

اثر سدیم هیدروژن سولفید (NaHS) بر برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی و تولید آلکالوئیدهای THC و CBD در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه هندی (*Cannabis indica*)

مریم عابدینی^۱، علیرضا ایرانبخش^{۱*}، سارا سعادت‌مند^۱، مصطفی عبادی^۲ و زهرا اوراقی اردبیلی^۳

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی.

^۲ ایران، دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی.

^۳ ایران، گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، گروه زیست‌شناسی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶

چکیده

شاهدانه هندی (*Cannabis indica*)، گیاهی با خواص دارویی ارزشمند است که بدلیل فراوانی متابولیت‌های ثانویه از جمله کانابینوئیدها یکی از گونه‌های مورد مطالعه در فیتوشیمی می‌باشد. فناوری کشت سوسپانسیون سلولی می‌تواند روشی بهینه با هدف شناسایی، تولید و استخراج این ترکیبات خاص از گیاه شاهدانه باشد. در این پژوهش اثر سدیم هیدروژن سولفید (دهنده هیدروژن سولفید) بر کشت سوسپانسیون سلولی مورد بررسی قرار گرفت و پس از تولید کالوس مناسب جهت کشت سوسپانسیون سلولی، اثر تیمارهای مختلف این الیسیتور (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و در سه تکرار بر برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی و میزان تولید کانابینوئیدهای کانابیدول و تتراهیدروکانابینول در زیست‌توده سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه ارزیابی شد. نتایج نشان داد میزان آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پرولین با استفاده از محرک سدیم هیدروژن سولفید نسبت به شاهد افزایش یافتند، درحالی که میزان آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و فنل نسبت به شاهد کاهش نشان دادند. هم‌چنین میزان پروتئین و قند محلول نیز به جز تیمار ۵۰ mg/L نسبت به شاهد افزایش نشان داد. از هفته دوم درصد سلول‌های رشد کرده نسبت به شاهد افزایش یافت و در سنجش درصد زنده‌مانی سلول نیز در تیمارهای ۱۰۰ mg/L و ۱۵۰ mg/L بهبود درصد زنده‌مانی سلول نسبت به شاهد مشاهده شد. باتوجه به نتایج سنجش، میزان آلکالوئیدهای مورد مطالعه نسبت به شاهد افزایش نشان ندادند. بنابراین به نظر می‌رسد که سدیم هیدروژن سولفید با کاهش اثر عوامل سرکوبگر رشد سلول‌ها از قبیل ROS و در نتیجه کاهش آسیب اکسیداتیو و هم‌چنین افزایش ترکیبات دفاعی گیاه از جمله پرولین و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سبب سازگاری سلول‌های گیاه شاهدانه با شرایط تنش ایجاد شده در کشت سوسپانسیون سلولی گردید.

واژه‌های کلیدی: سدیم هیدروژن سولفید، تتراهیدروکانابینوئیداسید، کانابیدول، سوسپانسیون سلولی، شاهدانه هندی.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: iranbakhsh@iau.ac.ir

مقدمه

پیدا کرده‌است. این خانواده شامل حدود ۱۱۷ گونه بصورت پراکنده در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل جهان می‌باشد (۲۲). شاهدانه یکی از اولین گیاهانی بود که در دوره

شاهدانه با نام علمی *Cannabis indica* گیاهی علفی، یک‌ساله، از خانواده Cannabaceae می‌باشد. در اصل بومی آسیای میانه است و اکنون به‌میزان وسیعی در سراسر جهان گسترش

نوسنگی توسط چینی‌ها و برای هزاران سال بعنوان منبع فیبر، غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گرفته‌است (۱۵). این گیاه بیش از ۳۰۰۰ سال است که عمدتاً بدلیل خواص ضد درد آن بصورت دارویی استفاده می‌شود. فیتوکانابینوئیدهای غالب در گیاه شاهدانه، Δ^9 -تراهیدروکانابینول (THC) (Tetrahydrocannabinol) و کانابیدیول (CBD) (Cannabidiol) هستند، ترکیبات اصلی شاهدانه دارویی (MC) (Medical Cannabis) حاوی هریک یا هر دو این ترکیبات در نسبت‌های مختلف بعنوان مواد موثره، بصورت ایزوله و یا عصاره کامل می‌باشد (۳۸). شاهدانه دارای خواص دارویی ارزشمندی از جمله حفاظت از سیستم عصبی، درمان اضطراب، افسردگی، اختلالات خواب، درد، اختلالات عصبی می‌باشد (۱۹). علی‌رغم تقاضای بالای کانابینوئیدها به‌ویژه THC و CBD در بخش دارویی راندمان تولید این ترکیبات پایین است و بنابراین روش‌های متنوعی از جمله استفاده از محرک‌های شیمیایی برای تحریک متابولیسم ثانویه در سلول‌های شاهدانه در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱).

کشت بافت گیاهی روشی عالی برای استخراج بسیاری از متابولیت‌های هدفمند است. بنابراین، کشت اندام‌ها، بافت‌های گیاهی و کشت سوسپانسیون سلولی برای مطالعه ترکیبات شیمیایی متعدد و تبدیل زیستی ترکیبات فیزیولوژیکی نه‌چندان فعال به ترکیبات فعال دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). علاوه‌براین، سوسپانسیون سلولی، منبعی خوب و بستری استثنایی برای بررسی تغییرات متابولومیک و پروتئومی می‌باشد که در طول تولید ترکیبات فعال زیستی مختلف رخ می‌دهند (۱۶). در مقایسه با سیستم‌های گیاهی کامل که چرخه رشد نسبتاً طولانی‌تری دارند، در کشت سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها چرخه زندگی نسبتاً کوتاه‌تری دارند و تمایز نیافته باقی می‌مانند. چرخه عمر کوتاه‌تر، امکان مطالعه‌ی سلول‌های موردنظر که تحت شرایط محیطی کاملاً کنترل‌شده رشد می‌کنند را فراهم می‌نماید (۳۴).

الیستورها (Elicitors) عموماً به عواملی اطلاق می‌شوند که واکنش‌های دفاعی گیاهان را تحریک می‌کنند. پاسخ اصلی گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهی می‌تواند توسط محرک‌ها تحریک‌گردد (۳۷). استفاده از الیستورها راهی مناسب و شناخته‌شده جهت دستیابی به کانابینوئیدهای مهم در گیاه شاهدانه می‌باشد (۵). در پژوهش‌های انجام‌شده روی گیاهان، NaHS بعنوان یک الفاکندره ارزان مورد استفاده قرار می‌گیرد و بصورت خارجی به محلول هیدروپونیک، محیط‌کشت درون‌شیشه‌ای اضافه می‌شود و یا بصورت مستقیم روی گیاه محلول‌پاشی می‌گردد. NaHS که دهنده‌ی H_2S با طور عمر کوتاه می‌باشد از روند پیوسته و کند تولید H_2S در شرایط *In vivo* تقلید نمی‌کند و در دامنه وسیعی از غلظت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴). تعداد زیادی از مطالعات در زمینه گیاهان نشان داده‌اند که H_2S می‌تواند بطور مستقیم یا غیرمستقیم در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه از جمله حرکت روزنه، فتوسنتز، جوانه زدن بذر، رشد ریشه، رسیدن میوه و همچنین پیری گیاه نقش داشته باشد (۳۹). استفاده از سدیم هیدروژن‌سولفید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه با هدف تحریک و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه از جمله کانابینوئیدها و ترکیبات فنولیک که دارای خواص دارویی مهمی هستند می‌باشد. این ترکیب با القای تنش اکسیداتیو در سلول‌ها سبب تحریک مسیرهای بیوستیزی متابولیت‌های ثانویه و در نتیجه افزایش تولید آن‌ها می‌گردد. بطورکلی استفاده از NaHS بعنوان یک محرک بیولوژیکی جدید در کشت سوسپانسیون سلول گیاهی رویکردی نوآورانه و کارآمد برای افزایش تولید ترکیبات دارویی و فعال زیستی می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای گیاه شاهدانه، گونه‌ی ایندیکا (*Cannabis indica* L.) جنس اسپشیل کوش (Special Kush) اوایل فروردین ماه

چهاردهم، الیستور در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، و ۱۵۰ mg/L به محیط کشت اضافه‌شد.

بمنظور استخراج عصاره آنزیمی از بافر فسفات ۰/۱ (pH ۳/۷) استفاده‌شد. زیست‌توده تازه به‌خوبی در نیتروژن مایع پودر شد، سپس بلافاصله هموژنات در ۴°C سانتریفیوژ شد و ذرات شناور یا به‌عبارتی سوپرناتانت بصورت عصاره آنزیمی در دمای ۸۰°C- ذخیره شدند (۲۱).

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با مطالعه کاهش مقدار H₂O₂ در ۲۴۰nm در دقیقه با استفاده از اسپکتروفوتومتر T92 plus کمپانی PG instruments انجام‌شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰Mm و ۱۵Mm H₂O₂ و عصاره بود. با تهیه منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن، در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیم به ازای هر گرم بافت تر (Unit E g⁻¹) محاسبه‌شد (۱۲).

بمنظور سنجش محتوای فنلی، از ۱ml معرف فولین ۵۰٪ و ۲ml کرینات سدیم ۲۱٪ استفاده‌شد. ترکیب ۱ml عصاره با این مواد به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس سانتریفیوژ شد. جذب نمونه‌ها در ۷۶۰nm اندازه‌گیری شد و برای تعیین غلظت، منحنی استاندارد با استفاده از ترکیبات فنلی مانند اسید گالیک ایجاد شد. در نهایت، محتوای فنول کل بصورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک (GAE) بیان‌شد (۳).

برای سنجش پرولین، ابتدا زیست‌توده با ۱۰ml اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ هموژن‌شد. سپس معرف‌های نین‌هیدرین (برای تهیه آن ۳۰cc اسید استیک، ۲۰cc فسفریک ۶M به ۱/۲۵g نین‌هیدرین اضافه‌شد و به‌آرامی مخلوط‌گردید، سپس مخلوط حاصله در ۴°C نگاه‌داری‌شد. این محلول تا ۲۴ ساعت قابل استفاده است)، ۲ml اسید استیک خالص و ۴ml معرف تولوئن به نمونه‌ها اضافه‌شد. لوله‌ها در دمای ۱۰۰°C قرار داده‌شد و سپس جذب نوری در ۵۲۰nm اندازه‌گیری‌شد. محتوای پرولین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر (mgg⁻¹fw) محاسبه‌گردید (۹).

سال ۱۴۰۰ جهت کشت گلدانی به گلخانه منتقل‌شد پس از رشد مناسب گیاه، جداکشت‌ها از برگ‌های جوان دارای رگبرگ اصلی انتخاب و پس از سترون‌سازی در محیط کشت موراشیگ اسکوک (MS) (Murashige and Skoog) حاوی تیمارهای مختلف جدول ۱ کشت شدند. سپس در اتاقک رشد در دمای ۲۵±۲°C و تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت یک ماه، با مقایسه تاثیر تیمارهای هورمونی بر درصد کالوس‌زایی، رنگ و بافت کالوس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و مناسب‌ترین کالوس جهت استفاده در کشت سوسپانسیون سلولی انتخاب‌شد.

جدول ۱- غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌ای رشد در مرحله کشت اولیه.

Plant growth regulators treatments	KIN mg/L	BA mg/L	NAA mg/L	2,4-D mg/L
1	0	0.1	0	0.5
2	0	0	1	0
3	1	0	0	0
4	0	0	2	0
5	0	0	1	2
6	1	0	1	0
7	2	0	2	0
8	0	0	0	1
9	1	0	1	2

بمنظور تهیه کشت سوسپانسیون سلولی، میزان یک گرم از کالوس‌هایی که شرایط مناسبی از لحاظ رنگ، اندازه و بافت داشتند به ارلن‌های ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ ml محیط کشت MS منتقل‌شد و روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه، ۲۵°C و در تاریکی قرار گرفت. پس از اینکه سوسپانسیونی یک‌دست در حجم مناسب بدست آمد، الیستور در مرحله رشد خطی اضافه‌گردید. پس از چهارده روز از شروع کشت، سوسپانسیون سلولی وارد فاز خطی گردید و در ادامه در روز

سلول‌های مرده بصورت جداگانه با ایونس بلو رنگ‌آمیزی شد، سپس سلول‌های کشته‌شده با آن‌هایی که جوشانده نشده مقایسه گردید. چگالی نوری لکه‌آبی توسط اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد. از SDS ۱٪ و متانول ۵۰٪ بعنوان بلانک استفاده گردید (۳۰).

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_B - A_{UB}}{A_B}$$

در این فرمول A_B میزان جذب لکه آزادشده از زیست‌توده جوشانده شد و A_{UB} میزان جذب لکه آزادشده از زیست‌توده جوشانده نشده می‌باشد.

اندازه‌گیری شاخص رشد

سلول در محیط کشت سوسپانسیون (GI) (Growth index)

بمنظور اندازه‌گیری شاخص رشد وزن‌تر زیست‌توده شاهد از وزن تر زیست‌توده سوسپانسیون سلولی تحت تاثیر NaHS که چهارده روز پس از القا جمع‌آوری شده بود کسر شد و سپس تقسیم بر وزن تر زیست‌توده شاهد گردید (۲۹).

$$GI = \frac{\text{Final fresh weight} - \text{Initial fresh weight}}{\text{Initial fresh weight}}$$

سنجش آکالوئیدها

عصاره‌گیری جهت انجام HPLC روش گوباتی با اندکی تغییر انجام گرفت (۱۷). در این روش نمونه‌ها در انکوباتور و دمای ۳۵ °C خشک‌شد و تا زمان سنجش در فریزر ۸۰ °C - نگهداری شد. ۰/۲ g از وزن خشک زیست‌توده در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ ساییده‌شد و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس‌شد. پس از آن نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ °C در دستگاه اولتراسونیک قرارگرفت سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی روی شیکر با دور آرام و در دمای محیط قرارگرفت. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت آن با هدف انجام

جهت سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز (PAL) (Phenylalanine ammonialyase)، عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش حاوی بافر Tris-HCl و فنیل‌آلانین آمونیا‌لیاز افزوده‌شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری‌شد. پس از توقف واکنش با HCl، جذب نمونه‌ها در ۲۹۰nm اندازه‌گیری‌شد. فعالیت آنزیم بر اساس میکروگرم سینامات تولیدی در دقیقه به ازای هر میکروگرم پروتئین (Unit E g⁻¹ fw) محاسبه و گزارش‌شد (۱۰). برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، پس از تهیه مخلوط واکنش که شامل بافر استات، پراکسید هیدروژن و محلول بنزیدین بود، به این مخلوط عصاره آنزیمی افزوده شد و تغییرات جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ nm بررسی و مقایسه‌شد. فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم (Unit E g⁻¹ fw) به ازای یک گرم زیست‌توده بیان‌شد (۶).

محاسبه

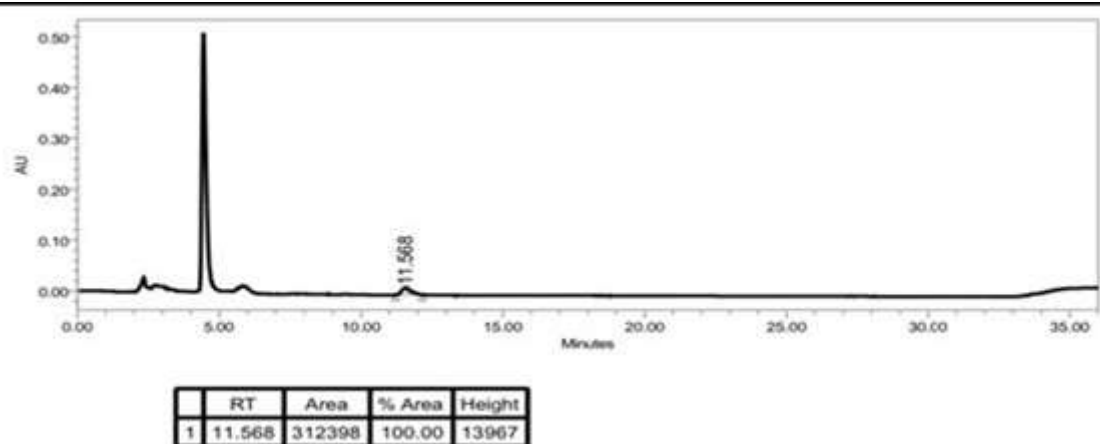
درصد زنده‌مانی سلول به روش ایونس بلو (Evans blue)

سنجش درصد زنده‌مانی سلول‌ها طی دوره کشت یک ماهه پس از القای الیستور انجام‌شد. ۲۰mg از سوسپانسیون (وزن‌تر پس از جداسازی محیط‌کشت اضافی) با ۱۸۰ μl آب‌مقطر و ۲۰ μl ایونس بلو ۰/۵٪ مخلوط‌شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با دور آرام در دمای محیط قرار داده‌شد. بعد از انکوبه‌کردن، سلول‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۳۰۰g سانتریفیوژ شد (Hettich 1195-a Sweden)، سپس رانشست خارج‌گردید و ته‌نشست ۳ بار با آب‌مقطر شسته‌شد و عمل سانتریفیوژ تکرار‌گردید تا جایی که مایع رویی بدون رنگ بدست آمد. سپس سلول‌ها در ۱/۲ ml SDS ۱٪ آسیاب گردید و به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰°C انکوبه‌شد. پس از انکوباسیون، به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و رانشست جمع‌آوری شد. برای تعیین مرگ سلول‌های سوسپانسیون سلولی، زیست‌توده به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C روی بخاری بلوک خشک (eppendrof Germany Thermomixer compact) گرما داده‌شد.

Waters996 Photodiode Array Detector) بود. پیک‌های مربوط به کانابینوئیدها در طول‌موج ۲۱۰nm شناسایی شد و از طریق برون‌یابی مبتنی بر منحنی استاندارد تعیین گردید. استاندارد اسیدهای کانابینولیک بعنوان ماده مرجع (Cerilliant®) و از شرکت Sigma-Aldrich تهیه گردید. این سنجش توسط نرم‌افزار (Milinium 32) کنترل شد و ترکیبات با استفاده از شیب‌گردان شسته شدند. سرعت جریان (Flow rate) به میزان ۱ mL/min و زمان اجرا ۴۰ دقیقه بود. ماده استاندارد با ۵ دوز مختلف تزریق شد و با این تعداد منحنی کالبراسیون رسم شد (شکل ۱).

HPLC به میکروتیوپ منتقل شد و در ۴ °C و تاریکی نگه‌داری شد.

جهت انجام سنجش HPLC، ۲۰ μl از عصاره‌ی بدست‌آمده به دستگاه (Alliance Waters 2695 Separations Module) تزریق شد. جداسازی کانابینوئیدها از طریق ستون (Knauer) Bach NO:B2090813- Column SN: EA 211) انجام شد. فاز ساکن مورد استفاده با مشخصات (25VE181ESJ 250*4.6mm) with precolumn Eurospher 100-5c18) بود و در فاز متحرک از آب و استونیتریل با نسبت ۵۰/۵۰ V/V استفاده شد. مشخصات دتکتور در این سنجش (Alltech ELSD800)



شکل ۱- منحنی استاندارد کانابینوئیدهای در گیاه شاهدانه.

جداکشت‌های برگ‌گی کشت‌شده در محیط کشت جهت کالوس‌زایی نشان‌داد که اولین توده کالوس دو هفته پس از کشت در محیط ایجاد گردید و پس از گذشت حدود سی روز کالوس‌ها رشد مناسبی داشتند. کالوس‌ها دارای بافت‌هایی بسیار فشرده در تیمار شماره نه تا بافتی ترد و شکننده در تیمار شماره هشت با طیف رنگی کرم روشن تا قهوه‌ای تیره بودند (شکل ۲). تیمار مناسب مورد استفاده از نظر بافت و رنگ کالوس جهت تهیه سوسپانسیون تیمار شماره‌ی هشت موجود در جدول ۱ بود.

آنالیز آماری داده‌ها

برای انجام آزمون‌های آماری از ضریب رگرسیون (پیرسون)، نرم‌افزار گراف‌پد و از آزمون‌های One-way ANOVA، Two-way ANOVA، ANOVA میانگین توکی و برای تجزیه واریانس و مقایسه‌ی داده‌های حاصل از آزمایش استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تیمارهای تنظیم‌کننده‌های

رشد برای تولید انواع کالوس در گیاه شاهدانه

بررسی اثر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد بر



شکل ۲-انواع کالوس‌ها براساس بافت و رنگ. **A:** جداکشت برگ **B:** کالوس‌زایی از جداکشت دمبرگ **C:** هفته‌ی دوم آغاز تشکیل کالوس بر سطح جداکشت، **D:** (2,4-D ۱mg/L), **E:** (NAA ۱mg/L), **F:** (NAA ۱mg/L + 2.4-D ۰/۵ mg/L), **G:** (NAA ۰/۱ mg/L + 2.4-D ۰/۵ mg/L), **H:** (KIN ۲mg/L + NAA ۲ mg/L), **I:** (KIN ۱ mg/L+ NAA ۱ mg/L).

نتایج تولید سوسپانسیون سلولی در گیاه شاهدانه

کالوس تشکیل‌شده در محیط‌کشت حاوی ۱mg/L 2,4-D جهت کشت سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفت. بافت این کالوس ترد و دارای رنگ کرم تیره بود. پس از آن‌که سلول‌ها به‌خوبی در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی رشد نمودند، طی چهار هفته فاکتورهای درصد زنده‌مانی، شاخص رشد و درصد سلول‌های رشدکرده در سوسپانسیون‌های بدون الیستور (شاهد) و حاوی الیستور مورد بررسی قرار گرفت. بطورکلی غلظت‌های ایمن NaHS معمولاً در محدوده ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای بسیاری از گیاهان گزارش شده‌است و معمولاً غلظت‌های بالای ۱۵۰mg/L در گیاه سمیت ایجاد می‌کند. باتوجه به اینکه هدف از این تحقیق مطالعه‌ی بهتر فیتوشیمی گیاه شاهدانه با دامنه‌ی وسیع‌تر در فضایی محدودتر و کیفیتی بهتر است

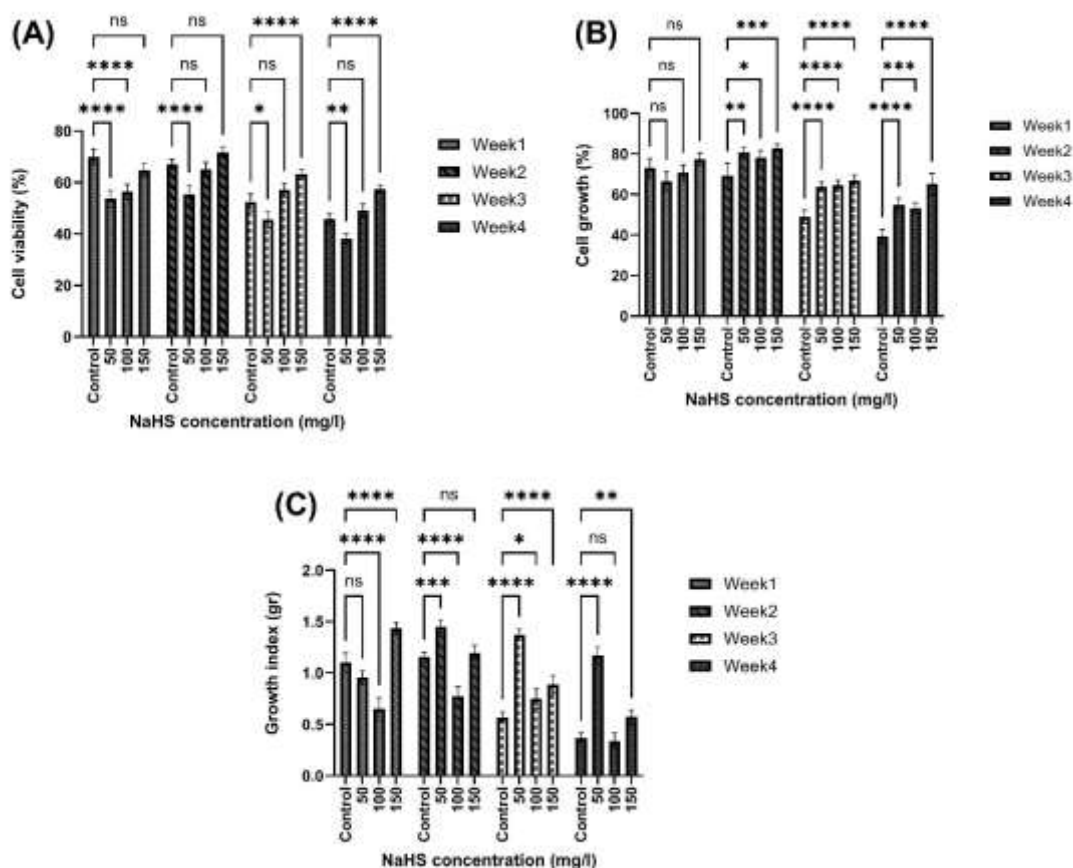
بنابراین، مسیر این پژوهش از مرحله‌ی کالوس‌زایی، کشت سوسپانسیون، سنجش فیتوشیمی و سنجش میزان کانابینوئیدها بر این مهم تمرکز داشته‌است.

همان‌طور که در شکل ۳-A مشاهده می‌شود، درصد زنده‌مانی سلول‌های سوسپانسیون گیاه شاهدانه تحت تاثیر تیمارهای سدیم هیدروژن‌سولفید، در پایان هفته‌ی دوم تیمار ۵۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد و بالاترین میزان درصد زنده‌مانی مربوط به تیمار ۱۵۰ mg/L با میانگین ۷۱/۶٪ بود که نسبت به شاهد افزایش را نشان داد و پایین‌ترین میزان این شاخص مربوط به تیمار ۵۰ mg/L و با میانگین ۵۵/۳٪ بود. در ارتباط با تاثیر الیستور سدیم هیدروژن‌سولفید بر کشت سوسپانسیون گیاه شاهدانه، از هفته‌ی دوم سنجش درصد زنده‌مانی در تیمارهای ۱۰۰mg/L

میانگین ۸۳٪ بود و پایین‌ترین میزان این شاخص مربوط به شاهد و با میانگین ۶۹٪ بود. در بررسی تاثیر تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید بر شاخص رشد گیاه شاهدانه (شکل ۳-۳)، در پایان هفته‌ی اول تیمار ۱۰۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) و ۱۵۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان‌دادند و بالاترین میزان شاخص رشد در این هفته مربوط به تیمار ۱۵۰ mg/L با میانگین ۱/۴۳ gr بود و پایین‌ترین میزان این شاخص مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L و با میانگین ۱/۶۵ gr بود.

و ۱۵۰ mg/L بهبود درصد زنده‌مانی، نسبت به شاهد حاصل‌گردید.

در پژوهش حاضر درصد سلول‌های دارای رشد (شکل ۳-۳) هم مورد بررسی قرار گرفت که باتوجه به نمودار مقایسه‌ی میانگین در پایان هفته‌ی دوم، تیمار ۵۰ mg/L ($p \leq 0.01$)، ۱۰۰ mg/L ($p \leq 0.05$) و ۱۵۰ mg/L ($p \leq 0.001$) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان‌دادند و بالاترین درصد سلول‌های رشد‌کرده مربوط به تیمار ۱۵۰ mg/L و با



شکل ۳- مقایسه‌ی درصد زنده‌مانی سلول (A)، درصد سلول‌های رشد کرده (B)، شاخص رشد (C)، سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه به مدت چهار هفته پس از اعمال تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید.

یادآوری: در تمامی گراف‌ها ستاره‌ها بیان‌گر تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد استفاده و نمونه‌ی شاهد می‌باشد.

**** ($p \leq 0.0001$):*** ($p \leq 0.001$):** ($p \leq 0.01$):* ($p \leq 0.05$)

با مطالعه‌ی نمودار مقایسه‌ی میانگین (شکل ۵-A)، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۵۰ mg/L، ۱۰۰ mg/L و ۱۵۰ mg/L (p≤0.0001) الیستور نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌است. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۱۵۰ mg/L و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۱۰۰ mg/L نسبت به شاهد مشاهده‌شد.

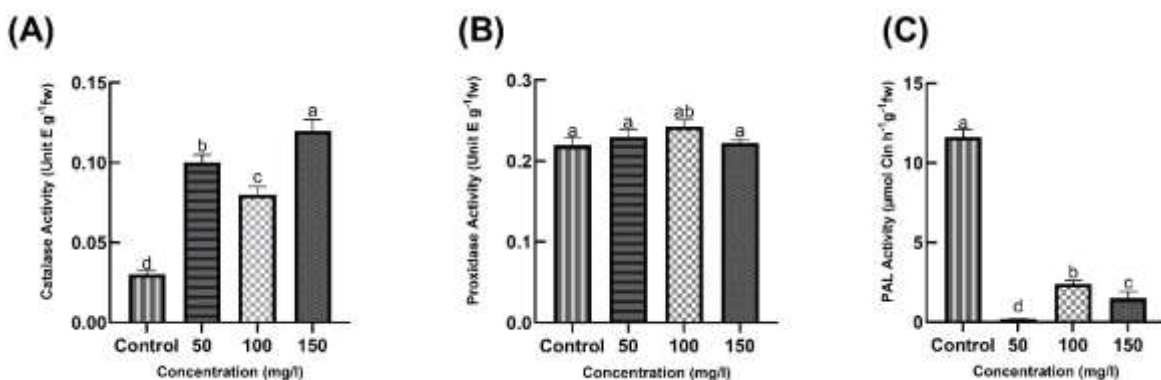
در پایان هفته‌ی دوم نیز تیمارهای ۵۰ mg/L (p≤0.001) و ۱۰۰ mg/L (p≤0.0001) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند و بالاترین میزان شاخص رشد مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L و با میانگین ۱/۴ gr بود و پایین‌ترین میزان این شاخص مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L و با میانگین ۰/۷۷ gr بود.

نتایج

سنجش فیتوشیمیایی سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه



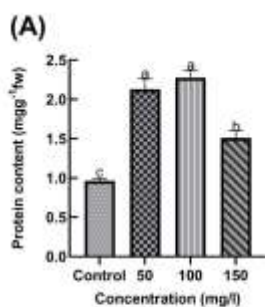
شکل ۴- سلول‌های زنده و مرده در سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه در روز چهاردهم. (سلول‌های زنده بدلیل عدم نفوذ رنگ به درون سلول به رنگ روشن و سلول‌های مرده بدلیل نفوذ رنگ به رنگ تیره دیده می‌شوند).



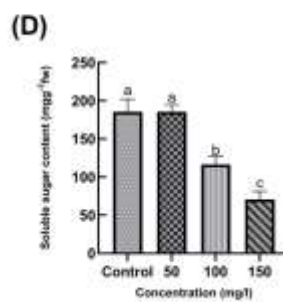
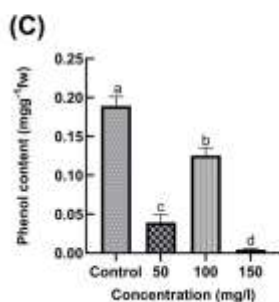
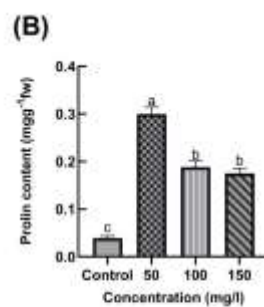
شکل ۵-مقایسه نتایج تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (A)، پراکسیداز (B) و فنیل آلانین آمونیلایز (C) سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه‌ی هندی به مدت چهار هفته پس از اعمال تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید. (حروف یکسان در هر نمودار نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد).

آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در تیمار ۱۰۰ mg/L مشاهده شد و کمترین میزان کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز مربوط به تیمار ۵۰ mg/L نسبت به شاهد بود.

مقایسه میانگین نتایج نشان داد که (شکل ۵-A) میزان پروتئین در تیمار ۵۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) و ۱۰۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) و ۱۵۰ mg/L ($p \leq 0.001$) نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌اند. بیشترین میزان پروتئین در نمونه‌های تیمار ۱۰۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید مشاهده شد و کمترین میزان پروتئین در تیمار ۱۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد بدست آمد.



در نمودار مقایسه‌ی میانگین (شکل ۵-B) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، تیمار ۱۰۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ۱۰۰ mg/L و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ۱۵۰ mg/L نسبت به شاهد مشاهده شد. با مطالعه‌ی نمودار مقایسه‌ی میانگین (شکل ۵-C) میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در تیمار ۵۰ mg/L ($p \leq 0.0001$)، ۱۰۰ mg/L ($p \leq 0.0001$) و ۱۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌است. بیشترین میزان کاهش فعالیت



شکل ۶- مقایسه نتایج میزان تغییرات پروتئین: (A)، پرولین: (B)، فنل: (C) و قند محلول: (D) سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه‌ی هندی به مدت چهار هفته پس از اعمال تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید. (حروف یکسان در هر نمودار نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد).

مربوط به تیمار ۱۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد بدست آمد.

همان‌طور که در شکل ۵-C مشاهده می‌گردد میزان فنل در تیمارهای ۵۰ mg/L ($p \leq 0.0001$)، ۱۰۰ mg/L ($p \leq 0.0001$)

مقایسه میانگین نتایج نشان داد که (شکل ۵-B) میزان پرولین تیمارهای ۵۰ mg/L، ۱۰۰ mg/L و ۱۵۰ mg/L نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌اند ($p \leq 0.0001$). بیشترین میزان پرولین در نمونه‌های تیمار ۱۰۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید مشاهده شد و پایین‌ترین میزان پرولین

نشان داد که میزان آلکالوئید CBD در زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه در تیمارهای ۵۰ mg/L (p<0.0001)، ۱۰۰ mg/L (p<0.0001) و ۱۵۰ mg/L (p<0.0001) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. بیش‌ترین میزان CBD مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۰/۴۵۶ mg100g⁻¹dw بود و کمترین میزان آلکالوئید CBD مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L با میانگین ۰/۱۴ mg100g⁻¹dw بود که نسبت به شاهد ۶۹/۴٪ کاهش داشت. هم‌چنین میانگین حاصل از نتایج نشان داد که میزان آلکالوئید THC در زیست‌توده سوسپانسیون مورد مطالعه در تیمارهای ۵۰ mg/L (p<0.0001)، ۱۰۰ mg/L (p<0.0001) و ۱۵۰ mg/L (p<0.0001) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. بیش‌ترین میزان THC مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۰/۲۲ mg100g⁻¹dw بود و کمترین میزان آلکالوئید THC مربوط به تیمار ۵۰ mg/L با میانگین ۰/۰۴۵ mg100g⁻¹dw بود که نسبت به شاهد ۷۹/۶٪ کاهش داشت. بنابراین الیستور سدیم هیدروژن‌سولفید در تمام تیمارهای مورد استفاده سبب افزایش میزان آلکالوئیدهای CBD و THC نسبت به شاهد نگردید و طبق نتایج این پژوهش این الیستور با این غلظت، محرک خوبی بمنظور القای تولید آلکالوئیدهای موجود در زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه شناخته‌نشده.

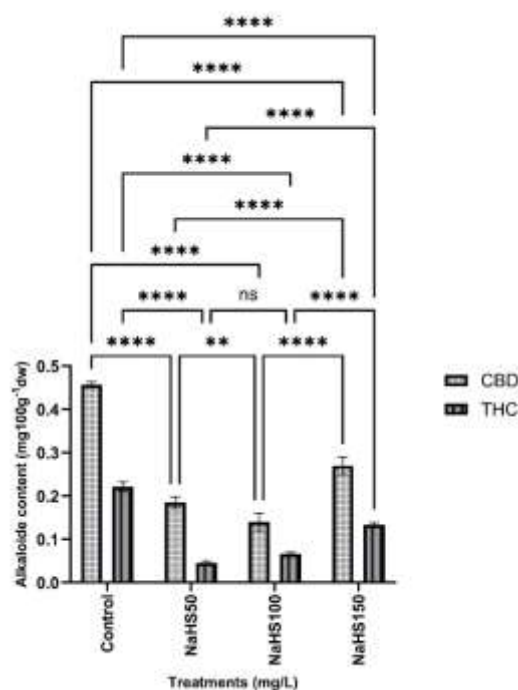
با هدف بررسی تاثیر الیستور سدیم هیدروژن‌سولفید بر زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه، در شرایط شاهد (شکل ۸-۸) آنزیم کاتالاز با کاهش میزان آلکالوئید CBD و نسبت آلکالوئید CBD به آلکالوئید THC دارای همبستگی مثبت بود. این آنزیم با کاهش میزان آلکالوئید THC همبستگی منفی داشت. در ارتباط با تاثیر سدیم هیدروژن‌سولفید بر زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه (شکل ۸-۸)، همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

شناخت گیاهان دارویی و ویژگی بیوشیمیایی آن‌ها، گام‌های

و ۱۵۰ mg/L (p<0.0001) نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌اند. بیشترین میزان فنل در تیمار ۱۰۰ mg/L مشاهده شد و کمترین میزان فنل مربوط به تیمار ۱۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد مشاهده شد.

مقایسه میانگین نتایج نشان داد که (شکل ۵-D) میزان قند محلول در تیمار ۱۰۰ mg/L (p<0.001) و ۱۵۰ mg/L (p<0.0001) نسبت به شاهد تفاوت معناداری داشته‌اند. بیشترین میزان قند محلول در نمونه‌های تیمار ۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید مشاهده شد و کمترین میزان پروتئین تیمار ۱۵۰ mg/L سدیم هیدروژن‌سولفید نسبت به شاهد مشاهده شد.



شکل ۷- مقایسه‌ی نتایج میزان آلکالوئیدهای CBD و THC در زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه تحت تاثیر تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید.

یادآوری: در تمامی گراف‌ها ستاره‌ها بیان‌گر تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد استفاده و نمونه‌ی شاهد می‌باشد.

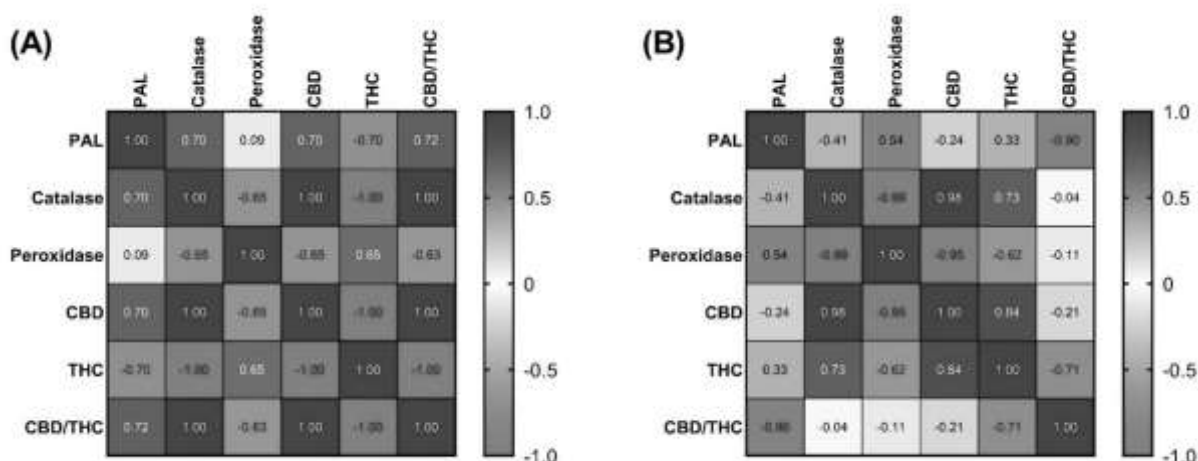
**** (p<0.0001); *** (p<0.001); ** (p<0.01); * (p<0.05)

مقایسه‌ی میانگین حاصل از نتایج سنجش HPLC (شکل ۷)

سوسپانسیون گیاه گوجه‌فرنگی اثرات مثبت غلظت بالای 2,4-D (۱-۲ mg/L) بر القای سریع سلول‌ها در کشت سوسپانسیون این گیاه گزارش شده‌است (۲۶). در مطالعه‌ای مشابه در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه، از جداکشت‌های برگ و دم‌برگ جهت تولید کالوس مورد نیاز استفاده نمود. وی در تحقیق خود با استفاده از ترکیب ۱ mg/L بنزیل‌آدنین (BA) (Benzyl adenine) و ۰/۲ mg/L نفتالین‌استیک اسید (NAA) (Naphthaleneacetic acid) بالاترین میزان کالوس را بدست‌آورد و سپس از کالوس‌های تولیدشده جهت کشت سوسپانسیون سلولی بهره‌برد (۱۳). در مطالعات کشت‌بافت صورت‌گرفته در گیاه شاهدانه اثر تیمارهای مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر جداکشت برگ و هیپوکوتیل مورد بررسی قرارگرفت و بیشترین حجم کالوس تولیدشده در غلظت ۱/۱ mg/L 2,4-D در ترکیب با ۱/۵ mg/L BAP در جداکشت برگ و کمترین حجم کالوس مربوط به جداکشت هیپوکوتیل در استفاده از تیمار هورمونی ۲ mg/L NAA به همراه ۱/۵ mg/L BAP بدست‌آمد (۴). بهترین کالوس مورد نیاز خود جهت کشت سوسپانسیون گیاه *Cannabis sativa* را با استفاده از ۱ mg/L 2,4-D تهیه نمود (۲۷).

اساسی جهت بهره‌برداری بهینه از ترکیبات و خواص دارویی آن‌ها را فراهم می‌کند (۲).

گیاهان دارویی در هر قسمت از جمله ریشه، ساقه، گل، میوه، برگ و دانه دارای مقادیر زیادی مولکول‌های فیتوشیمیایی هستند و این مولکول‌ها نقش مهمی در تولید داروهای جدید دارند. تولید گیاهان دارویی و مولکول‌های فعال زیستی آن‌ها با روش‌های بیوتکنولوژیکی مزایای بسیاری نسبت به روش‌های تولید کلاسیک دارد و کشت سوسپانسیون سلولی یکی از این تکنیک‌های کاربردی می‌باشد (۱۸). در این تحقیق استفاده از جداکشت برگ بدلیل تکثیر سریع سلول‌ها، آلودگی کمتر، تنوع ژنتیکی و سازگاری بهتر با محیط کشت گزینه مناسبی بود. تیمار هورمونی مورد استفاده در باززایی کالوس جهت تهیه سوسپانسیون از جداکشت اهمیت دارد و مقایسه تیمارهای هورمونی مورد استفاده از لحاظ تولید کالوس مناسب جهت دستیابی به کشت سوسپانسیون نشان‌داد که تیمار ۱ mg/L 2,4-D مناسب‌ترین بافت کالوس را بمنظور تولید سوسپانسیون ایجادکرد زیرا کالوس‌های که دارای بافتی ترد و شکننده، سوسپانسیونی هموزن تولیدنموده و بنابراین تیمار مورد استفاده یکنواخت اعمال‌گردید (۳۳). در بررسی تاثیر تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کشت



شکل ۸- همبستگی عوامل فیزیولوژیک و میزان کاناบินوئیدها در زیست‌توده سوسپانسیون گیاه شاهدانه در شرایط شاهد (A) و تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید (B).

در شرایط تاریکی، تهویه سلول‌ها و میزان اکسیژن بسیار حائز اهمیت است. بنابراین می‌توان با توجه به اینکه سدیم هیدروژن‌سولفید در غلظت‌های ذکرشده از هفته‌ی دوم توانسته میزان زنده‌مانی سلول را نسبت به شرایط شاهد بهبود بخشد می‌تواند نقش مهمی در مقابله با تنش اکسیداتیو احتمالی ایجاد شده در سوسپانسیون سلولی مورد مطالعه ایفا کند. در گذشته سولفید هیدروژن (H_2S) بعنوان ترکیبی سمی برای گیاهان شناخته می‌شد، اما در حال حاضر بدلیل عملکردهای متنوع آن در تنظیم جنبه‌های مختلف رشد گیاهان، بعنوان یک سیگنال‌دهنده قابل توجه در نظر گرفته می‌شود (۳۶). در ارتباط با درصد سلول‌های رشد یافته در این پژوهش نیز از هفته‌ی دوم افزایش رشد سلولی نسبت به شاهد مشاهده شد. سلول‌های گیاهی در سوسپانسیون ممکن است به مرحله رشد فعال برسند و تقسیم‌سلولی بیشتری را تجربه کنند. این تقسیم سلولی منجر به افزایش درصد سلول‌های رشد کرده می‌شود. همچنین بهینه‌سازی عواملی مانند حرارت، رطوبت، محیط کشت و ترکیب غذایی می‌تواند رشد سلول‌ها را تحت تأثیر قرارداد و افزایش درصد سلول‌های رشد کرده را تسریع کند. در طول دو هفته اول، سلول‌هایی که توانایی رشد و تقسیم بیشتری دارند، ممکن است به برتری در محیط کشت برسند و تعداد آن‌ها افزایش یابد، که در نتیجه درصد سلول‌های رشد کرده افزایش می‌یابد. در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum* L.) استفاده از تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید بطور قابل توجهی درصد بقای سلول‌های کشت شده در سوسپانسیون این گیاه که تحت تنش گرمایی بودند و توانایی رشد مجدد پس از تنش گرمایی افزایش داد تجمع مالون دی آلدئید (MDA) را کاهش داد (۲۴).

در ارتباط با مطالعه فیتوشیمی تأثیر سدیم هیدروژن‌سولفید بر کشت سوسپانسیون گیاه شاهدانه میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش داشتند در حالی که میزان PAL نسبت به شاهد کاهش نشان داد. کاتالاز و پراکسیداز آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه گونه‌های فعال

اکسیژن (ROS) در سلول‌های گیاهی نقش دارند. آن‌ها نقش مهمی در سم‌زدایی ترکیبات مضر و محافظت از سلول‌ها از آسیب اکسیداتیو دارند. از سوی دیگر PAL یک آنزیم درگیر در مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشد که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف از جمله ترکیبات فنلی می‌شود. هنگامی که سلول‌های گیاهی تحت تأثیر فشار و یا آسیب قرار می‌گیرند، مانند آسیب مکانیکی، پاتوژن‌ها و یا عوامل محیطی، اغلب با افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز پاسخ می‌دهند. این افزایش بخشی از مکانسیم دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو است. ROS می‌تواند در سلول‌های گیاهی تحت شرایط تنش انباشته شود و کاتالاز و پراکسیداز به تجزیه این ROS به ترکیبات بی‌ضرر کمک می‌کند و در نتیجه آسیب اکسیداتیو سلول‌ها را کاهش می‌دهد. در مقابل فعالیت PAL ممکن است در کشت سوسپانسیون سلولی تحت شرایط تنش کاهش یابد. کاهش فعالیت PAL اغلب با کاهش مسیر فنیل‌پروپانوئید همراه است. این مسیر مسئول سنتز متابولیت‌های ثانویه مختلف از جمله لیگنین، فلاونوئیدها و فیتوالکسین‌ها است که در پاسخ دفاعی سلول نقش دارند. در شرایط تنش‌زا، سلول ممکن است به‌جای سرمایه‌گذاری در تولید متابولیت‌های ثانویه منابع را به سمت مکانسیم‌های دفاعی فوری، مانند حذف ROS، الویت‌بندی کند. در نتیجه فعالیت PAL ممکن است به منظور هدایت منابع متابولیک به سمت سایر فرآیندهای مرتبط با دفاع گیاه کاهش یابد. کاربرد سدیم هیدروژن‌سولفید با افزایش متابولیت‌های ثانویه، تنظیمات اسمزی، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر منفی آبیاری کم را بر صفات رشد گیاه تاج‌خروس (*Amaranthus tricolor*) کاهش می‌دهد (۳۱). سدیم هیدروژن‌سولفید بعنوان دونه‌سولفید هیدروژن یک مولکول سیگنال‌دهنده جدید است که در رشد و نمو گیاهان و پاسخ آن‌ها به شرایط تنش نقش دارد (۲۵). در گیاه کدوسبز (*Cucurbita pepo* L.) تحت تأثیر تنش نیکل محلول‌پاشی با NaHS (۱۰۰ میکرومولار) و $CaCl_2$ (۱۵ میلی مولار) به‌تنهایی یا ترکیبی پارامترهای رشد و محتوای کلروفیل a، b و

بیان‌ژن، سلول‌های گیاهی را مختل می‌کند و منجر به کاهش رشد، کلروز، نکروز و استرس اکسیداتیو می‌شود (۴۱). با این حال، می‌تواند بعنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده در گیاهان عمل کند و پاسخ آن‌ها به تنش‌های مختلف را در مقادیر کم تعدیل نماید (۷)

سدیم هیدروژن‌سولفید سبب کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، افزایش عملکرد آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز گردیده و سبب از بین رفتن گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود که تمام این‌ها پایداری غشای سلولی را حفظ می‌کند (۲۰) که این گزارش با پژوهش انجام‌گرفته مطابقت دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان‌دهنده افزایش شدید میزان پرولین در شرایط استفاده از الیستور سدیم هیدروژن‌سولفید می‌باشد. پرولین در گیاهان بعنوان یک ماده تنظیم‌اسمزی برای مقاومت در برابر تنش خارجی، هنگامی که گیاهان تحت تنش غیرزیستی قرار می‌گیرند به سرعت تجمع می‌یابد و در نتیجه آسیب ناشی از تنش را کاهش می‌دهد (۴۰) در پژوهش صورت‌گرفته کاهش میزان فنل نسبت به شاهد بدست آمد که این امر می‌تواند در تولید میزان متابولیت‌های مورد مطالعه موثر باشد. ترکیبات فنلی معمولاً به واکنش‌های دفاعی در گیاه مربوط می‌شوند. با این حال، متابولیت‌های فنولیک نقش مهمی در سایر فرآیندها از جمله پیش‌ساز متابولیت‌های ثانویه دارد (۲۶). با مطالعه تاثیر سدیم هیدروژن‌سولفید بر کشت سوسپانسیون گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba L.*) محققان به این نتیجه رسیدند که تیمار دوز بالای این الیستور (۳mM) به مدت ۷ روز سبب کاهش رشد سلول‌ها می‌گردد درحالی‌که تیمار سلول‌ها با دوز پایین (۱mM) و به مدت یک روز سبب افزایش آلکالوئیدهای این گیاه می‌گردد. این نتیجه با نتایج ذکرشده در این پژوهش جهت تولید آلکالوئیدهای گیاه شاهدانه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی مطابقت نداشت (۲۸). در تحقیقات انجام‌شده در ارتباط با تاثیر سدیم هیدروژن‌سولفید بر گیاه کلم (*Brassica oleracea*) به این نتیجه دست یافتند که سطوح پایین تیمار

کاروتنوئیدها را در شرایط بدون تنش و تنش نیکل بهبود بخشید. محلول‌پاشی برگ با NaHS و $CaCl_2$ و به‌ویژه کاربرد ترکیبی آنها باعث کاهش تجمع نیکل در ریشه و اندام‌هوایی، کاهش جذب نیکل و مقادیر فاکتور جابجایی در گیاهان و افزایش فعالیت کاتالاز در برگ‌ها شد. محلول‌پاشی با NaHS باعث بهبود هموستاز مواد مغذی درشت و ریز (K, P, N, Ca, Mg, Fe) و در ریشه و اندام‌هوایی، افزایش محتوای پروتئین کل و افزایش فعالیت نترات‌ردوکتاز شد. بنابراین در این شرایط سدیم هیدروژن‌سولفید نه تنها استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد، بلکه به حفظ هموستاز مواد مغذی و کارایی متابولیسم نیتروژن در گیاهان کمک می‌کند (۳۵).

تیمار با NaHS همچنین منجر به القای وابسته به دوز فنیل‌آلانین آمونیلایز، تولید اسیدهای فنولیک (اسید سینامیک، اسید کوماریک، اسید فرولیک، اسید کافئیک و اسید سالیسیلیک) و تجمع اکتوژید می‌شود که در نهایت منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه *Scrophularia striata* می‌شود. تعدیل محتویات قندهای محلول شامل گلوکز، مانوز و رامنوز/گزیلوز، پس از تیمار با NaHS رخ داد که احتمالاً بدلیل فعالیت بیولوژیکی و اثرات ساختاری، تحمل گیاه را افزایش می‌دهد (۲۳). گزارش شده‌است که تیمار پس از برداشت با H_2S از رسیدن و پیری میوه‌های اقلیمی و غیراقلیمی جلوگیری می‌کند. این اثرات به کاهش تجمع ROS و افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، احتمالاً به مهار سنتز اتیلن و/یا سیگنال‌دهی، تعدیل متابولیسم قند و کنترل فرآیندهای اتوفاژیک نسبت داده می‌شود (۴۲). وجود آنتی‌اکسیدان‌ها جهت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن و جمع‌آوری اکسیژن یکتایی به جهت جلوگیری از تخریب سلول امری حیاتی است تا از ایجاد اختلال در روند فعالیت سلول‌ها، جلوگیری کند (۱).

H_2S در دوزهای بالا تعادل یونی، تنفس میتوکندری و

باعث افزایش کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، فنل کل و سینینگرین در گیاه شد (۳۲).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش تاثیر سه تیمار سدیم هیدروژن‌سولفید بر فاکتورهای فیتوشیمی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در سوسپانسیون سلولی گیاه شاهدانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد زنده‌مانی سلول از هفته دوم در تیمار ۱۰۰ mg/L و ۱۵۰ mg/L نسبت به شاهد افزایش داشت. هم‌چنین میزان آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در تمامی تیمارهای مورد استفاده نسبت به شاهد کاهش داشت که بدلیل ایجاد

منابع

- آرمند، ن، مروتی، ح. ۱۴۰۱. ارزیابی فعالیت آنتی باکتریال، آنتی‌قارچی، آنتی‌اکسیدانی و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه دارویی *Narcissus tazetta* L. بومی بهبهان. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۵، شماره ۴، ۱۴۰۱.
- آروین، پ، فیروزه، ر. ۱۴۰۲. بررسی فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه، برگ و میوه گیاه کور (*Capparis spinosa* L.) در دو رویشگاه در استان خراسان شمالی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۶، شماره ۴، ۱۴۰۲.
- Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiol.* 1985 Jul;78(3):438-41. doi: 10.1104/pp.78.3.438. PMID: 16664262; PMCID: PMC1064755.
- Darigh, F., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O., Ebadi, M. 2022. Non-thermal plasma improved callogenesis performance and elicited the production of cannabinoids by modifying DNA methylome, expression of WRKY1 and ERF1B transcription factors, and expression of genes that contributed to the biosynthesis of cannabinoids.
- Dhindsa, RS., Dhindsa, PP., Thorpe TA. 1981. Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase, *Journal of Experimental Botany*, Volume 32, Issue 1, February 1981, Pages 93–101.
- Ferreira, I. 2018. Studies on the development of callus cultures of *Cannabis sativa* L. regarding. Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
- Francisco, J. Corpas José, M. Palma. 2020. H₂S signaling in plants and applications in agriculture. *Journal of Advanced Research* 24 (2020) 131–137.
- Fu, X., Liu, Sh., van Velzen, R., Stull, G., Tian, Q., Li, Y., Ryan A., Robert F., Guralnick, Heather R., Jian-Jun
- ایرانبخش، ع، اوراقی اردبیلی، ز، ۱۳۹۳. اصول، مفاهیم و روش‌های آزمایشگاهی در زیست‌شناسی گیاهی.
- موحدی، م، قاسمی عمران، و، ترابی، س، ۱۳۹۵. کالوس‌زایی و اندام‌زایی گیاه دارویی شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) در شرایط درون شیشه‌ای. دو ماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۳۲ شماره ۵، ص ۷۶۹-۷۵۸.
- Abedini, M., Iranbakhsh, A., Saadatmand, S., Ebadi, M., Oraghi Ardebili, Z. 2024 Low UV radiation influenced DNA methylation, gene regulation, cell proliferation, viability, and biochemical differentiation in the cell suspension cultures of *Cannabis indica* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 254, 2024, 112902, ISSN 1011-1344.
- Abeles FB. and Biles CL., 1991, Characterization of Peroxidases in Lignifying Peach Fruit Endocarp, *Plant Physiol.* (1991) 95, 269-273, DOI: 10.1104/pp.95.1.269.
- Arif, Y., Hayat, Sh., Yusuf, M., Bajguz, A. 2021. Hydrogen sulfide: A versatile gaseous molecule in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 158, 2021, Pages 372-384, ISSN 0981-9428.
- Arya, S.S., Rookes, J.E., Cahill, D.M., Lenka, S.K. 2020. Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories. *Biotechnol. Adv.* 2020, 45, 107635.
- Bates LS., Walrow, RP. and Teare ID., 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-208.
- Beaudoin-Eagan LD, Thorpe, TA. 1985. Tyrosine and Phenylalanine Ammonia Lyase Activities during Shoot

- Jin, K., Li, ZH., Soltis, D., Soltis, P., g Yi, T. 2023. Phylogenomic analysis of the hemp family (*Cannabaceae*) reveals deep cyto-nuclear discordance and provides new insights into generic relationships. 2 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Month 2022 | Volume 00 | Issue 00 | 1–21.
16. Gandra, J., Patel, H.K., Kumar, S.A., Doma, M., Deepthi, Y., Bhalothia, P., Jalaja, N., Chimakurthy, J., Polavarapu, R., Katam, R. 2020. Metabolomic and proteomic signature of *Gloriosa superba* leaves treated with mercuric chloride and phenylalanine, a precursor of colchicine alkaloid. *Ind. Crops Prod.* 2022, 178, 114557.
17. Gabotti, D., Locatelli, F., Cusano, E., Baldoni, E., Genga, A., Pucci, L., Consonni, R., Mattana, M. 2019. Cell Suspensions of *Cannabis sativa* (var. Futura): Effect of Elicitation on Metabolite Content and Antioxidant Activity. *Molecules* 2019, 24, 4056.
18. Güner, B.Ç. 2024. Genome Engineering in Medicinal Plants for Improved Therapeutics. In Applications of Genome Engineering in Plants, S.K. Upadhyay (Ed.).
19. Hall, W., Hoch, E., Lorenzetti, V. 2019. Cannabis use and mental health: risks and benefits. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* (2019) 269:1.
20. Hu, K. D., Wang, Q., Hu, L. Y., Gao, S. P., Wu, J., Li, Y. H., 2014. Hydrogen sulfide prolongs postharvest storage of fresh-cut pears (*Pyrus pyrifolia*) by alleviation of oxidative damage and inhibition of fungal growth. *PLoS One* 9: e85524.
21. Iranbakhsh, A., Ardebili, Z. Ardebili, N., Ghoranneviss, M., Safari, N. 2018. Cold plasma relieved toxicity signs of nano zinc oxide in Capsicum annum cayenne via modifying growth, differentiation, and physiology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(8):154.
22. Jin, J-J., Yang, M-Q., Fritsch P.W., van Velzen R., Li D-Z., Yi T-S. 2020. Born migrators: Historical biogeography of the cosmopolitan family *Cannabaceae*. *Journal of Systematics and Evolution* 58: 461–473.
23. Khodamoradi, S., Sagharyan, M., Samari, E., Sharifi, M., Changes in phenolic compounds production as a defensive mechanism against hydrogesulfide pollution in *Scrophularia striata*, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 177, 2022, Pages 23-31.
24. Li, Zh., Gong, M., Xie, H., Yang, L., Li, J. 2011. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin, *Plant Science*, Volumes 185–186, 2012, Pages 185-189.
25. Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., Chen, S. 2016. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 2016 Oct 15;21(10):1374.
26. Lin, C., Hsu, C., Yang, L., Lee, L., Fu, J., Cheng, Q., Wu, F., Hsiao, H.C., Zhang, Y., Zhang, R. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1295-1310.
27. Lidoy Logoño, J. 2014. In vitro cell culture of *Cannabis sativa* for production of cannabinoids. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
28. Lu, JI., Hu, Yc., Chen, Y. 2024. Hydrogen sulfide promoted cell differentiation, antioxidant ability, and flavonoids accumulation in *Ginkgo biloba* L. suspension cells. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 156, 36 (2024).
29. Manaf, H. Rabie, K., Abd El-Aal, M. 2016. Impact of UV-B radiation on some biochemical changes and growth parameters in *Echinacea purpurea* callus and suspension culture. *Annals of Agricultural Sciences* Volume 61, Issue 2, December 2016, Pages 207-216.
30. Rudo Ngara, N., Ndimba, B. 2011. Mapping and characterisation of the sorghum cell suspension culture secretome. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (2), pp. 253-266.
31. Oraee, A., tehranifar, A. 2022. Effect of sodium hydrosulfide on physiological and morphological traits of *Amaranthus tricolor* under deficit irrigation. *Plant Process and Function*
32. Rahmatullah, J., Asaf, S., Numan Lubna, M., Kim, K. 2021. Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions *Agronomy* 11, no. 5: 968.
33. Ribeiro, I. G., Castro, T. C. de., Coelho, M. G. P., Albarello, N. 2021. Effects of different factors on friable callus induction and establishment of cell suspension culture of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *Rodriguésia*, 72, e00102020.
34. Solís-Ramos, L.Y., Carballo, L.M., Valdez-Melara, M. 2013. Establishment of cell suspension cultures of two Costa Rican *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 2013, 61, 1095–1107.
35. Valivand, M., Amooghaie, R. 2021. Foliar spray with sodium hydrosulfide and calcium chloride advances dynamic of critical elements and efficiency of nitrogen metabolism in *Cucurbita pepo* L. under nickel stress, *Scientia Horticulturae*, Volume 283, 2021, 110052, ISSN 0304-4238.
36. Verma, T., Bhardwaj, S., Kapoor, D., Singh, J. 2024. Is H₂S a lead or supporting player in plant development and growth? ISBN 9780323990356,
37. Wang, JW., Wu, JY. 2013. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013; 134:55-89.
38. Wardill, H.R., Wooley, L.T., Bellas, O.M. 2023. Supporting gut health with medicinal cannabis in people with advanced cancer: potential benefits and challenges. *Br J Cancer*.

39. Wen, D., Guo, Q., Zhao, W. 2023. Effect and mechanism of NaHS on tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Sci Rep* 13, 2462 (2023).
40. Zhang, P., Chao, R., Qiu, L., Ge, W., Liang, J., Wen, P. 2024. *ChaWRKY40* Enhances Drought Tolerance of 'Dawei' Hazelnuts by Positively Regulating Proline Synthesis. *Forests* 15, no. 3: 407.
41. Zhou, M., Zhang, J., Shen, J., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C. 2021. Hydrogen sulfide-linked persulfidation of ABI4 controls ABA responses through the transactivation of MAPKKK18 in arabidopsis. *Mol. Plant* 14, 921–936.
42. Ziogas, V., Molassiotis, A., Fotopoulos, V., Tanou, G. 2018. Hydrogen sulfide: a potent tool in postharvest fruit biology and possible mechanism of action. *Front Plant Sci* 9: 1–9.
41. Zhou, M., Zhang, J., Shen, J., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C. 2021. Hydrogen sulfide-linked persulfidation

The effect of Sodium HydrogenSulfide (NaHS) on some phytochemical characteristics and the production of THC and CBD alkaloids in the cell suspension culture of *Cannabis indica*.

Abedini M.¹, Iranbakhsh A.R.¹, Saadatmand S.¹, Ebadi M.² and Oraghi Ardebili Z.³

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

² Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, I.R. of Iran.

³ Department of Biology, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, I.R. of Iran.

Abstract

Cannabis indica is recognized for its medicinal properties, particularly due to its secondary metabolites like cannabinoids. This study explored the use of cell suspension culture technology to identify, produce, and extract these compounds. It specifically examined the impact of sodium hydrogen sulfide (NaHS), a hydrogen sulfide donor, on cell suspension cultures of hemp. The research involved treating callus cultures with varying NaHS concentrations (50, 100, and 150 mg/L) and assessing their effects on phytochemical traits and cannabinoid production, particularly Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol. Results showed that NaHS treatment elevated the levels of enzymes such as catalase, peroxidase, and proline, while decreasing phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds compared to control groups. Protein and soluble sugar levels increased, except in the 50 mg/L treatment. Cell growth rates improved from the second week onward, with 100 mg/L and 150 mg/L treatments enhancing cell survival rates. However, the alkaloid levels did not increase relative to controls. Overall, the study concluded that sodium hydrogen sulfide mitigates growth-inhibiting factors like reactive oxygen species (ROS), reducing oxidative damage. This leads to an increase in defensive compounds, such as proline and antioxidant enzymes, helping hemp cells better withstand stress conditions in cell suspension culture. Thus, NaHS shows potential in optimizing the production of valuable cannabinoids from *Cannabis indica* through enhanced cellular resilience and metabolic activity.

Keywords: sodium hydrogen sulfide, tetrahydrocannabinoid acid, cannabidol, cellular suspension, *cannabis indica*