(مقاله کوتاه)

القاء بافت کالوس و آنالیز مواد موثره اسانس گیاه دارویی *Dracocephalum moldavica* L.

سیدمهدی رضوی[1*]، علیرضا قاسمیان[2]، سونیا موسوی ثمرین[3]، هما عرش نشین[3]

[1]دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[2]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[3]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۹/۰۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۵

چکیده

بادرشبویه با نام علمی *Dracocephalum moldavica* L. گیاهی یکساله، علفی ومعطر از تیره‌نعناع و بومی آسیای مرکزی است.در این مطالعه تولید بافت کالوس از گیاه بادرشبویه و شناسایی ترکیبات فرار اسانس آن مورد توجه می‌باشد. بذرهای گیاه پس از ضدعفونی توسط اتانول (۷۰درصد) و هیپوکلریت سدیم (۱۰درصد)، در محیط کشت MS کشت داده شدند. پس از جوانه‌زنی، لپه گیاهچه‌های حاصل جدا شده و در محیط‌های کشت MS حاوی مقادیر مشخصی از ترکیبات هورمونی با غلظت‌های متفاوت از نفتالن ، استیک اسید و بنزیل آمینوپوزین منتقل شدند. نمونه‌ها جهت کالوس زایی در اتاقک رشد با شرایط نوری حدود ۲۴۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.پس از ایجاد مقادیر لازم از کالوس، مقدار کالوس بدست آمده توزین و بیشترین کالوس از بین محیط های کشت با ترکیبات هورمونی مختلف جهت استخراج اسانس انتخاب شد. اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و با روش تقطیر با آب انجام شد و مواد موثره آن به‌وسیله دستگاه GC/MS مورد تجزیه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان کالوس بدست آمده از لپه گیاهچه بادرشبویه به میزان هورمون‌های گیاهی بستگی دارد. حداکثر تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۴ میلی گرم درلیتر نفتالن استیک اسید به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپوزین حاصل شد. همچنین نتایج آنالیز اسانس نشان داد که ترکیبات عمده اسانس شامل تیمول (۴۵/۹ درصد)، دکان (۲۶/۳ درصد)، دودکان (۷/۰۳ درصد)و هگزادکانوئیک اسید (۷/۰۸ درصد)می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بادرشبویه، تیمول، کالوس، *Dracocephalum moldavica* L.

*نویسنده مسئول: razavi694@gmail.com

مقدمه

کشت سلول و بافت گیاهی که کشت درون شیشه‌ای و یا کشت استریل نیز نامیده می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. هرچند که هزینه و سرمایه زیاد و همچنین نیاز به نیروی کار ماهر و متخصص از جمله معایب روش‌های بیوتکنولوژیکی به شمار می‌آیند، اما کشت بافت توانسته راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به فرد ایجاد نماید که ساختن مصنوعی آن‌ها به‌دلیل مشکلات تکنیکی، مقدور نیست (Bajaj et al., 1988). ساختار پیچیده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آنها را به صورت مصنوعی سنتز نمود و لذا تنها منبع تولید آن‌ها سلول گیاه می‌باشد. اگر این سلول‌ها را نیز بتوان نظیر میکروارگانیسم‌ها کشت نمود، می‌توان تولید آنها را به مقدار قابل توجهی افزایش داد (Scragg, 1986).

تشکیل کالوس اولین رویداد در روند کشت بافت گیاهی است. کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی تمایز نیافته است که از ریزنمونه‌های گیاهان بالغ کشت شده در محیط‌های کشت غنی از آگار، درشت مغذی، ریز مغذی، ویتامین و فیتوهورمون‌ها بدست می‌آید. ثابت شده است که کالوس ممکن است منبعی برای متابولیت‌های ثانویه گیاهی باشد (Ikeuchi et al., 2013).

بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica* L.) به نام‌های فارسی بادرشبی و شاطر از دیرباز در طب سنتی ایران به‌عنوان گیاهی آرام‌بخش، اشتهاآور و التیام‌دهنده زخم مطرح بوده که از اسانس آن همچنین در صنایع غذایی، نوشابه‌سازی، بهداشتی و آرایشی استفاده می‌شود (Maham et al., 2013). بادرشبویه گیاهی است علفی یکساله به ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر با ساقه‌های راست به ارتفاع ۱۵ تا ۴۵ سانتی‌متر که به حالت وحشی و خودرو در بعضی از نواحی جنوبی اروپا، جزیره سیسیل، مولداوی و جنوب غربی آسیا می‌روید. جنس مذکور ۴۵ گونه در سراسر دنیا دارد و در ایران ۸ گونه از آن در نواحی مختلف یافت می‌شود که برخی گونه‌های آن انحصاری ایران هستند. این گیاه دارای گل‌های معطر شهدآور می‌باشد. در اسانس بدست آمده از اندام هوایی گیاه ۶۶ ترکیب شناسایی شده که ژرانیل استات، ژرانیول، ژرانیال و نرال اصلی‌ترین ترکیبات شناخته شده هستند (Sefidkon et al., 2010). اسانس بادرشبو دارای خاصیت ضد میکروبی و ضدباکتریایی و التیام‌دهنده زخم و جراحات می‌باشد. امروزه همچنین از عصاره بادرشبو در رفع سردرد، سرماخوردگی، ضعف عمومی بدن، به‌عنوان مسکن در دردهای عصبی و اسپاسم های معدی و کلیوی، برای شستشوی دهان و در تسکین دندان‌درد استفاده می‌شود (Trombetta et al., 2005). با توجه به اهمیت دارویی و صنعتی اسانس بادرشبویه و نیز با توجه به تغییرات کیفی یا در اسانس بدست آمده از کالوس گیاه نسبت به اسانس اندام‌های گیاهی، این مطالعه در خصوص کشت بافت و آنالیز اسانس حاصل از بافت کالوس حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

القای کالوس: بذرهای گیاه بادرشبویه در سال ۱۳۹۲ از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. بذرها در شرایط آزمایشگاهی ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۵-۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت ۱۰ درصد به‌مدت ۱۵-۱۰ ضدعفونی شدند. سپس در سه مرحله با آب مقطر استریل شستشو و در محیط کشت MS کشت داده شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، لپه‌های گیاهچه‌های حاصل، جدا شده و به محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از ترکیبات هورمونی NAA (۱، ۲، ۳، ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. به همین ترتیب

تیمارهایی نیز با ترکیبات هورمونی 2,4-D:BAP و NAA:Kin با غلظت‌های مشابه انجام گرفت. PH محیط کشت قبل از اتوکلاو (در دمای ۱۲۰ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه) با کمک HCL یا NaOH روی ۵٫۸ تنظیم شد. پتریدیش‌ها به ژرمیناتور با شرایط دمایی ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. بافت کالوس بدست آمده از هر یک از کشت‌ها بعد سه هفته واکشت گردیدند. وزن تر کالوس تولید شده در هر تیمار بعد ۶ هفته اندازه‌گیری شد.

استخراج و آنالیز اسانس: بعد از شش هفته ازالقائ کالوس در محیط کشت با ترکیب هورمونی بهینه، اسانس آن توسط دستگاه میکروکلونجر تقطیر شده و بعد از آبگیری با سولفات سدیم به‌منظور بررسی ترکیبات، به دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS) با مدل Thermoquest-Finnigan تزریق گردید. ستون مورد استفاده در دستگاه HP-5 به ابعاد ۳۰ متر در ۰/۲۵ میلی‌متر با قطر اجزای ۰/۲۵ میکرون بوده است. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ۳۲۰ درجه با سرعت ۴ درجه در دقیقه انجام گردیده است. گاز هلیم با شدت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت.

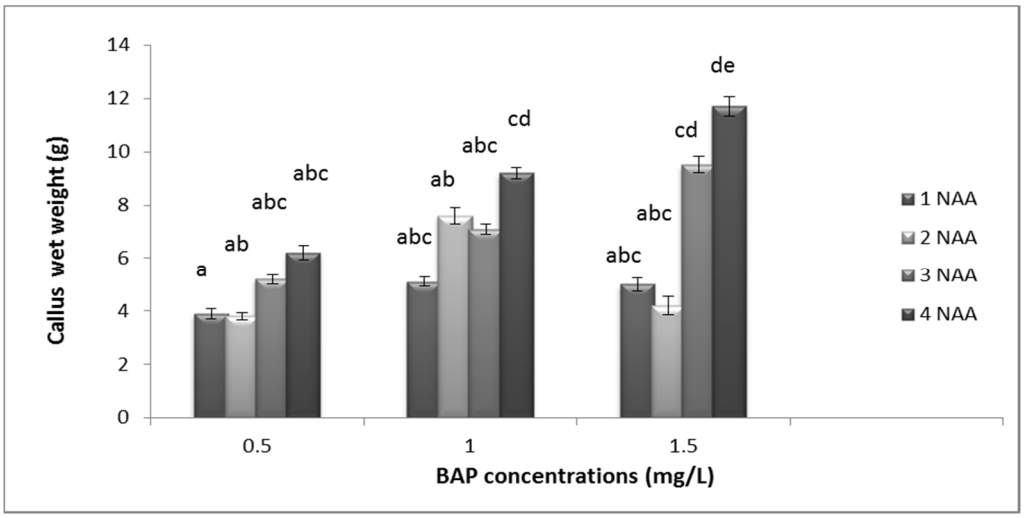
آنالیز آماری

آزمایش‌ها به‌صورت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. جهت انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. تجزیه واریانس (ANOVA) به همراه آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گردید.

نتایج

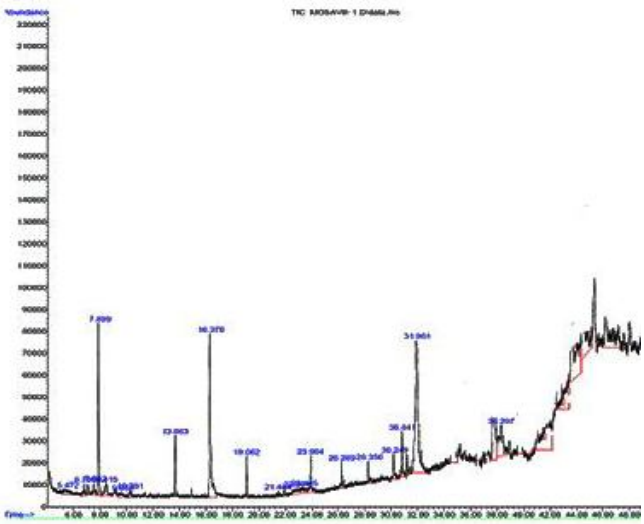
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که القای کالوس از ریزنمونه‌های لپه‌های گیاهچه بادرشبویه در محیط کشت بدون هورمون‌های گیاهی و نیز محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی NAA/Kin و 2,4-D/BAP و یا هر کدام از هورمون‌های مذکور به تنهایی موفقیت آمیز نبوده است. این در حالی است که در محیط‌های کشت حاوی هورمون‌های NAA و BAP کالوس‌زایی به نحو مطلوب صورت گرفت. از طرف دیگر نتایج بیانگر این نقطه بود که در محیط‌های کشت با نسبت بالاتر از NAA به BAP، القا و رشد کالوس بهتر صورت می گیرد. حداکثر میزان تولید کالوس در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP مشاهده شد. در این محیط کشت ۱۲/۲ گرم کالوس در دوره زمانی ۶ هفته تشکیل گردید (شکل ۱ و ۲).

شکل ۱: بافت کالوس گیاه بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica* L.).



شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف NAA و BAP در تولید بافت کالوس گیاه بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica* L.)

تقطیر اسانس حاصل از کالوس بدست آمده از محیط کشت با ترکیب هورمونی بهینه، بی رنگ و بازده آن ۰/۱ درصد وزنی حجمی بود.با توجه به داده‌ها و نتایج حاصل از آنالیز GC/MS (شکل ۳) در اسانس فوق در مجموع ۶ ترکیب شناسایی شدند که ۹۷/۴۹ درصد از کل اسانس را تشکیل می دادند. ترکیبات اصلی شامل تیمول (۴۶درصد)، دکان (۲۶ درصد)، هگزادکانوئیک اسید (۷ درصد) و دودکان (۷ درصد) بود.به عبارت دیگر در حدود ۳۱/۵ درصد از اسانس از هیدروکربن‌ها و قریب به ۵۰ درصد از گروه ترکیبات مونوترپنی می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز اسانس، همراه با زمان‌های بازداری، شاخص بازداری استاندارد و درصد نسبی ترکیبات حاصل در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۳: کروماتوگرام حاصل از آنالیز اسانس بدست آمده از کالوس گیاه بادرشبویه با دستگاه GC-MS

جدول ١: ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس حاصل ار کالوس بدست آمده از گیاه بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica*)

ردیف	ترکیبات	فراوانی (درصد)	زمان بازداری (دقیقه)	اندیس بازداری
١	دکان	٢۶/٢٩	٧/٨٩	١٠٠٠
٢	دودکان	٧/٠٣	١٣/۶۶	١٢٠٠
٣	تیمول	۴۵/٩٩	١۶/٣۶	١٢٩٠
۴	ترادکان	۴/٧٩	١٩/٠۶	١۴٠٠
۵	نونادکان	۶/٣١	٢٣/٩٠	١٩٠٠
۶	هگزاد کانوئیک اسید	٧/٠٨	٣٠/٨۴	١٩٨٢
کل		٩٧/۴٩		

بحث

این تحقیق اولین گزارش از القای بافت کالوس در گیاه بادرشبویه می‌باشد. نتایج نشان داد که تولید کالوس در گیاه بادرشبویه فقط در محیط‌های کشت حاوی NAA و BAP صورت می‌گیرد و سایر ترکیبات هورمونی قادر به القاء کالوس در این گیاه نمی‌باشند. برخلاف غالب گیاهان که روند کالوس زایی در شرایطی که نسبت هورمون پایه اکسین و سیتوکینین یکسان باشد صورت می گیرد، در گیاه بادرشبویه تولید کالوس در شرایطی بهینه است که نسبت NAA به BAP بیشتر باشد. از طرف دیگر مشخص شد که در هر حال با افزایش کمی هورمون‌ها، کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. در تحقیق دیگری که بر روی گونه دیگر این جنس یعنی *Dracocephalum kotschyi* صورت گرفته است نیز دو هورمون NAA و BAP هم در تولید کالوس و هم در باززایی آن موثرتر از بقیه ترکیبات هورمونی گزارش شده‌اند (Ostroshy and Moradi, 2012). مشاهدات دیگری در همین گیاه بر نقش ترکیب هورمونی متشکل از دو هورمون NAA و BAP در القاء کالوس تومورهای غیر تمایز یافته و تارهای کشنده تاکید دارد (Shrafi et al., 2014). بنابراین می‌توان دو هورمون اخیر را به‌عنوان موثرترین ترکیب هورمونی در کشت بافت مربوط به جنس *Dracocephalum* پیشنهاد نمود.

بررسی منابع نشان داده است که اسانس اندام هوایی گیاه بادرشبویه که در شرایط طبیعی رویش نموده است غنی از متابولیت‌های ثانویه ترپنوئیدی همچون ژرانیل استات، ژرانیول، ژرانیال، نرال و سیترال بوده و ازاینرو خواص قابل توجه آنتی باکتریایی و آنتی ویرال دارد (Yousefzadeh et al., 2010; Sefidkon et al., 2010; Maham et al., 2013).

مقایسه نتایج تحقیقات مذکور با نتایج بدست آمده ار پژوهش حاضر بیانگر این مطلب است که پروفیل ترکیبات اسانس بدست آمده از کالوس گیاه بادرشبویه کاملا متفاوت از اسانس بدست آمده از اندام هوایی گیاه است. ترکیب مونوترپنی تیمول و نیز ترکیبات هیدروکربنی همچون دکان که بخش عمده اسانس حاصل از کالوس را به خود اختصاص داده‌اند در اسانس اندام هوایی گیاه رویش یافته در شرایط طبیعی در حد بسیار ناچیزی بوده و یا اصلاً وجود ندارند. از طرف دیگر غالب ترکیباتی که در اسانس اندام هوایی گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی وجود دارد در اسانس بدست آمده از کالوس موجود نیست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ترکیبات شناسایی شده در کالوس تقریباً متفاوت از قطعات گیاه است. می‌توان

گفت متابولیسم گیاه در بافت کالوس متفاوت از بافت‌های گیاهی طبیعی می‌باشد. شاید این پدیده ناشی از تیمارهای هورمونی اعمال شده در شرایط درون شیشه باشد.

امروزه استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی به‌عنوان روشی بیوتکنولوژیکی در تولید ترکیبات موثره گیاهان مورد توجه محققین می باشد. تیمول که یک ترکیب مونوترپنی است در گیاهان جنس *Thymus* یافت شده و به‌عنوان ماده بلوری سفید با خاصیت ضدعفونی قوی شناخته می‌شود که در اغلب گونه‌های آویشن استخراج شده است (Buckingham, 2005). بررسی‌ها نشان داده است که ماده موثره تیمول دارای اثرات علف‌کشی می‌باشد (Nesrollahi and Razavi, 2016). همچنین تیمول به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی شناخته می‌شود که به تنهایی یا با سایرترکیبات مانند کارواکرول، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Filoche et al., 2005; Ahmed et al., 2010).

تحقیقات نشان داده است که آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی مانند تیمول و کارواکرول مقاومت باکتری‌ها را به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق اثر هم افزایی کاهش می‌دهند و تیمول به‌عنوان یک ترکیب قارچ کش به‌ویژه در سویه‌های مقاوم به فلوکونازول نشان داده شده است (Palaniappen and Holley, 2010). علاوه بر این شواهدی دال بر خواص ضدتوموری برای این ماده وجود دارد (Andersen, 2006). هر چند مکانیسم دقیق این عملکردهای زیستی تیمول ناشناخته است، می‌توان پیشنهاد کرد که که تیمول به‌دلیل ماهیت غیر قطبی خود حداقل برخی اثرات خود را از طریق گذر از غشاءهای زیستی اعمال می‌کند. با توجه به اهمیت مختلف زیستی، دارویی و صنعتی تیمول، رویکرد بیوتکنولوژی برای تولید آن میتواند حائز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در گیاه دارویی بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica* L.) کالوس زایی در محیط کشت حاوی دو هورمون NAA و BAP به نحو بهینه صورت می‌گیرد. در کالوس حاصل، ترکیب تیمول به‌عنوان یک متابولیت ثانویه فرار غالبیت دارد که در اسانس اندام‌های هوایی گیاه موجود نیست. بنابراین اثرا ت زیستی و دارویی اسانس حاصل از کالوس بایستی کاملاً متفاوت از اسانس بدست آمده از اندام‌های گیاه مذکور باشد.

References

1. Ahmad, A., Khan, A., Yousef, S., Khan, L.A. 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. Fitoterapia, 81(8):1157-62.
2. Andersen, A. 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. International journal of toxicology, 25(1): 29–127.
3. Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M., Olszowska, O. 1988. Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y P S (Ed.). Springer-Verlag, New York, 68 p.
4. Buckingham, J. 2005. Dictionary of natural products on CD-ROM. V.13:1. Chapman and Hall/CRC Press, Bocakaton.
5. 5-Filoche, S.K., Soma, K., Sissons, C.H. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidinedi gluconate. Oral Microbiology and Immunology, 20(4): 221–225.
6. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A. 2013. Plant callus: Mechanism of induction and repression. The Plant Cell, 25(9): 3159-3173.

7. Maham, M., Akabari, H., Delazar, A.2013. Chemical composition and antinociptive effect of the essential oil of *Dracocephalum moldavica* L. Pharmaceutical Science, 18(4):187-192.
8. Nesrollahi, P., Razavi, S.M. 2016. Investigation on phytotoxic effects of thymol. 2nd international conference on sustainable development. Strategies and Challenges, 24-26 Feb, Tabriz. Iran.
9. Otroshy, M., Moradi, K. 2012. Effect of explants and growth regulators on direct organogenesis of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. via tissue culture technique. Journal of Herbal Drugs, 3(3): 127-134.
10. Palaniappan, K. and Holley, R. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. International Journal of Food and Microbiology, 140(2): 164–8.
11. Scragg, A.H.1986. The economics of mass cell culture. In: Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW. (Eds) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge, 202p.
12. Sefidkon, F., Jahansoz, M., Davazdahemami, S., Mazaheri, D. 2010. Effects of irrigation water salinity on germination, emergency, biological yield, essence quality and quantity of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). Plant Production Technology, 2(1): 25-34.
13. Sharifi, A., Hashemi-Sohi, H., Azadi, P., Sharifi, A.A. 2014. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. Physiological Molecular Biology of Plants, 20(2):257-262.
14. Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A.,Mazzanti, G., Bisignano, G. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (6): 2474–8.
15. Yousefzadeh, S., Modarres-Sanavy, S.A., Sefidkon, F., Asgarzadeh, A., ghalavand A. 2010. Effects of different harvest time on essential oil content and composition of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26 (4): 561-573.