

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

تأثیر اسید سالیسیلیک بر محتوی متابولیت های ثانویه در کشت کالوس گیاه توکریوم پولیوم

(*Teucrium polium* .L)

پروین آزاد توپکانلو^۱، منیژه میان آبادی^۲، علی گنجعلی^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، گلستان، ایران

Pariazad6448@gmail.com

^۲استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، گلستان، ایران m.mianabadi@gu.ac.ir

^۳دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران Ganjeali@um.ac.ir

چکیده:

توکریوم پولیوم (*Teucrium polium*) متعلق به تیره Lamiaceae، گیاهی دارویی است که دارای اثرات ضد دیابت، ضد اسپاسم و آنتی اکسیدان می باشد. این گیاه غنی از متابولیت های ثانویه است. تحقیقات مختلف گزارش کرده اند که فلاونوئیدها، متابولیت های ثانویه موثر توکریوم پولیوم هستند، که می توان مقدار آنها را در شرایط کشت کالوس گیاهان دیگر افزایش داد. بنابراین، با استفاده از غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک تغییرات میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی کالوس بررسی شد. در این مطالعه تجربی، از برگ و ساقه گیاه توکریوم پولیوم برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه ها در محیط کشت MS تحت تیمار 2,4-D با غلظت ۰/۵ mg/l و یا BAP با غلظت ۱/۵ mg/l در شرایط تاریکی به مدت یک ماه در دمای ۲۵ °C کشت شدند. سپس کالوس های حاصل به محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ μg/l) در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ °C واکشت شدند. در نهایت، به روش فولین-سیوکالچو، کلریمتری آلومینیم کلراید و FRAP به ترتیب میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدان کالوس ها مطالعه شد. نتایج حاصل از ارزیابی نشان داد که در شرایط تاریکی محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی تیمارهای اسید سالیسیلیک نسبت به کالوس های اولیه حاصل از ریزنمونه های تحت تیمار 2,4-D و BAP افزایش قابل توجهی نداشت. اما کالوس های تحت تیمار BAP در مقایسه با 2,4-D بعد از تیمار با اسید سالیسیلیک افزایش معنی داری را در پارامترهای فوق نشان دادند.

واژگان کلیدی: توکریوم پولیوم، متابولیت های ثانویه، فلاونوئید، اسید سالیسیلیک

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

مقدمه

اثرات جانبی داروهای شیمیایی و مقاومت روز افزون میکروارگانیسم‌ها در برابر بسیاری از داروها به ویژه آنتی بیوتیک‌ها و همچنین درمان ناموفق بیماری‌های مزمن، دلیل اصلی توجه بیشتر به گیاهان دارویی است. اما، معمولاً به دلیل مواد مؤثره کم در گیاهان دارویی و برداشت بی رویه گیاهان دارویی به نظر می‌رسد نیاز به توسعه روش‌های کشت مناسب و بهینه سازی شرایط کشت در جهت افزایش تولید متابولیت‌های موثر دارویی احساس می‌شود. گیاه توکریوم پولیوم گیاهی علفی، پایا، کرکدار و معطر با ارتفاع ۴۰-۱۰۰ cm است (Esmaeili & Yazdanparast, 2004) که در نواحی بایر و سنگلاخی و ماسه‌زارهای نواحی جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (Esmaeili & Amiri, 2008) ترکیب‌های فرار اصلی گیاه توکریوم پولیوم آلفا پینن، بتا پینن، لینالول، کاروفیلین اکسید، بتاکاروفیلین هستند (Esmaeili & Yazdanparast, 2004). گیاه توکریوم پولیوم اثرات ضد دیابت (Mirghazanfari et al., 2010)، آنتی اکسیدان (Ljubuncic et al., 2006) مشخص دارد. اثرات درمانی این گیاه عمدتاً وابسته به فلاونوئیدهای موجود در آن است. فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه ای با یک ساختار پلی فنلی با وزن مولکولی کم هستند که به طور گسترده در میوه‌ها، سبزیجات و نوشیدنی‌ها یافت می‌شود. آنها دارای اثرات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی مناسب و متفاوت در ارتباط با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، بیماری آلزایمر و غیره هستند (Ovando et al., 2009). مطابق مطالعات، فلاونوئیدها اثرات ضد آلرژی، ضد ویروسی، گشادکننده عروق، و خاصیت آنتی اکسیدانی (Srivastava & Bezwada, 2015) از خود نشان می‌دهند.

مواد و روش‌ها

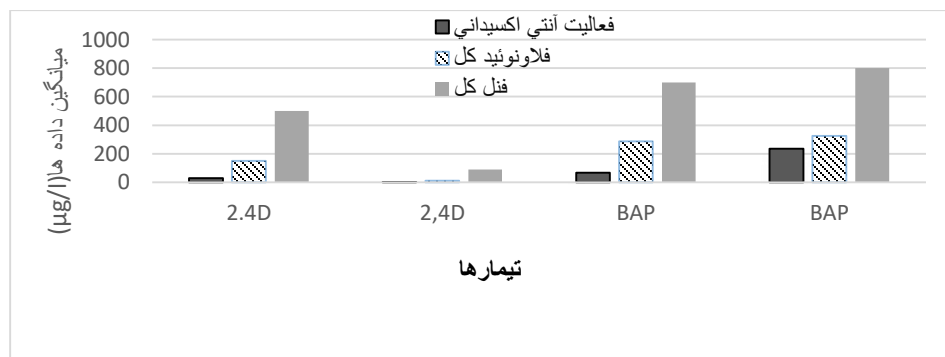
در این مطالعه تجربی از گیاهی استفاده شد که در دانشگاه فردوسی مشهد از بذر بدست آمده بود. دانه رُست‌ها در محیط کشت هوگلند و اتاق رشد در دمای 25°C برای چندین سال متوالی رشد کرده بودند. بنابراین، آنها مشابه گیاهان طبیعی کاملاً تمایز یافته بودند. از ساقه و برگ این گیاه برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. ابتدا محیط کشت‌های MS که حاوی هورمون‌های 2,4D با غلظت ۰/۵ mg/l و یا BAP با غلظت ۱/۵ mg/l تهیه شد. ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ و به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریدریک ۰/۵٪ استریل شدند. انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت در شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام شد. نمونه‌ها به اتاق رشد در تاریکی مطلق در دمای 25°C برای یک ماه نگهداری شدند. سپس، کالوس‌های حاصل درون محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (0, 100, 200, 300 μg/l) واکشت شدند و به مدت یک ماه در شرایط تاریکی در دمای 25°C نگهداری گردیدند. در نهایت، کالوس‌ها وزن و با اتانول ۷۰٪ عصارگیری شدند. از طریق روش فولین-سیوکالچو مقدار فنل کل، روش کلریمتری آلومینیم کلراید مقدار فلاونوئید و روش FRAP میزان فعالیت آنتی اکسیدانی هر عصاره محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

براساس مطالعات انجام شده تشکیل کالوس به نوع گونه گیاهی، مرحله نمو، سن گیاه مادری، و نوع ریز نمونه بستگی دارد (Abrishamchi, 2011). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از مکانیسم‌های گوناگونی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها و آنتوسیانین استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانی دارند و گونه‌های فعال اکسیژن از بین می‌برند (Ali et al., 2006).

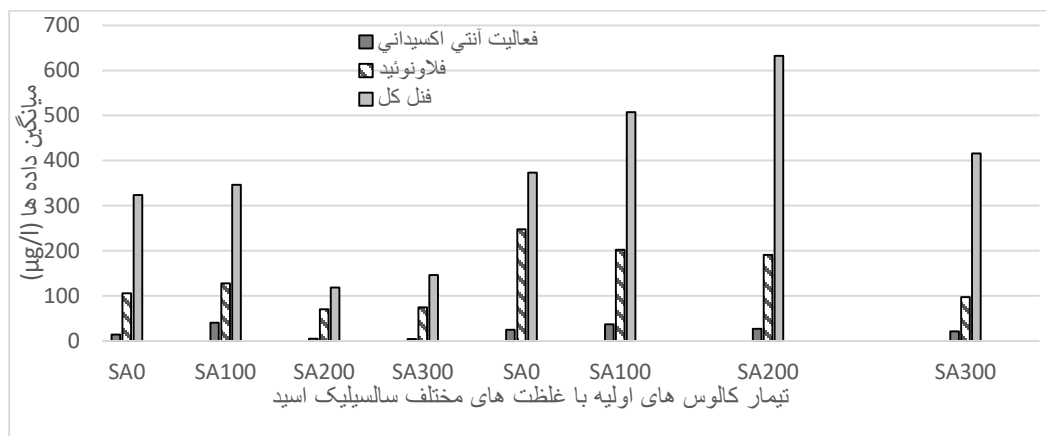
7th Iranian Conference of Plant Physiology
1-2 September 2021, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

افزایش متابولیت‌های ثانویه در تیمار با اسیدسالیسیلیک در بررسی‌های سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Kumar et al., 2013). بیشترین کالوس‌های تولیدی در تحقیق حاضر به رنگ قهوه‌ای تا سبز بوده که این نتیجه با تحقیقات مالیک و همکاران (Malik et al., 2007) مطابقت داشت. رنگدانه‌های فتوستتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئید در مجموعه فتوستتزی نقش دارند و شاخصی مهم برای رشد گیاه معرفی شده‌اند. سالیسیلیک اسید در غلظت‌های کم با مهار تجزیه کلروفیل این رنگدانه را در گیاه افزایش می‌دهد (Belkhadi et al., 2010). مطالعات Roa و همکارانش (۱۹۹۷) در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) و آراییدوبسیس در غلظت-های سمی سالیسیلیک اسید، کاهش کلروفیل را نشان داد (Rao, Patil and Kaviraj, 2005). نتایج این تحقیق نشان داد هر دو هورمون 2,4D و BAP جهت تحریک تولید کالوس مناسب هستند. مقایسه آنالیزهای انجام شده بر کالوس‌ها نشان داد بیشترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های تحت تیمار BAP مشاهده شد (شکل ۱). اگر چه وزن و اندازه کالوس‌ها در تیمار 2,4D بیشتر از تیمار BAP بود. محققین نشان دادند که تیمار گیاهان کشت شده با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش فلاونوئیدها و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خام گیاهی می‌شود. بنابراین، کالوس‌های حاصل از بخش اول تحقیق در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید واکنش گردیدند. شکل ۲ نشان می‌دهد که کالوس‌های حاصل از ساقه توکریوم پولیوم از محیط 2,4D هنگامی که در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک کشت شدند، تغییرات زیادی را در پارامترهای مورد بررسی نشان دادند. غلظت‌های بالاتر اسید سالیسیلیک اسید اثر مهمی بر پارامترهای مورد نظر نداشت.



شکل ۱: مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس حاصل از ساقه و برگ توکریوم پولیوم در تیمارهای 2,4D و BAP

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



شکل ۲: نتایج حاصل از تیمار ثانویه کالوس ها با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید. چهار هیستوگرام سمت چپ مربوط به کالوس های تیمار اولیه با 2,4D و چهار تای سمت راست مربوط به تیمار BAP هستند. در شکل SA مخفف سالیسیلیک اسید است.

نتیجه گیری

مطالعه کالوس های حاصل از ریزنمونه های ساقه تحت تیمار BAP بعد از قرار گرفتن در معرض تیمار با سالیسیلیک اسید نشان داد که نسبت با همتاهاى خود که تحت تیمار اولیه 2,4D بودند مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری را از خود نشان می دهند. همچنین غلظت سالیسیلیک اسید در غلظت بالا نسبت به غلظت های پایین تر رشد معنی داری نداشته است. لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر، تیمارها در شرایط تاریکی مطلق مطالعه شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از کار تحقیقاتی مربوط به پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی مصوب دانشگاه گلستان است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گلستان به دلیل همکاری در تامین منابع مالی پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

Reference

- Abrishamchi , P. (2011).** Callus Induction and Plant Regeneration from Meristem Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Quarterly Journal of Science Kharazmi University 10(4): 1011-1032. (Persian)
- Ali , M. B., Khatun , S., Hahn , E. J. & Paek, K. Y. (2006).** Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in Phalaenopsis orchid and their influence on plant acclimatization at different levels of photosynthetic photon flux. Plant Growth Regulation 49: 137-146.
- Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, Z., Barhoumi, M., Zarrouk, W., Chaibi, W. & Djebali, W. (2010).** Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1004- 1011.
- Esmaeili , A. & Amiri , H. (2008).** [Effects of antimicrobial and identification of composition of essential oil of *Teucrium polium*]. J Isfahan Univ.31(2): 15-22 (Persian).
- Esmaeili, M.A. & Yazdanparast , R. (2004).** Hypoglycemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets, J Ethnopharmacol. 95(1):27-30 (Persian).
- Kumar , D., Mishra , D. S., Chakraborty , B. & Kumar, P. (2013).** Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. Journal of Food Science and Technology 50: 797 -802 .

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

- Ljubuncic, P., Dakwar, S., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H. & Bomzon, A. (2006). Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in vitro, *Evid Based Complement Alternat Med*;3(3):329-38
- Malik, M., Zia, R. & Chaudhary, F. (2007). In vitro plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Momordica charantia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(22): 4118- 4122
- Mirghazanfari, S.M., Keshavarz, M., Nabavizadeh, F., Soltani, N. & Kamalinejad, M. (2010). The effect of "*Teucrium polium* L." extracts on insulin release from in situ isolated perfused rat pancreas in a newly modified isolation method: the role of Ca^{2+} and K^{+} channels, *Iran Biomed* ;14(4):178-85[Persian].
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P. & Watkins, C. B. (1997). Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2 -metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H_2O_2). *Plant Physiology* 115: 137-149.
- Srivastava, N. & Bezwada, R. (2015). *Flavonoids: The Health Boosters*. White Paper. Hillsborough, NJ: Indofine Chemical Company.

The effect of salicylic acid on secondary metabolite contents in Callus culture of *Teucrium polium* L.

Parvin Azad Tupkanlu¹, Manijeh Mianabadi², Ali Ganjali³

¹Master of Science, Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Golestan, Iran. (Pariazad6448@gmail.com)

²Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Golestan, Iran

³Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract:

Teucrium polium belongs to *Lamiaceae* family, is a herb that has anti-diabetic, anti-spasmodic and antioxidant effects. This plant is rich in secondary metabolites. Various studies have reported flavonoids are effective secondary metabolites of *Teucrium polium*, which can be increased in other plant callus culture. Therefore, different concentrations of salicylic acid were used to study the changes in phenol content, flavonoid content and antioxidant activity of its calli. In this experimental study, leaves and stems of *Teucrium polium* were used to prepare explants. Explants were cultured in MS medium under 2,4-D treatment at a concentration of 0.5 mg / l or BAP at a concentration of 1.5 mg / l in the dark for one month at 25 ° C. The calli were then cultured in MS medium containing different concentrations of salicylic acid (0, 100, 200, 300 µg / l) in the dark at 25 ° C. Finally, total phenol, total flavonoids and antioxidant activity of calli were studied by folin-ciocalteu, aluminum chloride colorimetric and FRAP methods, respectively. The results showed, the content of total phenol, total flavonoids and antioxidant activity of callus under salicylic acid treatments did not increase significantly compared to the initial calluses that treated with 2,4-D and BAP. However, calluses treated with BAP showed a significant increase in the above parameters compared to those treated with 2,4-D, of course, after treatment with salicylic acid.

Keywords: *Teucrium polium*, Secondary metabolites, Flavonoids, Salicylic acid