

هفتمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران

شهریور ۱۴۰۰، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

7th Iranian Conference of Plant Physiology

1-2 September 2021, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی محتوای ترکیبات فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی در کالوس‌های القاء شده از برگ کلپوره

زهرا محمدزاده^۱، منیره چنیانی^{۲*}، لیلا سمیعی^۳

^۱ دانشجو کارشناسی ارشد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

^{۲*} استادیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

^۳ استادیار، فیزیولوژی و اصلاح گیاهان زیتنی، گروه پژوهشی گیاهان زیتنی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

*Cheniany@um.ac.ir

چکیده

در این پژوهش، توان تولید مشتقات فنلی در کالوس ریزنمونه برگ کلپوره (*Teucrium polium*) در محیط کشت MS ارزیابی شد. پس از القاء کالوس بر روی محیط‌های کشت دارای هورمون‌های BAP (۰-۱/۵ میلی گرم در لیتر) و IAA (۰-۱ میلی گرم در لیتر)، بهترین تیمارهای هورمونی از باب درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس، مورد ارزیابی محتوای ترکیبات فنل، فلاونوئید، اسیدهای فنلی و توان آنتی‌اکسیدان بر مبنای آزمون FRAP قرار گرفتند. در محیط‌های کشت منتخب از جهت درصد کالزایی [“IAA_{0.1}+BAP₁”] و [“IAA_{0.1}+BAP_{0.5}”] و بیشترین وزن تر و خشک [“IAA₁+BAP_{1.5}”] و [“IAA₁+BAP_{0.5}”]؛ بیشترین محتوای فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی در کالوس القاء شده در تیمار هورمونی “IAA₁+BAP_{1.5}” حاصل شد. این در حالی بود که کالوس‌های محیط کشت “IAA₁+BAP_{0.5}”؛ بیشترین ظرفیت احیاکنندگی یون‌های آهن را از خود بروز دادند. نتایج حاضر نشان می‌دهد که تکنیک کالوس کلپوره می‌تواند شیوه مناسبی برای تولید ترکیبات و مشتقات فنلی در شرایط درشیشه باشد.

کلمات کلیدی: کلپوره، کالوس، فنل، فلاونوئید، اسیدهای فنلی.

مقدمه

گیاهان دارای خاصیت‌های دارویی میراثی منطقه ای و بااهمیت جهانی هستند که به‌عنوان منابع بسیار گسترده جهت دستیابی به ترکیبات دارویی و توسعه صنعت داروسازی می‌باشند. با توجه به اینکه بخش اعظم گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه‌ی متابولیت‌های ثانوی مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا متابولیت‌های ثانوی گیاهان از ارزش اقتصادی و ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند؛ هرچند سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد، به این نحو که کنترل دقیق عوامل مختلف سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند؛ در حالی که در شرایط طبیعی مرتباً تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و آفات می‌باشند. بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله تکنیک کشت سلول، کالوس و بافت گیاه، راه جایگزین سودمندی است به طوری که کشت بافت گیاهی به‌عنوان مکمل کشاورزی سنتی در تولید صنعتی ترکیبات فعال گیاهی ایفاکننده نقش مهمی است. البته امروزه تعدادی از گیاهان در سطح جهانی از طریق کشت بافت تولید می‌شوند و ریزازدیادی به یک بخش ضروری در کشاورزی مدرن نیز تبدیل شده است (۹). جنس کلپوره با دارا بودن گونه‌های بسیار، با توجه به خواص آنتی‌اکسیدان،

هفتمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران

شهریور ۱۴۰۰، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

7th Iranian Conference of Plant Physiology

1-2 September 2021, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ضدمیکروب و ضدقارچی نشات گرفته از ترکیبات ثانوی آن دارای اهمیت بسیار می‌باشند. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی توان تولید مشتقات فنلی به‌عنوان دسته مهم ترکیبات دارویی کلپوره در شرایط درشیشه (کالوس) است تا بتواند جایگزین مناسبی برای استفاده مستقیم از خود گیاه باشد.

مواد و روش‌ها

مستند بر پژوهش‌های قبلی ما (۷)، برگ‌های گیاه کلپوره به‌عنوان ریزنمونه و پس از فرایند استریل، بر روی محیط‌کشت دارای تیمارهای هورمونی BAP (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر) و IAA (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم درلیتر) قرار گرفتند. نگهداری نمونه‌ها به مدت هشت هفته و به ترتیب در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در پایان این دوره، درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها بررسی شد و محیط‌های کشت منتخب برای بررسی محتوای مشتقات فنلی انتخاب شدند.

جهت استخراج ترکیبات فنلی، عصاره‌گیری به روش Annegowda و همکاران (۱) انجام شد. سنجش محتوای ترکیبات فنلی به شیوه فولین-سیو کالچو و بر مبنای روش Marinova و همکاران (۵) انجام شد. سپس محتوای ترکیبات فنلی بر اساس منحنی استاندارد گالیک‌اسید و به‌صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه شد. از روش Matkowski و همکاران (۶) برای ارزیابی محتوای اسیدهای فنلی استفاده شد و محتوای این دسته از ترکیبات، بر حسب میلی‌گرم کافئیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه گردید. به منظور سنجش محتوای فلاونوئیدکل، اصول روش Zhishen و همکاران (۱۰) مبنی کار قرار گرفت تا محتوای فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه کالوس ارائه گردد. برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP، نیز از محلول سولفات آهن II برای رسم منحنی استاندارد استفاده و انجام محاسبات استفاده گردید. در نهایت، تجزیه آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۵) و مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج گویای این مطلب بود که بیشترین درصد کالزایی متعلق به تیمار هورمونی "IAA_{0.1}+ BAP₁" و هم‌چنین تیمار هورمونی "IAA_{1.5}+ BAP₁" میلی‌گرم درلیتر می‌باشد. بیشترین وزن تر کالوس‌ها در تیمار تلفیقی "IAA_{0.1}+ BAP_{0.5}" میلی‌گرم درلیتر و تیمار تلفیقی "IAA₁+ BAP_{1.5}" میلی‌گرم درلیتر به دست آمد. بیشترین وزن خشک کالوس‌ها نیز در تیمارهای تلفیقی "IAA_{0.1}+ BAP_{0.5}"، "IAA₁+ BAP_{0.5}" و "IAA₁+ BAP_{1.5}" میلی‌گرم درلیتر مشاهده شد (جدول ۱). از این کالوس‌های منتخب به‌دست آمده در کلیه تیمارها، برای بررسی محتوای ترکیبات بیوشیمیایی-فنلی به‌کار گرفته شد.

جدول ۱- صفات کالزایی ریزنمونه برگ کلپوره در شرایط هورمونی مختلف

هورمون (میلی‌گرم درلیتر)	IAA ₀ + BAP ₀	IAA ₀ + BAP _{0.5}	IAA ₀ + BAP ₁	IAA ₀ + BAP _{1.5}	IAA _{0.1} + BAP ₀	IAA _{0.1} + BAP _{0.5}	IAA _{0.1} + BAP ₁	IAA _{0.1} + BAP _{1.5}	IAA _{0.5} + BAP ₀	IAA _{0.5} + BAP _{0.5}	IAA _{0.5} + BAP ₁	IAA _{0.5} + BAP _{1.5}	IAA ₁ + BAP ₀	IAA ₁ + BAP _{0.5}	IAA ₁ + BAP ₁	IAA ₁ + BAP _{1.5}
درصد کالزایی (گرم)	۰ ^c	۸۰ ^b	۹۳ ^b	۸۰ ^b	۹۳ ^b	۱۰۰ ^a	۷۳ ^b	۸۷ ^b	۸۷ ^b	۸۷ ^b	۸۷ ^b	۸۷ ^b	۸۷ ^b	۹۳ ^b	۸۷ ^b	۱۰۰ ^a
وزن تر کالوس (گرم)	۰	۱/۰۳	۱/۲۲	۱/۲۹	۰/۶۲	۲/۸۰	۲/۴۴	۱/۶۴	۰/۶۸	۱/۱۴	۱/۶۲	۱/۷۵	۱/۳۵	۲/۳۹	۱/۶۲	۲/۷۶
وزن خشک کالوس (گرم)	۰	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۲۱	۰/۰۵	۰/۲۶	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۱۳	۰/۲۶	۰/۱۵	۰/۲۶

بیشترین محتوای فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی در کالوس القاء شده در تیمار هورمونی "IAA₁+BAP_{1.5}" میلی‌گرم درلیتر حاصل شد. نکته مهم آن‌که

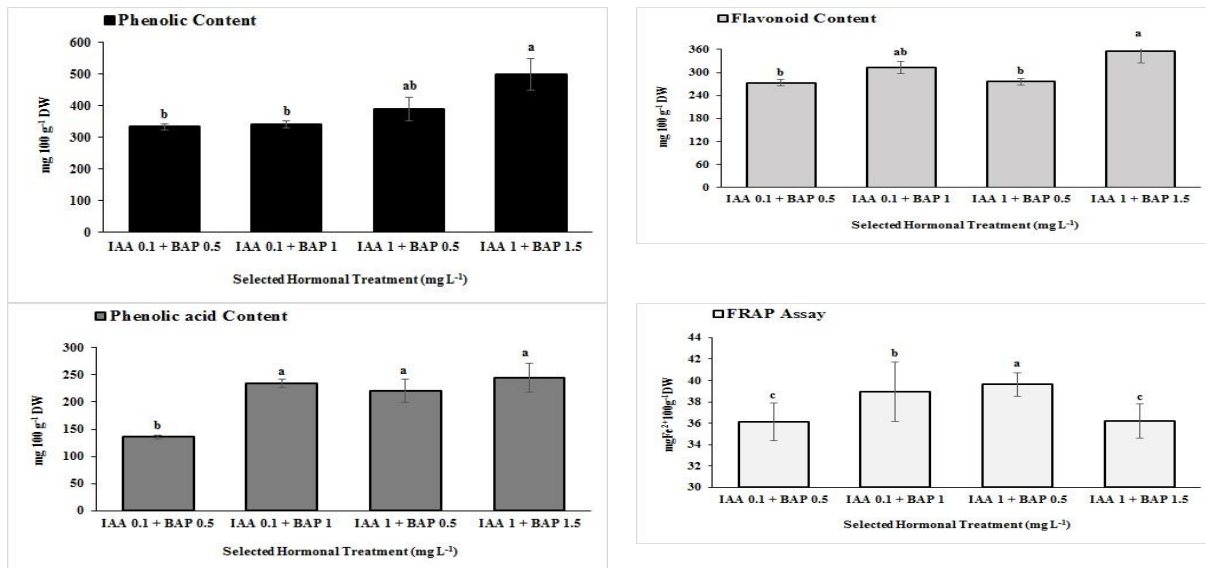
هفتمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران

شهریور ۱۴۰۰، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

7th Iranian Conference of Plant Physiology

1-2 September 2021, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

با افزایش غلظت هورمون BAP به کاربرده شده در کنار غلظت ثابت هورمون IAA، محتوای هر سه دسته از ترکیبات افزایش یافت. نتایج آزمون FRAP هم نشان داد که کالوس‌های محیط کشت میلی گرم در لیتر "IAA₁+BAP_{0.5}" میلی گرم در لیتر، بیشترین توان آنتی‌اکسیدان را از خود بروز دادند (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر شرایط هورمونی منتخب بر دستجات مختلف ترکیبات فنلی کالوس: فنل کل، فلاونوئید، اسیدهای فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان. حرف یا حروف

مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای پنج درصد-بر مبنای آزمون دانکن- می‌باشد.

هورمون‌ها از عوامل تاثیرگذار بر مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانوی در شرایط کشت کالوس و بافت هستند. در تحقیقاتی که بیشتر صورت گرفت، تاثیر هورمون 2,4-D و BAP بر محتوای فنل کالوس حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره بررسی شد و نشان داده شد که با افزایش بیش از حد غلظت هورمون، محتوای فنل کالوس کاهش می‌یابد (۲ و ۴). در مطالعه Sagharyan و همکاران (۸)، اثر هورمون‌های BAP، 2,4-D، و NAA بر محتوای فنل کالوس گیاه پونه‌سای بینالودی صورت گرفت و مشخص شد که بیشترین محتوای فنل کالوس ریزنمونه برگ متعلق به در محیط‌کشت حاوی تیمار هورمونی "NAA_{0.5} + BAP₂" میلی گرم در لیتر است. در این تحقیق بیان شد که افزایش محتوای فنل کالوس با غلظت هورمون BAP رابطه مستقیم دارد به این‌نحوه که هر چه غلظت هورمون BAP در کنار غلظت ثابت هورمون NAA افزایش یابد، محتوای فنل نیز افزایش می‌یابد که این یافته با نتایج پژوهش حاضر هم راستا است. این مساله مهم در پژوهش Hemmati و همکاران (۳) نیز به اثبات رسید و با افزایش غلظت هورمون BAP در کنار غلظت ثابت هورمون NAA، محتوای فنل کل کالوس مریم‌گلی طبسی افزایش یافت. یافته دیگر پژوهش اخیر آن بود که تاثیر هورمون‌های تلفیقی "BAP و 2,4-D" و هم‌چنین هورمون‌های "BAP و NAA" بر محتوای فنل کالوس بسیار بیشتر از کاربرد آن‌ها بود که مشابه با نتایج پژوهش پیش رو است.

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر تایید می‌کند که با بهینه سازی شرایط هورمونی برای تولید انبوه کالوس کلپوره، می‌توان از پتانسیل‌های متفاوت کالوس‌های تولید شده به‌عنوان منابع مهم برای تولید ترکیبات موثره دارویی- فنلی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با شماره کد طرح به‌شماره ۳/۵۱۴۹۵) سپاس‌گزاری می‌کنند.

هفتمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران

شهریور ۱۴۰۰، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرجان

7th Iranian Conference of Plant Physiology
1-2 September 2021, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

منابع

1. **Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A. & Mansor, S. M. (2012)** "Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits". *Journal of Food Science and Technology*, 49(4): 510-514.
2. **Hashemyan, M. (2018)** "Investigating the effect of some abiotic elicitors on the content of phenolic compounds and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. in vitro". MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
3. **Hemmati, N., Cheniany, M. & Ganjeali, A. (2020)**. "Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge". *Botanica Serbica*, 44 (2): 163-173.
4. **Javidimoghadam, M., Cheniany, M., Ganjeali, A. & Lahouti, M. (2016)**. "An investigation on callogenesis and antioxidant capacity of different explants of *Teucrium polium*". *Iranian Journal of Plant Biology*, 8(29): 37-52.
5. **Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M. (2005)**. "Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables". *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(3): 255-26.
6. **Matkowski, A. (2008)** "Plant in vitro culture for the production of antioxidants". *Biotechnology Advances*, 26: 548-560.
7. **Mohammadzadeh, Z., Cheniany, M. & Samiei, L. (2021)**. "Induction of callus from leaf explant of *Teucrium polium* L. under the hormonal conditions BAP and IAA". 21th National & 9th International Congress on Biology, Semnan.
8. **Sagharyan, M., Ganjeali, A. & Cheniany, M. (2019)**. "Investigating the effect of antioxidant compounds and various concentrations of BAP and NAA on the improvement of in vitro stem and root formation of *Nepeta binaloudensis* Jamzad". *Nova Biologica Reperta*, 6: 198-205.
9. **Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., & Tsay, H. S. (2004)**. "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures". *Botanica Bulletin Academia Sinia*, 45: 1-22.
10. **Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999)**. "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". *Food Chemistry*, 64(4): 555-559.

Evaluation of phenolic, flavonoid, and phenolic acid compounds in calluses from the leaf of *Teucrium polium* L.

Zahra Mohammadzadeh¹, **Monireh Cheniany**^{2,*}, **Leila Samiei**³

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

^{2*} Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

³ Research Center of Plant Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

* Cheniany@um.ac.ir

Abstract

In the context of this survey, it was investigated phenolic production potential from callus of *Teucrium polium* L. leaf explant in MS culture medium. After the induction of callus on media with hormones BAP (from 0 to 1.5 mg L⁻¹) and IAA (from 0 to 1 mg L⁻¹) and based on the most percentage of callogenesis, fresh and dry weights of them; phenolic, flavonoid and phenolic acid contents as well as antioxidant capacity (FRAP assay) were measured. In selected MS cultures based on percentage of callus ["IAA_{0.1} + BAP₁" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹] and fresh and dry weights of callus ["IAA_{0.1} + BAP_{0.5}", "IAA₁ + BAP_{0.5}" and "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹], the highest content of phenols, flavonoids and phenolic acids were obtained in the hormonal treatment of "IAA₁ + BAP_{1.5}" mg L⁻¹. While the highest reduction capacity of iron ions was seen in callus on "IAA₁ + BAP_{0.5}" mg L⁻¹. The present results showed that the callus technique can be a good alternate for the production of phenolic derivatives *in vitro*.

Keywords: Callus, "Feltly Germander", Phenol, Flavonoid, Phenolic acid.