۲۰ mg/l فنیل‌آلانین به محیط کشت تاثیری در میزان سالویانولیک اسید B نسبت به شاهد نداشت ولی افزودن کافئیک اسید به محیط کشت بطور معنی‌داری میزان سالویانولیک اسید B را نسبت به شاهد کاهش داد بطوری که در غلظت ۲۰ mg/l این ماده تولید نشد (شکل ٤).

بحث

در این پژوهش تاثیر نور بر رشد سلول‌ها و تولید کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B در کشت سوسپانسیون سلول *S. leriifolia* بررسی گردید. این مطالعه نشان داد نور تاثیر افزایشی بر رشد سلول‌ها و تجمع اسیدهای فنولیک انتخابی داشت. گزارش‌های کمی در مورد تاثیر نور بر تولید اسیدهای فنولیک در جنس salvia وجود دارد. در توافق با این پژوهش Krajewska-Patan و همکاران (2007) گزارش کردند محتوای رزمارینیک اسید در کشت سلولی *S. milthiorrhiza* در نور بطور معنی‌داری بیشتر از تاریکی بود. نقش موثر نور در افزایش بیومس و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول به خوبی شناخته شده است (Ananga *et al.*, 2013). نور با تاثیر بر فتوسنتز سبب افزایش سنتز اسیدهای آمینه فنیل آلانین و تیروزین می‌شود که پیش‌ساز اسیدهای فنولیک به شمار می‌روند (Tzin *et al.*, 2010). همچنین نور علاوه بر منبع انرژی برای فتوسنتز، به عنوان یک الیسیتور غیر زنده‌ی قدرتمند برای تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی به حساب می‌آید (Murthy *et al.*, 2014).

دراین پژوهش تأثیر کافئیک اسید بر رشد سلول‌ها و تجمع اسیدهای فنولیک منفی بود که احتمالاً به خاطر تاثیر سمی اسیدهای فنولیک در محیط کشت بوده است. هم‌چنین این پژوهش نشان داد غلظت‌های ۱۰ mg/l و ۲۰ فنیل آلانین تأثیر معنی‌داری بر رشد سلول‌ها نسبت به شاهد نداشت اما فنیل آلانین در غلظت ۱۰ mg/l به طور موثری میزان هر سه اسید فنولیک را افزایش داد به‌طوری‌که میزان کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در سلول‌های تحت تیمار بیش از ٤ برابر شاهد افزایش یافت. قابل ذکر است این مقادیر در مقایسه با برگ گیاه کامل(Modarres *et al.*, 2014) ، در مورد کافئیک اسید ۱۳ برابر ، در مورد رزمارینیک اسید ۱/۳و در مورد

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

سالویانولیک اسید B ۱۰ برابر است. با افزایش غلظت فنیل‌آلانین به mg/l ۲۰ غلظت اسیدهای فنولیک به طور معنی‌داری کاهش یافت ضمن این‌که غلظت کافئیک اسید و سالویانولیک اسید B از گروه شاهد نیز کمتر شد. تأثیرات وابسته به غلظت فنیل آلانین بر میزان ترکیبات فنولیک قبلاً نیز گزارش شده است. به عنوان مثال Karam و همکاران ۲۰۰۳ گزارش کردند که در کشت ریشه *S. fruticosa* فنیل‌آلانین در غلظت ۱۰mg/l میزان رزمارینیک اسید را افزایش داد اما در غلظت ۱۰۰mg/l به میزان زیادی رزمارینیک اسید را کاهش داد. همین نتیجه در مورد کشت سلول *S. officinalis* نیز گزارش شده است (Hyppolyte *et al.*, 1992). در کشت ریشه موئین *Psoralea corylifolia*، فنیل‌آلانین در غلظت ۲ mM تولید دیادزئین و ژنیستئین را به اندازه ۱/۳ برابر نسبت به شاهد افزایش داد ولی با افزایش غلظت فنیل‌آلانین به ۱۰ mM از تولید دو فلاونوئید مذکور به شدت ممانعت گردید (Shinde *et al.*, 2009). با توجه به این‌که اسیدهای فنولیک از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی و از اسید آمینه فنیل‌آلانین ساخته می‌شوند (Petersen and Simmonds. 2003)، بنابراین با افزودن فنیل‌آلانین به محیط کشت انتظار می‌رود که جریان متابولیت‌ها از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی افزایش یافته و متابولیت‌های هدف به میزان بیشتری ساخته شوند. بنابراین احتمال دارد که در کشت سوسپانسیون سلول *S. leriifolia* نیز افزودن فنیل‌آلانین به محیط کشت سبب افزایش تولید اسیدهای فنولیک شده باشد. این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت فنیل‌آلانین در محیط کشت از میزان تولید اسیدهای فنولیک ممانعت شد. کاهش تولید اسیدهای فنولیک می‌تواند به علت عدم تعادل فاکتورهای تغذیه‌ای و از جمله اسیدهای آمینه در محیط کشت باشد که اثر منفی بر متابولیسم سلول و در نتیجه بر سنتز اسیدهای فنولیک دارد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نور و اسید آمینه فنیل آلانین بر تجمع اسیدهای فنولیک انتخابی تاثیر افزایشی داشتند و بیشترین میزان اسیدهای فنولیک در محیط کشت حاوی mg/l ۱۰ فنیل آلانین در حضور نور بدست آمد. این پژوهش به درک ما از چگونگی پاسخ متابولیت‌های ثانویه به نور و پیش‌سازها و بهبود تولید متابولیت‌های هدف کمک می‌کند

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولان و کارکنان پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که امکانات لازم جهت پیشبرد این پروژه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

مدرس،م.، ابریشم چی، پ. اجتهادی، ح. و رمضانی، ع. (۱۳۸٦). تکثیر گیاه نوروزک با استفاده از کشت رویان. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۵: ۱٤۱-۱۲۹.

مدرس، م. ، لاهوتی، م. ، اصیلی، ج. و گنجعلی، ع. (۱۳۹۲) بهینه سازی کشت کالوس برگ گیاه نوروزک برای تولید اسید های فنولیک. مجله علمی پژوهشی فرآیند و کارکرد گیاهی ۲: ۷٤-٦۵

مدرس، م. (۱۳۹۲) بررسی امکان ریزازدیادی و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نوروزک(*S. leriifolia*) و تولید اسیدهای فنولیک در محیط *in vitro* پایان نامه دکتری .دانشگاه فردوسی .مشهد. ایران

Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J. W., Phills, B., and Tsolova, V. (2013) Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: The Mediterranean Genetic Code -Grapevine and Olive (Ed. B. Sladonja), Pp. 247–287. Intech.

Bulgakov, V. P., Inyushkina, Y. V., and Fedoreyev S. A. (2012) Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. Critical Reviews in Biotechnology 32: 203–217.

Chen, A. H., Chai, Y. R., Li, J. N. and Chen, L. (2007) Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*). Journal of biochemistry and molecular biology 40:247–260.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 20:25 IRDT on Monday April 19th 2021

Di, P.; Zhang, L.; Chen, J.; Tan, H.; Xiao, Y.; Dong, X.; Zhou, X.; Chen, W.(2013) 13C Tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. ACS Chemical Biology 8: 1537–1548.

Dong U, Guowei W and Zongsuo L. (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal Biotechnology 148: 99-104.

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. Int Sch Res Notices: Pharmacology. 10:1-6.

Hippolyte I, Mann B, Baccou JC and Jonard R. (1992) Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell 11: 109–112.

Hosseinzadeh H and Lary P. (2000) The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. Phytother Reserch 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 MH and Hosseini E. (2000) Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 10: 63-64.

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 73: 117-121.

Krajewska-Patan, A., Dreger, M., Gorska-Paukszta, M., Mscisz, A., Mielcarek, S., Baraniak, M. and MrozikieWicz, P. M. (2007) *Salvia milthiorrhiza* Bunge *in vitro* cultivation in callus cultures. Herba Polonica 53: 88-96.

Loizze MR, Menchini F, Tundis R, Bonesi M and Cenforti F.(2009) *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. J Oleo Sci. 58: 443-446.

Lu Y and Foo LY.(2002) Polyphenolics of Salvia. Phytochemistry 59: 117-40.

Modarres M, Asili J, Lahouti M, Iranshahi M and Sahebkar A. (2014) Simultaneous determination of Rosmarinic acid, Salvianolic acid B and Caffeic acid in *Salvia leriifolia* Benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 37: 1721-1730.

Murashige T and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Murthy, H. N., Dandin, V. S., Zhong, J. J., and Paek, K. Y. (2014) Strategies for enhanced production of plant secondary metabolites from cell and organ cultures. In: Production of Biomass And Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology (Eds. Murthy, N., Zhong, J. and Paek, Y.). (Pp. 471–508). Netherlands: Springer.

Petersen, M. and Simmonds M. S. Rosmarinic acid. (2003) Phytochemistry. 62: 121–125.

Rechinger KH, Flora Iranica. N.150, (1982) Academishe Druk.u.Verlag sustalt Gratz.; pp 439.

Ren-Wang J, Kit-Man L, Po-Ming Hon, Thomas CW, Mak KS and Kwok-Pui F.(2005) Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. Curr. Med. Chem. 12: 237-246.

Sadeghnia HR, Nassiri Asl M, Haddad Khodaparast MH and Hosseinzadeh H.(2003) The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on lipid peroxidation during global ischemic-reperfusion in rats.Iranian Journal of Medicinal Plants. 2: 9-28.

Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, and Fernandes- Ferreira M.(2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). J Plant Physiol. 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. J. Neurosci. Res. 88: 896-904.

Shinde A.N., Malpathak N. and Fulzele D.P. (2009) Induced high frequency shoot regeneration and enhanced isoflavones production in *Psoralea corylifolia*. Rec. Nat. Prod. 3: 38-45.

Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in Arabidopsis thaliana. In: The Arabidopsis Book (Ed. G. Jander). Pp. 2–18.