ارزیابی کاربرد پیش ساز رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی

امیر صحرارو[1*]، محمد حسین میرجلیلی[2]، عبدالکریم زارعی[3]، مجاهد کمالی زاده[3]

۱- دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی ۲- دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان دارویی و معطر ۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه جهرم

*نویسنده مسئول: asahraroo@guilan.ac.ir

چکیده

مرزه خوزستانی یکی از گیاهان دارویی بومی ایران می باشد که مقادیر کمی از ماده رزمارینیک اسید را در خود نشان داده است. بنابراین برای افزایش تولید چنین ماده مهمی می بایست از روش کشت سلول گیاهی کمک گرفت. کشت سلولی مرزه خوزستانی حاوی مقادیر قابل توجهی از رزمارینیک اسید است. برای ارزیابی اثر پیش ساز رزمارینیک اسید بر روی تولید این ماده در شرایط کشت سلولی، غلظت های مختلف فنیل آلانین (۴/۵ و ۳، ۱/۵، ۰/۵ میلی مولار) به محیط کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی اضافه گردید. نتایج نشان داد با کاربرد فنیل آلانین، وزن تر و خشک و همچنین مقادیر رزمارینیک اسید سلول ها تغییر یافت. کمترین میزان وزن تر و خشک در غلظت ۴/۵ میلی مولار فنیل آلانین بدست آمد. با وجود این، بیشترین میزان رزمارینیک اسید در غلظت ۳ میلی مولار در روز هفتم مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: فنیل آلانین، گیاهان بومی، گیاهان دارویی، متابولیت ثانویه

مقدمه

از مهم ترین کاربرد های مواد شیمیایی تولیدی توسط گیاهان استفاده از متابولیت های ثانویه در مصارف دارویی می‌باشد اما اغلب این مواد در گیاهان در در غلظت های کم تولید می شوند. بنابراین افزایش تولید متابولیت های ثانویه مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. رزمارینیک اسید از جمله متابولیت های گیاهی دارویی است که در سال های اخیر توجه بسیاری به آن شده و خواص دارویی آن از قبیل اثرات مثبت آن بر آلزایمر و افسردگی نیز آزمون گردیده است. بیوسنتز این ماده در گیاهان خانواده نعناییان، گونه‌های گیاهی این خانواده را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید و افزایش بیوسنتز رزمارینیک اسید معرفی می‌کند. در بین گیاهان بومی ایران، گونه‌های متعددی از خانواده نعناییان همچون گونه‌های سالویا و مرزه را می‌توان یافت که پتانسیل بالقوه‌ای را در تولید رزمارینیک اسید فراهم می‌کنند. طی دو دهه گذشته برای تولید سریع و انبوه بسیاری از متابولیت های ثانوی بویژه برای انواع دارای خواص دارویی ارزشمند که در منابع گیاهی به مقدار ناچیزی وجود دارند (مانند رزمارینیک اسید) از روش های بیوتکنولوژی و کشت بافت استفاده شده است (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2000, 2002). در این بین، کاربرد پیش ساز ها در کشت های سلولی شیوه‌ای مشهود و معمول برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه می‌باشد. چنین مفهومی از این ایده نشات می‌گیرد که هر ترکیبی که به عنوان ترکیب حد واسط در مسیر بیوسنتزی یک متابولیت ثانوی عمل می‌کند، می‌تواند نماینده خوبی برای افزایش عملکرد محصول نهایی باشد. تا کنون تلاش های زیادی برای انگیختن و یا افزایش تولید متابولیت های ثانوی با کاربرد پیش ساز ها انجام گرفته و در بسیاری موارد نیز موفق بوده است (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). فنیل آلانین و تیروزین دو پیش ساز رزمارینیک اسید هستند که کاربرد آنها در کشت های سلولی می‌تواند به افزایش رزمارینیک منجر شود.

مواد و روش ها

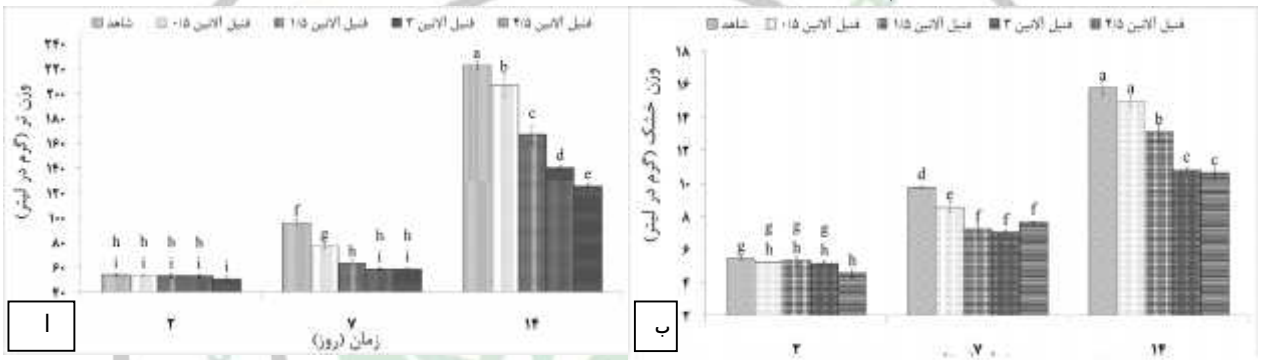
کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی پیشتر مورد بررسی قرار گرفته بود و برای این پژوهش نیز از سلول های مرزه خوزستانی در همان محیط و شرایط استفاده شد (Sahraroo et al. 2013, 2014, 2015). کشت های سلولی مرزه خوزستانی

در این آزمایش تحت چهار غلظت فنیل آلانین (۴/۵ و ۳، ۱/۵، ۰/۵ میلی مولار) قرار گرفتند و با احتمال اینکه فنیل آلانین برای سلول ها سمیت داشته باشد، داده‌ها در روز های دوم، هفتم و چهاردهم برداشته شد. برای هر تکرار سه ارلن که حاوی محیط کشت و سلول های مرزه خوزستانی بودند در نظر گرفته شد. داده های وزن تر، وزن خشک، درصد ماده خشک و بیوسنتز رزمارینیک اسید به روش صحرارو و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۴) اندازه گیری گردید.

نتایج و بحث

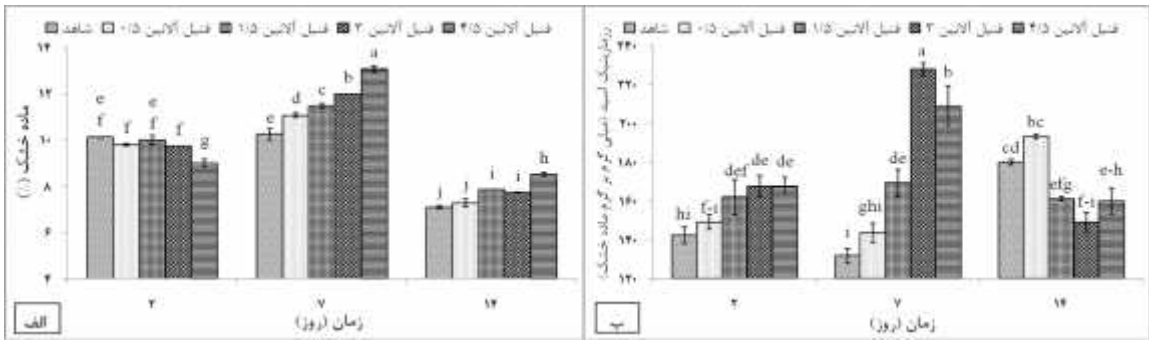
تجزیه واریانس داده‌ها اثر معنی دار کاربرد فنیل آلانین بر ویژگی های اندازه گیری شده ی کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی را نمایان ساخت (جدول ۱).

وزن تر و خشک سلول ها در تمامی غلظت های فنیل آلانین نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۱-الف و ب). با افزایش غلظت فنیل آلانین، رشد سلول ها (وزن تر و خشک) متناسب با غلظت کاربردی کاهش نشان داد. این کاهش را می‌توان به سمیتی که فنیل آلانین برای سلول های گیاهی دارد نسبت داد (Voll et al. 2004). این در حالیست که غلظت های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بر رشد سلول های اُسطوخودوس اثر منفی نداشت ولی غلظت های ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم در لیتر آن، افزایش رشد سلولی را در کشت های سلولی مریم گلی در پی داشت (Hippolyte et al. 1992; Pavlov and Ilieva, 1999).



شکل ۱- نمودار تغییرات وزن تر (الف) و خشک (ب) سلول های مرزه خوزستانی در تیمار با غلظت های مختلف فنیل آلانین

درصد ماده خشک سلول ها نیز با کاربرد فنیل آلانین دچار تغییر شد. بیشترین میزان درصد ماده خشک در روز هفتم مشاهده شد و پس از آن درصد ماده خشک در تمامی تیمار ها روند کاهشی نشان داد (شکل ۲-الف). بیوسنتز رزمارینیک اسید روند متفاوتی را در سطوح تیمار های اعمال شده با هم و با شاهد نشان داد. روند بیوسنتز رزمارینیک اسید در غلظت های ۴/۵ و ۳ میلی مولار فنیل آلانین در روز هفتم بیشترین بود و سپس روندی کاهشی را در پی گرفته و در روز چهاردهم به کمترین میزان خود رسید. غلظت ۱/۵ میلی مولار روند نسبتا ثابتی را در طول دوره داده برداری نشان داد و اندک افزایشی را روز هفتم داشت. روند تغییرات رزمارینیک در غلظت ۰/۵ میلی مولار مطابق با روند شاهد بود (شکل ۲-ب). بیشترین میزان بیوسنتز رزمارینیک اسید، ۲۲۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک رزمارینیک اسید پس از یک هفته در غلظت ۳ میلی مولار دیده شد.



شکل ۲- نمودار تغییرات درصد ماده خشک (الف) و رزمارینیک اسید (ب) سلول های مرزه خوزستانی در تیمار با غلظت های مختلف فنیل آلانین

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت های مختلف فنیل آلانین بر ویژگی های اندازه گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی مرزه خوزستانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر	وزن خشک	درصد ماده خشک	رزمارینیک اسید
فنیل آلانین	۴	۶۷/۱**	۰/۲۵۵**	۱/۴۷۱**	۱۴۱۱/۷۷**
زمان	۲	۱۲۴۷/۴**	۴/۸**	۵۶/۲۵**	۱۲۹۹/۱۷**
فنیل آلانین × زمان	۸	۲۶/۵۵**	۰/۰۷۵**	۱/۶۷۳**	۲۵۱۷/۴۸**
خطا	۲۸	۰/۸۱۵	۰/۰۰۴۳	۰/۰۴۶۸	۹۴/۱۶۲
ضریب تغییرات (٪)		۶/۴۷	۵/۳	۲/۲۴۲	۵/۷۹

در مطالعه هیپولایت و همکاران (۱۹۹۲) نیز روندی مشابه برای رزمارینیک اسید بدست آمده بود بطوریکه غلظت های ۷۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین، افزایش رزمارینیک اسید را زودتر از سلول های کشت شده در محیط شاهد نشان دادند. در مطالعه ایشان، بیشترین میزان رزمارینیک اسید ۱/۱۸ گرم در لیتر گزارش شد که در غلظت ۷۵۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بود (تقریبا دو برابر شاهد) (Hippolyte et al. 1992).

در کشت سلولی اُسطوخودوس، روند بیوسنتز رزمارینیک اسید در تیمار های اعمال شده با شاهد مطابقت داشت (Pavlov and Ilieva, 1999). در آن آزمایش، بیشترین میزان بیوسنتز رزمارینیک اسید در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بدست آمد (۸۵ میلی گرم بر لیتر، ۱/۲۵ برابر شاهد). در این تحقیق نیز بیوسنتز رزمارینیک اسید در بالاترین حد خود، تقریبا ۱/۷۱ برابر شاهد در روز هفتم بود. این میزان بیوسنتز (۲۲/۷ درصد وزن خشک)، پس از مقادیر گزارش شده توسط هیپولایت و همکاران (۱۹۹۲) (۳۶ درصد وزن خشک) و زابو و همکاران (۱۹۹۹) (۳/۳ درصد وزن خشک) بیشترین درصد بیوسنتز در بین سلول های گیاهی می‌باشد (Szabo et al. 1999; Hippolyte et al. 1992).

نتیجه گیری کلی

کاربرد پیش ساز های و اضافه نمودن آنها به محیط کشت های سلولی از مواردی است که امید به افزایش متابولیت های ثانویه در کشت های سوسپانسیون سلولی را در پی دارد. با همین هدف، ماده فنیل آلانین که یکی از پیش ساز های رزمارینیک اسید می‌باشد به محیط کشت مایع سلول های مرزه خوزستانی اضافه گردید. نتایج این بخش نشان داد که بیشترین میزان بیوسنتز رزمارینیک اسید (۲۲۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک رزمارینیک اسید) پس از یک هفته در غلظت ۳ میلی مولار دیده شد. البته این میزان سپس کاهش یافت که به نظر می‌رسد کاهش ذخیره پیش ساز دوم رزمارینیک اسید (یعنی تیروزین) در سلول ها چنین واکنشی را در پی داشته است. این میزان تولید یکی از بیشترین موارد گفته شده در رابطه با رزمارینیک اسید می‌باشد که تا به حال گزارش شده است.

منابع

1. Hippolyte. I., Marin. B., Baccou. J. C., and Jonard. R. 1992. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell Reports, 11: 109–112.
2. Pavlov. A., and Ilieva. M. 1999. The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic and cafeic acids by *Lavandula vera* MM cell culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15: 397-399.
3. Ramachandra Rao. S., and Ravishankar. G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 20: 101-153.
4. Ravishankar. G. A., and Ramachandra Rao. S. 2000. Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. Journal of Biochemistry Molecular Biology and Biophysics, 4: 73-102.

5. Sahraroo. A., Babalar. M., Mirjalili M.H., Fattahi Moghadam. M.R., and Nejad Ebrahimi. S. 2014. In vitro callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iran J Pharm Res. 13(4):1445–1454
6. Sahraroo. A., Mirjalili. M. H., and Corchete. P. 2013. Production of rosmarinic acid in cell culture of *Satureja khuzistanica*. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal. Lisbon, Portugal: p 182.
7. Sahraroo. A., Mirjalili. M.H., Corchete. P., Babalar. M., and Fattahi Moghadam. M.R. 2015. Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. Cytotechnology. (In press).
8. Szabo. E., Thelen. A., and Petersen. M. 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Reports, 18: 485–489.
9. Voll. L. M., Allaire. E. E., Fiene. G., and Weber. A. P. M. 2004. The Arabidopsis phenylalanine insensitive growth Mutant Exhibits a Deregulated Amino Acid Metabolism. Plant Physiology, 136: 3058–3069.

Evaluation of Rosmarinic acid precursor application on cell suspension culture of *Satureja khuzistanica*

A. Sahraroo*[1], M. H. Mirjalili[2], A. Zarei[3], M. Kamalizadeh[3]

1-Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran 2- Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran 3- Department of Biotechnology, Jahrom Universtiy

*****Corresponding author: asahraroo@guilan.ac.ir

Abstract

Satureja khuzistanica is an Iranian endemic medicinal plant which showed Rosmarinic acid content in low quantity in the whole plant. High production of such compound can be obtained by plant cell culture. *S. khuzistanica* cells revealed remarkable amounts of RA in cell suspension culture. So, different levels of phenylalanine (0.5, 1.5, 3 and 4.5 mM) were added to the media for evaluation of the precursor effects on RA production. The results suggested that fresh and dry weight as well as RA content were changed by adding precursor to the culture media. The lowest fresh and dry biomasses were obtained at 4.5 mM phenylalanine. In spite of this, highest RA content (227 mg/g dry weight) was achieved at 3 mM phenylalanine after 7 days.

Key words: endemic plant, medicinal plants, phenylalanine, secondary metabolite.