

## بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 نعنائیان است. این گیاه غنی از ترکیبات ثانوی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و می‌تواند منبع مناسبی برای تهیه آنتی‌اکسیدانها در شرایط کشت در شیشه باشد. کشتهای سلولی گیاهان منابع بالقوه ای از متابولیت‌های ثانوی با ارزش مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ترکیبات معطر و طعم دهنده هستند. این پژوهش با هدف بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در کشت سوسپانسیون سلولی انجام شده است. کشت سوسپانسیون سلولی اسطوخودوس در محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l NAA و ۴ mg/l BAP پایدار و نگهداری شد. سالیسیلیک اسید در غلظتهای ۳، ۶، ۱۲ و ۱۸ میلی‌گرم در لیتر در 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی را بر اساس آزمونهای سنجش فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد (IC<sub>50</sub> معادل ۱۰۷ μg/ml)، سنجش قدرت کاهشی یا (۴/۸۶۵ μM/ASA) و سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید (۷۴/۲۰۵ درصد) نشان داد. غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید برای ۷۲ ساعت برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ستنز ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب تر بود.

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

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

### مقدمه

اکسیداتیو بر سلامت انسان جلوگیری می‌کنند (۶، ۷ و ۲۹). در بین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حاصل از گیاهان، ترکیبات فنولی حائز اهمیت زیادی هستند (۳۲ و ۳۸). 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 آنتی‌اکسیدانی خود را نشان می‌دهند (۳۹ و ۴۳).

اسطوخودوس گیاهی دارویی از خانواده نعنائیان است که در طب سنتی موارد استفاده زیادی دارد. از گیاه اسطوخودوس در درمان بیماریهای مجاری ادرار، تنفسی، اضطراب، تشنج و افسردگی استفاده می‌شود (۱) همه بخشهای گیاه به خصوص برگ آن غنی از موادی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. آنتی‌اکسیدانها در صنایع غذایی و دارویی کاربرد زیادی دارند از جمله از تغییرات مضر مواد غذایی در اثر اکسیداسیون و اثرات مضر تشهای

در گل آذین شیپوری، القای گل دهی در برخی از گیاهان، کنترل جذب یون توسط ریشه و هدایت روزنه ای شرکت می‌کند و موجب بیان برخی از ژنهای تولید کننده متابولیت‌های ثانوی از جمله آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید می‌شود (۲، ۲۱ و ۴۰).

بررسی‌ها حاکی از اثر سالیسیلیک اسید بر بهبود و افزایش سنتز متابولیت‌های ثانوی مختلف است؛ برای مثال، افزایش تجمع *acteoside* در کشت ریشه موین رهمانیا (*Rehmannia glutinosa*) (۱۵). افزایش مقدار ایزوفلاونوئیدها در کشت سلولی گیاه تیریشه (*Pueraria tuberosa*) (۲۰). افزایش محتوای ترکیبات فنولی در نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) (۴۲) و کاساوا (*Manihot esculenta*) (۱۴) و افزایش تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه موین گیاه ریحان (*Ocimum basilium*) (۲۹) گزارش شده است. گزارش‌هایی در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس و سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های حاصل از کشت برگ گیاه وجود دارد (۳ و ۴) ولی تا کنون گزارشی از مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و زمان تأثیر آنها بر تولید ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی در گیاه اسطوخودوس انجام شده است.

### مواد و روشها

**تهیه نمونه و کشت:** گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) 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

با توجه به اهمیت و کاربرد گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدانی در گیاه کامل تکنیک‌های کشت بافت و سلول‌رشد روش جایگزینی برای تولید متابولیت‌های ثانوی و از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند (۲۹). به این طریق می‌توان به یک منبع دائمی از ترکیبات ثانوی دست یافت که تحت تأثیر تغییرات فصلی و آب و هوایی، آفات و بیماری‌های گیاهی قرار نمی‌گیرد و امکان کنترل شرایط تولید و دست‌ورزی ترکیبات نیز وجود دارد. روش‌های زیست‌فناوری زیادی از قبیل غربالگری دودمان‌های سلولی پرتولید، تغییر در ترکیب محیط کشت، استفاده از پیش‌ماده‌ها و الیستورها، کشت در مقیاس وسیع در بیورآکتور، کشت ریشه موئی، غیر متحرک سازی سلول گیاهی و تراریختی زیستی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان به کار گرفته شده‌اند (۸، ۹، ۱۰ و ۴۵). در بسیاری از موارد تولید متابولیت‌های ثانوی با تیمار سلول‌های تمایز یافته با الیستورهایی مانند متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و فلزات سنگین افزایش می‌یابد (۱۳، ۳۷ و ۴۷).

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

سالیسیلیک اسید یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی با ماهیت فنولی است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی از قبیل مقاومت در برابر پاتوژن‌ها، تنش فلزات سنگین، ایجاد گرما

عصاره با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه گردید. (۲۸).

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی 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، سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به مخلوط اضافه شد و با اتانول ۹۰ 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 استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید (۲۷).

**سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (سنجش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد با ۲،۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH):** عصاره‌های متانلی تا خشک شدن کامل تبخیر شدند. غلظت‌های ۰/۱ 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:

$$IC\% = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100$$

در این فرمول  $A_{blank}$  جذب کنترل و  $A_{sample}$  جذب محلول حاوی نمونه گیاهی می‌باشد (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

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

نمونه‌ها 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  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد 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  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت قرار گرفتند و پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، توده‌های سلولی برداشت شدند و پس از خشک شدن در دمای ۶۰ درجه جهت عصاره‌گیری و سنجش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

**عصاره‌گیری:** ۰/۲ گرم 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. عصاره‌ها 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

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 ۱۰۰ میکرو مولار استفاده شد (۳۵).

## نتایج

**محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی:** افزودن سالیسیک اسید پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب افزایش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در تیمار ۱۲ میلی گرم در لیتر سالیسیک 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 سالیسیک اسید افزایش یافتند، اثر محرک سالیسیک اسید بر سنتز ترکیبات فنولی بیشتر بود.

**سنجش فعالیت جاروب کنندگی آنیون سوپراکسید:** ۹ میلی لیتر بافر تریس-HCl (۵۰ میلی مولار و pH= ۸/۲) در لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۲۵ درجه قرار گرفت. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروگال (۴۵ میلی مولار پیروگال در 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 ۵۰  $\mu\text{L}$  عصاره گیاهی به عنوان  $A_1$  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):

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت تعلیقی سلول گیاه اسطوخودوس ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن سالیسیک اسید. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است ( $p \leq 0/05$ ).

سالیسیک اسید mg/l	ترکیبان فنولی ۴۸ ساعت mgGA/gdw	ترکیبان فنولی ۷۲ ساعت 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	۲/۳۳۹۲±۰/۱۸۳d
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

مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 سالیسیلیک اسید در تمام تیمارها سبب افزایش فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید شد و این اثر افزایشی در ۷۲ ساعت قابل ملاحظه تر بود. بیشترین فعالیت جاروب‌کنندگی آنیون سوپراکسید در ۷۲ ساعت در تیمار ۱۲ mg/l سالیسیلیک اسید به میزان ۷۴/۳۰۵ درصد مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 غلظت ۱۲ mg/l سالیسیلیک اسید به مدت ۷۲ ساعت بهترین تیمار برای افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سنتز ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود.

جدول ۲ - مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت تعلیقی در حضور غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید در زمانهای مختلف. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $p \leq 0/05$ )

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

کافنیک اسید مربوط می‌شود (۷). بر اساس نتایج پژوهش حاضر. با افزودن سالیسیلیک اسید فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت تعلیقی سلول گیاه اسطوخودوس افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در تیمار ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید مشاهده شد و در زمان ۷۲ ساعت اثر سالیسیلیک اسید قابل ملاحظه تر بود.

**فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** سالیسیلیک اسید در تمام غلظتهای مورد بررسی باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. این افزایش در اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با هر سه روش و در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت قابل مشاهده بود. در بین غلظتهای استفاده شده غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون DPPH در غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید پس از ۷۲ ساعت با  $\text{IC}_{50}$  معادل  $107 \mu\text{g}/\text{ml}$  مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی با روش اندازه گیری قدرت کاهشی (RP) نتایج مشابهی داشت و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار ۱۲ mg/l سالیسیلیک اسید در ۷۲ ساعت به میزان ۴۵۲/۲۵ میکرومول آسکوربیک اسید

## بحث

ترکیبات فنولی و پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها آنتی‌اکسیدانهای قدرتمندی هستند که در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی کاربرد دارند (۲۶، ۳۲ و ۳۸) اسطوخودوس گیاهی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آن عمدتاً به وجود ترکیبات فنولی از قبیل رزمارینیک اسید، فرولیک اسید و

زمان ۳۶ ساعت و غلظت ۴۰۰ میکرومول سالیسیلیک اسید مشاهده شد (۹).

در شرایط طبیعی به دنبال حمله پاتوژنها گروهی از ژنهای دفاعی فعال می‌شوند و سنتز متابولیت‌های گیاهی را فعال می‌کنند (۴۲ و ۴۶). کاربرد برون زای سالیسیلیک اسید در غیاب پاتوژن می‌تواند 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 پروپانویید و القای سنتز ترکیبات فنولی در پاسخهای دفاعی گیاه شرکت کرده و میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (۵، ۳۶ و ۴۶). این افزایش با آزاد شدن کلسیم از منابع درون سلولی و فعال شدن تعدادی از آنزیمهای مسیر از قبیل فنیل آلانین آمونیا لیاژ و چالکون سنتز صورت می‌گیرد. (۱۸ و ۲۳). علی‌رغم اطلاعاتی که در رابطه با نحوه تأثیر سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیت‌های دفاعی وجود دارد شناسایی سازوکار دقیق تر اثر سالیسیلیک اسید به بررسیهای بیشتری نیاز دارد.

#### نتیجه‌گیری کلی

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

بر اساس یافته‌های این پژوهش کشت تعلیقی سلول اسطوخودوس منبعی مناسب برای تولید ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است و استفاده از سالیسیلیک اسید در مواردی موجب افزایش این ترکیبات به میزانی بالاتر از گیاه طبیعی می‌شود. 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)

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 و ۴۸) کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاه بومادران و ریحان مقدس نیز موجب افزایش ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (۲۲). در کشت تعلیقی ریحان مقدس سالیسیلیک اسید فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (۱۹).

بر اساس یافته‌های 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 سالیسیلیک اسید کاهش یافت. همچنین از نظر زمان تأثیر هم، بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت وجود داشت و با افزایش زمان اثر سالیسیلیک اسید بیشتر بود.

عوامل متعددی مانند غلظت و نوع الیستور، زمان تأثیر الیستور، سن کشت و نوع تنظیم کننده‌های رشد به کار رفته بر تولید متابولیتها مؤثر هستند (۳۴ و ۴۹). غلظتهای بالای الیستور پاسخهای فوق حساس را القاء می‌کند و موجب مرگ سلولی می‌شود 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 ۰/۰۵ میلی مولار در زمان ۲۴ ساعت مؤثرتر بوده است (۳۰). در کشت سلولی گیاه کاساوا (*Manihot esculenta*) بیشترین مقدار ترکیبات فنولی پس از ۷۲ ساعت در غلظت ۱۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید (۱۴) و در کشت سلولی *Alternanthera tenella* بیشترین میزان ترکیبات فنولی در

این وضعیت در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH نیز مشاهده می‌شود ( $IC_{50}$ ، معادل  $114 \mu\text{g/ml}$  برای برگ گیاه کامل در مقایسه با عدد  $107 \mu\text{g/ml}$  در تیمار مذکور).

همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش RP  $242/733$  ( $\mu\text{M/ASA}$ ) گزارش شده است که نسبت به مقدار اندازه‌گیری شده در همین تیمار از سالیسیلیک اسید ( $452/256$  ( $\mu\text{M/ASA}$ )) کمتر است.

## منابع

- ۱- قهرمان ا، (۱۳۷۳). کورموفیت‌های 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 رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیمهای آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون شیشه و اثر نانو نقره و سایر الیستورها بر سنتز آنتی‌اکسیدانها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهراء.
- ۴- کیارستمی، خ. و مصفا، ن. (۱۳۹۴). بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی 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*, 190: 109-116.
- 6-Azizova OA. (2002). Role of free radical processes in the development of atherosclerosis. *Biologicheskies 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. *Farmacologia*, 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: 411-417.
- 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 acetoside 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 Naturforschung, 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 tuberosa* 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., Likičb,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 , 22, 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 methyterthritol 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<sub>3</sub> 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 Growth Regulation*, 55: 1–10.
- 49-Yang, Q., Shi, M., Ng, J.and Wu, J.(2006). Elicitor-induced rosmarini acid 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 property 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 angustifolia*. Cell suspension culture of *L. angustifolia* 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 107 $\mu$ g/ml, 4.865  $\mu$ M/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 with 12mg/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