دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.105632.1735
جلد ۳۳، شماره ۲، صفحه ۳۱۳-۳۰۴ (۱۳۹۶)

القاء کالوس و تولید اسیدهای فنولیک در کشت کالوس مریستم انتهایی و رویان گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

معصومه مدرس[1*]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

پست الکترونیک: m_modarres70@yahoo.com؛ m.modarres@cfu.ac.ir

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

چکیده

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) از خانواده نعناعیان، دارای خواص ضددرد، ضدالتهاب، ضددیابت و آنتی‌اکسیدان است. به‌منظور القاء کالوس از مریستم انتهایی و رویان گیاه نوروزک برای تولید اسیدهای فنولیک آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. جداکشت‌های مریستم انتهایی و رویان بر روی محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های مختلف از مواد تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) با KIN (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و نیز BAP (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) با NAA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت داده شد. پس از چهار هفته درصد تولید کالوس، وزن تر و خشک کالوس‌ها بررسی گردید و تجمع اسیدهای فنولیک با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. بهترین تیمار برای القاء و رشد کالوس از مریستم انتهایی و رویان 2,4-D، ۲ میلی‌گرم بر لیتر با Kin ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. میزان تجمع کافئیک اسید در کالوس‌های رویان در این تیمار به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ گیاه بود و میزان رزمارینیک اسید تولید شده قابل مقایسه با برگ بود. بیشترین میزان سالویانولیک اسیدB از عصاره حاصل از کالوس مریستم انتهایی بدست آمد که حدود سه برابر بیشتر از برگ گیاه نوروزک بود.

واژه‌های کلیدی: کافئیک اسید، رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسیدB، کالوس.

مقدمه

نوروزک (*Salvia leriifolia*) گیاهی است متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد (Rechinger, 1982) و دارای خواص متعدد دارویی است. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. فعالیت ضددرد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروزک در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قابل مقایسه با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازپام (Diazepam) گزارش شده‌است (Hosseinzadeh & Lary, 2000). مقابله عصاره گیاه با التهاب‌های مزمن از نظر کارآیی مشابه با داروی دیکلوفناک (Diclofenac) می‌باشد (Hosseinzadeh & Yavary, 1999). همچنین تأثیر عصاره آبی و الکلی برگ نوروزک در جلوگیری از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش گزارش شده‌است که کارآیی آن مشابه داروی سوکرالفت (sucralfate) است (Hosseinzadeh *et al*., 2000). همچنین عصاره‌های برگ و ریشه آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Modarres *et al*., 2007b) است. قابل ذکر است که خواص ضدمیکروبی

ریشه و برگ این گیاه روی باکتری‌های *Staphyllococcus aureuse*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Proteus mirabilis* بررسی شده‌است که عملکرد آن مشابه برخی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Modarres & Abrishamchi, 2011؛ Modarres & Abrishamchi, 2009).

گونه‌های مختلف جنس سالویا به‌عنوان منبع غنی از پلی‌فنل‌ها به‌شمار می‌روند. مهمترین اسیدهای فنولیک دارویی در جنس سالویا از گروه مونومرها (Monomer)، دایمرها (Dimer)، تریمرها (Trimer) و تترامرهای (Tetramer) کافئیک اسید (Caffeic acid) می‌باشند که شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید (Rosmarinic acid) و انواع سالویانولیک اسید (Salvianolic acid) می‌شوند (Lu & Foo, 2002).

گزارش‌های زیادی در رابطه با خواص دارویی مشتقات کافئیک اسید وجود دارد، به‌عنوان مثال خواص آنتی‌اکسیدانی، محافظت‌کنندگی عصبی در برابر ایسکمی (Ischemia)، ضدویروسی، ضد ترومبوز (Thrombosis)، کاهش‌دهنده فشار خون و ضد سرطانی این ترکیب‌ها معلوم شده‌است (Ren-Wang *et al*., 2005). کافئیک اسید دارای خواص ضد التهابی و ضد توموری می‌باشد (DuzzoGamaro *et al*., 2011). همچنین اثر درمانی رزمارینیک اسید در بهبود آلزایمر القاء شده با آمیلوئید بتا (Amyloid β) و افزایش عملکرد حافظه ثابت شده‌است (Shimojo *et al*., 2010).

رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدها در انسان به‌طور چشمگیری تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدهای با وزن کم که در بیماری آرتریواسکلروزیس (Arteriosclerosis) نقش دارند را کاهش می‌دهد (Liu & Liu, 2002).

اثرات حفاظتی سالویانولیک اسیدها در مقابله با صدمات ناشی از ایسکمی در مغز موش ثابت شده‌است. به‌علاوه این ترکیب‌ها می‌توانند عملکرد یادگیری و حافظه را پس از ایسکمی به‌طور 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 می‌شوند (Ren-Wang *et al*., 2005).

سالویانولیک اسیدB سلول‌ها را در مقابل آسیب‌های القاء شده توسط استرس اکسیداتیو محافظت کرده و نقش مؤثری در پیشگیری از سرطان دارد. به‌علاوه دارای اثرات ضدفیبروز بوده و برای درمان آرتریت روماتوئید، بیماری‌های مغزی-عروقی (cerebrovascular disorders) و بیماری‌های قلبی-عروقی (cardiovascular disease) بکار می‌رود. قابل ذکر است که تحقیقات انجام شده روی خواص دارویی اسیدهای فنولیک رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در سطح مکانیسم‌های مولکولی بررسی شده است (Bulgakov *et al*., 2012).

گزارش‌هایی در مورد تولید اسیدهای فنولیک در کالوس برخی از گونه‌های جنس *Salvia* وجود دارد. به‌عنوان مثال در کالوس گونه *S. fruticosa* رزمارینیک اسید تولید شده‌است (Karam *et al*., 2003). علاوه‌بر این در کالوس *S. officinalis* ترکیب‌های فنولیک ازجمله کافئیک اسید و رزمارینیک اسید شناسایی شد (Santos-Gomes *et al*., 2003). همچنین در کالوس و کشت سوسپانسیونی گونه *S. miltiorrihiza* ترکیب‌های کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB تولید شده‌است (Wu *et al*., 2016؛ Dong *et al*., 2010؛ Krajewska-Patan *et al*., 2007).

اخیراً شناسایی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک مشتق از کافئیک اسید، شامل کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در برگ و ریشه *Salvia leriifolia* انجام شده‌است (Modarres *et al*., 2014). اگرچه در برخی گونه‌های *Salvia* اسیدهای فنولیک در کشت بافت تولید شده‌است اما تا کنون مطالعه‌ای برای القاء کالوس و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کشت بافت گیاه نوروزک که گیاهی بومی و در معرض خطر انقراض می‌باشد (Jalili & Jamzad, 1999) انجام نشده است. تنها پژوهش انجام شده مربوط به القاء کالوس از برگ نوروزک و بهینه‌سازی آن به‌منظور تولید اسیدهای فنولیک است که در آزمایشگاه ما انجام شد و از بین

۳۸ تیمار، بهترین تیمار برای تولید رزمارینیک اسید از برگ نوروزک بدست آمد (Modarres *et al*., 2013). هدف از این پژوهش القاء کالوس از مریستم انتهایی و رویان گیاه نوروزک و بررسی تولید اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از آنها در مقایسه با برگ گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذر و برگ گیاه نوروزک از منطقه کوهسنگی مشهد واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شده و برگ‌ها در سایه و دمای ۲۴ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. بذرها برای سرمادهی به مدت سه هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به جوانه‌زنی بسیار کم بذرها در شرایط درون شیشه‌ای از کشت رویان برای بدست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد.

برای کشت رویان، از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلایسین، ۲ گرم بر لیتر زغال فعال و ۷ گرم بر لیتر آگار استفاده شد. pH محلول روی ۵/۸ تنظیم شد (Modarres *et al*., 2007a). در ادامه ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند.

برای کشت رویان، ابتدا پوشش روی بذرها حذف شد و برای استریل شدن به مدت۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و ۵ دقیقه در آب ژاول ۳٪ قرار گرفتند و۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. سپس رویان چند میلی‌متری با دقت از میان دولپه خارج شده و در سطح محیط کشت قرار گرفت. رویان‌ها ابتدا به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و بعد به شرایط ۱۶ و ۸ ساعت به‌ترتیب روشنایی (۴۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه) و تاریکی و دمای ۲۴±۱°C منتقل شدند. از مریستم انتهایی گیاهچه‌های ده روزه و نیز از رویان جدا شده از بذر برای ریزنمونه استفاده شد.

به‌منظور دسترسی به بهترین ترکیب هورمونی برای القای کالوس دو آزمایش جداگانه طراحی گردید. در آزمایش اول به محیط کشت MS، تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) در غلظت‌های (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و KIN (Kinetin) در غلظت (صفر، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد (جدول ۳ و ۵) و القای کالوس در آنها مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم ۱۳ تیمار شامل تنظیم‌کننده‌های رشد NAA (Naftalen acetic acid) در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (Benzylaminopurine) با غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت توأم، در محیط کشت MS برای القای کالوس از جداکشت‌های مذکور بررسی گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای حاوی هورمون‌های BAP و NAA

BAP0, NAA0	
BAP0.5, NAA0.5	BAP2, NAA0.5
BAP0.5, NAA1	BAP2, NAA1
BAP0.5, NAA1.5	BAP2, NAA1.5
BAP1, NAA0.5	BAP3, NAA0.5
BAP1, NAA1	BAP3, NAA1
BAP1, NAA1.5	BAP3, NAA1.5

از هر تیمار ۲۰ تکرار و در هر تکرار دو جداکشت، کشت شد. محیط کشت‌ها به شرایط تاریکی و دمای ۲۴±۱°C منتقل شدند. پس از چهار هفته، وزن تر و خشک کالوس‌ها (پس از یخ زدن و خشک شدن در خلأ (Freeze dry: توسط دستگاه (Zirbus-technology- Germany)) به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۲۰°C-)، اندازه‌گیری شد. همچنین درصد کال‌زایی برای هر تیمار و جداکشت برای ۵ تکرار محاسبه گردید.

به‌منظور تعیین غلظت کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدB در کالوس‌ها، ابتدا بیشترین درصد کال‌زایی و وزن خشک کالوس در تیمارهای مختلف در هر آزمایش تعیین شد. سپس مناسب‌ترین کالوس به لحاظ بیشترین درصد کال‌زایی و وزن خشک، برای سنجش اسیدهای فنولیک انتخاب شد. هر یک از نمونه‌های کالوس پس از خشک شدن

توسط فریزدرای، از نظر میزان اسیدهای فنولیک در مقایسه با برگ گیاه نوروزک در رویشگاه طبیعی مقایسه شدند.

استخراج عصاره فنلی

۰/۵ گرم از برگ یا کالوس‌های خشک شده پس از پودر شدن، با ۲۰ میلی‌لیتر اتانل ۶۰ درجه مخلوط شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در سونیکاتور [Sonicator (Ultrasonic homogenizer)] قرار گرفت. در مرحله بعد حلال توسط دستگاه تبخیرگردان (Rotary-evaporator) حذف گردید و pH عصاره روی ۲ تنظیم شد. سپس اتیل استات (Ethyl acetate) در ۵ مرحله به آن اضافه شد و فاز اتیل استاتی جدا و تبخیر گردید. عصاره حاصل در متانول حل شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (Dong *et al*., 2010).

آماده‌سازی استانداردها

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

شرایط کروماتوگرافی

برای جداسازی و تعیین غلظت اسیدهای فنولیک از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC (High performance liquid chromatography) (Knauer, Germany) مجهز به پمپ ۱۰۰۰، دتکتور PDA۲۸۰UV (Knauersmartline) و نرم‌افزار کروم گیت (Chromgate) استفاده شد. فاز ساکن ستون با مشخصات C18 (5µm, Macherey-Nagel) به ابعاد (۱۵۰×۴/۶mm)، فاز متحرک آب و اسید فسفریک ۰/۱٪ و متانول به‌صورت گرادیان با جریان فاز مایع یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول موج مورد استفاده ۳۳۰ نانومتر، طول زمان انجام HPLC، ۳۰ دقیقه، حجم عصاره تزریق شده ۲۰ میکرولیتر و دمای آن ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (Modarres *et al*., 2013). میزان هر یک از فنولیک اسید تولید شده به ازای میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک محاسبه گردید.

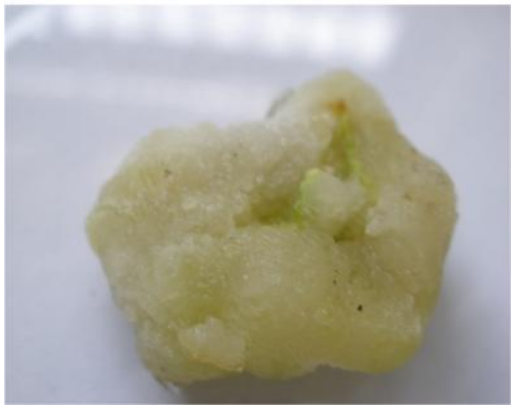
آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای JMP و MSTATC استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن ($P\leq$۰/۰۵) انجام گردید.

نتایج

نتایج کال‌زایی در مریستم انتهایی

نتایج بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و Kin بر جداکشت مریستم انتهایی نشان داد، القاء کالوس از جداکشت مریستم انتهایی۱۰ روز پس از کشت انجام شد. محاسبه درصد کال‌زایی پس از چهار هفته نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۹۴/۷۱٪) مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود و کالوس‌ها همگی کرم رنگ و نرم بودند.

بیشترین وزن تر و خشک نیز مربوط به تیمار مذکور بود که تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد ($P\leq$۰/۰۵) (جدول ۲ و ۳ و شکل ۱). در محیط کشت MS بدون هورمون جدا کشت مریستم انتهایی کالوس تولید نکرد.



شکل ۱- کالوس حاصل از کشت مریستم انتهایی در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات کالوس‌های مریستم انتهایی گیاه نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	
		وزن تر	وزن خشک
تیمارها	۶	۳/۸۴۴۲۷ *	۰/۰۳۰۲۵۴ *
خطا	۲۸	۰/۰۰۹۷۸	۰/۰۰۰۱۳۰
ضریب تغییرات		۱۱/۹	۱۵/۲۴

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۳- مقایسه درصد کال‌زایی و خصوصیات کالوس‌های حاصل از جداکشت مریستم انتهایی در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D و Kin

نوع تیمار	درصد کال‌زایی	وزن تر کالوس (g)	وزن خشک کالوس (g)
2,4-D 0+Kin0	۰	۰ c	۰ c
2,4-D1+Kin0.3	۸۸/۸۸	۰/۴۹ c	۰/۰۴۸ c
2,4-D 2+Kin 0.3	۷۰/۰۰	۰/۲۵۱ c	۰/۰۲۶ c
2,4-D 3+Kin 0.3	۵۵/۲۵	۰/۱۹۲ c	۰/۰۱۹ c
2,4-D1+ Kin 1	۸۹/۵۶	۰/۳۲۳ c	۰/۰۳۰ c
2,4-D 2 +Kin 1	۹۴/۷۱	۲/۲۸۱ a	۰/۲۲۶ a
2,4-D 3 +Kin 1	۷۸/۵۷	۱/۴۴۳ b	۰/۱۰ b

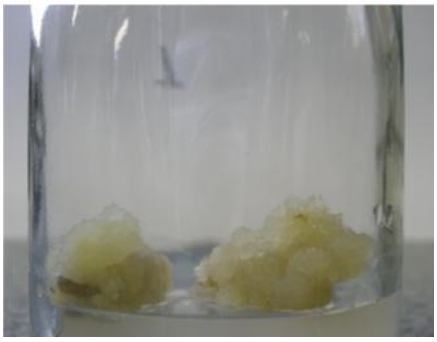
حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

کشت مریستم انتهایی در محیط کشت حاوی هورمون‌های BAP و NAA (جدول ۳) بعد از یک هفته منجر به اندام‌زایی شد.

نتایج کال‌زایی در رویان

کشت رویان در اغلب محیط‌های کشت، گیاهچه تولید کرد. در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، رویان‌ها تولید کالوس کردند. نتایج محاسبه درصد کال‌زایی بعد از چهار هفته نشان داد که بیشترین درصد کال‌زایی (۸۲/۳۵٪) در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D وجود داشت. همچنین نتایج آنالیز داده‌های حاصل از وزن تر و خشک کالوس‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک متعلق به تیمار مذکور بود که به لحاظ آماری با تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D تفاوت معنی‌داری داشت ($P\leq$۰/۰۵) (جدول ۴ و ۵ و شکل ۲).

رویان گیاه نوروزک در محیط‌های حاوی هورمونهای BAP و NAA کالوس تولید نکرد و در همه تیمارهای مذکور کشت رویان منجر به تولید گیاهچه گردید.



شکل ۲- کالوس حاصل از کشت جنین در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات کالوس‌های رویان گیاه نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	
		وزن تر	وزن خشک
تیمارها	۱	۰/۲۵۹۲۱۰ *	۰/۰۰۲۲۵۰ *
خطا	۸	۰/۰۰۱۰۷۱	۰/۰۰۰۲۶۶
ضریب تغییرات		۸/۳۲	۲۱/۴۵

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۵- مقایسه درصد کال‌زایی کالوس‌های حاصل از رویان در محیط MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های 2,4-D و KIN

نوع تیمار	درصد کال‌زایی	وزن تر کالوس (g)	وزن خشک کالوس (g)
2,4-D 0+Kin0	۰	۰	۰
2,4-D 1+Kin0.3	۰	۰	۰
2,4-D 2+Kin 0.3	۰	۰	۰
2,4-D 3+Kin 0.3	۰	۰	۰
2,4-D 1+Kin 1	۰	۰	۰
2,4-D 2 +Kin 1	۸۲/۳۵	۰/۵۵۵ a	۰/۰۵۲ a
2,4-D 3 +Kin 1	۳۳/۳۳	۰/۲۳۲ b	۰/۰۲۴ b

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج تعیین غلظت اسیدهای فنولیک درکالوس‌های حاصل از مریستم انتهایی و رویان در مقایسه با برگ نوروزک در رویشگاه طبیعی

کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های مریستم انتهایی و رویان در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، با توجه به وزن بیشتر و درصد کال‌زایی بالاتر ($P\leq$۰/۰۵) برای تعیین غلظت اسیدهای فنولیک انتخاب شدند. غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌ها در مقایسه با برگ گیاه نوروزک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سالویانولیک اسیدB در کالوس مریستم انتهایی به میزان ۳/۳ برابر گیاه نوروزک بود، در حالیکه میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید آن کمتر از گیاه کامل بود. نتایج سنجش اسیدهای فنولیک در کالوس رویان نشان داد که مقدار کافئیک اسید در کالوس به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاه کامل بود، در حالیکه میزان رزمارینیک اسید در کالوس و گیاه نوروزک تفاوت معنی‌داری نداشت. در این کالوس، میزان سالویانولیک اسیدB ناچیز بود (جدول ۶ و ۷).

جدول ۶- تجزیه واریانس میزان اسیدهای فنولیک در کالوس‌های مریستم انتهایی، رویان و برگ گیاه نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات		
		کافئیک اسید	رزمارینیک اسید	سالویانولیک اسید
کالوس‌های مریستم انتهایی رویان و برگ	۲	۰/۰۴۲۷۰۰*	۰/۹۴۲۵۰*	۰/۲۱۹۷۰۰*
خطا	۶	۰/۰۰۲۵۶۷	۰/۱۱۳۳۳	۰/۰۰۰۲۶۷
ضریب تغییرات		۲۲/۳۷	۷/۳۹	۷/۵۲

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت اسیدهای فنولیک در کالوس‌های حاصل از مریستم انتهایی، رویان و برگ گیاه نوروزک

نمونه گیاهی	کافئیک اسید (mg/gDW)	رزمارینیک اسید (mg/gDW)	سالویانولیک اسیدB (mg/gDW)
کالوس رویان	۰/۳۹ a	۵/۳ a	۰ c
کالوس مریستم انتهایی	۰/۱۷ b	۳/۷ b	۰/۵۲ a
برگ	۰/۲ b	۴/۶۵ a	۰/۱۳ b

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

نتایج این پژوهش در مورد بررسی کال‌زایی رویان مشابه با پژوهش Liu و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد. در پژوهش مذکور رویان‌ها در دو واریته مختلف از گونه *S. splendens* در تیمارهای حاوی BAP و NAA تولید گیاهچه نمودند، در حالیکه در حضور هورمون 2,4-D کالوس تولید کردند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که برای تولید کالوس از رویان، وجود هورمون 2,4-D ضروریست (Vikrant, 2003). البته یافته‌های مشابهی نیز در مورد گیاه *Benincasa hispida* گزارش شده‌است (Thomas & Sreejesh, 2004).

باززایی از مریستم انتهایی در حضور هورمون‌های BAP و NAA توسط Ourmazd و Chalabian (۲۰۰۶) در گونه *S. nemoroza* نیز گزارش شده‌است. همچنین کالوس‌های حاصل از رویان و مریستم انتهایی هر دو کرم‌رنگ و ترد بودند و از نظر ظاهری شباهت زیادی داشتند. بررسی‌ها نشان داده است که 2,4-D از سنتز کلروفیل و تولید پروتوکلروفیلید (Protochlorophyllide) ۶۵۲ ممانعت می‌کند. تأثیر مشابهی هم توسط کلرامفنیکل (chloramphenicol) گزارش شده‌است. بنابراین ممکن است 2,4-D به‌طور مستقیم از طریق سنتز پروتئین پلاستیدی بازدارنده‌ای که مثل کلرامفنیکل عمل می‌کند سبب ممانعت از سنتز ALA (Amino levulinic acid) شده و از این طریق از سنتز کلروفیل جلوگیری کند (Shewry *et al*., 1971). به این ترتیب در این تحقیق ایجاد کالوس‌های کرم‌رنگ از مریستم انتهایی و رویان در محیط کشت واجد 2,4-D که در برابر نور نیز سبز نشدند قابل توضیح می‌باشد.

بررسی‌ها نشان داده‌است که اکسین‌های مختلف در رونویسی از ژن‌ها و افزایش تراز mRNA نقش دارند، ولی تنظیم افزایش mRNA در سلول به‌طور مستقیم به نوع اکسین بستگی دارد. علاوه‌بر این معلوم شده است که گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف گیاهان برای نوع اکسین، تخصص یافتگی دارند. همچنین تعداد و نوع گیرنده‌های اکسین در بافت‌های مختلف یک گیاه ممکن است متفاوت باشند (Moore, 1989). بنابراین احتمال دارد که پاسخ متفاوت جداکشت‌های رویان در گیاه نوروزک نسبت به اکسین‌های NAA و 2,4-D در ارتباط با این مسئله باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در هر دو نوع کالوس تولید گردید و سالویانولیک اسیدB در کالوس حاصل از رویان وجود نداشت. در همه کالوس‌ها بیشترین اسید فنولیک تولید شده رزمارینیک اسید بود. میزان کافئیک اسید در همه کالوس‌ها در محدوده ۰/۱۷۵ تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در گرم بدست آمد، در حالیکه میزان آن در برگ نوروزک ۰/۲ میلی‌گرم در گرم بود. گزارش‌های بسیار کمی در مورد تولید کافئیک اسید در کالوس گیاهان مختلف وجود دارد. طبق گزارش Santos-Gomes و همکاران (۲۰۰۳) نیز میزان تولید کافئیک اسید در کالوس حاصل از میان‌گره *S. officinalis* در محیط کشت MS به میزان ۰/۰۰۸ میلی‌گرم در گرم بود که کمتر از میزان تولید شده در کالوس‌های گیاه نوروزک می‌باشد.

همچنین طبق گزارش Kintzios و همکاران (۱۹۹۹) میزان رزمارینیک اسید تولید شده در کالوس‌های *S. officinalis* و *S. Fruticosa* در محیط کشت MS حاوی

KIN و 2,4-D به‌ترتیب ۲۹ گرم بر لیتر و ۲۵/۹ گرم بر لیتر بود. در این پژوهش میزان رزمارینیک اسید در کالوس‌های حاصل از رویان و مریستم انتهایی به‌ترتیب ۰/۵۲٪ و ۰/۳۷٪ بود، در حالیکه در کشت کالوس *S. miltiorrhiza* میزان رزمارینیک اسید در کالوس برگ و ساقه به‌ترتیب ۰/۲۸٪ و ۱/۲۷٪ گزارش شده است (Wu *et al*., 2016).

در توافق با نتایج ما میزان تولید سالویانولیک اسیدB در کالوس *S. miltiorrhiza* ۰/۱٪ بود (Morimoto *et al*., 1994). در حالیکه Wu و همکاران (۲۰۱۶) میزان تولید سالویانولیک اسیدB را در کالوس‌های برگ و ساقه *S. miltiorrhiza* به‌ترتیب به میزان ۰/۰۷٪ و ۰/۸۷٪ گزارش کردند.

از آنجا که کافئیک اسید پیش‌ساز رزمارینیک اسید و رزمارینیک اسید پیش‌ساز سالویانولیک اسیدB می‌باشد (Petersen, 2013) احتمالاً این واکنش‌ها در مریستم انتهایی با سرعت بیشتری انجام شده‌است، زیرا پس از چهار هفته از میزان کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در کالوس کاسته شده و میزان سالویانولیک اسیدB بیشتری تولید شده‌است. در حالیکه در کالوس رویان تجمع کافئیک اسید و رزمارینیک اسید و عدم تولید سالویانولیک اسیدB مشاهده شد. دلیل احتمالی این امر ممکن است تفاوت در بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مربوط به مسیر سنتزی اسیدهای فنولیک در جداکشت‌های مختلف باشد.

به‌طور کلی براساس نتایج این تحقیق، کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های رویان و مریستم انتهایی گیاه نوروزک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN می‌تواند به‌طور مؤثری برای القاء کالوس با درصد کال‌زایی بالا و تولید اسیدهای فنولیک در محیط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان و کارکنان محترم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که امکانات لازم را برای پیشبرد این پروژه فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- 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.
- 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 of Biotechnology, 148: 99-104.
- Dong, Y.B., Liu, Z.S. Liang, and Wang, W.L., 2010. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. Ultrasonics Sonochemistry, 17: 61-65.
- DuzzoGamaro, 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. International Scholarly Research Notices: Pharmacology, 10: 1-6.
- Hosseinzadeh, H. and Lary, P., 2000. The effect of *Salvia leriifolia* Benth. root extracts on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research, 14: 384-387.
- Hosseinzadeh, H. and Yavary, M., 1999. Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf extract in mice and rat. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 9: 60-61.
- Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseini, E., 2000. Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 10: 63-64.
- Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forest and Rangeland, 215p.
- Karam, N.S., Jawad, F.M., Arikat, N.S. and Shibli, R A., 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 117-121.
- Kintzios, S., Nikolaou, A. and Skoula, M., 1999. Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and S. fruticosa leaf callus cultures. Plant Cell Reports, 18: 462-466.
- Krajewska-Patan, A., Dreger, M., Górska-Paukszta, M., Mścisz, A., Mielcarek, S., Baraniak, M., Buchwald, W., Marecik, R., Grajek, W. and Mrozikiewicz, P.M., 2007. *Salvia milthiorrhiza*

Salvia miltiorrhiza. Journal of Natural Products, 57: 817-823.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Ourmazd, P. and Chalabian, F., 2006. Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa.* Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(2): 69-79.
- Petersen, M., 2013. Rosmarinic acid, new aspects. Phytochemistry Reviews, 12: 207-227.
- Rechinger, K.H., 1982. Flora Iranica. N.150 Labiatae. Tab 582 (Tabulate). Graz-Austeria: AcademischeDruk-u,Verlagsantalt, 439p.
- Ren-Wang, J., Kit-Man, L., Po-Ming, H., Thomas, C.W., Mak, K.S. and Kwok-Pui, F., 2005. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. Current Medicinal Chemistry, 12: 237-246.
- Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B. and Fernandes-Ferreira, M., 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of Plant Physiology, 160: 1025-1032.
- Shewry, P.R., Pinfield, N.J. and Stobart, A.K., 1971. The effect of 2.4-dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyle)-trimethylammo chloride on chlorophyll synthesis in barley leaves. Planta, 101: 352-359.
- Shimojo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., Shimizu, T. and Shirasawa, T., 2010. Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Neuroscience Research, 88: 896-904.
- Thomas, T.D. and Sreejesh, K.R., 2004. Callus induction and plant regeneration from cotyledoary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.). Scientia Horticulturae Journal, 100: 359-367.
- Vikrant, R.A., 2003. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of Paspalumscrobiculatum. Biologia Plantarum, 46: 297-300.
- Wu, C.F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A.R. and Efferth, T., 2016. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acutelymphoblastic leukemia cells. Food chemistry, 201: 292-297.

Bunge in vitro cultivation in callus cultures. Herba Polonica Journal, 53: 88-96.
- Liu, H., Guoping, Z., Guozheng, S., Songlin, R. and Qiaojuan, F., 2012. Callus induction and plant regeneration from mature seeds of *Salvia splendens*. International Journal of Agriculture and Biology, 14: 445-452.
- Liu, Y.L. and Liu, G.T., 2002. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by salvianolic acid-A. Acta Pharmaceutica Sinica B, 37: 81-85.
- Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia*. Phytochemistry, 59: 117-40.
- Modarres, M. and Abrishamchi, P., 2009. The effect of harvesting time on the antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. Leaf extract. Journal of Science Tarbiat Moallem University, 8(4): 343-356.
- Modarres, M. and Abrishamchi, P., 2011. Antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. root extract in different stages of growth and development, 23(5): 707-717.
- Modarres, M., Abrishamchi, P., Ejtehadi, H. and Ramezani, A., 2007a. Propagation of *Salvia leriifolia*by embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15(2): 129-141.
- Modarres, M., Abrishamchi, P., Farhoosh R. and Ejtehadi, H., 2007b. Variation of antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. root and leaf extracts during the different stages of plant growth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23(3): 285-294.
- 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 techniques, 37(12): 1721-1730.
- Modarres, M., Lahooti, M., Asili, J., Kafi, M. and Ramazani, A., 2013. Optimizing leaf callus culture in *Salvia leriifolia* for phenolic acids production. Journal of Plant Process and Function, 2(4): 65-74.
- Moore, T.C., 1989. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, 14: 234-242.
- Morimoto, S., Goto, Y. and Shoyama, Y., 1994. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of

Callus induction and phenolic acids production in apical meristem and embryo callus culture of *Salvia leriifolia* Benth.

M. Modarres[1*]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Farhangian University, Tehran, Iran
E-mail: m_modarres70@yahoo.com, M.modarres@cfu.ac.ir

Received: April 2016 Revised: December 2016 Accepted: December 2016

Abstract

Salvia leriifolia Benth., belonging to Lamiaceae, has antinociceptive, anti-inflammatory, antidiabetic and antioxidant properties. In order to callus induction from apical meristem and embryo of *salvia leriifolia* to produce phenolic acids, an experiment was carried out in a completely randomized design. The apical meristem and embryo explants were cultured in MS medium supplemented with 2,4-D (0, 1, 2, 3mg/L), KIN (0, 0.3, 1mg/L), BAP (0, 0.5, 1, 2, 3mg/L) and NAA (0, 0.5, 1, 1.5mg/L). The fresh and dry weights were evaluated and accumulation of phenolic acids was measured after four weeks of culture by HPLC. The best treatments for callus induction and growth was at the 2,4-D 2mg/L and KIN 1mg/L. Accumulation of caffeic acid in embryo callus was higher than that of leaves of *Salvia leriifolias* and concentration of rosmarinic acid was comparable to the leaves. The highest salvianolic acid B concentration was found in callus of apical meristem that was about four times higher than that of leaves.

Keywords: Caffeic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, callus.