

اثر غلظت محیط کشت MS بر کشت ریشه‌هایی موین *Salvia reuterana*

رضا نوروزی^{1*}، مصباح‌آبادی²، مسعود میر معصومی³، جواد هادیان⁴

^{1*} - نویسنده رابط: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 2- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 3- مربی گروه فیزیولوژی گیاهی، پردیس علوم دانشگاه تهران. 4- استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

نویسنده رابط: رضا نوروزی (reza.norziabhari@yahoo.com)

چکیده

ریشه‌های موین گیاه *Salvia reuterana* توسط تلقیح با آگروباکتریوم ریزوژنز سویه 15834 به دست آمد. اثر غلظت محیط کشت MS مایع، به صورت نیم غلظت و تمام غلظت، بر کشت ریشه‌های موین این گیاه بررسی گردید. نتایج نشان داد غلظت محیط کشت اثر معنی داری بر روی رشد و میزان تولید رزمارینیک اسید ریشه‌های موین دارد. بیشترین وزن تر (41/6 گرم در لیتر) و وزن خشک (3/7 گرم در لیتر) در محیط کشت MS تمام غلظت به دست آمد. اما بیشترین میزان تولید رزمارینیک اسید در محیط کشت نیم غلظت MS و به میزان 1/4 برابر محیط کشت تمام غلظت MS حاصل گردید.

کلمات کلیدی: *Salvia reuterana*، ریشه‌های موین، رزمارینیک اسید، محیط کشت

مقدمه

ریشه‌های موین از تراریخت شدن بافت‌های گیاهی توسط آگروباکتریوم ریزوژنز به وجود می‌آیند که رهیافت نوینی برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (1). *S. reuterana* گیاهی علفی و چند ساله اندمیک ایران است، که اثرات ضد باکتریایی، ضد اضطرابی و آرامبخشی ترکیباتش به اثبات رسیده است (2). از طرفی گیاهان خانواده نعنا شامل یک ترکیب فنلی به نام رزمارینیک اسید می‌باشند که دارای خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانتی است (3). با وجود تحقیقات فراوان برای تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های موین گیاهان خانواده نعنا (4)، تا کنون گزارشی از تولید این ماده در *S. reuterana* منتشر نشده است. از طرفی مطالعات متعددی نشان می‌دهد که غلظت محیط کشت نقش عمده‌ای در رشد و تولید متابولیت‌ها در کشت ریشه‌های موین گیاهان دارد (5، 6). بنابراین در تحقیق حاضر به بررسی این مورد پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

بذرهای *S. reuterana* (جمع آوری شده از جاده چالوس، بیلقان، ارتفاع 1363 متر) در گلدان‌های حاوی مخلوطی از پیت‌ماس و پرلیت کشت شدند و در دمای اتاق با دوره نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار داده شدند. کشت سوسپانسون باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز سویه 15834 در محیط LB مایع و در ارلن‌های 100 ml انجام گرفت. سپس ارلن‌ها به مدت 48 ساعت در تاریکی بر روی شیکر با سرعت 100 rpm در دمای 26°C قرار گرفتند.

برای تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، برگ‌های جوان پس از ضد عفونی، توسط اسکالپل به قطعات دو سانتی متری تقسیم شدند و 10 دقیقه در سوسپانسون باکتری غوطه‌ور بودند. سپس بر روی محیط کشت جامد MS قرار گرفتند. به منظور حذف باکتری 72 ساعت پس از تلقیح، ریزنمونه‌ها به محیط تازه حاوی 500 ppm سفوتاکسیم منتقل شدند. و این عمل تا حذف کامل باکتری چند بار با فواصل 2-4 روز و غلظت‌های کمتر تکرار شد. پس از 11 روز ریشه‌های موین در حاشیه برگ‌ها ظاهر شدند. ریشه‌هایی با طول 2-3 سانتی متر جدا

شده و به ارلن 250ml حاوی 70 cc محیط کشت B5 مایع نیم غلظت کشت گردید. پس از یک ماه یک کلون پر رشد انتخاب و جهت استفاده در آزمایش واکشت گردید. برای بررسی اثر غلظت محیط کشت بر ریشه‌های موین، با استفاده از محیط کشت مایع MS به صورت نیم و تمام غلظت آزمایشی در 3 تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید. پس از گذشت 28 روز ریشه‌های موین رشد یافته در محیط کشت‌های مختلف با همدیگر مقایسه شوند. پس از استخراج عصاره گیاهی با روش اولتراسونیک، شناسایی اسید رزمارینیک با استفاده از سیستم اچ پی تی ال سی (کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا) انجام گرفت (7).

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر غلظت محیط کشت بر روی وزن تر، وزن خشک و میزان تولید رزمارینیک اسید در سطح یک درصد معنی دار است (جدول 1). مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین وزن تر (41/6 گرم در لیتر) و وزن خشک (3/7 گرم در لیتر) در محیط کشت تمام غلظت MS به دست آمد. مشاهده شد که با افزایش غلظت از یک دوم به تمام غلظت میزان وزن تر و خشک ریشه‌ها به ترتیب 1/7 و 2/1 برابر گردید (جدول 2).

جدول 1- تجزیه واریانس اثر غلظت محیط کشت در کشت ریشه‌های موین *Salvia reuterana*

SOV	وزن تر (g.L-1)	وزن خشک (g.L-1)	رزمارینیک اسید (mg/g DW)
غلظت محیط کشت	486/1**	6/12**	313/93**
error	7/29	0/074	2/7
CV%	8/2	9/98	4/07

اما بیشترین میزان تولید رزمارینیک اسید در محیط کشت نیم غلظت MS به دست آمد. میزان رزمارینیک اسید تولید شده در محیط کشت نیم غلظت MS تقریباً 1/4 برابر محیط کشت MS می‌باشد (جدول 2).

جدول 2- تاثیر غلظت محیط کشت بر رشد و تولید رزمارینیک اسید در کشت ریشه‌های موین *Salvia reuterana*

غلظت	وزن تر (g.L-1)	وزن خشک (g.L-1)	رزمارینیک اسید (mg/g DW)
تمام غلظت MS	41/6 a	3/7 a	33/9 b
نیم غلظت MS	23/6 b	1/7 b	48/4 a

بحث

در مطالعه حاضر میزان وزن تر و خشک و تولید رزمارینیک اسید تحت تاثیر غلظت محیط کشت قرار گرفت. نوع و غلظت محیط کشت به دلیل دارا بودن خاصیت تغذیه‌ای، اسمزی و تحریک کنندگی نقش مهمی در رشد ریشه‌های موین و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارد (8، 9). اثر غلظت محیط کشت بر رشد ریشه‌های موین در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است. ریشه‌های موین گیاه *Paulownia tomentosa* در محیط‌های کشت MS نیم غلظت و B5 نیم غلظت رشد بیشتری نسبت به محیط‌های تمام غلظت داشتند (10)، که این

نتیجه با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر در مغایرت است. گزارش‌های دیگری مبنی بر تاثیر غلظت محیط‌های کشت بر رشد ریشه‌های موئین یا تولید متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها وجود دارد (11).

در مطالعه حاضر، هر چند تولید رزمارینیک اسید به ازای هر گرم ماده خشک در محیط کشت MS تمام غلظت کمتر از محیط MS نیم غلظت انجام گرفت، با این حال با محاسبه‌ای ساده می‌توان دریافت که میزان تولید این ترکیب به ازای هر لیتر محیط کشت، در محیط کشت MS تمام غلظت بیشتر بود (0/13 گرم در لیتر در برابر 0/05 گرم در لیتر). با توجه به اینکه بیشترین وزن تر و خشک نیز در محیط کشت MS تمام غلظت به دست آمد، این محیط کشت مناسب‌ترین محیط برای رشد ریشه‌های موئین *S. reuterana* می‌باشد.

منابع

1. Syklowska-Baranek, K., A. Pietrosiuk, A. Kokoszka, and M. Furmanowa. 2009. Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*. *Journal of plant physiology*. 166: 1950-1954.
2. Rabbani, M., SE. Sajjadi, A. Jafarian, and G. Vaseghi. 2005. Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 101(3): 100-103.
3. Huang, B., B. Yi, Y. Duan, L. Sun, X. Yu, J. Guo, and W. Chen. 2008. Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Molecular biology reports*. 35(4): 601-612.
4. Tada, H., Y. Murakami, T. Omoto, K. Shimomura, and K. Ishimaru. 1996. Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*. 42(2): 431-434.
5. Nussbaumer, P., I. Kapétanidis, and P. Christen. 1998. Hairy roots of *Datura candida* × *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant cell reports*. 17: 405-409.
6. Satdive, RK., DP. Fulzele, and S. Eapen. 2007. Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of biotechnology*. 128(1): 281-289.
7. Babalar, M., H. Mumivand, J. Hadian, and SM. Fakhri Tabatabaei. 2010. Effects of Nitrogen and Calcium Carbonate on Growth, Rosmarinic Acid Content and Yield of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural*.
8. Srivastava, S., and AK. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*. 27: 29-43.
9. Xu, H., J. Park, Y. Kim, N. Park, S. Lee, and S. Park. 2009. Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(11): 978-981.
10. Giri, A., and ML. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*. 18: 1-22.
11. Chang. CK., KS. Chang, YC. Lin, SY. Liu, and CY. Chen. 2005. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnology letters*. 27(16): 1165-1169.

The effect of MS medium concentration on hairy root cultures of *Salvia reuterana*

Reza Norouzi*1, Mesbah Babalar1, Masoud Mirmasoumi2, Javad Hadian3

1- Dep. of Horticultural Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran. 2- Dep. of Botany, College of Sciences, University of Tehran, Iran. 3- Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Iran.

*Corresponding author: Reza Norouzi (reza.norouziabhari@yahoo.com).

Abstract

Hairy roots of *Salvia reuterana* were induced by infecting plantlets with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. The effect of MS liquid medium concentration on hairy root cultures was studied. The results showed that medium concentration had significant effect on growth and rosmarinic acid production. Maximum fresh weight (41.6 g. L⁻¹) and dry weight (3.7 g. L⁻¹) achieved in full-strength liquid MS medium. While highest production of rosmarinic acid was observed in half-strength MS medium, which was 1.4-fold higher compared to full-strength MS medium.

Keywords: *Salvia reuterana*, hairy roots, rosmarinic acid, culture medium