بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill)

فیروزه علیرضایی و خدیجه کیارستمی*

ایران، تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

اسطوخودوس گیاهی دارویی از خانواده نعناعیان است. این گیاه غنی از ترکیبات ثانوی با خاصیت آنتی اکسیدانی است و می‌تواند منبع مناسبی برای تهیه آنتی اکسیدانها در شرایط کشت درشیشه باشد. کشتهای سلولی گیاهان منابع بالقوه ای از متابولیتهای ثانوی با ارزش مانند ترکیبات آنتی اکسیدان، ترکیبات معطر و طعم دهنده هستند. این پژوهش با هدف بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در کشت سوسپانسیون سلولی انجام شده است. کشت سوسپانسیون سلولی اسطوخودوس در محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l NAA و۴ mg/l BAP پایدار و نگهداری شد. سالیسیلیک اسید در غلظتهای ۳، ۶، ۱۲ و ۱۸میلی‌گرم در لیتردر فاز سکون(۱۸ روز پس از کشت) به محیط کشت اضافه شد. ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، توده های سلولی برداشت شدند و محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها با استفاده از آزمونهای سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد یا DPPH، سنجش قدرت کاهشی یا RP و سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید یا SO بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل بیشترین مقدار ترکیبات فنولی (۲۳/۸۱۴ mg GA/gdw) و فلاونوئیدی(۴/۸۶۵ mg QE/gdw) در غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد، و همین تیمار، بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را بر اساس آزمونهای سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد (IC_{50}،معادل ۱۰۷ µg/ml)، سنجش قدرت کاهشی یا (۴/۸۶۵µM/ASA) و سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید (۷۴/۲۰۵ درصد) نشان داد. غلظت ۱۲ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید برای ۷۲ ساعت برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سنتز ترکیبات با فعالیت آنتی اکسیدانی مناسب تر بود.

واژه های کلیدی: اسطوخودوس، ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی، کشت سلولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۰۴۴۰۵۱، پست الکترونیکی: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

مقدمه

اسطوخودوس گیاهی دارویی از خانواده نعناعیان است که در طب سنتی موارد استفاده زیادی دارد. از گیاه اسطوخودوس در درمان بیماریهای مجاری ادرار، تنفسی، اضطراب، تشنج و افسردگی استفاده می شود (۱) همه بخشهای گیاه به خصوص برگ آن غنی از موادی با خاصیت آنتی اکسیدانی است. آنتی اکسیدانها در صنایع غذایی و دارویی کاربرد زیادی دارند از جمله از تغییرات مضر مواد غذایی در اثر اکسیداسیون و اثرات مضر تنشهای اکسیداتیو بر سلامت انسان جلوگیری می‌کنند(۶ ،۷ و۲۹). در بین ترکیبات آنتی اکسیدانی حاصل از گیاهان، ترکیبات فنولی حائز اهمیت زیادی هستند (۳۲و۳۸). ترکیبات فنولی از قبیل فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی با مکانیسمهای مختلف نظیر جلوگیری از تشکیل رادیکالهای آزاد به واسطه ویژگی کلات کنندگی فلز، فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد و اثر بر مسیرهای علامت دهی و بیان ژن، فعالیت آنتی اکسیدانی خود را نشان می دهند (۳۹و۴۳).

با توجه به اهمیت و کاربرد گیاهان حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی (۷)و همچنین مشکلات مربوط به زراعت این قبیل گیاهان از جمله مشکلات مربوط به رویش بذر ، کند بودن رشد گیاهان، نیاز به شرایط اقلیمی خاص برای تعدادی از گیاهان و کم بودن مقدار ترکیبات آنتی اکسیدانی در گیاه کامل تکنیکهای کشت بافت و سلول روش جایگزینی برای تولید متابولیتهای ثانوی و از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند (۲۹). به این طریق می توان به یک منبع دائمی از ترکیبات ثانوی دست یافت که تحت تأثیر تغییرات فصلی و آب و هوایی ، آفات و بیماریهای گیاهی قرار نمی گیرد و امکان کنترل شرایط تولید و دست ورزی ترکیبات نیز وجود دارد. روشهای زیست فناوری زیادی از قبیل غربالگری دودمانهای سلولی پرتولید، تغییر در ترکیب محیط کشت، استفاده از پیش ماده ها و الیسیتورها، کشت در مقیاس وسیع در بیورآکتور،کشت ریشه مویی ، غیر متحرک سازی سلول گیاهی و تراریختی زیستی برای افزایش تولید متابولیتهای ثانوی درگیاهان به کار گرفته شده اند (۸، ۹، ۱۰ و ۴۵). در بسیاری از موارد تولید متابولیتهای ثانوی با تیمار سلولهای تمایز یافته با الیسیتورهایی مانند متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فلزات سنگین افزایش می‌یابد (۱۳، ۳۷ و ۴۷).

از الیسیتورهای مختلف از قبیل سالیسیلیک اسیدسولفات مس، نیترات نقره، کلسیم کلراید، یون نقره، عصاره مخمر و الیسیتور قارچی برای افزایش مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در گیاهان استفاده شده است (۴۴،۲۵،۱۶ و ۴۹). استفاده از وانادیل سولفات در کشت سلولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula vera* مقدار رزمارینیک اسید را افزایش داد (۱۷).

سالیسیلیک اسید یک تنظیم کننده رشد گیاهی با ماهیت فنولی است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی از قبیل مقاومت در برابر پاتوژنها، تنش فلزات سنگین، ایجاد گرما در گل آذین شیپوری، القای گل دهی در برخی از گیاهان، کنترل جذب یون توسط ریشه و هدایت روزنه ای شرکت می کند و موجب بیان برخی از ژنهای تولید کننده متابولیتهای ثانوی از جمله آنزیمهای مسیر فنیل پروپانوئید می‌شود (۲،۲۱و۴۰).

بررسیها حاکی از اثر سالیسیلیک اسید بر بهبود و افزایش سنتز متابولیتهای ثانوی مختلف است؛ برای مثال، افزایش تجمع acteoside در کشت ریشه مویین رهمانیا (*Rehmannia glutinosa*) (۱۵). افزایش مقدار ایزوفلاونوئیدها در کشت سلولی گیاه تیریشه (*Pueraria tuberose*) (۲۰). افزایش محتوای ترکیبات فنولی در نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) (۴۲) و کاساوا (*Manihot esculenta*) (۱۴) و افزایش تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه مویین گیاه ریحان (*Ocium basilium*)(۲۹) گزارش شده است. گزارشهایی در رابطه با فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه اسطوخودوس و سنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی در کالوسهای حاصل از کشت برگ گیاه وجود دارد (۳ و۴) ولی تا کنون گزارشی از مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه و اثر سالیسیلیک اسید بر سنتز این ترکیبات دریافت نشده است. با توجه به نقش و اهمیت سالیسیلیک اسید بر تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید و زمان تأثیر آنها بر تولید ترکیباتی با خاصیت آنتی اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی در گیاه اسطوخودوس انجام شده است.

مواد و روشها

تهیه نمونه و کشت: گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angostifolia*) موجود در محوطه دانشگاه الزهرا (تهران، ده ونک) در مرحله قبل از گلدهی برداشت شد. برگهای ناحیه ۵ سانتیمتری راس گیاه اسطوخودوس به طور کامل از ساقه جدا شده و با آب جاری و سپس

آب مقطر استریل شسته شدند. قطعات برگ با استفاده از الکل ۷۰ درصد (به مدت۳ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (به مدت ۱۵ دقیقه) ضد عفونی و بعد ۳ بار با آب مقطر استریل شست و شو شدند.

نمونه ها در محیط کشت MS (۳۳) جامد حاوی NAA به میزان ۲ میلی گرم در لیتر و BAP به میزان ۴ میلی گرم در لیتر کشت شدند. (۳) و در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی گراد و با شدت نور ۴۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت کشت شدند. کالوسهای حاصل پس از یک ماه به محیط کشت MS مایع با همان تیمار انتقال یافتند. پس از رسیدن به فاز سکون (۱۸ روز پس از کشت) سالسیلیک اسید در غلظتهای ۳، ۶، ۱۲ و ۱۸ میلی گرم در لیتر به محیطهای کشت اضافه شد . محیطهای کشت روی شیکر افقی با سرعت ۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲±۲۳ درجه سانتی گراد و شدت نور ۴۰۰۰لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت قرار گرفتند و پس از ۴۸ و۷۲ ساعت، توده های سلولی برداشت شدند و پس از خشک شدن در دمای ۶۰ درجه جهت عصاره گیری و سنجشهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره گیری: ۰/۲گرم پودر خشک توده سلولی با ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد (حجمی–حجمی) سائیده شد و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ۷۰ درجه قرار گرفت. عصاره ها پس از صاف شدن با کاغذ صافی تا انجام سنجشهای مورد نظر در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفتند (۱۲).

سنجش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: برای سنجش ترکیبات فنولی، به ۰/۲ میلی لیتر عصاره گیاهی ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۲ میلی لیتر معرف فولن – سیوکالتو و ۳ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه شد و بعد از ۹۰ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر در دمای اتاق خوانده شد. مقدار ترکیبات فنولی موجود در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه گردید. (۲۸).

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره ها با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم در طول موج ۴۱۴ نانومتر انجام شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر عصاره متانلی با ۰/۲ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط شد، سپس۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به مخلوط اضافه شد و با اتانول۹۰ درصد به حجم ۵ میلی لیتر رسید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ۴۱۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL9000SERIES ENGLAND) خوانده شد. مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی با استنفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید(۲۷).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی (سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد با ۲و۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH): عصاره های متانلی تا خشک شدن کامل تبخیر شدند. غلظتهای ۰/۰۱ تا ۰/۱۵ میلی گرم از عصاره خشک شده با متانل مطلق به حجم ۱ میلی لیتر رسید و با ۱ میلی لیتر DPPH (۰/۰۰۰۴ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر متانل مطلق) مخلوط شد و حجم آن با متانل مطلق به ۳ میلی لیتر رسید. پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری نمونه در مقابل شاهد (۱ میلی لیتر DPPH و ۲ میلی لیتر متانل) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهار رادیکال آزاد (IC%) توسط عصاره گیاهی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد :

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد (IC\%)} = (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$$

در این فرمول A_{blank} جذب کنترل و A_{sample} جذب محلول حاوی نمونه گیاهی می باشد (۳۱).

سنجش قدرت کاهشی یا Reducing power(RP): برای سنجش قدرت کاهشی، ۰/۲ میلی لیتر عصاره با ۰/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲ مولار (PH=۶/۶) و ۰/۵ میلی لیتر از پتاسیم فری سیانیدین ۱ درصد مخلوط و در دمای ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از خنک

شدن، ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (W/V) اضافه و سپس در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در 1000g سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رو شناور، ۰/۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد (W/V) اضافه و جذب نوری آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد.

قدرت کاهشی به صورت میکرومول آسکوربیک اسید معادل گرم خالص وزن تر بیان شد. برای رسم منحنی استاندارد از آسکوربیک اسید در دامنه ۰ تا ۱۰۰میکرو مولار استفاده شد (۳۵).

سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید: ۹ میلی لیتر بافر تریس- HCl (۵۰ میلی مولار و ۸/۲ =pH) در لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار گرفت. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگالل (۴۵ میلی مولار پیروگالل در HCl ۱۰ میلی مولار) به آن افزوده و بعد از ۳ دقیقه ، یک قطره آسکوربیک اسید ۵ درصد (W/v) محلول در آب اضافه شد.. بعد از ۵ دقیقه جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده و به عنوان A_0 در نظر گرفته شد.. جذب نمونه حاوی µL ۵۰ عصاره گیاهی به عنوانA_1 در نظر گرفته شد . برای نمونه شاهد (A_2) به جای عصاره آب مقطر ریخته شد. درصد جاروب کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴):

$[A_0-(A_1-A_2)/A_0] \times 100$ = درصد جاروب کنندگی رادیکال آزاد

آنالیز های آماری: آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شدند. آنالیز واریانس یک طرفه با نرم افزار SPSS 18 انجام و میانگینها با آزمون دانکن و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: افزودن سالسیلیک اسید پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب افزایش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در تیمار ۱۲میلی گرم در لیترسالسیلیک اسید به مدت ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۲۳/۸۱۴ mgGA/gdw و ۴/۸۶۵ mgQE/gdw مشاهده شد (جدول ۱). در این تیمار ترکیبات فنولی حدود ۳/۵ برابر و ترکیبات فلاونوئیدی حدود ۳ برابر نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت افزایش داشتند. در حالی که افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به نمونه های شاهد به ترتیب حدود ۲/۵ و ۵ برابر بود. با این که هر دو ترکیب تحت تأثیر سالسیلیک اسید افزایش یافتند، اثر محرک سالسیلیک اسید.بر سنتز ترکیبات فنولی بیشتر بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت تعلیقی سلول گیاه اسطوخودوس ۴۸و۷۲ساعت پس از افزودن سالسیلیک اسید.حروف حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است ($p\leq0/05$).

سالیسیلیک اسید mg/l	ترکیبان فنولی ۴۸ ساعت mgGA/gdw	ترکیبان فنولی ۷۲ساعت mgGA/gdw	فلاونوئیدها ۴۸ ساعت mgQE/gdw	فلاونوئیدها ۷۲ ساعت mgQE/gdw
۰	۳/۰۳۸±۰/۲۳۲i	۶/۵۴۴±۰/۹۸۷f	۰/۵۴۲±۰/۰۷۷f	۱/۶۱۰±۰/۱۵۵e
۳	۳/۶۱۰±۰/۸۷۶h	۸/۳۳۴±۰/۵۴۳d	۰/۹۴۹±۰/۰۲۹f	۲/۳۳92±۰/183d
۶	۶/۰۷۷±۰/۳۴۵g	۱۵/۰۷۳ ± ۰/۵۴۵b	۱/۵۴۲±۰/۰۵۸e	۳/۲۰۳±۰/۱۸۳b
۱۲	۷/۷۳۲±۰/۵۴۳e	۲۳/۸۱۴±۰/۲۷۷a	۲/۸۹۸±۰/۱۵۲c	۴/۸۶۵±۰/۰۷۷a
۱۸	۳/۷۰۰±۰/۱۲۳h	۱۰/۴۸۵±۰/۱۳۷c	۱/۳۵۶±۰/۱۲۷e	۲/۲۸۸±۰/۰۵۰d

فعالیت آنتی اکسیدانی: سالسیلیک اسید در تمام غلظتهای مورد بررسی باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد. این افزایش در اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با هر سه روش و در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت قابل مشاهده بود. در بین غلظتهای استفاده شده غلظت ۱۲ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی داشت. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون DPPH در غلظت ۱۲ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید پس از ۷۲ ساعت با IC_{50} **معادل** ۱۰۷ µg/ml مشاهده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به شاهد ۳/۶ برابر افزایش داشت. این افزایش نسبت به شاهد در همین غلظت از سالیسیلیک اسید در زمان ۴۸ ساعت حدود ۲ برابر بود. اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با روش اندازه گیری قدرت کاهشی (RP) نتایج مشابهی داشت و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۱۲ mg/l سالسیلیک اسید در۷۲ ساعت به میزان ۴۵۲/۲۵ میکرومول آسکوربیک اسید مشاهده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به شاهد و در زمان ۷۲ ساعت ۶/۷ برابر افزایش نشان داد. در حالی که این افزایش در زمان ۴۸ ساعت ۴/۶ برابر بود. افزایش غلظت سالسیلیک اسید در تمام تیمارها سبب افزایش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید شد و این اثر افزایشی در ۷۲ساعت قابل ملاحظه تر بود. بیشترین فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید در۷۲ساعت در تیمار۱۲mg/lسالسیلیک اسید به میزان۷۴/۳۰۵ درصد مشاهده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت ۹/۷ برابر افزایش نشان داد در زمان ۴۸ ساعت در همین غلظت ۸/۸ برابر افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد(جدول ۲).

در مجموع تیمار سلولها با غلظت۱۲ mg/l سالیسیلیک اسید به مدت ۷۲ ساعت بهترین تیمار-برای افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و سنتز ترکیبات با فعالیت آنتی اکسیدانی بود.

جدول۲ – مقایسه میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت تعلیقی درحضور غلظتهای مختلف سالسیلیک اسید در زمانهای مختلف. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($p \leq 0/05$)

سالیسیلیک اسید/mg	IC_{50}، (µg/ml)		RP (µM/ASA)		SO	
	۴۸ ساعت	۷۲ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰	۴۳۶±۴/۵۸۲a	۳۸۴±۱۰/۵۳۵b	۳۹/۳۱۶±۲/۶۴۹f	۶۷/۲۷۶±۱/۷۳۱e	۵/۵۵۵±۳/۱۸۲d	۷/۶۳۸±۴/۳۲d
۳	۳۷۶±۱۰/۵۳۵c	۲۷۸±۵/۷۷۳d	۴۴/۸۱۰±۱/۱۱۹f	۱۳۶/۹۹۵±۵/۸۹d	۱۲/۵±۲/۸۷۶c	۳۲/۸۶۱±۳/۸۱c
۶	۳۰۱±۷/۹۳۷e	۱۸۶±۱۱/۰۶۰g	۸۵/۴۶۹±۱/۱۷۷e	۲۷۷/۵۳۲±۱۲/۶۴۸c	۲۳/۶۱۱±۱/۱۲۸b	۵۰±۲/۷۶۵b
۱۲	۲۰۵±۰f	۱۰۷±۵/۱۳۱i	۱۳۴/۹۱۹±۳/۴۰۳d	۴۵۲/۲۵۶±۱۴/۲۱۶a	۴۹/۳۳۶±۰/۳۶۶a	۷۴/۳۰۵±۲/۶۵۸a
۱۸	۲۵۸±۴/۵۸۲e	۱۷۸±۰/۵۷۷h	۱۲۹/۰۵۹±۵/۲۳۶d	۳۹۱/۵۷۲±۱۸/۹۷۳b	۳۵/۴۱۶±۳/۶۹۸a	۶۵/۹۷۲±۱/۲۳۴a

بحث

ترکیبات فنولی و پلی فنولی مانند فلاونوئیدها آنتی اکسیدانهای قدرتمندی هستند که در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی کاربرد دارند (۲۶، ۳۲ و ۳۸) اسطوخودوس گیاهی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی است که. خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره آن عمدتاً به وجود ترکیبات فنولی از قبیل رزمارینیک اسید، فرولیک اسید و کافئیک اسید مربوط می شود (۷). بر اساس نتایج پژوهش حاضر. با افزودن سالسیلیک اسید فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت تعلیقی سلول گیاه اسطوخودوس افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در تیمار۱۲میلی گرم در لیتر سالسیلیک اسید مشاهده شد و در زمان ۷۲ ساعت اثر سالسیلیک اسید قابل ملاحظه تر بود.

افزایش محتوای ترکیبات فنولی در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)، کاساوا (*Manihot esculenta*) و زردآلو(*Prunus armeniaca*) در اثر تیمار سالیسیلیک اسید گزارش شده است (۴۲،۱۴ و۴۸) کاربرد سالیسیلیک اسیددر گیاه بومادران و ریحان مقدس نیز موجب افزایش ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی شد (۲۲). در کشت تعلیقی ریحان مقدس سالیسیلیک اسید فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش داد (۱۹).

بر اساس یافته های این پژوهش بین غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید در افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی تفاوت معنی داری وجود داشت و با افزایش غلظت به بیش از ۱۲mg/l اثر محرک سالسیلیک اسید کاهش یافت. همچنین از نظر زمان تأثیر هم، بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت وجود داشت و با افزایش زمان اثر سالسیلیک اسید بیشتر بود.

عوامل متعددی مانند غلظت و نوع الیسیتور، زمان تأثیر الیسیتور،سن کشت ونوع تنظیم کننده های رشد به کار رفته بر تولید متابولیتها مؤثر هستند (۳۴و۴۹). غلظتهای بالای الیسیتور پاسخهای فوق حساس را القاء می کند و موجب مرگ سلولی می شود در حالی که مقادیر بهینه آن برای القای تولید متابولیتها لازم است (۱۱ و ۴۱).

اثر غلظتها و زمانهای متفاوت تأثیر سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیتهای ثانوی در گیاهان مختلف متفاوت بوده است. برای مثال بررسی غلظتهای (۰/۰۵، ۰/۵ و ۱/۵ میلی مولار) سالیسیلیک اسید در کشت سلولی گیاه نائین هاوندی (*Andrographis paniculata*) در زمانهای ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت بر تولید فلاونوئیدها نشان داد غلظت ۰/۰۵میلی مولار درزمان ۲۴ ساعت مؤثرتر بوده است (۳۰). در کشت سلولی گیاه کاساوا (*Manihot esculenta*) بیشترین مقدار ترکیبات فنولی پس از ۷۲ ساعت در غلظت ۱۲۵میکرومولار سالیسیلیک اسید (۱۴) و در کشت سلولی *Alternanthera tenella* بیشترین میزان ترکیبات فنولی در زمان ۳۶ ساعت و غلظت ۴۰۰ میکرومول سالیسیلیک اسید مشاهده شد (۹).

در شرایط طبیعی به دنبال حمله پاتوژنها گروهی از ژنهای دفاعی فعال می شوند و سنتز متابولیتهای گیاهی را فعال می کنند(۴۲ و۴۶). کاربرد برون زای سالیسیلیک اسید در غیاب پاتوژن می تواند این ژنها را فعال کند (۳۶). بر اساس بررسیهای انجام شده، سالیسیلیک اسید با ورود به سیستم علامت دهی، تشکیل H_2O_2 ، تأثیر بر مسیر فنیل پروپانوئید و القای سنتز ترکیبات فنولی در پاسخهای دفاعی گیاه شرکت کرده و میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد (۵، ۳۶ و۴۶). این افزایش با آزاد شدن کلسیم از منابع درون سلولی و فعال شدن تعدادی از آنزیمهای مسیر از قبیل فنیل آلانین آمونیا لیاز و چالکون سنتاز صورت می گیرد. (۱۸و ۲۳). علی رغم اطلاعاتی که در رابطه با نحوه تأثیر سالیسیلیک اسید برتولید متابولیتهای دفاعی وجود دارد شناسایی سازوکار دقیق تر اثرسالیسیلیک اسید به بررسیهای بیشتری نیاز دارد.

نتیجه گیری کلی

در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی با هر سه روش کاربرد سالیسیلیک اسید در همه غلظتها در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد و بین افزایش مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی تحت تأثیر سالیسیلیک اسید رابطه مثبتی وجود داشت.

بر اساس یافته های این پژوهش کشت تعلیقی سلول اسطوخودوس منبعی مناسب برای تولید ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی اکسیدانی است واستفاده از سالیسیلیک اسید در مواردی موجب افزایش این ترکیبات به میزانی بالاتر از گیاه طبیعی می شود. به گزارش علیرضایی (۲) مقدار ترکیبات فنولی در گیاه کامل(۱۸/۹۵ (mgGA/gdw) و کمتر از مقدار گزارش شده در غلظت ۱۲ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به مدت ۷۲ ساعت مشاهده بود(

۲۳/۸۱۴ mgGA/gdw). همچنین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با روش RP ۲۴۲/۷۳۳(µM/ASA گزارش شده است که نسبت به مقدار اندازه گیری شده در همین تیمار از سالیسیلیک اسید (۴۵۲/۲۵۶(µM/ASA) کمتر است. این وضعیت در سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH نیز مشاهده می شود (IC_{50}، معادل ۱۱۴µg/ml برای برگ گیاه کامل در مقایسه با عدد ۱۰۷µg/ml در تیمار مذکور).

منابع

۱- قهرمان ا،(۱۳۷۳) .کورموفیت های ایران سیستماتیک گیاهی انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران، جلد سوم .مرکز نشر دانشگاهی.۲۳۵-۳۰۷

۲- قیصری،ف.،سعید نعمت پور،ف وصفی پورافشار،ا (۱۳۹۴). اثر سالیسیلیک اسید و اسکوربیک اسید بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی وفعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*.L) تحت تنش سرب. مجله پژوهشهای گیاهی جلد ۲۸ ، شماره ۴. ص ۸۱۴-,۸۲۵

۳- علیرضایی،ف.، (۱۳۹۳) بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون شیشه و اثر نانو نقره و سایر الیسیتورها بر سنتز آنتی اکسیدانها. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهرا.

۴- کیارستمی خ و مصفا، ن، (۱۳۹۴). بررسی خواص آنتی اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون شیشه ای.مجله پژوهشهای گیاهی جلد ۲۸ ، شماره ۴. ص ۸۳۵-۸۴۳

5-Apostol ,L.,Heinstein, P.F. and Low, P.S.(1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiology, l90**:** 109-116.

6-Azizova OA .(2002). Role of free radical processes in the development of atherosclerosis. Biologicheskie Membrany, 19**:** 451-471.

7-Blazekovic,B., Knezevic,S.V., Brantne,A. and Stefan,M.B. (2010). Evaluation of antioxidant Potential of Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel. 'Budrovka': A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill. Molecules,15: 5971-598.

8-Bota,C. and Deliu C. (2011). The effect of copper sulphate on the production of flavonoids in *Digitalis lanata* cell cultures. Farmacia, 59: 113-118.

9-Brandao,I.R.,Kleinowski,A.M., Einhardt,A.M., Lima,M.C., Amarante,L., Peters,J.A. and Braga,E.J.B.(2014). Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. Ciencia. Rural, 44 (10): 1893-1898.

10-Buitelaar,R. M.,Casario,M. T. and Tramper,J**.**(1992). Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula* **.** Enzyme and Microbial Technology, 14: 2–7.

11-Collinge, D.B. and Susarenka, A.J.(1987). Plant gene expression in response to pathogens. Plant Molecular Biology ,9**:** 389-410.

12-Conde , E., Cadahia , E., Garcia-Vallejo ,M.C .and Fernandez de Simon ,M.B**.**(1995). Polyphenolic composition of wood extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E.rudis*.Holkforschung, 49: 411-4 17.

13-Dicosmo,F.and Misawa, M. (1985). Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in Biotechnology, 3**:** 318–322.

14-Dogbo, D. O., Gogbeu, S. J., zue,B.N.,Yao, K. A., Zohouri,G. P., Mamyrbekova,J.A.and Bekro Y. A**.(** 2012). Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in Cassava elicited cell. -African Crop Science Journal, 20: 85 – 94.

15-Dornenburg,H. and Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology, 17**:** 674-684.

16-Fengqing, Wang., Jingyu ,Zhi ., Zhongyi ,Zhang., Lina ,W., Yanfei ,S., Caixia ,X., Mingjie, Li ., Bao, Z., Jiafang, Du., Li ,G and Hongzheng, Sun. (2017). Transcriptome analysis of salicylic acid Treatment in *Rehmannia glutinosa* Hairy Roots Using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis. Frontiers in Plant Science, 8: 1-15.

17-Georgieva,M., Kuzevab,S., Pavlova, A., Kovachevac, E. and Ilievaa ,M .(2006). Enhanced rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM Cell suspension culture through elicitation with vanadyl sulfate. Zeitschrift Fur Naturoforschung. C, 61: 241-244 .

18-Ghasemzadeh,A.,Hawa, Z. E. Jaafar.and Karimi.E. (2012). Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalconesynthase activity in Ginger (*Zingiberofficinale Roscoe*) Varieties. International Journal of Molecular Sciences,13: 14828-14844.

19-Giraldo.L.,Castro,V., Gregory,F and Dias, ACP .(2014).Potential of *Ocimum sanctum* L. cell suspensions for rosmarinic acid production. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Congress abstract, 10: P2F4

20-Goyal, S .and Ramawat,K.G. (2008). Increased isoflavonoid accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberose* by elicitors. Indian Journal of Biotechnology,7: 378-382.

21-Hayat, S., Hasan, S. A., Fariduddin, Q. and Ahmad. A**.**(2008). Growth of tomato (*Lycopersicom esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. Journal of Plant Interaction, 3: 297–304.

22- Henrique,P., Gorni and Cláudia Pacheco.A.(2016). Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. African Journal of Biotechnology, 15:657-66.

23-Hongbo,G., Nan,Z., Deyholos, M., Liu, J., Zhang, X.,Dong,J. (2015). Calcium mobilization in salicylic acid-induced *Salvia miltiorrhiza* cell cultures and its effect on the accumulation of rosmarinic acid. Applied Biochemistry & Biotechnology, 175: 2689-2702

24-Jiao.Z, Liu.J. and Wang.S . (2005). Antioxidant activity of total pigment extract from blackberries. Food Technology and Biotechnology, 43: 97–102.

25-Khaleel,I.R, Kadhim,M. I. and Subhi J. H.(2011). Effect of some biotic and abiotic elicitors on phenolic acids and diterpenes production from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf and callus analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC)**.** Journal of Al-Nahrain University 14: 104-109.

26-Komes,D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić,D., Rusak,G., Likićb,S and Berendikaa,M.(2011). Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. Phytochemical analysis , 2**2**, 172–180.

27-Kulisic – Bilusic, T ., Katalinic,V., Dragovic – Uzelac,V., Ljubenkov,I., Krisco ,A ., Dejannovic,B . and Jukic, M**.**(2008). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro. Food Technology and Biotechnology, 46 (4): 368–375.

28-López Arnaldos ,T., Muñoz ,R., Ferrer ,M.A and Calderón, A.A. (2001). Change in phenol content during strawberry callus. plant physiology, 113:315-322.

29-Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. Biotechnology Advances, 26: 548-560.

30-Mendhulkar,V.D. and Ali Vakil.M.(2013). Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata*(Burm.f.) Nees.cell culture. Research in Biotechnology, 4: 1-9.

31-Molyneux, P.(2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology,26: 211–219.

32-Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D.,Domínguez, J.M.,Sineiro, J.,Domínguez, H.,JoséNúñez, M. and Parajo, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry,72: 145-171.

33-Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum,15: 473–497.

34-Namadeo ,AG .(2007). Plant cell Elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacogenosy Reviews, 1:69-79.

35-Niciforovic,N., Mihailovic, V., Maskovic,P., Solujic,S., Stojkovic,A.and PavlovicMuratspahic, D**.**(2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. Food and Chemical Toxicology ,48: 3125-3130.

36-Okada ,A., Shimizu, T., Okada ,K., Kuzuyama, T., Koga, J., Shibuya, N., Nojiri,H.andYamane, H.(2007). Elicitor induced activation of the methyterythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. Plant Molecular Biology,65: 177-187.

37-Poulev.A.,Oneal,J.M.,Logendra,S.,Pouleva,R.B. ,Timeva,V., Garvey,A.S.,Gleba,D., Jenkins,I.S.,T. Halpern,B.T.,Kneer,R.,Gordon ,G.M. and Raskin,I.(2003). Elicitation, a new

window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. Journal of Medicinal Chemistry, 46: 2542–2547.

38-Pereira, D.M.,Valentão, P., Pereira, J.A. and Andrade, P.B.(2009). Phenolics: From chemistry to biology. Molecules, 14: 2202-2211.

39-Perron, N. and Brumaghim, J.(2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochemistry and Biophysics, 53: 75-100.

40-Raskin,I. (1992) Role of salicylic acid in plants.- Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43:439-463.

41-Roewer, I. A., Cloutier, N. and Van der Heijden, R.(1992). Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase, (SS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports, 11(2)**:** 86-89.

42-Shabrangi, A. and BeigiJazi ,E. A. (2014). Effect of salicylic acid on the amount of essential oil, phenolic compounds , flavonoids and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. International Journal of Agriculture and Crop Sciences ,7-8:499-502.

43-Soobrattee, M.,Neergheen, V.,Luximon-Ramma, A.,Aruoma, O.and Bahorun, T.(2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,579: 200-213.

44-Tumova,L. and Polivkova, D. (2006). Effect of $AgNO_3$ on the production of flavonoids by the cultureof *Ononis arvensis* L. in vitro. Ceska a slovenska Farmacie, 55: 186-188.

45-Vanishree,M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C.Y. ,and Tsay, H.S. (2004). Studies on the production of some important metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin- AcademiaSinica Taipei, 45:1-22,

46-Van Loon, L.C.(1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology,103: 753-765.

47-Wang,Z., Ma,L., Zhang,X., Xu,L., Cao,J and Jiang,W.(2015).The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit.ScientiaHorticulturae, 181:113–120.

48-Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan ,S.B., Kong ,W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan ,J.C., Pan ,Q.H. and Huang, W.D. (2008). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia lyase in grape berry in response to high temperature stress. Plant Growh Regulation, 55: 1–10.

49-Yang, Q., Shi, M., Ng, J.and Wu, J.(2006). Elicitor-induced rosmarini cacid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots.Plant Science,170(4):853-858.

Effect of salicylic acid on antioxidant properties of cell suspension culture of *Lavandula angustifolia* Mill.

Kiarostami Kh.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, Iran.

Abstract

Lavandula angustifolia Mill. is a medicinal herb belonging to lamiaceae. It is a rich source of secondary products with antioxidant propertiy and may be considered as a suitable source in order to antioxidant production. Plant cell cultures are potential source of valuable secondary metabolites such as antioxidant compounds, flavors and fragrances. This study was designed to evaluate the effect of different concentrations of salicylic acid on antioxidant activity in cell suspension culture of *Lavandula angostifolia*. Cell suspension culture of *L. angostifolia* were established and maintained in MS medium, supplemented with 2mg/l NAA and 4mg/l BAP. Salicylic acid was added to the medium at concentrations of 3,6,12 and 18 mg/l in stationary phase (18 days after culture). The antioxidant activity by the methods of free radical scavenging (DPPH), reducing power activity (RP) and superoxide anion scavenging activity (SO), total phenolics and total flavonoid-compounds were evaluated 48 and 72 h after salicylic acid treatment. As a result the highest free radical scavenging and higher reducing power activity (respectively 107µg/ml,4.865 µM/ASA), The highest value of superoxide anion scavenging activity (74.205%) as well as the highest value of total phenolics (814.23 mgGA/gdw) and flavonoids (4.865mgQE/gdw865/4) were observed 72h after treatment with 12mg/L salicylic acid. Treatment with12mg/L salicylic acid for 72 h was better in order to antioxidant activity and compounds with recognized antioxidant properties.

Key words: Antioxidant activity,cell culture,Flavonoids, Phenolics, Lavander