بررس خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون شیشه‌ای

خدیجه کیارستمی* و نسیم مصفا

تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia Mill*) به تیره نعناعیان (Lamiaceae) تعلق دارد. این گیاه بومی منطقه مدیترانه است و در بسیاری از نقاط دنیا به عنوان گیاه دارویی و زینتی کشت می شود. این گیاه حاوی ترکیباتی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. این پژوهش با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید در کالوس‌های حاصل از برگ در محیط پایه MS در حضور غلظت‌های مختلف NAA (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و BAP (۱،۲،۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) اندازه گیری شدند. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Ic_{50}:۹/۵۰۶±۰/۴۶۷ µg/ml) و بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۰۹۴۸±۰/۰۰۹ mg/gDW) و رزمارینیک اسید (۲۷/۸۶۷±۰/۰۸۶ µg/gDW) در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۴ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. کالوس‌های حاصل در این محیط از وزن بیشتری هم برخوردار بودند. به‌طوری‌که از نظر میزان ترکیبات فنلی تفاوت چندانی بین محیط‌های مختلف مشاهده نشد. بنابراین کشت بافت گیاه اسطوخودوس می‌تواند منبعی با توانایی تولید بالا از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی باشد.

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس، کشت در شیشه، آنتی‌اکسیدان، رزمارینیک اسید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲، پست الکترونیکی:su_kiarostami@yahoo.com

مقدمه

در اثر عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد در داخل بدن و مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی بیوشیمیایی تنش اکسیداتیو ایجاد می شود. حضور رادیکال های آزاد به خصوص پراکسید ها در ایجاد بیماری هایی مانند سرطان، دیابت، اختلالات عصبی و ریوی نقش کلیدی دارد و موجب پیری زود هنگام می شود.

در اثر اکسیداسیون مواد غذایی چرب در حضور عوامل محیطی طعم، رنگ و بوی ماده غذایی تغییر می کند (۸ و ۳۷). روش معمول حفاظت از لیپیدها افزودن آنتی‌اکسیدانهاست (۱۳). به منظور حفظ کیفیت مواد غذایی و افزایش طول عمر نگهداری آنها، از آنتی اکسیدان های طبیعی یا سنتزی استفاده می شود. متداولترین آنتی اکسیدان های سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیسول (butylhydroxyanisole (BHA)) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (butylhydroxytoluene (BHT)) هستند. مصرف طولانی مدت و دوز بالای این ترکیبات منجر به آسیب به اندام های بدن و القای تشکیل تومور می شود (۲۳و۳۶). امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که از گیاهان و ادویه جات بدست می آیند به طور گسترده ای ارزیابی می شوند و اعتقاد بر این است که آنتی اکسیدان های طبیعی اثرات جانبی کمتری دارند (۱۲،۹ و۳۲).

تعدادی از ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی به عنوان فرآورده های ثانوی توسط گیاهان ساخته می شود. از

مهمترین این ترکیبات می توان به کاروتنوئیدها، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی اشاره کرد.

ترکیبات فنلی گروه وسیعی از متابولیت های ثانوی را تشکیل می دهند که در گیاهان نقش های متعددی را به عهده می گیرند. ازجمله این نقش ها می توان به خواص هورمونی، دارویی و آنتی اکسیدانی آنها اشاره کرد. آنتی اکسیدان های فنلی رایج شامل توکوفرول ها، فلاوونوئیدها، کومارین ها، مشتقات سینامیک اسید، چالکون‌ها، دی‌ترپن‌های فنلی و اسیدهای فنلی هستند. این ترکیبات از بافت ها، DNA و RNA در برابر صدمه اکسیداتیو گونه های فعال اکسیژن محافظت می کنند. رزمارینیک اسید نیز یک ترکیب فنلی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که در گیاهان تیره های گاوزبان (Boraginaceae) و نعناعیان (Lamiacea) یافت می شود (۲۲). رزمارینیک اسید خواص ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد آلرژی دارد و در گیاهان به عنوان یک متابولیت دفاعی عمل می کند (۴۱).

فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی به طرق مختلف صورت می گیرد که ازجمله آنها می توان به جاروب کردن رادیکال های آزاد، دادن هیدروژن، جمع آوری اکسیژن یکتایی و همبند نمودن یون ها اشاره کرد (۳۵). البته بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان ارتباط مستقیمی وجود دارد (۱و۲).

با توجه به مقدار کم ترکیبات آنتی اکسیدانی در گیاه کامل، اثر عوامل محیطی بر تولید این ترکیبات، دسترسی محدود به منابع طبیعی (گونه های کمیاب و در حال انقراض) و شرایط دشوار کشت مزرعه ای، روش کشت در شیشه روش جایگزینی برای تولید متابولیت های ثانوی و ازجمله ترکیبات آنتی اکسیدانی است (۲۶). استخراج و خالص سازی آسان، وابسته نبودن به عوامل آب و هوایی و فصلی، کنترل بیشتر مسیر های بیوسنتزی برای دستیابی بیشتر به ترکیبات شیمیایی مطلوب، چرخه های تولید انعطاف پذیر و مختصر (۳۹) از مزایای این روش هستند.

در بین گیاهان حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان، گیاهان تیره نعناعیان بیشترین سهم را به خود اختصاص داده و حتی ترکیبات موجود در این منابع می توانند به صورت مدل هایی برای ساخت ترکیبات سنتزی به کار بروند.

اسطوخودوس یکی از گیاهان متعلق به تیره نعناعیان است که در درمان سوختگی و تسکین نیش حشرات، آسم، رماتیسم، نقرس و آرتروز نقش دارد و در طب سنتی به عنوان آرام بخش و کمک به هضم غذا به‌کار می رود. ترکیبات سازنده این گیاه شامل روغن اسانسی، مشتقات کومارین، تری ترپن ها، تانن ها و فنیل کربوکسیلیک اسیدهایی از قبیل رزمارینیک اسید است (۱۱). در سال های اخیر این گیاه به دلیل خواص آنتی اکسیدانی خود مورد توجه واقع شده است ولی اطلاعات محدودی در این زمینه وجود دارد (۱۱،۱۷و۱۹).

تولید آنتی اکسیدان ها و رزمارینیک اسید به روش کشت درون شیشه ای و از طریق کشت تعلیقی در گیاهان مختلف از قبیل حسن یوسف (*Coleus blume*i)، نعناع (*Mentha* spp.)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، مریم گلی (*Salvia* spp.) و اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*) بررسی شده است (۷،۳۱،۱۰و ۴۲). تولید رزمارینیک اسید با استفاده از کشت سلول به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است. EL-Naggar مقدار رزمارینیک اسید را در برگ ها و کالوس های ۵ ژنوتیپ مختلف اکلیل کوهی اندازه گرفت. وی دریافت بین ژنوتیپ ها از نظر تولید رزمارینیک اسید تفاوت وجود دارد (۱۶). همچنین محیط پایه WPM (Woody Plant Medium) برای تولید آنتی اکسیدان ها و رزمارینیک اسید در گیاه اکلیل کوهی نسبت به محیط MS بهتر شناخته شد (۳). مطالعاتی بر روی خواص آنتی اکسیدانی اسانس تعدادی از گیاهان تیره نعناع نیز انجام شده است، اما مطالعات انجام شده بر روی گیاه اسطوخودوس محدودتر است (۵ و ۱۷).

به دلیل اثرات نامساعد آنتی اکسیدان های سنتزی و ضرورت استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی جستجوی منابع جدید آنتی اکسیدان و همین طور معرفی پتانسیل آنتی اکسیدانی گیاهان رویش یافته در ایران ضروریست. در این زمینه مطالعاتی بر روی کشت بافت گیاه اکلیل کوهی انجام شده است (۴) ولی در مورد کشت بافت گیاه اسطوخودوس در ایران، مطالعه جامعی انجام نشده است، تولید متابولیت های مهم دارویی ازجمله ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی اکسیدانی و رزمارینیک اسید در شرایط کشت درون شیشه ای این گیاه ارزیابی و با هدف بهینه سازی تولید آنتی اکسیدان ها در شرایط کشت درون شیشه ای، اثر غلظت های مختلف NAA وBAP بر تشکیل کالوس و تولید متابولیت ها در کالوس بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: شاخه های اسطوخودوس کاشته شده در محوطه دانشگاه الزهرا (س) قبل از مرحله گلدهی جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافتند. برای کشت بافت، سرشاخه های پنج سانتی متری رأس گیاه مورد استفاده قرار گرفت. پس از جداکردن نمونه ها قطعات گیاهی با مقداری ماده شوینده همراه با آب شستشو داده شدند. در انتها نمونه ها با آب مقطر شستشو داده شده و آب اضافی با کاغذ خشک کن گرفته شد. سپس برگ های جوان رأسی از ساقه جداشده پس از سترون سازی برای کشت بافت به کار رفتند.

سترون سازی نمونه ها: سترون سازی با فرو بردن قطعات برگ در الکل ۷۰ درجه به مدت ۳ دقیقه، سپس در هیپوکلریت سدیم ۱/۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت ۳-۴ بار شستشوی نهایی با آب مقطر سترون انجام شد.

کشت و برداشت نمونه ها: برای کشت دادن نمونه ها از محیط کشت پایه MS (۲۷) واجد غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر NAA همراه با غلظت های ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر BAP استفاده شد. کشت ها در شرایط دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و تحت نور فلورسنت با شدت ۴۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. کالوس های حاصل پس از دو ماه برداشت شدند. نمونه های جمع آوری شده پس از توزین، خشک و پودر شده برای سنجش مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره از کالوس: ۰/۱ گرم از پودر خشک کالوس با ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ مخلوط شد و بعد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با R=40% در حمام اولتراسونیک عصاره گیری شد. عصاره متانولی حاصل پس از فیلتر شدن مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH : برای این منظور از روش Akowuah و همکاران استفاده شد (۶). واکنش با ۱ میلی لیتر متانل حاوی ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل هیدرات ($DPPH^{\bullet}$) (غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر ازعصاره در غلظت های مورد نظر (میکروگرم در میلی لیتر) انجام شد، حجم نهایی مخلوط واکنش توسط متانل مطلق به ۳ میلی لیتر رسید.

مخلوط های واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در غیاب نور نگهداری شدند، سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (CECIL 9000 SERIES , ENGLAND) خوانده شد. درصد بازداری با مقایسه عصاره ها و کنترل با استفاده از فرمول زیر به دست آمد :

$$I\% = (A_{blank}-A_{sample}/A_{blank}) x100$$

I%= درصد بازداری، A_{blank} = جذب شاهد در ۵۱۷ نانومتر، A_{sample} = جذب نمونه ها در ۵۱۷ نانومتر

برای مقایسه فعالیت عصاره ها از مفهوم IC_{50} استفاده شد. IC_{50} غلظتی از عصاره است که برای به دام اندازی ۵۰

درصد از رادیکال های آزاد مورد نیاز است. برای محاسبه IC_{50}با استفاده از برنامه Excel نموداری براساس جذب نمونه و غلظت عصاره رسم شد و با استفاده از معادله به دست آمده، IC_{50} تعیین شد (برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میانگین نتایج محاسبه گردید).

سنجش ترکیبات فنلی: ۰/۲ میلی لیتر از نمونه (نمونه مورد نظر شامل عصاره متانلی کالوس ها و اندام های گیاه بود) به همراه ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش مخلوط شدند، به مخلوط حاصل ۰/۲ میلی لیتر معرف فولن – سیوکالتو اضافه شد. در فاصله زمانی ۱ تا ۵ دقیقه بعد از اضافه کردن معرف و ورتکس، ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم۷ درصد به لوله های آزمایش اضافه شد. سپس ۵ میلی لیتر آب مقطر به ترکیب حاصل اضافه گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از قرار گرفتن نمونه ها در تاریکی، جذب نمونه ها در طول موج ۷۵۰ نانومترخوانده شد و به صورت میکروگرم گالیک اسید در گرم وزن تر یا خشک و با استفاده از فرمول Y=0.002X+0.016 محاسبه گردید (۴۰).

برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های ۰ تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر گالیک اسید استفاده شد.

سنجش فلاونوئید: ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره کالوس به ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ اضافه و ورتکس شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتراسید استیک گلاسیال ۳۳٪ به آن اضافه شد و پس از ورتکس، محلول با اتانول ۹۰٪ به حجم ۵ میلی لیتر رسید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ۴۱۴ نانومتر خوانده شد. میزان فلاونوئید عصاره های کالوس با مقایسه با استاندارد و با استفاده از فرمول Y=0.002X+0.003 محاسبه شد (۲۰ و۲۵).

برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های ۰ تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کوئرستین (quercetin) استفاده شد.

سنجش رزمارینیک اسید: جذب عصاره های متانلی در ۳۳۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SERIES, CECIL۹۰۰۰ENGLAND) خوانده شد، سپس با استفاده از منحنی استاندارد و با استفاده از فرمول Y=8.782X-0.010، غلظت رزمارینیک اسید تعیین شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های ۰ تا ۰/۰۲ میلی گرم در میلی لیتر رزمارینیک استفاده شد (۲۴). برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میانگین نتایج محاسبه گردید.

آنالیز آماری: تمام تیمارها در ۵ تکرار و هر تکرار با ۴ ریزنمونه در قالب طرح پایه بلوک های کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۱/۵ با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید و در موارد معنی دار بودن تفاوت ها از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین ها استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار ۲۰۰۷ Excelرسم شدند.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل بیشترین وزن تر کالوس در تیمارهای هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BAP، ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP و۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP به ترتیب با میانگین وزن ۸/۷۷±۰/ ۰۲۶، ۷/۲۹±۰/۵۴۷ و ۶/۶۸±۰/۱۹۵ گرم در جداکشت مشاهده شد (جدول ۱).

در بین تیمارهای هورمونی مورد استفاده تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی (با IC50=۹/۵۰۶±۰/۴۶۷) و تولید رزمارینیک اسید (۲۷/۸۶µg/g DW) نشان داد. پس از آن تیمارهای ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP (با فعالیت آنتی اکسیدانی ۱۹/۸۴۰±۰/۳۱۱ و ۲۳/۷۹۱±۰/۰۹۹ µg/g DW رزمارینیک اسید) و ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BAP (با فعالیت

آنتی اکسیدانی ۱/۰۸۱±۲۲/۳۹۷ وμg/g DW ۰/۲۰۹±۱۷/۹۷۹رزمارینیک اسید) نتایج مناسبی را نشان دادند. بیشترین میزان فلاونوئیدها (۰/۰۰۹±۰/۰۹۴۸ میلی گرم در گرم وزن خشک) نیز در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد و پس از آن تیمارهای ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر ,BAP و۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP به‌ترتیب با میزان ۰/۰۰۲۶±۰/۰۳۱۳ و ۰/۰۰۲۶±۰/۰۶۷۶ میلی گرم در گرم وزن خشک قرار داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه درصد تشکیل و وزن تر کالوس، فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنلی، فلاونوئید و رزمارینیک اسید در تیمارهای متفاوت هورمونی در محیط کشت

تیمار هورمونی (mg/l)	درصد تشکیل کالوس	وزن کالوس در جدا کشت (g)	IC50 (μg/ml)	ترکیبات فنلی تام (mg/gDW)	فلاونوئیدهای تام mg/gDW)	رزمارینیک اسید (μg/gDW)
* (1N/2B)	۲۵±۰ a	۱/۵۵ ±۳/۱۲۱b	۲۲/۳۹۷±۱/۰۸۱ e	۱/۰۹۷±۰/۰۲۰c	۰/۰۳۵۶±۰/۰۰۴۶b	۱۷/۹۷۹±۰/۲۰۹e
(1N/3B)	۵۶/۲۵±۱ c	۶/۶۸±۰/۱۹۵d	۱۶/۹۳۴±۰/۳۴۷c	۱/۰۴۴±۰/۰۰۴a	۰/۰۶۷۶±۰/۰۰۲۶d	۱۳/۵۴۴±۰/۲۶۴c
(1N/4B)	۲۷±۲ ab	۰/۶۷۳±۰/۰۲۸a	۱۷/۴۴±۲/۲۱۷c	۱/۰۸۲±۰/۰۰۷ab	۰/۰۱۶۳±۰/۰۰۱۶a	۱۲/۲۹۱±۰/۳۶۶b
(2N/2B)	۸۵/۵۰۳ ± ۴/۳۵۴d	۰/۴۲±۱a	۳۵/۷۳۲±/۶۹۵f	۱/۰۶۵±۰/۰۰۷ab	۰/۰۱۹±۰/۰۰۳a	۱۰/۸۲۴±۰/۸۷۴a
(2N/3B)	۵۸/۸۳±۰/۱۴۴ c	۷/۲۹±۰/۵۴۷e	۱۹/۸۴۰±۰/۳۱۱d	۱/۰۸۴±۰/۰۰۴bc	۰/۰۳۱۳±۰/۰۰۲۶b	۲۳/۷۹۱±۰/۰۹۹g
(2N/4B)	۳۸/۳± ۲b/	۸/۷۷±۰/ ۰۲۶g	۹/۵۰۶±۰/۴۶۷a	۱/۰۶۵±۰/۰۳۳ab	۰/۰۹۴۸±۰/۰۰۹e	۲۷/۸۶۷±۰/۰۸۶h

*N معادل NAA و B معادل BAP است . اعداد غلظت را بر حسب میلی گرم در لیتر نشان می دهند.

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش محیط کشت MS با تیمار هورمونی 2N/4B محیط مناسبی برای تولید رزمارینیک اسید (۲۷/۸۶۷±۰/۰۸۶ μg/gDW) و فعالیت آنتی اکسیدانی(Ic_{50}:۹/۵۰۶±۰/۴۶۷ μg/ml) بود. بیشترین وزن کالوس نیز در همین تیمار هورمونی مشاهده شد (۸/۷۷±۰/ ۰۲۶g/explant). نوع محیط کشت، شرایط محیطی و قطعه جداکشت ازجمله عواملی هستند که بر ایجاد کالوس اثر می گذارند. اغلب محققان برای تولید آنتی اکسیدان ها به روش کشت درون شیشه ای از محیط MS استفاده کردند، اما گزارش هایی هم وجود دارد که محیط LS یا B5 برای تولید آنتی اکسیدان ها مناسب‌تر تشخیص داده شد (۱۷،۳۱و۴۱). ترکیب هورمونی مورد استفاده برای این کشت ها TDZ و IAA، 2,4-D و Kn و یا NAA وBAP بود که نتایج متفاوتی از نظر وزن توده سلولی داشت (۱۸ و۲۸). در *Ocimum sanctum* هورمون 2,4-D برای تشکیل کالوس مناسب تر تشخیص داده شد (۱۸). در بررسی های انجام شده بر روی گیاه مرزنجوش برای تشکیل کالوس مشخص شد که بهترین محیط برای تشکیل و تکثیر کالوس در این گیاه محیط MS حاوی با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D است (۲۱). استفاده از غلظت های مختلف 2,4-D و NAA برای کشت ریزنمونه های برگی اسطوخودوس نشان داد که بالاترین درصد کالزایی و بیشترین وزن کالوس در محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد (۵).

در این پژوهش با افزایش غلظت NAA و BAP وزن کالوس افزایش یافت و بیشترین وزن کالوس در بالاترین غلظت به کار رفته از تنظیم کننده های رشد (محیط 2N/4B) مشاهده شد. در محیط های 1N/4B و 2N/2B وزن کالوس ها بسیار کم بود که نشان می دهد این نسبت

هورمونی برای تقسیم سلولی و تشکیل کالوس مناسب نبوده و نسبت بین اکسین و سیتوکینین در تشکیل کالوس مؤثر است.

تنظیم کننده های رشد بر تولید متابولیت ها نیز اثر می گذارند. حداکثر تولید رزمارینیک اسید در کشت *salvia fruticosa* کالوس S در حضورغلظت های مختلف TDZ و NAA ۲/۱۲ میلی گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک بود (۲۸). در کشت سوسپانسیون سلولی *Anchusa officinalis* افزودن NAA سنتز رزمارینیک اسید را افزایش داد (۱۵). به گزارش Nikolaeva و همکاران کاربرد NAA در محیط کشت، توانایی بیوسنتزی کالوس ها را افزایش می دهد و تجمع ترکیبات فنلی را تحریک می کند (۲۹). بررسی اثر سه نوع اکسین IAA, NAA و IBA بر کشت ریشه مویی *Nepeta cataria* نشان داد که هر سه هورمون تولید رزمارینیک اسید را تحریک کردند ولی IBA اثر بیشتری بر تجمع رزمارینیک اسید داشت (۴۳).

بر اساس یافته های این پژوهش نیز افزودن NAA به محیط کشت با افزایش تجمع آنتی اکسیدان ها و رزمارینیک اسید همراه بود و غلظت های بالای BAP همراه با غلظت بالای NAA بیشترین فعالیت آنتی-اکسیدانی و تجمع رزمارینیک اسید را نشان دادند. بنابراین به نظر می رسد غلظت دو برابر NAA به BAP نسبت مناسبی برای فعالیت آنتی اکسیدانی و تجمع رزمارینیک اسید باشد. زیرا در محیط های 2N/4B و 1N/2B فعالیت آنتی اکسیدانی و تجمع رزمارینیک اسید بالا بود و بالاتر بودن این مقادیر در محیط 2N/4B نشان می دهد که مقادیر بالای تنظیم کننده های رشد با تولید بیشتر متابولیت ها همراه هستند، هر چند همیشه بین محیط مناسب برای تشکیل کالوس و محیط کشت مناسب برای تجمع متابولیت ها ارتباط مثبتی مشاهده نمی شود. در تولید متابولیت های گیاهی تعیین محیط کشتی که هم وزن توده سلولی بیشتری ایجاد کند و هم در آن محیط تولید متابولیت بالا باشد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. البته در اغلب موارد ترکیب هورمونی استفاده شده برای ایجاد وزن بیشتر توده سلولی برای تولید متابولیت مناسب نیست و همیشه ارتباط مثبتی بین وزن توده سلولی و میزان متابولیت تولید شده مشاهده نمی شود. در این صورت بهتر است دو نوع محیط کشت استفاده شود که اولی برای افزایش توده سلولی و دومی برای تولید متابولیت‌ها مناسب باشد. بر اساس یافته های ما نیز در محیط با تیمار هورمونی 1N/ 2B که وزن کالوس‌ها نسبت به محیط 1N/3B کمتر بود میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و رزمارینیک اسید بیشتر بود.

بنابراین ترکیب هورمونی مورد استفاده جهت دستیابی به بهترین محیط رشد و محیط تولید به گونه و ژنوتیپ گیاه وابسته است. در گیاه *Lavandula angustifolia* نیز استفاده از غلظت های بالای NAA و BAP موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان رزمارینیک اسید شد.

در این پژوهش میزان ترکیبات فنلی در تیمارهای هورمونی مختلف تفاوت چندانی نداشت و بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی ارتباط مثبتی مشاهده نشد. در حالی که این ارتباط بین میزان رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی اکسیدانی قابل رؤیت بود. در کالوس ها سهم عمده فعالیت آنتی اکسیدانی به عهده رزمارینیک اسید بود. به گزارش Olajire میزان ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می یابد (۳۰ و۳۸) .

میزان رزمارینیک اسید در کشت های سلول های گیاهی گاهی اوقات بالاتر از گیاه مولد است (۳۴). Yestil-Celiktas و همکاران افزایش ۱/۷ برابری رزمارینیک اسید را در کالوس های گیاه اکلیل کوهی گزارش کردند (۴۴). در کشت تعلیقی *Ocimum sanctum* میزان رزمارینیک اسید دو برابربرگ گیاه کامل بود (۱۸). در کشت تعلیقی اسطوخودوس هم میزان رزمارینیک اسید چندین برابر گیاه مولد بود (۳۳). بر اساس نتایج این پژوهش میزان

رزمارینیک اسید در تیمار 2N/4B نسبت به گیاه کامل افزایش ۵/۴۵ برابری را نشان داد. بنابراین کشت بافت گیاه اسطوخودوس منبع مناسبی برای تولید آنتی اکسیدان ها و رزمارینیک اسید است و با دست‌ورزی بیشتر در محیط کشت می توان به مقادیر بیشتری از این ترکیبات دست یافت.

منابع

۱- جمشیدی ،م.،احمدی آشتیانی، ح.،رضازاده ،ش. ع.،فتحی آزاد، ف.،مازندرانی ،م و خاکی، آ . ۱۳۸۹ بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران. گیاهان دارویی ج ۹شماره۳۴ ؛ ص ۱۷۷-,۱۸۳

۲- شریعتی فر، ن، کامکار، ا.، شمس اردکانی، م. ،میثاقی، ع .،جمشید، ا و جاهد خانیکی، غ. ۱۳۹۰ . بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه علف هیضه . افق دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علو م پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد. دوره ی ۱۷ ؛ شماره ی ۴ ؛ ص ۳۵-۴۱.

۳- کمالی پور، م.۱۳۸۹.بررسی خواص آنتی اکسیدانی گیاه اکلیل کوهی *Rosmarinus officinalis* در کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهرا.

۴- کمالی پور، م .، کیارستمی ،خ و حسین زاده نمین ،م. ۱۳۸۹ . بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوی ترکیبات فنلی در کالوس های ساقه ای اکلیل کوهی. شانزدهمین کنفرانس سراسری و چهارمین کنفرانس بیت المللی زیست شناسی ایران. دانشگاه فردوسی مشهد.

۵- کیخا آخر، ف، خادم،آ.، باقری،ع و شریفی، ا. ۱۳۹۱. بهینه سازی کشت کالوس گیاه دارویی اسطوخودوس *(Lavandula angustifolia* Mill)، سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی) مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، http://www.civilica.com/Paper-AGRIBIOTECH03-AGRIBIOTECH03_515.html

6-Akowuah, GA., Ismail, Z., Norhayati, I and Sadikun ,A. (2005). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chemistry. 93:311–317.

7-Al-Amier ,H . , Mansour, B. M. M., Toaima,N. , Craker,L and Shetty,K. (2001).Tissue Culture Selection for Phenolics and Rosmarinic acid in Thyme. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.2001:8(1), 31-42.

8-Amonrat, T., Soottawat ,B., Wonnop. V., Eric, A and Decker, C.(2008). The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. Food Science and Technology. 41(1): 169-161.

9-Andreja ,H., Majda, H., Zeljko, K and Davorin, B.2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with " -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. Food Chemistry 2000. 71(2): 233-229.

10-Baure,N., Leljak-Levanic,L and Jelaska,S.2004. Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* .Benth Zeitchirift fur Naturforschung. 59c: 554-560.

11-Biljana, B., Sanda ,V., Adelheid, B and Maja, B.2010 .Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': A Comparative study with *L. angustifolia* Mill. Molecules. 15: 5971-5987.

12-Borneo, R., Leone, A.E., Aguirre ,A.,Ribotta, P and Cantero, J.J .2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry . 112(3): 670-664.

13-Botsoglou, NA., Christaki, E., Fletouris, DJ., Florou- Paneri, P and Spain ,AB. 2002.The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. Meat Science . 62: 259-265.

14-Conde , E., Cadahia , E., Garcia-Vallejo ,MC and Fernandez de Simon ,MB. 1995.Polyphenolic composition of wood extracts from *Eucalyptus camaldulensis, E. globulus* and *E, rudis*.Holkforschung. 49: 411-4 17.

15- De-Eknamkul W & Ellis BE .1985b. Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep. 4: 50–53.

16- EL-Naaggar ,H.2006.Using biotechnology to improve the production of rosmarinic acid from rosmary plants. ETD collection for university of Nebraska-Lincoln. Paper AAI 3217531. http://digitalcommons.unl.edu/dissertations/AAI3217531

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. Zeitchirift fur Naturforschung. 61c: 241-244.

18- Hakkima, F. L., kalyani,S., Essa,M., Girijab,S and Songc,H. 2011.Production of rosmarinic acid in *Ocimum sanctum (L.)* cell suspension cultures by the influence of growth regulators .International Journal of Biological and Medical Research. 2(4): 1158 -1161.

19- Kovatcheva ,EG**,** Koleva, II., Ilieva, M., Pavlov, A., Mincheva, M and Konushlieva ,M.2001. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula* veraMMcell cultures, Food Chemistry 72 :295-300.

20- Kuli ,T., Visnja, K., Verica, D., Ivica, L., Anita, K., Branka ,D., Mila, J., Olivera, P., Greta, P and Mladan, M.2006. Antioxidant and Acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous Tea infusions in vitro.Food Technology. 46(4) :368-375.

21- Kumari N and Saradhi P. 1992.Regeneration of plants from callus cultures of *origanum vulgare*.plant Cell Reports.11(9):476-479.

22- Livinenko V.I., Popva T.P., Simonjan A.V., Zoz I.G., Sokolov V.S.1975. "Gerbstoffe" and oxyzimtsaureakommliny in labiaten. Planta Medica. 27:372-380

23- Lobo,V., Patil,A., Phatak,A and Chandra,N. 2010.Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health .Pharmacognosy Reviews.4(8): 118–126.

24- Lopez –Arnaldos, T., Lopez-Serrano ,M., Barcelo ,A.R and Zapata , J.M. 1995. Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plants cell cultures by complexation with Fe^{2+} ions. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 351: 311-314.

25- Marinova, D., Ribarova ,F., Atanassova ,M. 2005.Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the university technology and metallurgy 40(3): 255-260.

26- Matkowski ,A.2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review. Biotechnology Advances. 26: 548–560.

27- Murashige .T. and Skoog.F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum,15:473-497.

28- Nabila ,S., Fawzia ,M., Naser ,A and Rida, A. 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 117–121.

29- Nikolaeva , T.N., Zagoskina ,N.V., Zaprometov, M.N. 2009. Production of phenolic compounds in Callus Cultures of Tea plants under the effect of 2,4-D and NAA .Russian Journal of Plants Physiology. 56(1): 45-49.

30- Olajire ,A.A and Azeez, L. 2011. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. African Journal of Food Science and Technology 2(2) : 22-29.

31- Par,S.U., Uddin,M.R., Xu,H., Kyoung Kim,Y and Lee,S.Y .2008.or 2008.Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. African Journal of Biotechnology . 7 (25): 4959-4965.

32- Paran, E., Novack ,V., Engelhard ,Y.N., Hazan-Halevy, I.2009. The effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. Cardiovascular Drugs and Therapy. 23(2):145-51.

33- Pavlov A. I., Ilieva M. P., and Panchev I. N. 2000. Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension. Biotechnolgy Progrress. 16: 668-670.

34- Petersen, M. and Simmonds, M.S.J.(2003). Moleculles of interest rosmarinic acid. Phytochemistry. 62: 121-125.

35- Scott G.1997.Antioxidants in science, technology,medicine and nutrition .Albion publishing Chichester.pp.41-44,80-83, 126-158,191-219.

36- Shahidi ,F., Wanasundara, U.N and Amarowicz, R.1994. Natural antioxidant from low pungency mustard flour. Food Research International .27: 489-493.

37- Sweetie ,R., Kanatt, RC., Arun, S.2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in iradiation processed lamb meat. Food Chemistry . 100: 458-451.

38- Tosun M., Ercisli S., Sengul M., Ozer H., Polat T. and Ozturk E.2009. Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* Species from Turkey . Biol Res. 42: 175-181.

39- Verpoorate, R., Contin ,A., Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant

secondary metabolites. Phytochem Rev. 1: 13-25.

40- Wu, Y., Taylor, K., Biswas ,N and Bewtra, J. 1998.A model for the Protective Effect of Additives on the Activity of Horseradish Peroxidase in the Removal of Phenol. Enzyme and Microbial Technology. 15: 315-322.

41- Xu,H., Kyoung Kim,Y., Xuanji,J., Young Lee,S and Park,S. 2008. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. Journal of Medicinal Plants Research.2(9): 237-241.

42- Yang,R. , Potter,T.P. , Otis F. C and Kalidas,S .1997.Tissue culture-based Selection of high rosmarinic acid producing clones of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Using Pseudomonas Strain F. Food Biotechnology. 11(1): 73-88.

43- Yang,Y.K., Lee,S.Y.,Woo,T.P., Park,N and Park,S. 2010. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L.Plant Omics Journal. 3(6):190-193.

44- Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., Wichers H.J., Bedir E.,Vardar-Sukan F. 2007. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. Eur Food Research Technology .224:443–51.

.

The study of antioxidant properties of *Lavandula angustifolia* in tissue culture

Kiarostami Kh. and Mosafa N.

Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Lavaner (*Lavandula angustifolia* Mill) belong to the lamiaceae family.Lavander is a native of Mediterranean region and cultivated in many regions as medicinal and ornamental plant. This plant has substances with antioxidant properties. This study was designed to evaluated antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* in vitro. The antioxidant activity, amount of phenolic substances, flavonoids and rosmarinic acid content of calli which were obtained from leaf explants on MS medium supplemented with NAA(1and 2mg/l) and BAP(1, 2, 3 and 4mg/l) were assayed. The highest antioxitant activities (Ic_{50}:9.506±0.467 µg/ml), highest amount of flavonoid (0.0948±0.009 mg/gDW) and rosmarinic acid (27.867±0.086 µg/gDW) content were obtained from medium supplemented with 2mg/l BAP and 4mg/l NAA. The amount of calli yield were much higher in mentioned medium. The biomass yield was significantly improved on mentioned medium. There was no significant difference between various media considering phenolic compounds. As a result of lavender plant tissue culture it could be high potent source of natural antioxidants.

Key words: lavender , in vitro culture, antioxidant, rosemarinic acid