بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف ساکارز به گلوکز بر رشد و تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل

شهلا قادری[۱]، محمدحسین میرجلیلی*[۱]، صمد نژادابراهیمی[۲]
[۱]* گروه کشاورزی، پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین-تهران
[۲] گروه فیتوشیمی، پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین-تهران
*نویسنده مسئول: m-mirjalili@sbu.ac.ir

چکیده

پروسکیا آبروتانوئیدس کارل (*Perovskia abrotanoides* karel) متعلق به خانواده نعناع است. یک گیاه دارویی محلی ایرانی است که نام فارسی رایج آن بَرازَمبِل می‌باشد. چندین نوع از ترکیبات شیمیایی از جمله ترپنوئیدها، اسیدهای فنولی مانند رزمارینیک اسید و ترکیبات دی‌ترپنی چربی دوست که به تانشینون معروف‌اند، در این گیاه گزارش شده است. نوع و غلظت قندها تأثیر متفاوتی بر روی واکنش‌های فیزیولوژیکی در شرایط کشت درون شیشه‌ای دارند. علاوه بر نقش متابولیکی آن‌ها، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده پتانسیل اسمزی نیز عمل می‌کنند. تولید و تجمع رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی تحت تأثیر نوع و غلظت قند قرار می‌گیرد. در این پژوهش اثر شش نسبت (۳:۱،۳:۲،۴:۱،۴:۲،۵:۱،۵:۲) ساکارز به گلوکز بر رشد سلول‌ها و تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل مورد بررسی قرار گرفت. داده‌برداری ۳۵ روز بعد از کشت صورت گرفت. نتایج مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری بین نسبت‌های مختلف ساکارز به گلوکز از نظر میانگین نتایج کلی وجود دارد. نتایج نشان داد که محیط موراشیک و اسکوک (اِم اِس) حاوی ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۴۰ گرم بر لیتر ساکارز در مقایسه با کاربرد فقط ۳ درصد ساکارز به‌تنهایی (شاهد) به ترتیب منجر به افزایش ۱/۷، ۱/۵ و ۲ برابری در وزن تر، وزن خشک و تولید رزمارینیک اسید گردید.

***کلمات کلیدی:* بَرازَمبِل، نعناعیان، کشت سوسپانسیون سلولی، ساکارز، گلوکز، رزمارینیک اسید**

مقدمه

بَرازَمبِل (*Perovskia abrotanoides* karel) گیاهی دارویی بوده و متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد .این گیاه پراکنش محدودی در جهان دارد و تنها در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید (Sairafianpour *et al.*, 2001). رزمارینیک اسید جزء اسیدهای فنولیک بوده و یکی از متابولیت‌های ثانویه گیاه بَرازَمبِل می‌باشد که دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضدویروس، ضد آلرژی، ضدالتهاب و ضد سرطان است(Leu *et al.*,1999). سرعت رشد و محتوای پایین مواد مؤثره در بافت‌های گیاهی و افزایش تقاضا برای این ترکیبات، ضرورت توجه به رویکردهای پربازده تولید را ایجاد کرده است. امروزه روش‌های بیوتکنولوژی با رویکرد کشت بافت گیاهی در مقیاس انبوه یک روش مفید و مطمئن برای تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به استفاده از کشت زراعی گیاه می‌باشد. سلول‌های گیاهی از نظر قابلیت بیوسنتز طیفی از ترکیبات شیمیایی را که در گیاه والد تولید می‌شوند، را دارند. کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و تجدیدپذیر برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است .با توجه به اهمیت اقتصادی و دارویی متابولیت‌های ثانویه،کشت‌های سلول مورد توجه بسیار قرار گرفته است. براساس بیشتر گزارش‌ها میزان تولید متابولیت ثانویه از کشت های تمایز نیافته بسیار کم است اما تلاش‌های زیادی برای تحریک سلول‌ها با استفاده از روش‌های متنوع صورت گرفته است. این روش‌ها شامل انتخاب لاین سلولی، بهینه‌سازی محیط کشت از نظر مواد غذایی، فیتوهورمون‌ها و پیش ماده،

شرایط کشت(PH، نور، دما و غیره) و اخیراً مهندسی متابولیکی می‌باشد. تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی در گیاهان متعددی از جمله اسطوخودوس(Georgiev *et al.*, 2004)، نعناع فلفلی[2] (Krzyzanowska *et al.*, 2012) با استفاده از تیمارهای متنوع بررسی شده است. یکی از تیمارهای مؤثر بر رشد و تولید متابولیت ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی نوع، غلظت و نسبت‌های مختلف کربوهیدرات در محیط کشت می‌باشد. کشت سلول های گیاهی در محیط کشت حاوی یک قند ساده یا ترکیبی از قندهای ساده مانند گلوکز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز رشد می‌کنند. قندها در محیط کشت به‌عنوان منبع انرژی و مواد مغذی معدنی عمل می‌کنند. در کشت سوسپانسیون سلولی گیمنما[3] چند قند، مورد آزمایش قرار گرفت و ساکارز به‌عنوان منبع کربوهیدرات ایده آل برای تجمع زیست‌توده (۱۱/۵۶گرم در لیتر وزن خشک) و تولید گیمنمیک اسید (۹/۹۵ میلی‌گرم در لیتر وزن خشک) مشخص شد (Nagella *et al.* 2011). وانگ و واتر (۲۰۰۷) اثر غلظت مولکولی (۳۰ گرم در لیتر) هر کدام از قندهای ساکارز، گلوکز، یا فروکتوز در کشت سوسپانسیون گَندِواش[4] به‌منظور تولید آرتمیزینین مورد آزمایش قرار دادند و مشاهده کردند که در محیط کشت همراه با گلوکز آرتمیزینین به‌طور چشم‌گیری تجمع یافته بود. آن‌ها همچنین پی بردند که مخلوطی از قندها، از جمله ساکارز (۲۷ گرم در لیتر) به همراه گلوکز یا فروکتوز (۳ گرم در لیتر)، منجر به کاهش تولید آرتمیزینین شد. به‌طور مشابه، غلظت مکمل کربوهیدرات در محیط تا حد زیادی تجمع زیست‌توده و تولید متابولیت تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌عنوان‌مثال، از سطوح مختلف ساکارز (۱-۸درصد وزن به حجم) تست شده در کشت سلولی گیمنما، مورد آزمایش قرار گرفت، غلظت ۳ درصد ساکارز برای تجمع زیست‌توده مطلوب می‌باشد، درحالی‌که بالاترین میزان گیمنمیک اسید (۱۰/۱میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در محیط حاوی ۴ درصد ساکارز نشان داده شد(Nagella *et al.*, 2011). در این تحقیق حاضر اثر شش نسبت ساکارز به گلوکز (۳:۱،۳:۲،۴:۱،۴:۲،۵:۱،۵:۲) روی کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل به‌منظور دستیابی به محیطی با تولید بیوماس و رزمارینیک اسید بالا بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور القا کالوس، سر شاخه‌ها و میانگره‌های گیاه بَرازَمبِل در محیط کشت اِم اِس حاوی ۸/۵ گرم در لیتر آگار، ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید قرار گرفتند. بعد از ایجاد کالوس قطعات خوش رشد به محیط کشت سوسپانسیون حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید انتقال داده شدند و سپس تأثیر ۶ نسبت(۳:۱،۳:۲،۴:۱،۴:۲،۵:۱،۵:۲) مختلف ساکارز به گلوکز بر تولید بیوماس و بیوسنتز رزمارینیک اسید مورد آزمایش قرار گرفت. محیط تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این آزمایش برای هر تکرار تعداد سه ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ۲/۵ گرم سلول اولیه در نظر گرفته شد و داده‌برداری در هفته پنجم صورت گرفت. ارلن‌های کشت شده در شرایط دمایی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. به‌منظور هوادهی مناسب به سلول‌ها، دور شیکر روی ۱۰۵ دور در دقیقه تنظیم گردید. وزن تر (گرم بر لیتر)، وزن خشک (گرم بر لیتر)، میزان رزمارینیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بررسی شد. وزن تر از روش فیلتر کردن کشت‌ها تحت خلأ صورت گرفت به نحوی بیشتر آب همراه نمونه‌ها حذف شد. نمونه سلولی در فریزدرایر[5] خشک شدند. برای اندازه‌گیری میزان تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل ، نمونه‌های خشک شده کاملاً پودر شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه پودر شده توزین و درون لوله‌های آزمایش دربدار ریخته شد. به هر لوله آزمایش ۳۰ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید و درب

[1] *Lavandula vera*
[2] Mentha× piperita
[3] *Gymnema sylvestre*
[4] *Artemisia annua*
[5] Freeze Dryer

آن‌ها بسته شد. پس از به هم زدن اولیه، دو بار لوله‌ها را در حمام اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها سانترفیوژ شدند. پس از این مرحله، حلال (متانول) به‌وسیله روتاری تبخیر گردید. بخش باقی‌مانده دوباره در ۵ میلی‌لیتر متانول اچ پی ال سی حل شد. یک سی‌سی از عصارهای تهیه‌شده در شیشه‌های مخصوص اچ پی ال سی ریخته شد. سپس به دستگاه تزریق و سطح زیر منحنی قله جذبی در طول‌موج ۳۲۰ نانومتر تعین گردید. منحنی استاندارد مربوط به رزمارینیک اسید بر اساس غلظت¬های محلول¬های استاندارد و سطح زیر هر قله آن‌ها رسم و از معادله حاصل، برای سنجش مقدار رزمارینیک اسید در نمونه¬های موردمطالعه استفاده شد آشکارسازی نمونه¬ها در طول‌موج ۳۲۰ نانومتر و با جریان عبوری یک میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد و حجم هر تزریق ۲۰ ماکرو لیتر بود. هر نمونه با سه بار تکرار به دستگاه اچ پی ال سی تزریق شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشات فاکتوریل انجام شده در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی و در سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار آماری اِس پی اِس اِس ورژن۲۰[6]صورت گرفت. مقایسه میانگین فاکتورهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱و۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر نسبت‌های مختلف ساکارز و گلوکز بر رشد سلول در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد(جدول۱).

جدول1) جدول تجزیه واریانس تأثیر نسبت ساکارز و گلوکز بر وزن تر، خشک سلول و تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل

		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	رزمارینیک اسید
نسب‌های قند	۵	۲۳۴۵۷/۹ **	۹۸/۶**	۴۱۵/۲**
خطای آزمایش	۱۲	۵۰۸	۲/۶	۱/۳
ضریب تغییرات(٪)		۸/۴	۶/۹	۱۰/۷

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد. که با افزایش قند کل(ساکارز+گلوکز) محیط کشت تا ۵ درصد رشد سلول افزایش می‌یابد. اما غلظت‌های بالاتر ۶ و ۷ درصد قند کل تأثیر منفی بر رشد سلول‌ها دارد. این نتایج نشان می‌دهد که رشد زیست‌توده در غلظت‌های نسبتاً بالای قند به خاطر فشار اسمزی بالا در کشت سوسپانسیون سلولی مهار می‌شود. بیشترین رشد سلول در محیط اِ م اِس تکمیل شده با ۴ درصد ساکارز و یک درصد گلوکز به دست آمد. با افزایش غلظت قند کل محیط کشت بیوسنتز رزمارینیک اسید افزایش می‌یابد. بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در محیط کشت حاوی ۷ درصد قند کل(۵ درصد ساکارز و ۲ درصد گلوکز) به دست آمد. نتایج حاکی از آن است که استفاده از گلوکز همراه ساکارز تأثیر بیشتری در رشد و بیوسنتز رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل دارد. مقایسه بین دو غلظت (۱ و ۲ درصد) گلوکز نشان داد که غلظت ۲ درصد گلوکز تأثیر بیشتری بر بیوسنتز رزمارینیک اسید دارد درحالی‌که روی رشد سلول اثر منفی دارد(جدول۲).

[6] Statistical Package for the Social Sciences

جدول ۲) تأثیر نسبت ساکارز و گلوکز بر وزن تر، خشک و تولید رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل

قند کل(درصد)	نسبت ساکارز به گلوکز	وزن تر (گرم بر لیتر± خطای استاندارد)	وزن خشک (گرم بر لیتر±خطای استاندارد)	رزمارینیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک±خطای استاندارد)
۳	۳:۰(شاهد)	۳۳۵±۲۱/۶^{d}	۱۶/۲±۰/۴^{c}	۳۳/۰±۴/۴^{f}
۴	۳:۱	۳۶۳/۳±۲۶/۷ ^{c}	۱۶/۶±۰/۸^{c}	۵۲/۰±۷/۳۵^{e}
۵	۳:۲	۳۹۱/۳±۱۷/۵^{c}	۱۹/۹±۱^{b}	۶۳/۸±۰/۳^{d}
۵	۴:۱	۵۰۳/۳±۱۲/۲^{a}	۲۷/۵±۲/۳^{a}	۶۶/۹±۰/۶^{c}
۶	۴:۲	۴۵۳/۷±۹ ^{b}	۲۱/۴±۲^{b}	۸۰/۴±۱^{b}
۶	۵:۱	۳۱۰/۱۸±۶/۶^{d}	۱۵±/۳^{c}	۶۴/۷±۰/۶^{d}
۷	۵:۲	۲۶۴/۸±۳۸^{e}	۱۱±۱^{d}	۸۴/۷±۰/۴^{a}

نتایج حاصل نشان داد، اگرچه در تیمار ۵:۲ ساکارز به گلوکز بیشترین بیوسنتز رزمارینیک اسید (۸۴/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشته‌ایم. اما سلول‌های رشد یافته در این محیط نسبت به سلول‌های رشد کرده در محیط تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز به‌تنهایی به‌شدت قهوه‌ای شده بودند و رشد آن‌ها تقریباً ۲۰ درصد کاهش یافته بود. بنابراین مناسب‌ترین نسبت ساکارز و گلوکز برای رشد و بیوسنتز رزمارینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی بَرازَمبِل نسبت ۴:۱ می‌باشد. در این تیمار علاوه بر افزایش ۱/۵ برابری وزن تر و ۱/۷برابر وزن خشک باعث افزایش ۲/۰۱ برابری بیوسنتز رزمارینیک اسید نسبت به کاربرد ساکارز به‌تنهایی شده است. محیط کشت‌های تکمیل شده با ۴ درصد ساکارز و ۱ درصد گلوکز محیط کشت شفاف و روشن بود و سوسپانسیون سلولی همگن به همراه سلول‌های سالم با درصد زنده‌مانی بالا داشتند.

منابع

Sairafianpour, M., Christensen, J., Stærk, D., Budnik, B.A., Kharazmi, A., Bagherzadeh, K. and Jaroszewski, J.W., 2001. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1, 2-quinones from Perovskia abrotanoides: new source of tanshinones. *Journal of natural products*, *64*(11), pp.1398-1403.

Liu S, Zhnong JJ (1999) Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of Panax ginseng and Panax quinquefolius. Proc Biochem 33:69–74.

Georgiev, M., Pavlov, A. & Ilieva, M. (2004). Rosmarinic acid production by Lavandula vera MM cell suspension: the effect of temperature. Biotechnology Letters, 26(10), 855–856.

Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2012). The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in Mentha× piperita cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(1), 73-81.

Nagella P, Murthy HN, Chung IM (2011) In vitro production of gymnemic acid from cell suspension cultures of Gymnema sylvestre R. Br Eng Life Sci 11:537–540.

Wang Y, Weathers PJ (2007) Sugars proportionately affect artemisinin production. Plant Cell Rep 26:1073–1081.

Evaluation of Different Sucrose to Glucose Ratios on the Growth and Production of Rosmarinic Acid in Cell Suspension Culture *Perovskia Abrotanoides* Karel (Lamiaceae)

Shahla Ghaderi[1], Mohammad Hossein Mirjalili[1*], Samad Nejad Ebrahimi[2]
[1]Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran, Iran.
[2]Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran, Iran.
[*]*Corresponding Author: m-mirjalili@sbu.ac.ir*

Abstract

***perovskia abrotanoides karel*, belongs to the family Lamiaceae, is an Iranian folk medicinal herb with the common Persian name of "Brazambel". *P. abrotanoides* is reported to contain several classes of phytochemicals including terpenoids, phenolic acids as rosmarinic acid (RA) and lipophilic abietane biterpenoids which called tanshinones. The type and concentration of sugars affects the biomass and secondary metabolites (SMs) accumulation in cell suspension culture. In addition to their metabolic roles, also act as osmotic potential regulator. Rosmarinic acid production and accumulation in cell suspension culture is influenced by the type and concentration of sugar. In the present work, the effects six ratio (3:1,3:2,4:1,4:2,5:1,5:2) sucrose to glucose in cell suspension culture were investigated on cell growth and production of rosmarinic acid in *P. abrotanoides*. Data were recorded after 35 days. Comparison of mean values showed significant differences among different ratios of sucrose to glucose. The results showed that Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 10 g L^{-1} glucose plus 40 g L^{-1} sucrose increased 1.7, 1.5 and 2 folds of fresh weigh, dry weigh and RA production, respectively than the medium containing 30 g L^{-1} sucrose.**

***Keywords*: *Perovskia abrotanoides* Karel, Lamiaceae, cell suspension culture, sucrose, glucose, rosmarinic acid**