القای کالوس و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی (*Salvia sahendica*) برای تولید تری‌ترپنوئیدهای دارویی بتولینیک، اولئانولیک و اورسولیک اسید

Callus Induction and Cell Suspension Culture Establishment of *Salvia sahendica* for the Production of Medicinal Triterpenoids Betulinic, Oleanolic and Ursolic Acid

احد هدایتی[۱]، محمدحسین میرجلیلی[۲*] و زیبا بختیار[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۲۸

چکیده

بتولینیک، اولئانولیک و اورسولیک اسید، تری‌ترپنوئیدهای باارزشی هستند که اثرات دارویی متعددی ازجمله ضدتومور، ضدمیکروب، ضدالتهاب و ضدویروس ایدز برای آن‌ها گزارش شده است. گیاه مریم‌گلی سهندی یک گیاه انحصاری و چندساله جنس مریم‌گلی است که در مناطق محدودی از شمال‌غرب ایران رویش دارد. در این تحقیق القای کالوس و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه برای تولید این تری‌ترپنوئیدها مطالعه شده است. از ریزنمونه‌های برگِ دانهال‌های درون شیشه‌ای برای القای کالوس بر روی محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به‌همراه غلظت‌های مختلف توفوردی (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با بنزیل آدنین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل کامل تصادفی استفاده شد. بیش‌ترین درصد القای کالوس (۱۰۰٪) در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌دست آمد. مطالعه الگوی رشد سلولی نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن تر (۱۳/۲ گرم) و خشک (۲/۲ گرم) در هفته چهارم به‌دست آمده و بعد از آن رشد سلول‌ها کاهش یافت. ارزیابی الگوی تولید تری ترپنوئیدها (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) نیز حاکی از بیش‌ترین میزان تولید اورسولیک اسید (۱۷۳/۸۱)، بتولینیک اسید (۱۶۲/۲) و اولئانولیک اسید (۱۷۴/۳۲) در هفته سوم بود. نتایج نشان داد که میزان تولید بتولینیک و اورسولیک اسید در هفته سوم کشت به‌ترتیب ۱۰/۴ و ۱/۵ برابر بیشتر از مقدار آن‌ها در گیاه وحشی است. این نتایج می‌تواند برای تولید انبوه این ترکیبات دارویی مهم در شرایط کنترل شده به‌ویژه بیوراکتور مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: نعناعیان، کشت بافت، کشت سلول، متابولیت ثانویه، تری‌ترپن‌های اسیدی

۱، ۳ و ۲. به‌ترتیب دانشجویان کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

*: نویسنده مسوول Email: m-mirjalili@sbu.ac.ir

مقدمه

نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی با پراکنش جهانی است که در حدود ۲۰۰ جنس و ۵۰۰۰ گونه گیاهی علفی معطر و درختچه‌ای کوتاه را شامل می‌شود هِج (Hedge, 1982). معمولاً گیاهان این تیره به‌واسطه داشتن اسانس از بوی مطبوع و گاهی تند برخوردارند. در اندام‌های مختلف آن‌ها بندرت مواد تلخ، پلی‌فنول و تانن مشاهده می‌شود و کاملاً فاقد آلکالوئید هستند *لاری یزدی* و همکاران، (Lari Yazdi *et al.*, 2005). جنس مریم‌گلی (*Salvia*) یکی از جنس‌های بزرگ این تیره است که شامل ۷۰۰ تا ۹۰۰ گونه در سراسر جهان می‌باشد. در ایران ۵۷ گونه از این جنس شناسایی شده است که ۱۷ گونه آن (۲۹ درصد) بومی هستند *کروتئو*؛ هِج؛ *هی وود* (Croteau, 1981; Hedge, 1982; Hey Wood, 1978). مریم‌گلی سهندی (*Salvia sahendica* Boiss. Buhse) یکی از گونه‌های انحصاری (Endemic) جنس مریم‌گلی است که در مناطق محدودی از شمال غرب ایران ازجمله تبریز، میانه، شیبلی (بستان‌آباد)، باسمنج و کندوان رویش دارد *قهرمان* (Ghahraman, 2008) و توسط مردم بومی این مناطق جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، قارچی و رفع سوء هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرد *لطفی‌پور* و همکاران (Lotfipour *et al.*, 2007). *صالحی* و همکاران (Salehi *et al.*, 2005) طی مطالعه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی اسانس و عصاره این گیاه را بررسی کرده و نشان دادند که عصاره گیاه در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از خاصیت ضدباکتریایی خوبی برخوردار است.

امروزه از گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع عمده برای تولید متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites) استفاده می‌شود به‌طوری‌که برداشت بی‌رویه آن‌ها از رویشگاه‌های طبیعی جهت استحصال این ترکیبات دارویی سبب شده برخی از این گیاهان در معرض انقراض قرار گیرند و به همین دلیل علاوه‌بر کاهش جمعیت این گیاهان، فراورده‌های دارویی آن‌ها نیز اغلب خیلی گران هستند *حسنلو* و همکاران (Hasanloo *et al.*, 2008). یکی از موارد استفاده از فن‌آوری کشت بافت گیاهی در کشاورزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است *رضانژاد* و *طراحی* (Rezanejad and Tarrahi, 2013). تاکنون مطالعات بسیاری بر روی تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سلول‌های گیاهی انجام شده است. *آذرمهر* و همکاران؛ *شیرازی* و همکاران (Azarmehr *et al.*, 2014; Shirazi *et al.*, 2014). در سال‌های اخیر تولید این فرآورده‌ها از طریق کشت بافت، اندام و سلول‌های گیاهی به‌صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت‌های کنترل شده درآمده است؛ به‌طوری‌که در بعضی موارد میزان تولید متابولیت‌های ثانویه موجود در کشت‌های سلول و بافت‌های گیاهی بیشتر از میزان آن در گیاه وحشی است و یا برخی متابولیت‌های ثانویه تولید شده در کشت سلول‌های گیاهی در خود گیاه مادری تولید نمی‌شوند *مِویس* و همکاران؛ *ژیائو* و همکاران (Mevis *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2005).

بتولینیک اسید (Betulinic acid)، اولئانولیک اسید (Oleanolic acid) و اورسولیک اسید (Ursolic acid) از انواع تری‌ترپنوئیدهای پنج حلقوی هستند که اثرات متعدد درمانی ازجمله ضدتومور، ضدمالاریا، ضدمیکروب، ضدالتهاب، ضدویروس ایدز، پایین‌آورنده قند و چربی خون و محافظت‌کننده کبد برای آن‌ها گزارش شده است. این ترکیبات در برگ، گل و میوه گیاهان تیره بُداغ (Caprifoliaceae)، پنجه گرگیان (Lycopodiaceae)، فرفیون (Euphorbiaceae)، گلسرخیان (Rosaceae)، شاه‌پسند (Verbenaceae) و نعناعیان وجود دارد چن و همکاران؛ جی، *کازاکووا* و همکاران؛ *کریستیانا* و همکاران (Chen *et al.*, 2009; Jie, 1995; Kazakova *et al.*, 2010; Krystyna *et al.*, 2010). گیاهان دارویی متعلق به تیره نعنا از مهم‌ترین منابع گیاهی حاوی این ترکیبات می‌باشند و تاکنون مقدار آنها در گونه‌های ریحان (*Ocimum* sp.)، دُم شیر (*Leonurus cardiac*)، اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*) مرزه زمستانه (*Satureja montana*) و آویشن ایرانی (*Thymus persicus*) از این تیره گزارش شده است *علی* و همکاران؛ *بختیار* و همکاران؛ *روزبورشِک* و همکاران (Ali *et al.*, 2007; Bakhtiar *et al.*, 2014; Razboršek *et al.*, 2008). در گونه‌های مریم گلی باغی (*S. officinalis*)، مریم‌گلی کبیر (*S. sclarea*) و مریم‌گلی جنگلی (*S. glutinosa*) نیز این ترکیبات وجود دارند *سانتوز گومز* و همکاران؛ *تان* و همکاران (Santos Gomes *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002). مرور منابع علمی نشان داد که برای تولید این ترکیبات با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت و سلول‌های گیاهی نیز تلاش‌هایی صورت گرفته است. تجمع اورسولیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی *Ancaria tomentosa* بررسی و گزارش شده است به‌طوری‌که با تغییر ویژگی‌های رشد و بوسیله فراهم کردن ساکارز و انگیزش بوسیله جاسمونیک اسید، عصاره مخمر و پکتین مرکبات تجمع این ترکیب در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه افزایش یافته است *فریا-رومِرو* و همکاران (Feria-Romero *et al.*, 2005). در مطالعه¬ای که بر روی کشت درون شیشه¬ای شاهپسند درختچه¬ای (*Lantana camara*) انجام شده است، عصاره تهیه شده از کالوس با استاندارد مشخص اورسولیک اسید مقایسه و میزان ترکیب اورسولیک اسید با سه روش لایه نازک کروماتوگرافی و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، طیف‌سنجی جرمی بررسی شده و گزارش شد که میزان اورسولیک اسید در عصاره کالوس گیاه، بیشتر از مقدار آن در

عصاره تهیه شده از برگ‌های گیاهان مزرعه¬ای است *سریواستاوا* و همکاران (Srivastava *et al.*, 2010). در مطالعه¬ای دیگر بر روی همین گونه، میزان اورسولیک اسید در روش کروماتوگرافی مایع تحت فشار بالا، در هر گرم وزن خشک محاسبه و ذکر کردند که کشت سلولی، منشاِ پایداری از ترکیباتِ مهم دارویی، در مقدار بالا، در طول سال است. به‌علاوه تشکیل لاین‌های سلولی در کشت درون شیشه‌ای برای تولید اورسولیک اسید در این گیاه را توجیه‌پذیر دانستند. *سریواستاوا* و *چاتوروِدی* (Srivastava and Chaturvedi, 2010). تولید اورسولیک اسید و اولئانولیک اسید در کشت سلول *Hedyotis corymbosa* نیز مطالعه و گزارش شده است. *نوریزاه* و همکاران (Norrizah *et al.*, 2012). مطالعه بر روی کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی باغی برای تولید اورسولیک اسید، محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (MS) به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، بهترین محیط جهت القای کالوس و سرعت رشد آن معرفی شد. بعد از انتقال کالوس در محیط سوسپانسیون با همان نوع ترکیبات، محتوای اورسولیک اسید پس از ۳۴ روز به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و طیف‌سنجی جرمی محاسبه شد و تجمع اورسولیک اسید در کالوس‌ها ۳۹۲ میکروگرم در گرم وزن خشک گزارش گردید. *بولتا* و همکاران (Bolta *et al.*, 2014). با توجه به اهمیت دارویی این تری-ترپن‌های اسیدی و هم‌چنین وجود مقدار قابل‌توجه آن‌ها در جنس مریم‌گلی، در تحقیق حاضر برای اولین بار ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی برای تولید این ترکیبات دارویی با ارزش مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان گامی مؤثر جهت تولید نیمه‌صنعتی این ترکیبات ضدسرطان مورد توجه قرار گرفته و زمینه‌ساز تولید این ترکیبات در بیوراکتورها باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

نمک‌های محیط‌کشت، ویتامین‌ها، ساکارز، آگار، تنظیم‌کننده‌های رشد، متانول و اسید فسفریک با خلوص کروماتوگرافی و استانداردهای بتولینیک، اولئانولیک و اورسولیک اسید از شرکت‌های مِرک آلمان و سیگما-آلدریچ آمریکا خریداری و تهیه شد. از آب با درجه خلوص کروماتوگرافی برای آنالیز استفاده گردید.

جمع‌آوری بذر و نمونه گیاهی

نمونه بذر و اندام هوایی مریم‌گلی سهندی در اواخر تیرماه سال ۱۳۹۱ از گیاهان رویش یافته (شکل ۱A) در دامنه‌های کوه سهند، منطقه کندوان در استان آذربایجان شرقی (طول شرقی´۱۱ °۴۶ و عرض شمالی ´۵۲ °۳۷ با ارتفاع ۱۸۱۳متر) جمع‌آوری گردید. نمونه هرباریومی این گونه در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی شناسایی، تأیید و با کد ۱۹۹۱ ثبت شده است. اندام هوایی گیاه در شرایط سایه و دمای اتاق خشک و به‌همراه بذر برای آزمایشات به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

کشت بذر و تولید گیاهچه‌های استریل درون شیشه‌ای

در ابتدا بذور به‌مدت ۲۴ ساعت جهت از بین رفتن مواد موسیلاژی تحت شستشو با آب جاری قرار گرفتند و سپس طی سه مرحله در زیر هود میکروبیولوژی کلاس ۲ (فرپژوه، تهران) با مواد ضدعفونی‌کننده تیمار شدند. در مرحله اول، بذور به‌مدت۱ دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفته سپس به‌مدت ۲ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله دوم، به‌مدت ۸ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به‌همراه چند قطره توین ۸۰ (جهت کاهش کشش سطحی) ضدعفونی شده و در مرحله آخر سه بار به‌مدت ۲، ۵ و ۷ دقیقه با آب مقطر استریل ششتشو داده شدند. بذور ضدعفونی شده در محیط‌کشت MS *موراشیک* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) کشت شده و در محیط تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۸ تا ۱۰ روز بذور جوانه زده (شکل ۱B) و گیاهچه‌های یک ماهه (شکل ۱C) نگهداری شده در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی برای تهیه ریزنمونه و القای کالوس استفاده شدند.

القای کالوس

برای این منظور ریزنمونه‌های برگ (شکل ۱D) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بر روی محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف توفوردی (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار و در تاریکی مطلق قرار داده شدند. محیط MS فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این مرحله درصد کالوس‌زایی، مشخصات ظاهری کالوس (رنگ و تردی) و شاخص رشد آن ۵ هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها انجام شد. واکشت کالوس‌ها نیز به‌علت تجمع مواد فنلی در محیط‌کشت و هم‌چنین به‌دلیل کاهش مواد غذایی، خشک شدن محیط‌کشت جامد و کم شدن نرخ رشد، هر ۵ هفته یک بار بر روی محیط‌کشت تازه انجام گرفت. در طی واکشت‌های متوالی قطعات بسیار ریز کالوس که ظاهری سالم داشتند (شکل ۱E) در کنار هم به‌صورت متراکم

قرار گرفتند. *بختیار* و همکاران (Bakhtiar *et al.*, 2012). پس از گذشت ۵ هفته از زمان شروع تیمار، کالوس‌هایی که در ابتدا وزن شده بودند مجدداً توزین شدند؛ با کم کردن وزن اولیه، وزن تر کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. میزان رشد نسبی کالوس (RGR) طبق فرمول زیر به‌دست آمد *لوخانده* و همکاران (Lokhande *et al.*, 2014):

وزن اولیه/ (وزن اولیه – وزن نهایی) = سرعت رشد نسبی کالوس ×۱۰۰

$$RGR\% = (Wf - Wi) / Wi \times 100\%$$

ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی

از کالوس‌های با سن دو ماه (شکل ۱F) برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی (شکل ۱ G) و هم‌چنین ارزیابی الگوی رشد سلول‌ها استفاده شد. به این ترتیب حدود ۲/۵ گرم کالوس نرم برای کشت به ارلن‌های با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت بهینه شده (بهترین محیط‌کشت از نظر تولید وزن تر در مرحله کال‌زایی) بدون آگار منتقل شد. کشت‌های سوسپانسیون درون شیکر (Adolf Kuhner AG, Switzerland) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای مطالعه الگوی رشد سلول و الگوی تولید تری ترپنوئیدها، یک دوره کشت ۶ هفته‌ای انجام گرفت و در هر هفته، سلول‌ها برداشت شده و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری و منحنی رشد آن رسم شد. سلول‌های جمع‌آوری شده جهت اندازه‌گیری میزان تری‌ترپنوئیدها رطوبت‌گیری و در دستگاه خشک‌کن انجمادی (Lyophilizer, CHRiST, Germany) خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن خشک تا زمان آنالیز فیتوشیمیایی درون دسیکاتور نگهداری شدند.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها (Cell viability)

برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan blue) استفاده شد *استووارد* و همکاران (Stward *et al.*, 1999). برای این منظور، محلول رنگ‌آمیزی مذکور در ۰/۴ درصد وزنی حجمی تریپان بلو در بافر فسفات (Phosphate-buffered saline) تهیه و سپس، حجم مساوی از سلول‌ها با محلول رنگ، به مدت ۵ دقیقه تیمار و درون دستگاه شمارش‌کننده سلول (Haemocytometer) در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد، رنگ به علت آسیب دیدن دیواره‌ی سلولی و غشاء سلول‌های مرده به داخل آن‌ها نفوذ کرده و به رنگ آبی دیده می‌شوند و سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. هر یک میلی‌مترمربع بایستی تعداد سلولی بین ۳۰ تا ۲۰۰ عدد داشته باشد تا نتیجه‌ای دقیق به‌دست آید.

سلول‌های زنده (کاملاً واضح، یا کاملاً روشن) و سلول‌های مرده (آبی) در حداقل دو سطح ۲ میلی‌مترمربع شمارش شد (شکل ۱H). تعداد و درصد سلول‌های زنده و مرده طبق فرمول زیر مشخص شد:

ت ×پ × الف = غلظت سلول‌های زنده (هر میلی‌لیتر)

ت ×پ × ب = غلظت سلول‌های مرده (هر میلی‌لیتر)

الف: تعداد سلول‌های زنده شمارش شده، ب: تعداد سلول‌های مرده، پ: فاکتور رقّت (=۲)، ت فاکتور تصحیح است که از طرف کارخانه سازنده سلول شمار مشخص شده است (عددی که برای تبدیل ۰/۱ میلی‌مترمکعب به میلی‌لیتر مورد نیاز است و معمولاً $۱۰^۴$ می‌باشد).

درصد زنده‌مانی سلول‌ها بر طبق فرمول زیر محاسبه شد:

حجم × غلظت سلول‌های زنده = تعداد کل سلول‌های زنده

تعداد سلول‌های مرده × تعداد سلول‌های زنده =تعداد کل سلول‌ها

تعداد کل سلول‌ها/ (۱۰۰× تعداد سلول‌های زنده) =درصد زنده‌مانی سلول‌ها

استخراج عصاره و آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

مقدار ۱ گرم سلول خشک در داخل ظرف عصاره‌گیری ریخته شده و پس از افزودن ۴۰ میلی‌لیتر حلال متانول به‌مدت ۴۰ دقیقه تحت امواج مافوق صوت (Ultrasonic) قرار گرفت. در ادامه متانول تحت شرایط خلاء در دستگاه روتاری جدا شده و بر روی عصاره موجود مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳۰ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه و در قیف جداکننده (دکانتور) جداسازی انجام شد. فاز اتیل استات برداشت شده و پس از تبخیر حلال در دستگاه روتاری، عصاره باقیمانده در ۱۰ میلی‌لیتر متانول با خلوص HPLC حل شد. در ادامه با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرونی عصاره فیلتر شده و برای آنالیز استفاده شد. عصاره اندام هوایی خشک گیاه مادری نیز به‌همین صورت تهیه گردید. برای تعیین میزان تری‌ترپنوئیدها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (Knauer, Berline, Germany) با ستون Sunfire-RP-C18 column استفاده شد. فاز متحرک دستگاه شامل متانول/ آب اِچ پی اِل سی/ فسفریک اسید با نسبت حجمی ۸۷: ۱۲/۹۵: ۰/۰۵ بود. سرعت جریان حلال در ستون ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. محلول‌های استاندارد و عصاره‌های به‌دست آمده از اندام هوایی و سوسپانسیون سلولی گیاه برای تعیین میزان تری‌ترپنوئیدها به دستگاه تزریق گردید.

نتایج

القای کالوس

بهینه‌سازی شرایط القاء و تکثیر کالوس اولین مرحله در تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی از طریق کشت سوسپانسیون سلولی می‌باشد. در این تحقیق پس از تهیه گیاهچه استریل از ریزنمونه برگ جهت القای کالوس استفاده شد. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در القای کالوس در جدول ۱ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) بر روی محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌دست آمد. هم‌چنین کالوس‌های حاصل از این تیمار از نظر ظاهری ترد و سفید رنگ بوده و از شاخص رشد بیشتری نیز برخوردار بودند که برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی در نظر گرفته شدند. محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین نیز درصد کالوس‌زایی بالایی داشتند ولی به‌دلیل رشد کند کالوس و رنگ تیره آن مناسب کشت سوسپانسیون سلولی نبودند. هم‌چنین در محیط‌کشت شاهد که فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشدی بود هیچ‌گونه القای کالوسی انجام نشد. بررسی داده‌های مربوط به رشد نسبی کالوس نشان داد که به‌طور میانگین پس از ۵-۴ روز از کشت، میزان رشد کالوس به دوبرابر مقدار آن می‌رسد.

جدول ۱: نتایج القای کالوس از برگ مریم‌گلی سهندی بر روی محیط‌کشت اِم اِس همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد ۵ هفته بعد از کشت

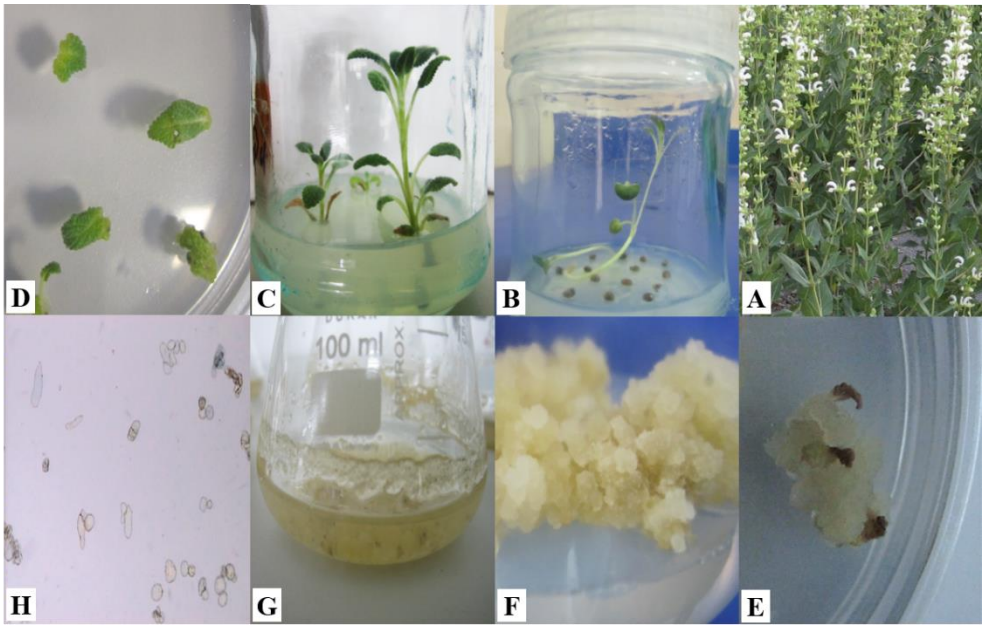
Table 1: The results of callus induction from the leaf of *Salvia sahendica* cultured on MS medium supplemented with different concentrations of plant growth regulators after five weeks

شکل کالوس Callus form	میزان رشد Growth rate	درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر) Plant growth regulators (mg/l)	
			بنزیل‌آدنین Benzyl adenine	توفوردی 2,4-D
Crispy and white	Medium growth	50	0.5	0.5
Crispy and white	Low growth	65	1	0.5
Hard and white	Medium growth	25	1.5	0.5
Crispy and white	Very high growth	100	0.5	1
Hard and very white	Low growth	75	1	1
Hard and dark brown	Very low growth	20	1.5	1
Crispy and dark brown	Low growth	95	0.5	1.5
Very hard and white	Medium growth	55	1	1.5
Hard and white	Very low growth	35	1.5	1.5
Friable and brown	High growth	30	0.5	2
Friable and dark brown	High growth	45	1	2
Crispy and brown	Low growth	10	1.5	2
-	-	0	0	0

جدول ۲: میزان تری‌ترپنوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی، کالوس و اندام هوایی مریم‌گلی سهندی

Table 2: Content of triterpenoids in wild aerial parts, callus and cell suspension culture of *Salvia sahendica*

ترکیبات Compounds	مقدار (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) Content (mg/100 dry weight)							
	هفته اول First week	هفته دوم Second week	هفته سوم Third week	هفته چهارم Forth week	هفته پنجم Fifth week	هفته ششم Sixth week	اندام هوایی (گیاه وحشی) Aerial parts (wild plant)	کالوس Callus
بتولینیک اسید Betulinic acid	5.01	2.78	162.20	1.57	1.36	0.93	15.5	17.28
اولئانولیک اسید Oleanolic acid	28.04	28.52	174.32	41.82	38.47	28.61	645.93	126.27
اورسولیک اسید Ursolic acid	39.05	33.72	173.81	45.65	44.58	32.21	112.92	121.59



شکل ۱: مراحل القای کالوس و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی: (A) گیاه مادری در رویشگاه طبیعی، (B) کشت درون شیشه‌ای بذر، (C) گیاهچه استقرار یافته برای تهیه ریزنمونه، (D) کشت ریزنمونه جهت القای کالوس، (E) کالوس‌زایی از برگ روی محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین، (F) رشد کالوس، (G) کشت سوسپانسیون سلولی و (H) مطالعه زنده‌مانی سلول‌ها

Fig. 1: Callus induction and establishment of cell suspension culture of *Salvia sahendica*: (A) Mother plant in the natural habitat, (B) *In vitro* seed germination, (C) Seedling establishment for explant preparation, (D) explant culture for callus induction, (E) Callogenesis from the plant leaf cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP, (F) growth of callus, (G) Cell suspension culture and (H) Cell viability studying

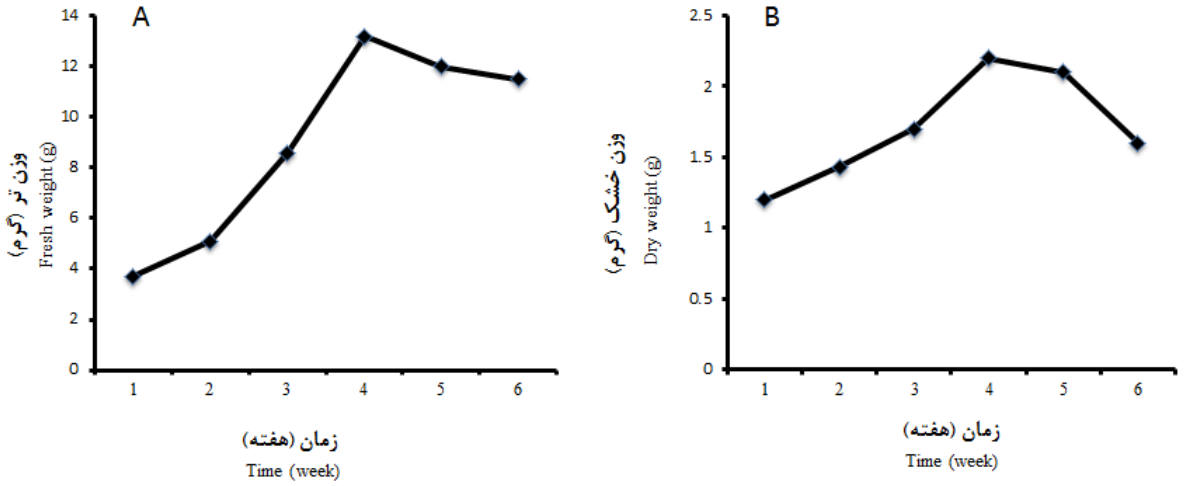
کشت سوسپانسیون سلولی، درصد زنده‌مانی و منحنی رشد

با توجه به رشد خوب کالوس در محیط‌کشت حاوی ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین، در کشت سوسپانسیون سلولی نیز از این ترکیب استفاده شد. زنده‌مانی سلول‌ها نیز بر اساس فرمول‌های موجود مورد ارزیابی قرار گرفت. با شمارش تعداد سلول‌های زنده (۲۳۰) و مرده (۲۰) و با احتساب فاکتور ترقیق (۲) و فاکتور تصحیح ($۱۰^۴$)، غلظت سلول‌های زنده در هر میلی‌لیتر $۴۶×۱۰^۵$ و درصد زنده‌مانی سلول‌ها ۹۲٪ به‌دست آمد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سلول‌های مورد مطالعه از الگوی رشد بالایی برای تولید بیوماس تا هفته چهارم برخوردار بوده و از هفته پنجم به بعد سلول‌ها با بروز علایمی نظیر قهوه‌ای شدن وارد فاز پیری شده و تولید بیوماس در آن‌ها متوقف می‌شود که دلیل این امر کاهش مواد غذایی موجود در محیط‌کشت می‌باشد. ارزیابی وزن تر و خشک سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن تر (۱۳/۲ گرم) و وزن خشک (۲/۲ گرم) در هفته چهارم بوده است (شکل ۲).

مقدار تری‌ترپنوئیدهای بتولینیک، اولئانولیک و اورسولیک اسید

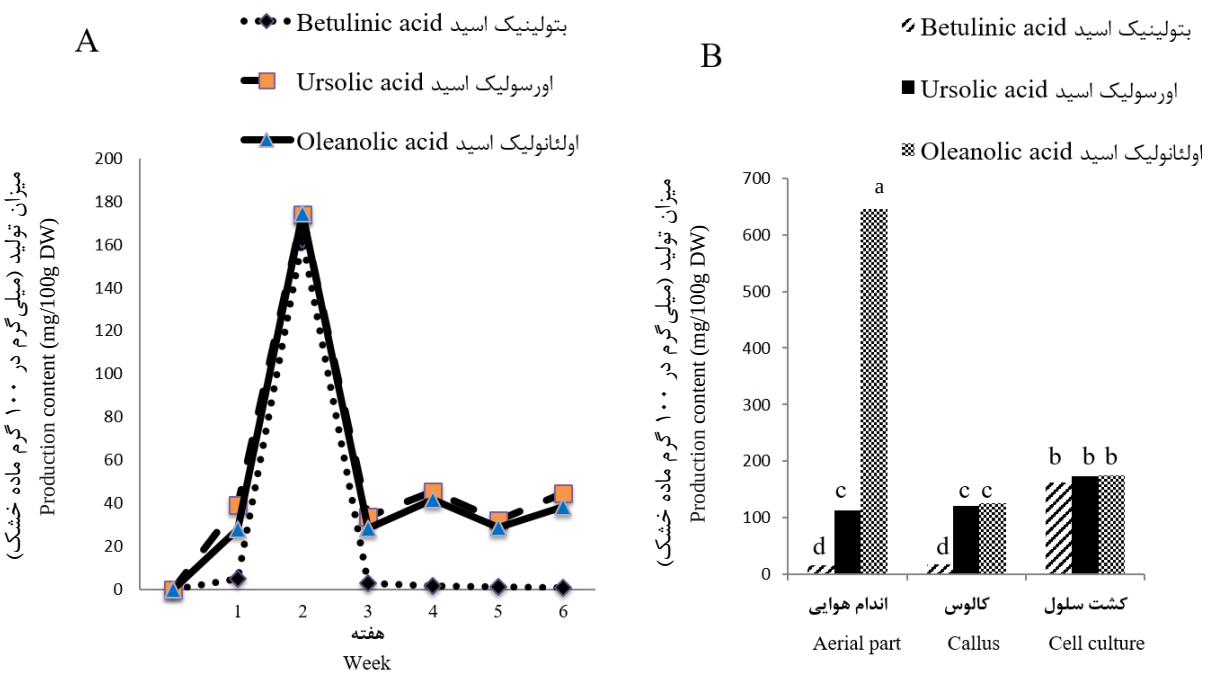
مقدار تری‌ترپنوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی بعد از شش هفته بررسی شد. نتایج حاصل از منحنی تولید تری‌ترپنوئیدها در طول دوره‌ی کشت در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین نشان داد که تولید و تجمع این ترکیبات در هفته اول کم بوده و در هفته سوم به بیش‌ترین حد خود رسیده و از هفته چهارم به بعد کاهش می‌یابد و این کاهش به‌علت محدود شدن شرایط تولید اعم از مواد غذایی و مقدار منبع کربن (قند) قابل‌توجیه است. میزان تری‌ترپنوئیدهای حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی در هفته‌های مختلف، کالوس و اندام هوایی مریم‌گلی سهندی در جدول ۲ آمده است. بر طبق این جدول بیش‌ترین میزان بتولینیک اسید (۱۶۲/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، اورسولیک اسید (۱۷۳/۸۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و اولئانولیک اسید (۱۷۴/۳۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) در هفته سوم به‌دست آمد.

منحنی تولید تری‌ترپنوئیدها هم نشان داد که تولید هر سه ترکیب دارویی از الگوی یکسانی برخوردار بوده و از هفته سوم به بعد سیر نزولی دارند (شکل ۳A). مقایسه میزان تولید این ترکیبات در کشت سوسپانسیون سلولی، کالوس و اندام هوایی نشان داد که میزان تولید بتولینیک و اورسولیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بیشتر از کالوس و اندام هوایی بوده و تنها در مورد اولئانولیک اسید مقدار آن در اندام هوایی بیشتر از کشت سوسپانسیونی و کالوس بود (شکل ۳B).



شکل ۲: منحنی رشد و تولید بیوماس در کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی براساس وزن تر (A) و وزن خشک (B)

Fig. 2: Growth curve and biomass production of *Salvia sahendica* cell suspension culture based on the fresh weight (A) and dry weight (B)



شکل ۳: الگوی تجمع و تولید تری‌ترپنوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی (A) و مقایسه تولید تری‌ترپنوئیدها در اندام‌هوایی، کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی (B)

Fig. 3: Production and accumulation patterns of triterpenoids in cell suspension culture (A) and comparison of triterpenoids production in the aerial part, callus and cell suspension culture of *Salvia sahendica* (B)

بحث

امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان دارویی با انواع روش‌های بسته و پیوسته صورت می‌گیرد. در سیستم‌های بسته، رشد و نمو سلول‌ها و هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه در تقابل با شرایط حاکم بر این سیستم اعم از مواد غذایی و پیش‌سازها قرار دارد که در طی دوره رشد با محدودیت روبه‌رو می‌شوند. رشد و نمو سلول‌ها در مراحل ابتدایی دوره کشت با سرعت بیشتری انجام گرفته و به‌تدریج با محدود شدن مواد غذایی محیط‌کشت، به فاز ثابت وارد می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز این موضوع را تأیید می‌کند چراکه سلول‌های کشت شده مریم‌گلی سهندی نیز در هفته چهارم وارد فاز ثابت شدند. درصورتی‌که هدف از القای کالوس در یک گیاه دارویی تولید و بهره‌برداری از متابولیت‌های ثانویه آن درون سیستم‌های کشت سوسپانسیون باشد، مطالعه منحنی تولید برای این سیستم بسیار ضروری است. نتایج حاصل از مطالعه الگوی رشد و تولید برای کشت‌های سوسپانسیون سلولی بهترین زمان برای بالاترین مقدار تولید را مشخص می‌نماید. *راماچاندرا* و *راویشانکار* (Ramachandra and Ravishankar, 2002). در بررسی کشت کالوس مشاهده شد که کالوس‌های ایجاد شده در محیط‌های کشت متفاوت دارای خصوصیات ظاهری و رشد متفاوت هستند. براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان به این نکته پی برد که نوع و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد در ایجاد، میزان رشد و فرم کالوس نقش به‌سزایی دارد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق پیش‌رو به‌خوبی این موضوع را تأیید می‌کند. یکی از راه‌کارهای افزایش تولید مواد مؤثره، افزایش بیوماس تولیدی از طریق بهینه‌سازی شرایط رشد است. میزان رشد و فرم کالوس به‌عنوان مواد اولیه کشت سوسپانسیون سلولی نقش مهمی در میزان تولید ترکیبات دارویی داشته و باید در انتخاب نوع کالوس دقت نمود که در این تحقیق ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین بهترین نوع کالوس را ایجاد کرد. مشابه همین نتایج در القای کالوس آویشن ایرانی توسط *بختیار* و همکاران (Bakhtiar *et al.*, 2016) به‌دست آمد. در تحقیقی که بر روی آویشن ایرانی انجام شده بود ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) به‌دست آمد و کالوس ایجاد شده نرم و ترد بوده و سرعت رشد زیادی داشت (*بختیار* و همکاران، 2016). *سانتوز گومز* و همکاران (2002) نیز گزارش کردند که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بیش‌ترین تأثیر بر القای کالوس *Salvia officinalis* را داشت. آن‌ها هم‌چنین گزارش شد که در سطوح پایین توفوردی بافت کالوس ترد، رنگ آن روشن و دارای بالاترین وزن است و غلظت‌های بالای توفوردی (بیشتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث ژلاتینی و قهوه‌ای شدن بافت کالوس

شده و وزن تر آن را کاهش می‌دهد. با توجه به این‌که کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌صورت کنترل شده بوده و کمتر دستخوش تغییرات محیطی ناخواسته می‌گردد، می‌توان با بهینه‌سازی شرایط موجود به روشی پایدار در تولید مواد دارویی ارزشمند دست یافت. کشت سوسپانسیون سلولی یکی از موارد کارآمد در بهره‌برداری از تکنیک تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش از گیاهان دارویی برای صنایع دارویی می‌باشد. با توسعه روش‌های کشت سلول و بافت‌های گیاهی، این تکنیک باعث تولید متابولیت‌های گیاهی در مقیاس انبوه در بیوراکتورها می‌شود *باقری* و *صفری* (Bagheri and Saffari, 2008). مطالعات گسترده‌ای برای افزایش راندمان تولید این ترکیبات در کشت‌های درون شیشه‌ای در گونه‌های مختلف گیاهی انجام گرفته است که می‌تواند برای ارتقای راندمان تولید در گونه مریم‌گلی سهندی نیز انجام شود. به‌عنوان مثال تغییرات شرایط تغذیه‌ای و استفاده از الیسیتورها ازجمله متیل جاسمونات، عصاره مخمر و پکتین مرکبات در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه برای کشت‌های درون شیشه‌ای بسیاری از گیاهان دارویی ارائه شده که با نتایج قابل توجهی همراه بوده است (*شیرازی* و همکاران، 2014). نتایج حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی مریم‌گلی سهندی نشان داد که بیش‌ترین میزان ماده تر و خشک در هفته چهارم به‌دست آمد و هم‌چنین بیش‌ترین میزان تری‌ترپنوئیدها در هفته سوم تولید شد و این نتایج در تأیید نتایج *بولتا* و همکاران (Bolta *et al.*, 2014) که بیش‌ترین میزان وزن تر و خشک در هفته سوم و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین به‌دست آوردند. مقایسه تولید این ترکیبات دارویی هم نشان داد که تولید بتولینیک و اورسولیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بیشتر از اندام هوایی و کالوس گیاه مریم‌گلی سهندی بوده و می‌تواند جایگزین خوبی برای تولید این ترکیبات باشد. *بختیار* (Bakhtiar, 2012) در مطالعه‌ای بر روی آویشن ایرانی گزارش کرد که بیش‌ترین میزان تولید اورسولیک اسید در هفته اول به‌میزان ۸۶۰ میکروگرم در گرم وزن خشک بوده و در هفته‌های بعدی میزان اورسولیک اسید به‌دلیل محدود شدن مواد غذایی و منبع کربن (قند) کاهش یافته است. ارزیابی میزان تری‌ترپنوئیدها در گیاهان رزماری، مریم‌گلی و مرزه نشان داد که میزان اورسولیک اسید بین ۰/۰۹-۰/۹ درصد ماده خشک، بتولینیک اسید ۰/۶ درصد ماده خشک و اولئانولیک اسید بین ۰/۰۹-۱/۶ درصد ماده خشک بود. *رازبورشک* و همکاران (Razboršek *et al.*, 2008). اگرچه تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و اندام در طیف وسیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است ولی در حال حاضر این روش فقط برای ترکیبات با ارزشِ افزوده بالا نظیر داروهای ضدسرطان (تاکسول، وینکریستین و وینبلاستین) به‌صورت صنعتی کاربرد دارد و تحقیق حاضر می‌تواند گامی در جهت تولید تری‌ترپنوئیدهای با ارزش دارویی در مقیاس وسیع در بیوراکتورها باشد البته این امر نیز مستلزم مطالعات فراوانی در آینده می‌باشد.

جمع‌بندی

مطالعه حاضر نشان داد که بیش‌ترین میزان القای کالوس (۱۰۰ درصد) در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌دست آمد و این ترکیب هورمونی برای کشت سوسپانسیون سلولی نیز ترکیب بهینه می‌باشد. مقایسه میزان تری‌ترپنوئیدها در گیاه، کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی نشان داد که تولید بتولونیک و اورسولیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بیشتر از کالوس و اندام هوایی بوده و در مورد اولئانولیک اسید مقدار آن در کالوس بیشتر از کشت سوسپانسیونی و اندام هوایی بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی بابت حمایت مالی و تأمین امکانات آزمایشگاهی و هم‌چنین آقای دکتر مهدی مریدی فریمانی و سرکارخانم فاطمه گودرزی بابت همکاری آن‌ها در آنالیزهای دستگاهی این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۹-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.