تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه *Achillea millefolium* L. و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل

محمدرضا شمس‌اردکانی[1]*، عباس حاجی‌آخوندی[2]، امیرحسین جمشیدی[3]، پروانه محمدرفیعی[4]

۱- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی

٤- داروساز، محقق

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی

تلفن: ٦٦٩٥٩٠٩٠ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٨١١٧٨ (۰۲۱)

پست الکترونیک: shams@ias.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/۲/۳ **تاریخ تصویب:** ۱۳۸٤/۹/۱۷

چکیده

مقدمه: گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.) گیاهی پایا، ایستاده از خانواده کاسنی می‌باشد. این گیاه در نقاط مختلف ایران و جهان می‌روید. گیاه بومادران عمدتاً حاوی اسانس، فلاونویید، آلکالویید و تانن است و دارای خواص درمانی مختلف می‌باشد. با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس گیاه بومادران در زمینه‌های گوناگون دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی تصمیم بر آن شد که کشت سلولی گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

هدف: هدف از این مطالعه، تولید و نگهداری کالوس از بذر گیاه بومادران، بررسی توانایی کالوس برای تولید متابولیت‌های ثانویه و مقایسه آن با متابولیت‌های تولید شده در گیاه کامل بوده است.

روش بررسی: بذرهای گیاه بومادران با قرار گرفتن در محلول‌های استریل کننده، سترون شدند. پس از قرار گرفتن بذرها در محیط آگار ۰/۸ درصد و تولید دانه رست، قسمت‌های فوقانی دانه‌رست در شرایط کاملاً استریل به محیط کشت MS اتوکلاو شده که دارای مقادیر مشخصی از هورمون‌های گیاهی بود منتقل و جهت رشد و ایجاد کالوس در گرمخانه در دمای ۲۷ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ایجاد مقادیر لازم از کالوس، عصاره دی‌کلرومتانی کالوس تهیه و به دستگاه GC/MS تزریق گردید. اسانس حاصل از سرشاخه‌های هوایی گیاه کامل هم جهت تعیین ترکیبات موجود به دستگاه GC/MS تزریق شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بیشترین درصد ترکیبات موجود در اسانس گیاه را آلفا - پینن، بتا - پینن و کاریوفیلن اکساید تشکیل می‌دهند. در مقابل، کالوس هیچ‌گونه ترکیب اسانسی تولید نکرده است. اما بررسی مقدماتی روی عصاره کالوس نشان داد که سلول‌ها، تانن تولید کرده‌اند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که کالوس به دست آمده از گیاه بومادران در محیط MS و با هورمون‌های گیاهی فوق نمی‌تواند تولید روغن فرار نماید اما کالوس مزبور توانسته است تانن تولید نماید.

گل‌واژگان: بومادران، کشت بافت، اسانس

مقدمه

گیاه بومادران[1] گیاهی است پایا، ایستاده که ارتفاع آن به ۵۰-۳۰ سانتی‌متر می‌رسد. ساقه ایستاده، ساده یا در بخش فوقانی منشعب، برگ‌ها پوشیده از کرک، دوبار منقسم و ته شانه‌ای، پهن‌دراز - سرنیزه‌ای یا خطی است. گل به رنگ سفید یا سفید متمایل به زرد یا سفید متمایل به ارغوانی، مجتمع در کپه‌های کوچک به صورت دیهیم شکل و میوه فندقه می‌باشد. محل رویش گیاه در جهان اروپا، آمریکای شمالی و آسیا و در ایران ارتفاعات البرز به ویژه دماوند، گچسر، کندوان، پلور، ارومیه، تبریز و راسوند است [۱،۲،۳].

از ترکیبات شیمیایی که توسط گیاه ساخته می‌شود می‌توان به اسانس، اسیدهای آمینه، آلکالویید، فلاونویید و تانن اشاره کرد [٤].

امروزه بومادران در طب نوین به صورت خوراکی به عنوان ضدالتهاب، ضداسپاسم، کاهنده فشار خون، کاهنده تب، ضدعفونی کننده مجاری ادراری و به صورت موضعی به عنوان ضدشوره سر و مرطوب کننده پوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طب گذشته این گیاه به عنوان ضدالتهاب، مدر، قاعده‌آور مورد مصرف قرار می‌گرفته است [۱،۲،۳].

با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس‌ها در زمینه‌های گوناگون و توجه جهانی به گیاهان حاوی اسانس، همچنین با توجه به مشکلات زراعی، تغییرات آب و هوایی، آفات و بیماری‌های گیاهی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی، از روش‌های دیگری جهت به دست آوردن مواد موثر گیاهی می‌توان استفاده نمود [۵،٦].

یکی از روش‌های تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده از کشت بافت گیاهان می‌باشد.

اصطلاح کشت بافت گیاهی در مورد تمام انواع کشت‌های گیاهی سترون که به صورت درون شیشه‌ای[2] انجام می‌پذیرند به کار برده می‌شود. ماده سلولی اصلی در اکثر سیستم‌های کشت سلولی تحت عنوان کالوس نامیده می‌شود.

کالوس عبارت از یک توده آمورف تشکیل یافته از مجموعه‌ای از سلول‌های پارانشیمی بوده که این سلول‌ها از رشد و نمو و تکثیر سلول‌های بافت اولیه به وجود می‌آیند.

شروع کالوس با استفاده از دانه رست و یا قطعه جدا کشت، صورت می‌گیرد و متعاقباً در محیط کشت، تکثیر و ازدیاد سلولی رخ می‌دهد و کالوس شکل می‌گیرد [۵،٦،۷]

تاکنون مطالعه‌ای جهت مقایسه مواد تولید شده در کشت بافت گیاه بومادران با روغن فرار حاصل از گیاه کامل حاصل از همان بذر استفاده شده در کشت بافت انجام نشده است.

بر این اساس گیاه بومادران با توجه به خواص درمانی مختلف و مهم، تولید اسانس جهت انجام کشت سلولی گیاهی و تولید کالوس و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: گیاه مورد نظر از باغ گیاهان دارویی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع (ارتفاع ۱۳۵۰ متر) در تاریخ ۱۳۸۲/۳/۱۷ تهیه شد و نام علمی گیاه توسط گیاه‌شناس هرباریوم موسسه مورد تایید قرار گرفت.

سرشاخه‌های هوایی گیاه جمع‌آوری شده و بعد از پاک کردن، در شرایط سایه و هوای آزاد خشک شد.

بذر گیاه نیز از موسسه جهت ایجاد کشت کالوس تهیه گردید.

تحقیقات انجام شده روی نمونه گیاهی:

۱ - اسانس‌گیری از نمونه گیاهی: اسانس‌گیری از سرشاخه‌های هوایی گیاه بومادران طبق روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر انجام شد.

بعد از گذشت ۳ ساعت، اسانس گیاه جمع‌آوری، توسط هگزان نرمال استخراج و تعیین مقدار گردید. سپس توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و نمونه جهت تزریق به دستگاه GC/MS و بررسی اجزای موجود در ظرف کوچک شیشه‌ای در بسته و تیره در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بازدهی روغن فرار ۰/٤۵ درصد حجمی - وزنی سرشاخه‌های هوایی خشک گیاه بود.

[1] *Achillea millefolium* L.

[2] *in vitro*

کشت بافت گیاهی:

در تحقیق انجام شده، از بذرهای گیاه *Achillea millefolium* L. برای انجام کشت سلول گیاهی و ایجاد کالوس استفاده گردید.

جهت سترون کردن بذرهای گیاه بومادران از ترکیبی از چند ماده استریل کننده استفاده شد. بذرها توسط سه ماده الکل اتیلیک ۸۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و پراکسید هیدروژن ۳ درصد استریل گشتند. بذرها توسط صافی پارچه‌ای به ترتیب به مدت ۸ دقیقه در الکل اتیلیک ۸۰ درصد، ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و ۲ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳ درصد به صورت متوالی قرار گرفتند. سپس توسط آب مقطر دوبار تقطیر شده استریل چندین بار شستشو داده شدند.

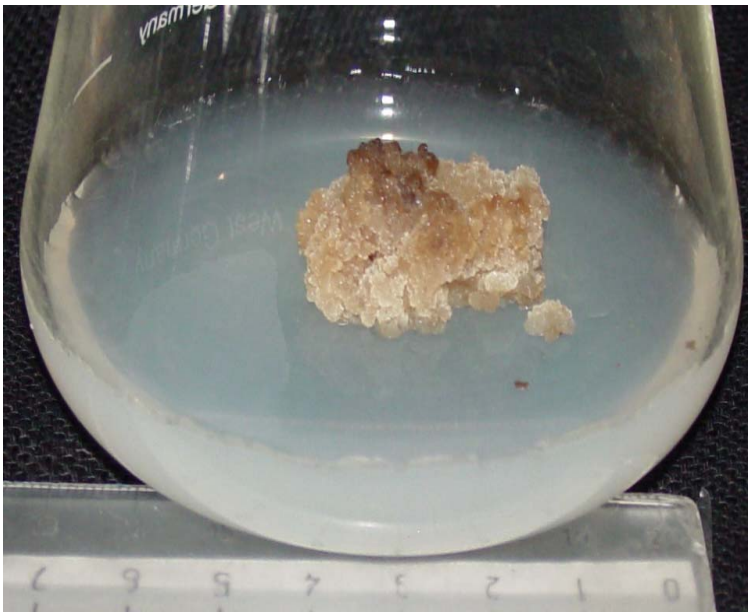
دانه‌ها با رعایت کامل شرایط استریلیتی، در محیط کشت آگار ۰/۸ درصد استریل قرار داده شدند.

بعد از گذشت ۱٤ روز از رشد بذرها در محیط کشت آگار و پدیدار شدن دانه رست‌های اولیه، در زیر کابین لامینارایرفلو و با رعایت کامل نکات استریلیتی قسمت‌های فوقانی دانه رست‌ها جدا شده و به ارلن مایرهای حاوی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) پایه اتوکلاو شده که با وجود میواینوزیتول (۱۰۰ mg/l)، کینتین (۰/۲ mg/l)، IAA (۱mg/l)، 2,4-D (۳mg/l) و شیر نارگیل (۱۵ V/V درصد) تقویت شده و در حضور آگار (۰/۸ درصد) جامد و pH آن روی ۵/۷ تنظیم شده است، انتقال داده شدند و در گرمخانه در دمای ۲۷ – ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

پس از تولید کالوس از دانه‌رست، جهت ادامه حیات کالوس باید آن را واکشت نمود و وارد محیط کشت تازه‌ای کرد.

مراحل واکشت زیر کابین لامینارایرفلو و تحت شرایط کاملاً سترون انجام شد. سلول‌های تولید شده روی محیط کشت در فواصل ٤٥–٤٠ روزه به محیط کشت مشابه جدید انتقال داده شدند تا کالوس مطلوب با رشد و شادابی مناسب حاصل آید.

جهت جداسازی ترکیبات فرار احتمالی ساخته شده به وسیله کالوس، مقدار ۱۰ گرم از کالوس تازه به وسیله ۱۰ میلی‌لیتر دی کلرومتان عصاره گیری شده و بعد از تغلیظ، مقدار ۱۰۰ µl از این عصاره جهت تزریق به دستگاه GC و GC/MS نگهداری شد.



شکل شماره ۱ – کالوس حاصل از گیاه *Achillea millefolium* L.

مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف

دستگاه کروماتوگرافی گازی از نوع Hewlet Packard 6890N با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود.

برنامه حرارتی: دمای ابتدایی آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انتهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی آون ۳ درجه ساتی‌گراد در هر دقیقه افزایش دما تا ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه.

دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه ساتنی‌گراد، گاز حامل: هلیوم

سرعت جریان گاز: ۱/۲ میلی‌لیتر در دقیقه

مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی و برنامه دمایی آن:

دستگاه کروماتوگرافی گازی از نوع Hewlet Packard 6890N با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود.

برنامه حرارتی: دمای ابتدایی آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انتهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی آون ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه.

دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل: هلیوم

سرعت جریان گاز: ۱/۲ میلی‌لیتر در دقیقه

طیف نگار جرمی مدل Hewlet Packard 5973N

ولتاژ یونیزاسیون: ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون: EI.

دمای منبع یونیزاسیون: ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد.

نتایج و بحث:

با توجه به مطالعه طیف‌های جرمی حاصل از GC/MS و اعداد کواتس محاسبه شده و مقایسه این مشخصات با ترکیبات استاندارد و مراجعه به منابع مختلف، ۲۰ ترکیب در اسانس بومادران شناسایی شد که مجموعاً ۸٤/۷٦ درصد اسانس را تشکیل می‌دهند.

اسانس فوق دارای ۳٦/۹۰ درصد ترکیب مونوترپنی و ٤۷/٦۰ درصد ترکیب سزکویی‌ترپنی و ۰/۲٦ درصد ترکیب فنیل پروپانوییدی می‌باشد.

کلیه ترکیبات شناسایی شده به همراه شاخص بازداری کواتس و درصد کمی هر ترکیب به ترتیب زمان خروج از ستون در جدول شماره ۱ دیده می‌شود.

جدول شماره ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس گیاه *Achillea millefolium* L.

ردیف	ترکیبات	ضریب بازداری	درصد
۱	آلفا ـ پینن	۹۳۸	۱۳/٦٦
۲	بتا ـ پینن	۱۰۰۲	۱۲/۰٦
۳	گاما ـ ترپینن	۱۰۹٤	۱/۷٦
٤	ترپینولن	۱۱۰۲	۰/۸۵
۵	کامفر	۱۱٦٦	٤/۸۲
٦	بورنئول	۱۲۳۵	Trace
۷	۱ – آلفا ـ ترپینئول	۱۲۸۳	۰/۷۱
۸	ترانس ـ کاروئول	۱۲۹٦	۱/۲۲
۹	سیس ـ کاروئول	۱۳۰۲	۰/۲۹
۱۰	بورنیل استات	۱۳۲٤	۱/۳۱
۱۱	کارواکرول	۱۳۳۰	۰/۲۲
۱۲	اوژنول	۱۳۷۸	۰/۲٦
۱۳	آرمادندرن	۱٤۳۰	۵/٤۲
۱٤	آلفا ـ جورجونن	۱٤۸۱	۸/۳٦
۱۵	گاما ـ کادینن	۱۵۰۲	۱/۲۰
۱٦	دلتا ـ کادینن	۱۵۱٤	٤/٤۳
۱۷	کاریوفیلن اکساید	۱۵۸۰	۸/۵۱
۱۸	اپلوپنن	۱۵۹۸	۵/۲۵
۱۹	والنسن	۱٦۸۱	۸/۳۱
۲۰	کامازولن	۱۸۰٦	٦/۱۲

جدول شماره ۲ – درصد و میزان دسته ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه بومادران

ترکیبات	درصد ترکیبات
مونوترپن هیدروکربنی	۲۸/۳۳
مونوترپن اکسیژنه	۸/۵۷
مجموع مونوترپن‌ها	۳۶/۹۰
سزکویی‌ترپن هیدروکربنی	۲۵/۵۳
سزکویی‌ترپن اکسیژنه	۲۲/۰۷
مجموع سزکویی‌ترپن‌ها	٤۷/٦۰
مجموع ترکیبات هیدروکربنی	٦۲/۱۷
مجوع ترکیبات اکسیژنه	۲۳/۹۰
مجموع ترکیبات فنیل پروپانوییدی	۰/۲٦
میزان ترکیبات شناسایی شده	۸٤/۷٦

در مطالعات قبلی انجام شده در زمینه بررسی اسانس گیاه بومادران تعدادی از ترکیبات با ترکیبات شناسایی شده در تحقیق ما مشترک بودند. که البته بسته به شرایط اقلیمی رویشگاه گیاه و زمان برداشت آن درصد این مواد کمی تفاوت می‌کند [۸،۹]

در زمینه کشت سلولی گیاه بومادران و تولید کالوس آن نیز، تحقیقات انجام شده تاکنون نشان داده است که سلول‌های کالوس نمی‌توانند مقادیر قابل اندازه‌گیری از ترکیبات فرار ترپنوییدی که در گیاه کامل به مقدار زیاد دیده می‌شود را تولید کنند. اما گزارش‌هایی در زمینه تولید ترکیبات فرار ترپنوییدی در کشت سوسپانسیونی گیاه وجود دارد [۱۰].

در تحقیق انجام شده هم مشخص شد که سلول‌های کالوس نتوانسته‌اند اسانسی تولید کنند اما در بررسی‌های مقدماتی انجام شده روی عصاره کالوس مشخص گردید که سلول‌ها تولید تانن کرده‌اند. که با توجه به امکان تولید تانن در سلول‌های اولیه و تمایز نیافته، قابل توجیه خواهد بود.

منابع

۱. قهرمان احمد. *فلور رنگی ایران*. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ۱۳٦۵. جلد هشتم، شماره ۸۸٦.

۲. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. *فارماکوپه گیاهی ایران*. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. ۱۳۸۱. صفحات ۱٦۸ – ۱٦۱.

۳. آخوندزاده شاهین. *دایره‌المعارف گیاهان دارویی ایران*. ارجمند. ۱۳۷۹. جلد اول، صفحه ۲۲.

4. Evans W.C. *Trease and Evans pharmacognosy*. 15th ed. W.B. Saunders; 2002. p 283.

۵. افشاری‌پور سلیمان. *مبانی کشت بافت گیاهی*. معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۷۲. صفحات ۱۱۰ – ۱ و ۱۸۲ – ۱۷۷.

٦. تاجی اکرم، ادی. داد ویلیام، ار. ویلیامز ریچارد. *عملیات کشت بافت‌های گیاهی*. ترجمه سعید رضا وصال، عبدالرضا باقری. چاپ اول. دانشگاه امام رضا (ع). ۱۳۸۲.

7. Samuelsson G. Drugs of natural origin (A text book of pharmacognosy). 4 th ed. Apotekarsocieteten. 1999, pp: 67-75.

8. Afsharypour S; Asgary. S; Lockwood G.B. Essential oil constituents of the Iranian Yarrow Growing wild in North-East of Tehran. *Daru*. 1996; 5: 25-33.

9. Shawl A S. Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. growing wild in Kashmir, India. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002; 17: 165-168.

10. Figueiredo AC. Composition of the essential oil

from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1995; 40: 113 - 118.